HAL
open science

Le rôle des protéines à ancre GPI chez Candida albicans dans les interactions hote/pathogène

Armêl Plaine

To cite this version:

Armêl Plaine. Le rôle des protéines à ancre GPI chez Candida albicans dans les interactions hote/pathogène. Biologie cellulaire. Institut national agronomique paris-grignon - INA P-G, 2006. Français. NNT : . tel-00131148

HAL Id: tel-00131148

https://theses.hal.science/tel-00131148

Submitted on 15 Feb 2007

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

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

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS GRIGNON

Soutenance publique le 18 décembre 2006

Armêl PLAINE

LE ROLE DES PROTEINES A ANCRE GPI CHEZ *CANDIDA ALBICANS* DANS LES INTERACTIONS HOTE/PATHOGENE.

Jury :

Dr. Michel CHIGNARD,	président
Dr. Christophe d'ENFERT,	rapporteur
Prof. Claude GAILLARDIN,	directeur de thèse
Dr. Mathias LAVIE-RICHARD,	examinateur
Prof. Daniel POULAIN,	rapporteur
Dr. Pierre THURIAUX,	examinateur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier J.M. Beckerich et J. Deutscher de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et C. Gaillardin pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse sous sa direction.

Mes remerciements vont conjointement à C. Gaillardin et M. Lavie-Richard pour avoir encadré ce travail de thèse avec enthousiasme. Merci pour vos compétences et vos conseils dont j'ai bénéficié durant ces trois années.

Je tiens à exprimer mes remerciements à C. d'Enfert et D. Poulain pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs ainsi qu'à M. Chignard et P. Thuriaux d'en être les examinateurs.

Je voudrais remercier D. Poulain et tous les membres de son équipe pour leur accueil chaleureux et le partage de leurs connaissances lors de mon séjour dans leur laboratoire.

J'adresse également mes remerciements à toute l'équipe de M.L. Gil et D. Gozalbo qui ont rendu mon séjour en Espagne très agréable et très enrichissant d'un point de vue scientifique mais aussi culturel.

Un grand merci à toutes les personnes présentes au laboratoire pendant ces années de thèse et grâce auxquelles ce travail s'est déroulé dans une ambiance chaleureuse. Je pense notamment aux Kfètiens, fumeurs et habitués de la cantine. Merci à vous aussi pour vos conseils et votre aide de toutes sortes (problèmes de lig ou de couleur de slides). Spéciale dédicace à Greg pour son aide technique.

Merci à tous mes compagnons de navette-train qui ont permis de rendre ces trajets moins pénibles et même agréables.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont soutenue durant ces trois années ……forfait soirs et WE illimité (le Bréguet, la Colok place des fêtes, les Ex D'dorfer, mes frères, les Ligériens, les sportives et Kim Ki-duK).

Merci à Joachim Ernst de m'avoir présenté *C. albicans* et surtout pour m'avoir encouragée à continuer en thèse ; je ne l'ai pas regretté !

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout cœur mes parents.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS **8**

PROTEINES LES PLUS COURAMMENT CITEES DANS CE TRAVAIL **9**

INTRODUCTION **10**

I. Présentation générale de *Candida albicans* 11

I.1 Le genre *Candida* et *C. albicans* 11

I.1.1 La taxonomie des différentes espèces de *Candida* 11

I.1.2 Une levure à cycle parasexué 12

I.1.3 Les caractéristiques morphologiques de *C. albicans* 13

I.1.4 La transition « white/opaque » 14

I.1.5 Les différentes morphologies de *C. albicans*, un facteur de virulence ? 15

I.2 Les infections dues à *C. albicans* 16

I.2.1 Les infections superficielles 16

I.2.2 Les infections profondes 17

I.3 *C. albicans* : un modèle d'étude 18

I.3.1 Le séquençage du génome et ses avancées 18

I.3.2 Les stratégies d'invalidation de gènes chez *C. albicans* 19

I.3.3 Les promoteurs régulables et les gènes rapporteurs chez *C. albicans* 22

II. Interface hôte-pathogène : La paroi 24

II.1 L'organisation architecturale de la paroi 24

II.2 La composition de la paroi 26

II.2.1 La chitine 26

II.2.2 Le réseau des β(1-3) glucanes 27

II.2.3 Les β1-6 glucanes 27

II.2.4 Les glycolipides 28

II.2.5 Les protéines pariétales 28

II.3 Les protéines à ancre GPI chez *C. albicans* 32

II.3.1 La biosynthèse des GpiP 32

II.3.2 Les caractéristiques communes aux GpiP 36

II.3.3 Le rôle des GpiP 37

III. Les défenses de l'hôte face à *C. albicans* 38

III.1 Les acteurs de la réponse innée face à *C. albicans* 38

III.1.1 Les barrières naturelles 38
III.1.2 Les cellules immunitaires non phagocytaires 39
III.1.3 Les cellules phagocytaires 39
III.2 Les senseurs de l'immunité innée : les PRR 42
III.2.1 Les lectines, des PRR endo-phagocytaires.....42
III.2.2 Les TLR des PRR de signalisation 44
III.3 Le rôle instructif des cytokines dans l'induction de la réponse adaptative 46
III.3.1 Les CD : à l'interface hôte/pathogène.....46
III.3.2 La réponse Th1 et Th2 47
III.3.3 La réponse adaptative : un équilibre subtil entre Th1, Th2 et Treg 48
III.3.4 Le rôle du dimorphisme de *C. albicans* dans la réponse adaptative 48

PROJET DE THESE 50

MATERIEL ET METHODES.....51
I. Matériel.....51
I.1 Matériel biologique.....51
I.1.1 Souches des différents microorganismes utilisés.....51
I.1.2 Les cellules de mammifères.....52
I.1.3 Les souris.....53
I.2 Les plasmides.....53
I.3 Produits et enzymes 53
I.4 Milieux de culture.....54
II. Méthodes 56
II.1 Techniques de préparation et d'analyse des acides nucléiques 56
II.1.1 Préparation d'ADN plasmidique d'*E. coli* 56
II.1.2 Préparation d'ADN génomique de *C. albicans*.....56
II.1.3 Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....57
II.1.4 Ligation de fragments d'ADN.....57
II.1.5 Transposition *in vitro* 57
II.1.6 Méthode du Southern Blot 58
II.2 Techniques de transformation 58
II.2.1 Transformation de la bactérie *E. coli* 58
II.2.2 Transformation de la levure *C. albicans* 58
II.3 Tests phénotypiques 59
II.3.1 Tests en gouttes 59
II.3.2 Tests antifongiques en microplaque 60

II.4 Techniques permettant l'étude de la réponse des cellules hôtes.....61
II.4.1 Tests de survie des levures après phagocytose.....61
II.4.2 Production *in vitro* de cytokines TNFα.....62
II.4.3 Test de recrutement des neutrophiles murins.....64
II.4.4 Infection de souris par *C. albicans* par injection en intraveineux.....64
II.4.5 Analyses statistiques.....64

RÉSULTATS.....66
I. Analyse *in silico* des GpiP chez *C. albicans*.....66
II. Analyse fonctionnelle des GpiP chez *C. albicans*.....84
II.1 Création de la banque de mutants UAU1.....84
II.1.1 Choix des gènes à interrompre et méthode utilisée pour y parvenir.....84
II.1.2 Construction des cassettes de disruption.....85
II.1.3 Disruption systématique des gènes codant des GpiP par la méthode UAU1.....88
II.1.4 Criblage des mutants par PCR sur colonies.....90
II.1.5 Vérification par Southern du génotype des mutants sortant de cette étude.....91
II.1.6 Banque de 47 mutants GPI.....96
II.2 Etude phénotypique des mutants GpiP.....97
II.2.1 Catégorisation des mutants en fonction de leur phénotype.....97
II.2.2 Nouveaux gènes identifiés par le crible.....99
II.2.3 Article de recherche : « Functional analysis of GPI proteins in *C. albicans* ».....110
II.3 Crible interaction hôte pathogène.....125
II.3.1 Crible de la banque pour une plus grande sensibilité à la phagocytose.....125
III. Analyse de la réponse innée induite par le mutant *gpi7*-/-.....128
III.1 Susceptibilité des souris à des candidoses disséminées induite par le mutant *gpi7*-/-.....128
III.2 Production de cytokines TNFα par les macrophages après stimulation par *gpi7*-/-.....129
III.2.1 Le rôle de Gpi7p dans la production de TNFα par les macrophages.....129
III.2.2 Le rôle de TLR2 et TLR4 dans la production de TNFα induit par *gpi7*-/-.....133
III.3 Recrutement de neutrophiles dans la cavité péritonéale en réponse à *gpi7*-/-.....135
III.3.1 Le rôle de Gpi7p dans le recrutement de neutrophiles.....135
III.3.2 Le rôle de TLR2 et TLR4 dans le recrutement de neutrophiles induit par *gpi7*-/-.....136
III.4 L'activité candicide du sang sur *gpi7*-/-.....137

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....139
Les techniques utilisées.....139
Les résultats.....143

BIBLIOGRAPHIE.....149

ANNEXES **173**

Annexe 1: Liste des ORF identifiés par de Groot comme codant putativement des protéines à ancre GPI. 173

Annexe 2 : Voies de régulation de la biosynthèse de la paroi impliquées chez *S. cerevisiae* dans la tolérance à la caspofungine. 176

Annexe 3 : Taxonomie du règne des champignons d'après James *et al*., (James *et al.*, 2006) 177

ABSTRACT **178**

RESUME **179**

ABREVIATIONS

Amp ..... ampicilline
APC ..... **A**ntigen-**P**resenting **C**ell
ASL ..... **A**lkalin **S**ensitive **L**inkage
CD ..... cellule dendritique
CR3..... **C**omplement **R**eceptor 3
CWP ..... **C**ell **W**all **P**rotein
DAG ..... diacylglycérol
DC-SIGN..... **D**endritic **C**ell-**S**pecific **I**CAM **G**rabbing **N**onintegrin
DMEM ..... **D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium
DO ..... **D**ensité **O**ptique
EDTA ..... **E**thylène **D**iamine **T**racyclique **A**cide
EtN-P ..... phosphoéthanolamine
Gal3 ..... galectine 3
GM-CSF ..... **G**ranulocyte-**M**acrophage **C**olony-**S**timulatinf **F**actor
GPI ..... **G**lycosyl**P**hosphatidyl**I**nosytol
GpiP..... Protéine à ancre GPI
GlcN-PI ..... glucosamine-PI
GRACE™..... **G**ene **R**eplacement and **C**onditional **E**xpression
IDO..... enzyme 2,3-dioxygénase
IFNγ..... Interféron γ
IL ..... Interleukine
i.p..... injection par voie intra péritonéale
i.v..... injection par voie intraveineuse
Kan ..... kanamycine
LB..... **L**uria-**B**ertani
LPS ..... **L**ipo**p**oly**s**accharides
MIP-2 ..... **M**acrophages **I**nhibitory **P**rotein
MTL ..... **M**ating-**T**ype **L**ike
MR..... **M**annose **R**eceptors
NAG ..... N-acétylglucosamine
NF-kB..... nuclear factor K B
PAMP ..... **P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**attern IL interleukin
PGA..... **P**utative **G**PI **A**nchored protein
pb..... paire de bases
PBS..... **P**hosphate **B**uffered **S**aline
Pir ..... **P**rotein with **i**nternal **r**epeats
PLM..... **P**hospho**L**ipo**M**annane
PI ..... phosphoinositol
PPM..... **P**hospho**P**eptido **M**annane
PRR ..... **P**attern **R**ecognition **R**eceptors
ORF ..... **O**pen **R**eading **F**rame
RE..... **R**éticulum **E**ndoplamique
RPMI ..... **R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute
ROI ..... **R**eactive **O**xygen **I**ntermadiate
TGF-β..... **T**ransforming **G**rowth **F**actor
TLR ..... **T**oll-**L**ike **R**eceptors
TNFα..... **T**umor **N**ecrosis **F**actor
Treg ..... cellules régulatrice

PROTEINES LES PLUS COURAMMENT CITEES DANS CE TRAVAIL

Nom des protéines	**Leur fonction chez *C. albicans* :**	**Prédite comme GpiP**
Als1-7p et Als9p	Agglutinin-Like Sequence	oui
Chs1-3p et Chs7-8p	CHitin Synthesis	non
Csa1p	Candida Surface Antigen	oui
Fks1p/Gsc1p	β(1-3) Glucan Synthase Catalytic unit	non
Gpi7p	Enzyme de la voie de biosynthèse de l'ancre GPI, impliquée dans l'incorporation des GpiP à la paroi	non
Hwp1p	Hyphal Wall Protein, impliquée dans l'adhérence aux cellules épithéliales	oui
Mid1p	un canal membranaire perméable au Ca2+ putatif	oui
Phr1p et Phr2p	pH Responsive, β(1-3) glucosyl transférase pH dépendante	oui
Rbt1p et Rbt5p	Repressed By TUP1, fonction inconnue	oui
Sap9 et Sap10	Secreted Aspartyl Proteinase	oui
Sod4-6p	Superoxide Dismutase	oui
Ssr1p	Secretory Stress Response protein 1, protéine pariétale impliquée dans l'intégrité de la paroi	oui

INTRODUCTION

Les infections causées par les espèces *Candida* ont considérablement augmenté durant les deux dernières décennies ; ce phénomène est en partie attribué à la population grandissante de patients immunodéprimés en milieu hospitalier. Aux Etats-Unis, des études montrent que ces candidoses seraient responsables de la mort de 10 000 patients chaque année. Le coût annuel des soins occasionnés par ces infections est quant à lui estimé supérieur à un milliard de dollars (Edmond *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2001). Parallèlement, les outils génétiques et moléculaires permettant l'étude de *Candida albicans*, l'espèce la plus virulente de *Candida*, se sont nettement développés. Nos connaissances sur cette levure se sont accrues et il semble que la paroi, située à l'interface entre le pathogène et les cellules hôtes, soit impliquée dans les différentes étapes d'initiation et de développement de l'infection. Dans cette introduction bibliographique nous exposerons les principaux aspects de la biologie de *C. albicans*, ainsi que ceux liés à ce travail de thèse à travers :

– une présentation générale de *C. albicans* ;

– la structure et le rôle de la paroi en mettant l'accent sur les protéines pariétales ;

– les principaux aspects de la défense de l'hôte face à *C. albicans*.

I. PRESENTATION GENERALE DE *CANDIDA ALBICANS*

I.1 Le genre *Candida* et *C. albicans*

I.1.1 La taxonomie des différentes espèces de Candida

Les *Candida* sont des champignons (ce règne est présenté en Annexe 3) eucaryotes unicellulaires. Elles font partie du phylum des Ascomycota, de l'ordre des Saccharomycetales (les levures bourgeonnantes) et de la famille des Saccharomycétales mitosporiques. Le genre *Candida* n'est pas phylogénétiquement homogène (cf. Figure 1), et comprend aujourd'hui plus de 200 espèces.

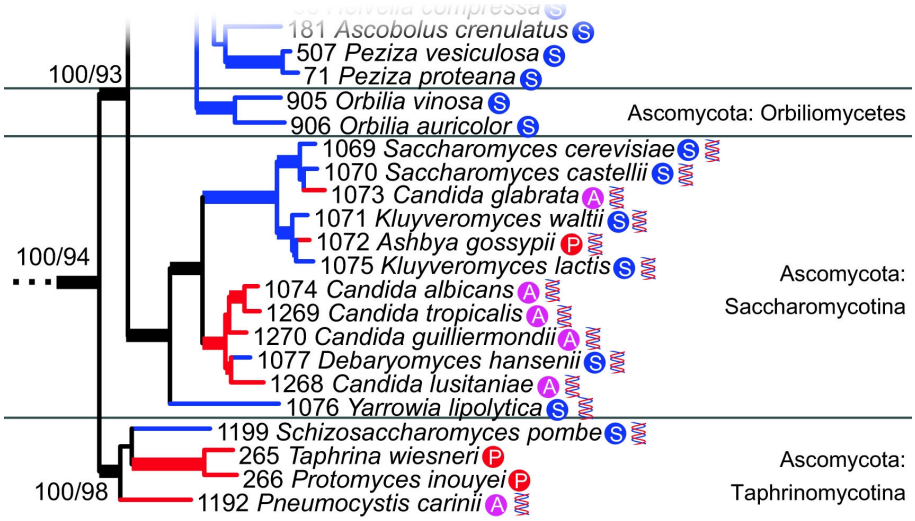


Figure 1 : Position du genre *Candida* dans le sous phylum des *Saccharomycotina* (James *et al.*, 2006). *C. albicans* est plus proche de *Debaryomyces hansenii* que de *C. glabrata* qui est plus proche de *S. cerevisiae*. Les pathogènes des animaux (A), des plantes (P) et les saprophytes (S) sont précisés ; les génomes séquencés sont indiqués par un double brin d'ADN.

Parmi elles, les principales espèces identifiées comme pathogène opportuniste de l'homme sont *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*. *C. albicans* est l'espèce la plus fréquemment incriminée (> 50 %) lors de candidoses (Morgan, 2005). Cependant, depuis une dizaine d'années d'autres espèces pathogène non-*albicans* tendent à émerger telles que *C. parapsilosis, C. krusei* et *C. glabrata ;* le développement de ces deux dernières espèces est principalement favorisé par l'utilisation de prophylactiques antifongiques, principalement le fluconazole (Malani *et al.*, 2001). En effet, *C. krusei* est intrinsèquement résistante au fluconazole tandis que *C. glabrata* est résistante aux doses habituellement administrées au patient mais reste sensible à des doses plus élevées.

I.1.2 Une levure à cycle parasexué

Contrairement à la plupart des levures, *C. albicans* est un organisme diploïde pour lequel aucune phase haploïde n'a été observée. La découverte en 1999 de l'existence d'un locus *MTL* (**M**ating-**T**ype **L**ike) chez *C. albicans*, par homologie à certains gènes des loci sexuels *MATa* et *MATα* de *S. cerevisiae*, a remis en question le mode de reproduction de cette levure qui avait toujours été décrite comme asexuée jusqu'alors (Hull and Johnson, 1999). Le génome de *C. albicans* semble contenir les gènes nécessaires à la reproduction sexuée des champignons, cependant le locus *MTL* de *C. albicans* est beaucoup plus complexe que celui de *S. cerevisiae* (cf. Figure 2-a).

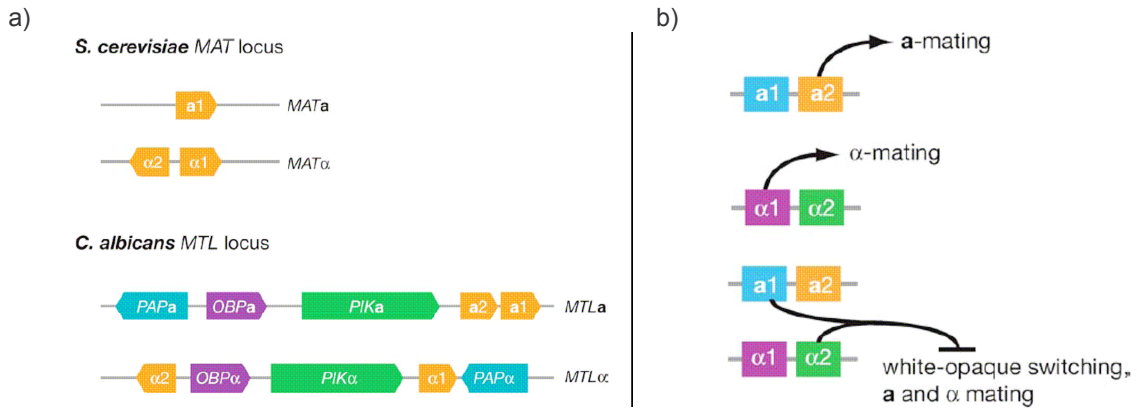


Figure 2 : Les loci *MTL* de *C. albicans* (9 kb) a) comparés aux loci *MAT* de *S. cerevisiae* (0,7 kb) et b) les circuits transciptionnels de leur régulation. Issu de Bennet et Johnson (Bennett and Johnson, 2005).

Chez *C. albicans*, la souche de laboratoire standard hétérozygote (a/α, cf. Figure 2-b), SC5314, est incapable de conjuguer et se multiplie par bourgeonnement. Seules des souches homozygotes a/a et α/α, manipulées ou isolées à partir de patients, peuvent conjuguer (Hull *et al.*, 2000; Lockhart *et al.*, 2003; Magee and Magee, 2000). Pourtant, à l'heure actuelle aucun des tétraploïdes ainsi formés n'est capable d'entrer en méiose. Le retour des souches tétraploïdes à l'état diploïde est réalisé au cours de la mitose par perte chromosomique, *C. albicans* est donc considérée comme une levure à cycle parasexué. Comme chez *S. cerevisiae*, la conjugaison est liée à la production de phéromones qui semblent, chez *C. albicans*, exclusivement produites par les cellules α (Bennett *et al.*, 2003). Cette production de phéromones induit l'expression de gènes codant des protéines de surface à ancre GPI telles que Hwp1p, Sap9p, Sap10p, Rbt1p et Rbt4p. La plupart de ces protéines sont connues pour

leur implication dans la virulence de *C. albicans* (voir Revue, partie I des résultats) (Braun *et al.*, 2000; Felk *et al.*, 2002).

I.1.3 Les caractéristiques morphologiques de C. albicans

Une caractéristique frappante de *C. albicans* est sa capacité à croître sous des formes morphologiques variées (cf. Figure 3). Celles-ci s'étendent de (i) la blastospore unicellulaire globuleuse ovoïde de 3 à 10 µm de diamètre, (ii) à l'hyphe qui correspond à un allongement apical d'un tube germinatif avec formation de septa après chaque division cellulaire, en passant par (iii) le pseudo-hyphe qui résulte de l'accroissement polaire du bourgeon fille avec formation d'une constriction (cf. Figure 3). De nombreuses conditions environnementales caractérisées et d'autres encore mal comprises (le phagolysosomes des macrophages, les reins de souris, la croissance à l'intérieur de l'agar), induisent la formation d'hyphes. Sur un milieu pauvre en micro-aérobie, on observe la formation de cellules de grande taille (10-12 µm) à paroi très épaisse à l'extrémité de certaines hyphes ou pseudo-hyphes appelées chlamydospores. Cette caractéristique est partagée avec l'espèce *C. dubliniensis*, et quelques cas ont été observés chez *C. tropicalis*.

Des études montrent que la forme hyphe participerait à la pénétration du pathogène dans les tissus et son échappement face aux défenses immunitaires de l'hôte (cf. paragraphe III.3.4), tandis que la forme blastospore serait plus adaptée à la dissémination du microorganisme dans le système sanguin. Ces deux formes sont nécessaires à la virulence de *C. albicans* (Kumamoto and Vinces, 2005; Saville *et al.*, 2003). Le rôle des chlamydospores reste quant à lui inconnu à l'heure actuelle mais semble peu important dans la virulence de *C. albicans*.

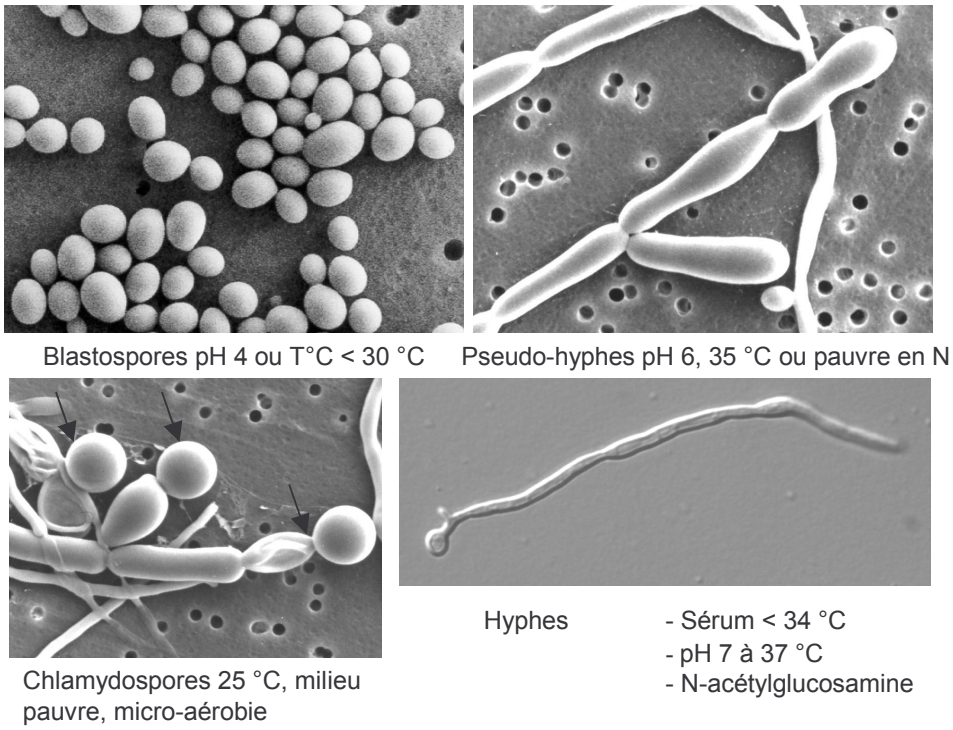


Figure 3 : Différentes morphologies de *C. albicans* en fonction de son environnement. Photos présentées avec l'autorisation de l'auteur C. Munro (Aberdeen University, Ecosse). Les flèches indiquent les chlamydospores.

I.1.4 La transition « white/opaque »

C. albicans présente également d'autres variations phénotypiques alternatives qui correspondent à un changement morphologique et physiologique des cellules. Ces transitions phénotypiques sont réversibles, mais cependant stables pour de nombreuses divisions cellulaires (Soll *et al.*, 1993). La variation la plus étudiée est la transition « white-opaque » (Slutsky *et al.*, 1987) : certaines souches sont capables de varier de la forme « white », cellules rondes formant des colonies blanches, à la forme « opaque » correspondant à des cellules plus allongées à paroi rugueuse formant des colonies plus foncées (cf. Figure 4).

En plus de leurs caractéristiques morphologiques, les cellules « white » et « opaques » diffèrent également par l'expression de leurs gènes. Certains auteurs notent une différence significative du niveau d'expression d'environ 7 % des gènes du génome entre les cellules « opaques » et « white » (Lan *et al.*, 2002; Tsong *et al.*, 2003). Ces gènes sont impliqués dans des fonctions allant de la conjugaison, de l'adhésion, de la réponse au stress, de la résistance aux antifongiques jusqu'à l'invasion des tissus. Ces fonctions sont considérées pour la plupart comme des facteurs de virulence. La transition « white-opaque » et le croisement (cf. Figure 4) sont facilités à basse température, suggérant que, dans la nature, les souches se croisent

hors de l'organisme, sur la peau par exemple. La conjugaison permettrait d'augmenter la diversité génétique et pourrait contribuer à l'adaptation de *C. albicans* dans un nouvel environnement. Les cellules white seraient plus adaptées au système sanguin (Kvaal *et al.*, 1999; Kvaal *et al.*, 1997; Lachke *et al.*, 2003).

Bien que de nouveaux régulateurs de la transition « white-opaque » aient été récemment identifiés (Huang *et al.*, 2006; Srikantha *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2006), le facteur de transcription le mieux connu jusqu'à présent est l'hétérodimère *MTL*a1/α2 qui réprime la transition « white-opaque » (Miller and Johnson, 2002). En effet, la régulation de cette transition par le *MTL* permet aux cellules « white » a ou α d'effectuer une transition vers la forme « opaque ». Après passage à l'état tétraploïde, l'hétérodimère a1/α2 induit la réversion de l'état opaque à l'état white. La conjugaison de *C. albicans* est presque exclusivement observée chez ces cellules opaques (facteur 10^6 par rapport aux cellules white) (Miller and Johnson, 2002).

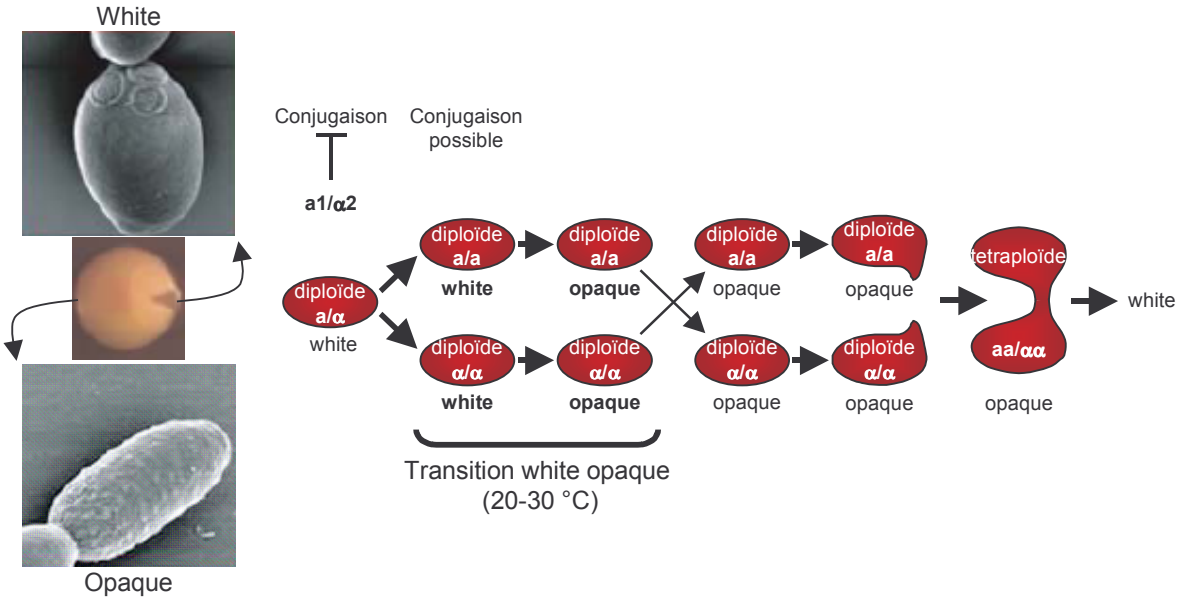


Figure 4 : La transition de la forme « white » à la forme « opaque » chez *C. albicans* avant la conjugaison.

Photos issues de Bennett et Johnson (Bennett and Johnson, 2005), le schéma est adapté de Soll *et al.*, (Soll *et al.*, 2003).

I.1.5 Les différentes morphologies de C. albicans, un facteur de virulence ?

Il semble que les différentes morphologies, présentées ci-dessus, permettent à *C. albicans* de s'adapter rapidement aux changements d'environnement tels que les variations de pH ou de température et la présence ou l'absence de sérum, ce qui lui permet de coloniser, pénétrer et de se disséminer dans l'hôte (Laprade *et al.*, 2002; Lockhart *et al.*, 2005). Le lien entre la

morphogenèse et la virulence reste un débat ouvert au sein de la communauté scientifique (Gow *et al.*, 2002; Rooney and Klein, 2002). En définissant comme facteur de virulence tout attribut dont l'absence chez le pathogène réduit ou élimine les dommages causés par celui-ci dans un système hôte *in vivo*, alors qu'il n'a que peu (ou pas) d'effet sur le développement *in vitro*, nous pouvons considérer que la capacité de *C. albicans* à changer de formes phénotypiques participe à la virulence du pathogène lors de certaines étapes du processus de l'infection. Cette définition semble la plus appropriée pour un pathogène opportuniste comme *C. albicans* puisqu'elle prend en compte (i) le caractère dynamique des interactions microorganisme/hôte et (ii) le rôle de l'hôte, qui en répondant aux stimuli du pathogène, participe également à la pathogénie de *C. albicans* (Casadevall and Pirofski, 2003; Romani *et al.*, 2003).

Nous venons de voir deux exemples de facteurs de virulence chez *C. albicans* : la morphogenèse et la transition « white-opaque ». D'autres facteurs seront abordés dans l'étude bibliographique relative à la paroi mais ces aspects ne seront pas développés dans cette introduction ; les lecteurs pourront se référer à une revue complète (Calderone, 2002).

I.2 Les infections dues à *C. albicans*

C. albicans est une levure commensale présente principalement dans le tube digestif, la sphère oropharyngée et dans le tractus génito-urinaire chez 50 à 70 % des sujets sains (Ruhnke and Maschmeyer, 2002). *C. albicans* est également un pathogène opportuniste, c'est-à-dire que l'équilibre dynamique entre l'organisme commensal et son hôte peut être rompu et permet la transition de commensalisme à l'état de pathogène et le basculement vers l'infection.

I.2.1 Les infections superficielles

Les infections superficielles causées par *C. albicans* correspondent à des lésions limitées au niveau de la surface de la peau (comme les intertrigos), des ongles (onyxis) ou de la muqueuse buccale (muguet et langues noires) et vaginale. Ces infections s'accompagnent de réactions inflammatoires locales et parfois d'ulcération. La morbidité associée aux candidoses superficielles est très faible mise à part chez les sidéens. Ces infections peuvent être toutefois tenaces et récidivantes, particulièrement dans le cas de candidoses vaginales qui touchent 70 % de la population féminine. Chez les patients en réanimation, elles doivent être considérées

comme le premier signe d'une colonisation qui est un facteur de risque majeur du développement ultérieur d'une infection profonde.

I.2.2 Les infections profondes

Les infections disséminées ou profondes correspondent à l'infection d'un organe avec une invasion tissulaire extensive. Ces infections sont plus rares que les infections superficielles mais beaucoup plus graves, provoquant la mort du patient dans 26 à 46 % des cas (Morgan, 2005). Ces chiffres peuvent être en partie expliqués par le fait que ces infections (i) se déclarent dans la majorité des cas en milieu hospitalier, chez des individus fragilisés atteints de lourdes pathologies tels que les cancéreux, les greffés et les patients en réanimation et (ii) sont difficiles à diagnostiquer car les signes de dissémination ne surviennent habituellement que tardivement en cours d'évolution. Les espèces de *Candida* sont actuellement l'une des causes mondiales majeures d'infections nosocomiales du système sanguin (Gudlaugsson *et al.*, 2003). Elles sont classées au quatrième rang des pathogènes isolés par hémoculture aux Etats-Unis après les staphylocoques à coagulase négative, les staphylocoques dorés et les entérocoques (Trick *et al.*, 2002).

L'origine des contaminations est endogène dans la plupart des cas, mais elle peut être d'origine exogène lors d'utilisation prolongée de cathéters, ou plus exceptionnellement, lors d'épidémie et par manuportage (Figure 5). La colonisation par *C. albicans* peut s'établir sur tous les segments du tube digestif : cavité buccale, œsophage, estomac, intestin grêle, colon, anus. Chez les sujets hospitalisés, la colonisation du pathogène est souvent une première étape vers l'infection. Elle est suivie de la pénétration des tissus par *C. albicans* ; une dissémination hématogène secondaire peut alors survenir à l'occasion d'une baisse, même transitoire, de l'immunité. Le pathogène envahit ensuite les organes dont les principaux viscères cibles sont les reins (pyélonéphrites), les yeux (chorio-rétinite) et le cœur (endocardite). L'initiation et le développement de l'infection sont favorisés par de nombreux facteurs altérant l'intégrité des barrières mécaniques (les muqueuses) ou immunologiques telles que l'administration d'antibiotiques à large spectre, l'intensification du traitement des patients cancéreux, l'absorption d'immunosuppresseurs utilisés lors de chimiothérapies ou de transplantation d'organes, la nutrition parentérale totale, la chirurgie digestive, etc.

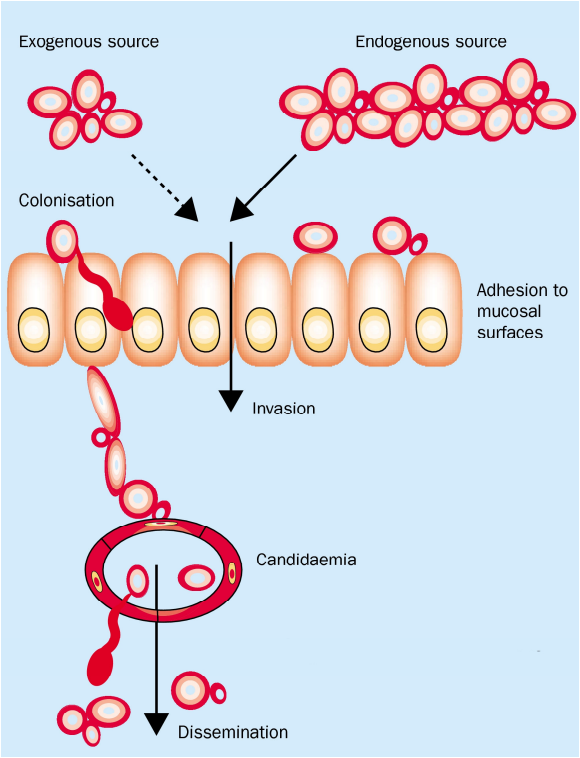


Figure 5 : Les différentes étapes menant à l'infection par *C. albicans* : colonisation, invasion et dissémination de *C. albicans*. Issu de Eggiman (Eggimann *et al.*, 2003).

I.3 *C. albicans* : un modèle d'étude

L'absence d'un cycle sexuel complet chez ce diploïde et la présence d'un code génétique alternatif - le codon CUG qui est traduit par une sérine au lieu d'une leucine - rendent plus difficile l'étude de *C. albicans*. Une part significative de nos connaissances sur la biologie de *C. albicans* était basée sur les études effectuées sur *S. cerevisiae*. Depuis le séquençage du génome, la biologie moléculaire et la génétique de *C. albicans* se sont considérablement développées et ont révolutionné la recherche sur ce pathogène en tenant compte du contexte hôte/pathogène dans lequel évolue ce dernier.

I.3.1 Le séquençage du génome et ses avancées

La séquence diploïde complète du génome de la souche SC5314 de *C. albicans* représente une avancée historique dans la recherche sur ce pathogène et est le fruit de plus de 10 années de travail (Jones *et al.*, 2004). Avant 2004, les résultats d'un séquençage partiel étaient accessibles sur le site de Stanford Genome Technology Center aux Etats-unis où le séquençage a été effectué (http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/). Différentes bases de données d'annotations du génome sont accessibles sur des sites Internet tels que :

http://www.candidagenome.org/ ou http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/. La version 20, disponible depuis octobre 2006, présente une couverture pratiquement complète de chaque chromosome. Le génome haploïde de *C. albicans* est constitué de huit chromosomes appelés R et 1-7. Il avoisine les 16 Mbases regroupant 6 419 cadres ouverts de lecture (ORF > à 100 codons, (Jones *et al.*, 2004)). Il est intéressant de noter que plus de 1000 gènes ont des fonctions inconnues qui ne présentent pas d'orthologues flagrants chez *S. cerevisiae* ni chez *Schizosaccharomyces pombe* ; ces gènes présentent un intérêt majeur dans l'étude de la pathogénie de *C. albicans*. De plus, ce génome présente deux caractéristiques principales : un très grand polymorphisme (1 nucléotide sur 237), et un codon alternatif sérine présent dans deux tiers des ORF (Jones *et al.*, 2004).

Le séquençage de *C. albicans* a permis, via l'utilisation des puces à ADN, l'étude du profil de transcription des gènes à l'échelle du génome, en réponses à différents paramètres de cultures, comme la présence d'antifongiques (Liu *et al.*, 2005), de cellules phagocytaires (Fradin *et al.*, 2005; Lorenz *et al.*, 2004) ou dans des conditions de formation de biofilms (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004). Les résultats de Lorenz ont permis d'identifier de nouveaux facteurs de virulence telles que certaines enzymes du cycle du glyoxylate nécessaires à *C. albicans* une fois phagocytée par les macrophages pour se défendre (Barelle *et al.*, 2006; Lorenz and Fink, 2001; Lorenz *et al.*, 2004).

I.3.2 Les stratégies d'invalidation de gènes chez C. albicans

La technique classique de l'URA-blaster

En 1993, une cassette recyclable URA, appelée « URA-blaster » (cf. Figure 6-a), a été adaptée pour des transformations multiples et séquentielles d'une souche auxotrophe pour uracile de *C. albicans,* CaI4 (Fonzi and Irwin, 1993). Après transformation, les hétérozygotes sont sélectionnés grâce à leur prototrophie pour l'uridine. Ces transformants sont ensuite étalés sur un milieu contenant de l'acide 5-fluoroorotique (5FOA). Cette étape rend possible la sélection des cellules pour lesquelles la recombinaison entre les deux séquences répétées directes HisG, qui flanquent le gène *URA3*, se sera produite et aura permis l'excision de ce marqueur (cf. Figure 6A). Les ségrégants auxotrophes pour l'uridine peuvent alors être retransformés avec la même cassette URA-blaster pour interrompre le second allèle. Cette procédure peut être répétée pour interrompre d'autres gènes ce qui représente un avantage considérable.

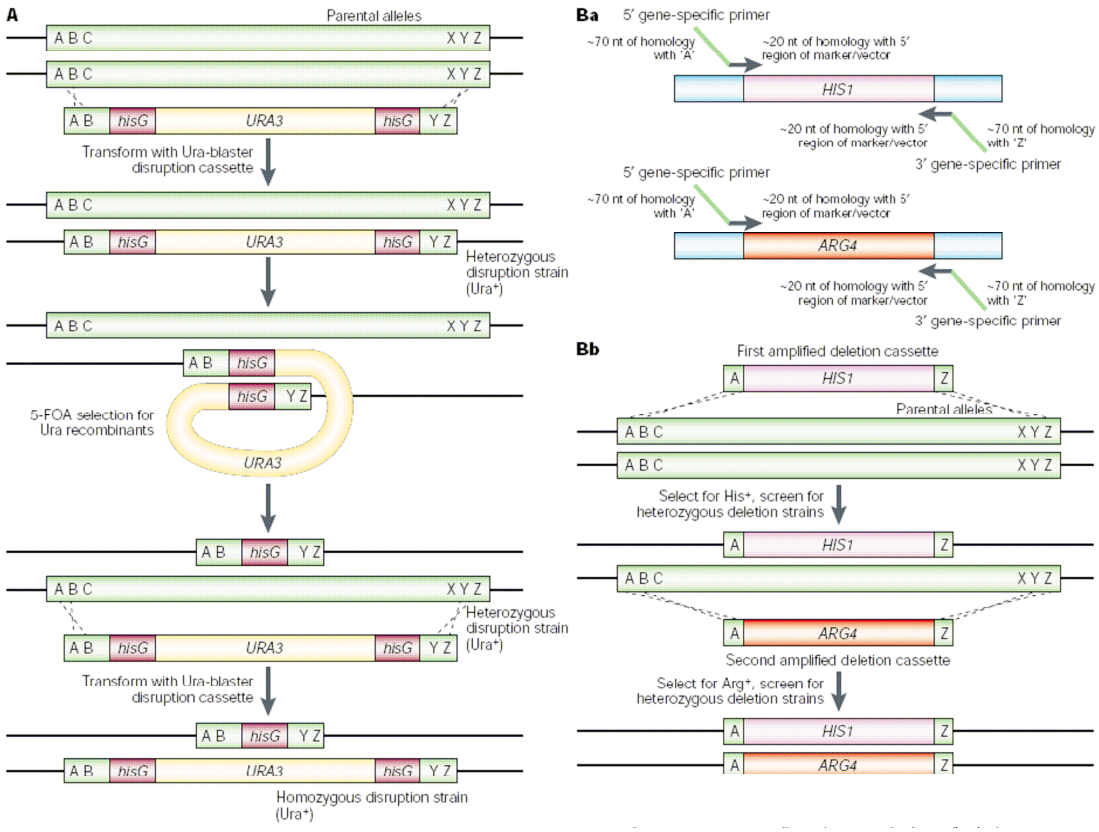


Figure 6 : Les différentes techniques d'invalidation de gènes chez *C. albicans*. A : Méthode le l'URA-Blaster utilisant une cassette recyclable. Ba : Construction des cassettes de délétion par PCR en utilisant des oligos de 100 pb, Bb : Délétion d'un gène cible grâce à deux cassettes portant deux marqueurs de sélection différents (Schéma issu de la revue (Berman and Sudbery, 2002)).

Les autres techniques de disruption chez C. albicans

Depuis les travaux de Fonzi, des méthodes d'interruption-délétion plus rapides se sont développées :

– La construction de la souche BWP17, portant les auxotrophies pour *URA3*, *HIS1* et *ARG4* (Wilson *et al.*, 1999), a permis d'adapter à *C. albicans* la méthode de délétion utilisant des produits de PCR développée pour *S. cerevisiae* (Wach, 1996). Deux cassettes de disruption portant deux marqueurs de sélection différents sont nécessaires. Ces dernières sont construites par PCR grâce à l'utilisation d'amorces de 100 pb constituées d'une séquence d'environ 70 nucléotides pouvant s'apparier au gène d'intérêt ainsi qu'une séquence de 20 nucléotides homologue au marqueur de sélection (cf. Figure 6Ba et Bb). Cette méthode évite donc d'une part une étape de clonage du gène d'intérêt et d'autre part l'étape de recyclage du marqueur.

– Noble et Johnson ont également mis au point une stratégie de fusion par PCR permettant la construction de cassettes de délétion. Ces dernières sont flanquées de deux régions

d'environ 350 pb homologues au gène cible et portant le marqueur de sélection *ARG4*, *HIS1* ou *LEU2* (Noble and Johnson, 2005).

– Enloe et ses collègues ont développé une cassette UAU1 portant potentiellement deux marqueurs de sélection et présentant l'intérêt de ne nécessiter qu'une seule étape de transformation pour interrompre les deux copies d'un gène (Enloe *et al.*, 2000) ; cette stratégie sera détaillée ultérieurement dans la partie résultats (cf. II.1.3).

Des approches alternatives ont également été développées :

– Le laboratoire de Morschhauser a modifié le gène *FLP* de *S. cerevisiae* pour l'adapter au biais de codon de *C. albicans* (Morschhauser *et al.*, 1999). Ce système, appelé flipper, avait été allié, dans un premier temps, au marqueur sélection URA3 (cf. Figure 7) et a récemment été couplé à une cassette portant le marqueur de résistance à la nourseothricine (un antibiotique) pour la sélection des transformants intégratifs (Reuss *et al.*, 2004). L'activation du gène *FLP* permet l'excision d'une cassette flanquée des séquences cibles de FLP (*FRT*) ; la disruption peut être répétée pour le second allèle (cf. Figure 7).

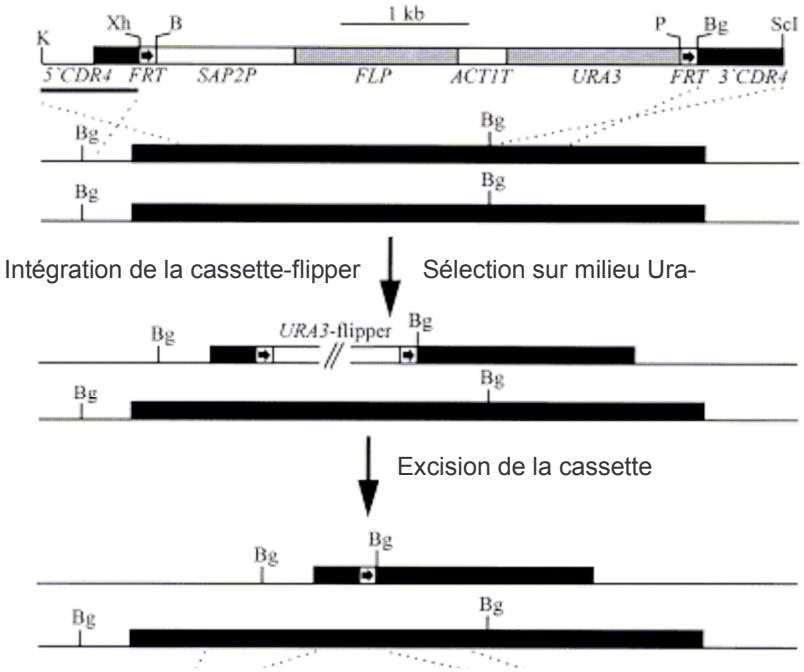


Figure 7 : Invalidation du gène *CDR4* par la cassette flipper : (i) le premier allèle est délété par double recombinaison homologue, (ii) une étape sur milieu Ura- sélectionne les transformants, (iii) l'expression de *FLP* permet l'excision de la cassette et (iv) la réutilisation de cette cassette invalide le second allèle. Issu de Morshhauser (Morschhauser *et al.*, 1999).

– La stratégie de l'anti-sens, permettant l'inhibition des gènes à un niveau post-transcriptionnel. Elle a également été adaptée à *C. albicans* (De Backer *et al.*, 2001), mais est remise en cause (cf. Figure 8-a).
– Roemer et ses collègues ont construit chez *C. albicans* des mutants conditionnels par la méthode GRACE™ (**G**ene **R**eplacement and **C**onditional **E**xpression). Cette approche permet de déléter une copie du gène et de placer la seconde sous le contrôle d'un promoteur régulable par la tétracycline (Tet) (Roemer *et al.*, 2003) (cf. Figure 8-b).

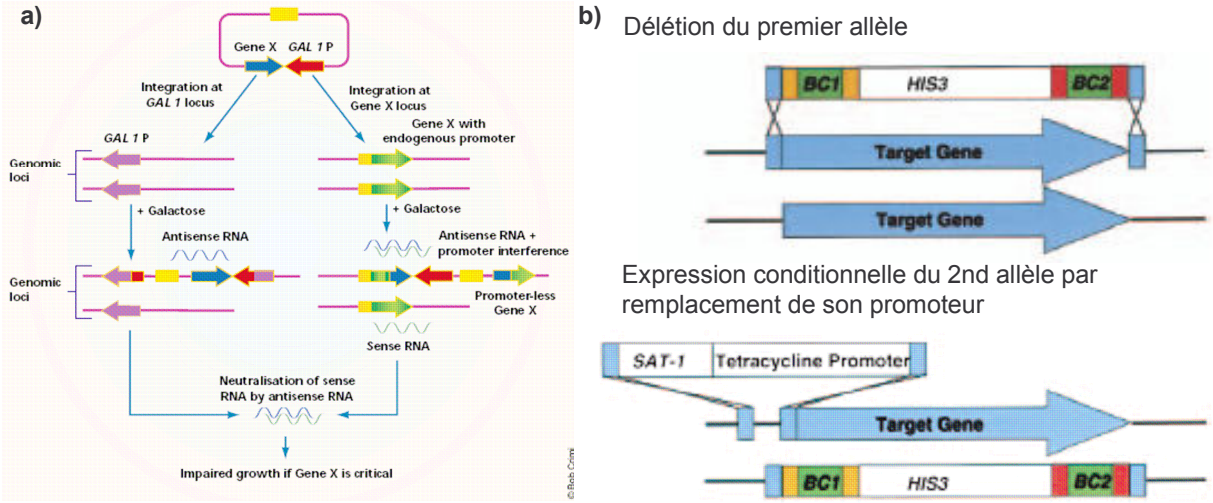


Figure 8 : Méthodes d'invalidation peu répandues, a) la méthode de l'anti-sens (Sanglard, 2001) et b) la méthode GRACE™ (Roemer *et al.*, 2003).

Les améliorations considérables des techniques de disruption chez *C. albicans* ont permis d'amorcer des approches génétiques à grande échelle (Davis *et al.*, 2002; De Backer *et al.*, 2001; Roemer *et al.*, 2003; Uhl *et al.*, 2003).

I.3.3 Les promoteurs régulables et les gènes rapporteurs chez C. albicans

Il existe de nombreux promoteurs endogènes régulables chez *C. albicans* utilisés (i) pour réprimer l'expression d'un gène grâce aux promoteurs *MET3* (Care *et al.*, 1999) et *MAL2* (Geber *et al.*, 1992), (ii) pour exprimer constitutivement un gène par p*ACT1* (Delbruck and Ernst, 1993) et p*ADH1* (Bertram *et al.*, 1996) et (iii) l'induire fortement par les promoteurs *GAL1* et *PCK1* (Leuker *et al.*, 1997).

Le système d'expression hétérologue et régulable par la tétracycline a également été adapté à *C. albicans* (Nakayama *et al.*, 2000) et appliqué à l'interruption de gène (voir la méthode GRACE™). Des gènes rapporteurs hétérologues sont maintenant disponibles chez *C.*

albicans. Ils ont été adaptés à partir du gène β-galactosidase (*LacZ*) de *Streptococcus thermophilus* (Uhl and Johnson, 2001) ou de la luciférase de *Renilla reniformis* (Srikantha *et al.*, 1996). Le développement du système de rapporteur GFP d'*Aequorea victoria* chez *C. albicans* (Cormack *et al.*, 1997; Morschhauser *et al.*, 1998) offre la possibilité de suivre l'expression du gène et de localiser une protéine *in vivo,* ce qui représente un avantage certain pour l'étude des interactions avec les cellules hôtes (Barelle *et al.*, 2006). De plus, le développement de variantes de la GFP telles que la YFP (pour yellow fluorescent protein) et la CFP (pour cyan fluorescent protein) permet également des études de co-expression et de co-localisation chez *C. albicans* (Meyer-Lindenberg *et al.*, 2005).

II. INTERFACE HOTE-PATHOGENE : LA PAROI

C. albicans, comme tous les champignons, possède une paroi qui exerce des fonctions essentielles telles que la protection contre les stress physiques extérieurs et contre la lyse de la cellule par turgescence. De plus, cette structure rigide est dotée d'une grande plasticité ce qui permet à la cellule de se maintenir sous différentes morphologies. Chez un organisme pathogène comme *C. albicans*, la paroi occupe également une place essentielle dans les échanges entre la cellule fongique et son environnement, et à ce titre, elle joue un rôle central dans les interactions hôte/pathogène.

II.1 L'organisation architecturale de la paroi

L'organisation et la composition structurale de la paroi de *C. albicans* sont semblables à celle de *S. cerevisiae*. Les β(1-3) glucanes sont toutefois présents en moins grande quantité chez *S. cerevisiae* au profit des β(1-6) glucanes (cf. Tableau I). Chez ces deux organismes, la paroi constitue une matrice extracellulaire d'une épaisseur de 100 à 200 nm entourant la membrane plasmique. Elle représente 10-25 % du poids sec de la cellule et est composée chez *C. albicans* de 35 à 40 % de mannoprotéines, 20 % de β(1-3) glucanes, 40 % de β1-6 glucanes et à 1-2 % de chitine ; ces valeurs varient toutefois en fonction des conditions de culture.

Tableau I : Les différents composants de la paroi de *S. cerevisiae* et *C. albicans* cultivées sous forme blastospore. Les données concernant *C. albicans* et de *S. cerevisiae* sont respectivement issues de (Klis *et al.*, 2001; Klis *et al.*, 2002).

	Poids sec de la paroi (%)	
	S. cerevisiae	***C. albicans***
Mannoprotéines[1]	35-40	35-40
β1-3 glucanes	5-10	20
β1-6 glucanes	50-55	40
Chitine	1-2	1-2

La paroi de *C. albicans* n'est pas homogène mais apparaît stratifiée, comme cela est visible en microscopie électronique par transmission (cf. Figure 9-a). La couche la plus intérieure, adjacente à la membrane, est constituée de β(1-3) glucanes et de chitine. Elle procure à la cellule sa structure rigide (cf. flèche rouge Figure 9-a). Les molécules de β(1-3) glucanes s'associent, via des liaisons hydrogènes, pour former un réseau continu tridimensionnel renforcé par des liaisons covalentes avec la chitine et les β(1-6) glucanes (Figure 9-b). Ce

[1] Le pourcentage réel de protéines est de 5-10 %, la masse restante est due aux mannoses liés aux protéines.

squelette polysaccharidique joue le rôle d'échafaudage sur lequel se lient de manière covalente des protéines glycosylées appelées protéines à ancre GPI ou protéines Pir (cf. II.2.5) ; ces mannoprotéines constituent la couche extérieure qui apparaît plus dense en microscopie (Flèche noire Figure 9-a et -b).

Sur la partie la plus externe de cette couche, nous retrouvons certaines des protéines liées de manière covalente (les Alsp, cf. II.3.3) et des macromolécules peu attachées à la paroi (liaisons non-covalentes, cf. II.2.5) telles que (i) des protéines « atypiques », (ii) des protéines glycosylées dont des enzymes excrétées, des peptidomannanes de haut poids moléculaire fortement glycolysées (260 kDa) appelées PPM (**P**hospho**P**eptido **M**annane), et (iii) des glycolipides dont le PLM (**P**hospho**L**ipo**M**annane) (Poulain *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 1985; Yu *et al.*, 1994). Cette couche externe empêche l'accès à la membrane et à la partie interne de la paroi aux enzymes extérieures.

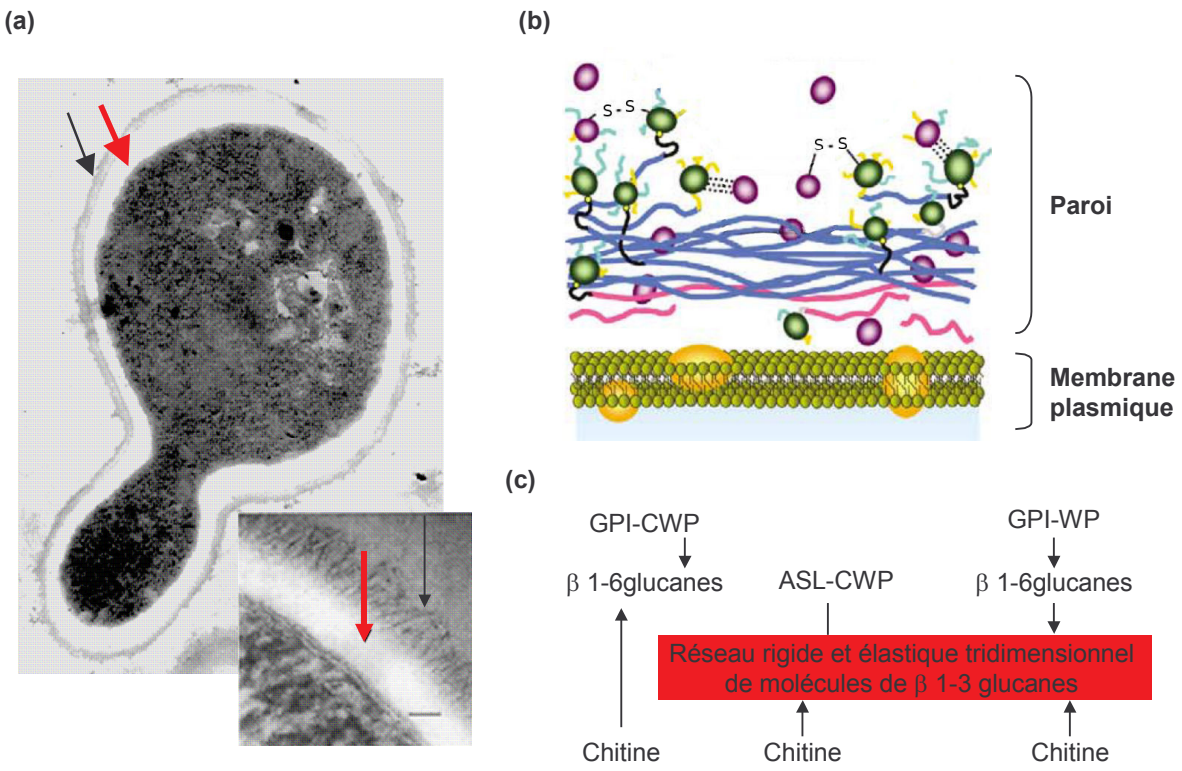


Figure 9: La paroi de *C. albicans* : (a) Vue en microscopie électronique, la flèche rouge indique la couche interne et la flèche noire la couche externe, (b) représentation schématique de l'organisation de surface cellulaire issue de Nombela *et al.*, (Nombela *et al.*, 2006) (c) représentation schématique des liaisons existantes entre le squelette polysaccharidique et les protéines pariétales, les flèches indiquent l'orientation du polysaccharide à partir de l'extrémité réductrice vers l'extrémité non réductrice. CWP : cell wall protein, GPI : glycosyl phosphatidylinositol protein, ASL : alkali-sensitive linkage, (S-S) liaison disulfure.

II.2 La composition de la paroi

II.2.1 La chitine

La chitine est un polymère linéaire de résidus N6-acétyl-glucosamine liés par des liaisons β(1-4). Elle est principalement présente au niveau de l'anneau de bourgeonnement et des septums. Bien que la chitine soit un composant mineur de la paroi (2 à 4%), ce polymère est essentiel à la cellule.

La chitine est synthétisée par l'action de chitine synthases, des N6-acétylglucosaminyl-transferases qui biosynthétisent la chitine à partir du substrat UDP-GlcNAc. Cinq chitines synthases ont été identifiées chez *C. albicans* :

– Chs1p est nécessaire à la synthèse de chitine lors de la formation des septa du champignon sous forme blastospore et hyphe. *CHS1* est essentiel à *C. albicans* contrairement à son orthologue chez *S. cerevisiae* (Au-Young and Robbins, 1990; Mio *et al.*, 1996; Munro *et al.*, 2001).
– Chs3p est responsable de la grande majorité de l'activité chitine synthase chez l'hyphe et la blastospore (Sudoh *et al.*, 1993). Le mutant *chs3*-/- ne présente pas de défaut majeur de croissance ou de filamentation, mais il semble être moins virulent dans un modèle de candidose disséminée chez la souris (Bulawa *et al.*, 1995).
– Chs2p et Chs8p contribuent également à l'activité chitine synthase *in vitro*, mais les mutants correspondants ne sont pas atteints dans la composition de leur paroi en chitine (Chen-Wu *et al.*, 1992; Gow *et al.*, 1994; Munro *et al.*, 2003).
– Chs7p participe à l'intégrité de la paroi et à la filamentation de *C. albicans* ; le mutant *chs7*-/- est moins virulent dans un modèle de candidose disséminée (Sanz *et al.*, 2005).

L'expression des chitine synthases est régulée en fonction du cycle cellulaire (Braun and Calderone, 1978) mais également de la morphologie : la forme mycélienne présente un taux plus élevé de chitine que la forme levure (Klis *et al.*, 2001). Comme chez *S. cerevisiae*, il existerait chez *C. albicans* un mécanisme de compensation (« salvage pathway »), qui induirait l'augmentation de chitine dans la paroi. Ce mécanisme, activé en réponse aux stress pariétaux, servirait probablement à renforcer la paroi (Smits *et al.*, 1999). Ainsi de nombreux mutants affectés dans la composition de la paroi (β glucanes ou protéines pariétales) présentent une augmentation de la production de chitine qui compenserait leurs faiblesses structurales (Albrecht *et al.*, 2006; Kapteyn *et al.*, 2000). En bloquant l'incorporation de la

chitine dans la paroi de ces mutants, le calcofluor en bloque la croissance à des concentrations plus faibles que celles qui bloquent le sauvage.

II.2.2 Le réseau des β(1-3) glucanes

Les β(1-3) glucanes sont formés de longues chaînes linéaires de glucoses liés en β(1-3) (cf. Figure 9-c). Leur synthèse, comme celle de la chitine, implique des enzymes membranaires. L'activité glucane synthase est portée par un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique, Gsc1p/Fks1p (Mio *et al.*, 1997) et d'une sous-unité régulatrice à activité GTP-ase, Rho1p (Kondoh *et al.*, 1997). Ce complexe enzymatique utilise l'UDP-glucose sécrété à travers la membrane plasmique et catalyse la formation des β(1-3) glucanes linéaires. Fks1p est par ailleurs la cible de la caspofungine, un antifongique appartenant aux échinocandines. Dans l'espace périplasmique, les β (1-3) glucanes linéaires néosynthétisés sont modifiés et associés aux autres polymères pariétaux (β(1-6) glucanes et chitine) pour constituer l'armature rigide de la paroi fongique. Plusieurs enzymes intervenant dans ce processus ont été identifiées chez *C. albicans* :

– Bgl2p pour l'introduction de chaînes β(1-6) glucanes (Sarthy *et al.*, 1997);
– Exg1p (anciennement Xog1p) pour son activité exo-β(1-3)-glucanase (Gonzalez *et al.*, 1997).
– Les protéines à ancre GPI, Phr1p et Phr2p, dont l'expression est pH dépendante, sont également nécessaires à la maintenance de l'intégrité des β(1-3) et β(1-6) glucanes dans la paroi via leur activité β(1-3) glucanosyl-transférase (Fonzi, 1999; Muhlschlegel and Fonzi, 1997; Saporito-Irwin *et al.*, 1995).

II.2.3 Les β1-6 glucanes

Les β1-6 glucanes sont très ramifiés et peuvent se lier aux β1-3 glucanes, à la chitine ou aux protéines à ancre GPI (cf. Figure 9-c). A l'heure actuelle, aucun schéma de biosynthèse des β1-6 glucanes n'a été établi chez *C. albicans* et la plupart de nos connaissances provient des études réalisées chez *S. cerevisiae*. Un crible de résistance à la toxine K1, ayant pour cible le β1-6 glucane, a permis d'identifier la famille des gènes KRE (**K**iller toxin **RE**sistant) impliquée dans la biosynthèse des β1-6 glucanes (Brown *et al.*, 1993). Un second crible a également été effectué en utilisant le calcofluor ; les gènes isolés par ce criblage ont été nommés CWH (**C**alcofluor **W**hite **H**ypersensitive) (Ram *et al.*, 1994). L'étude de certains paralogues chez *C. albicans* tend à montrer que l'implication de ces gènes dans la synthèse du

β1-6 glucane est probablement conservée chez *C. albicans* ; ceci semble vrai pour les gènes *KRE1*, *KRE5, KRE6* (Boone *et al.*, 1991; Herrero *et al.*, 2004; Mio *et al.*, 1997).

II.2.4 Les glycolipides

Le glycolipide le plus étudié est le PLM, du fait de ses très fortes propriétés antigéniques. Cette petite molécule de 14 à 18 kDa est composée d'une chaîne linéaire de β(1-2) oligomannosides, variant de 2 à 19 résidus mannoses, associée à un céramide via un phosphoinositol (Trinel *et al.*, 1999; Trinel *et al.*, 2002). Le PLM joue un rôle immonumodulateur important (cf. paragraphe III.2.2). Il est exprimé chez *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. glabrata*, mais pas chez les espèces non pathogènes proches de *C. glabrata, K. lactis* et *S. cerevisiae* (Cantelli *et al.*, 1995).

Bien que les liaisons en β(1-2) entre les mannoses soient un type de liaison peu commun, elles sont retrouvées sur certaines mannoprotéines pariétales de fonction inconnue de moyen et haut poids moléculaires dont le PPM (Cantelli *et al.*, 1995). Les β(1-2) oligomannosides sont des immunogènes puissants (cf. paragraphe III.2.1 sur Gal3) et possèdent des propriétés d'adhésion (Li and Cutler, 1993). De plus, la présence ou l'absence de résidus mannoses liés en β(1-2) détermine le sérotype des souches de *C. albicans*, sérotype A et B respectivement (Suzuki *et al*., 1995). Le sérotype serait également lié à l'hydrophobicité de la paroi (Masuoka and Hazen, 2004). Une paroi hydrophobe serait plus adhérente aux tissus de l'hôte et plus résistante à la phagocytose par des macrophages que les parois hydrophiles. D'autre part, *C. albicans* peut moduler la quantité relative et le degré de polymérisation des β(1-2) oligomannosides à sa surface en fonction des conditions de culture, de la morphologie et des souches considérées (Trinel *et al.*, 1999; Trinel *et al.*, 2005). Cette variabilité antigénique montre, une fois de plus, la grande capacité d'adaptation développée par *C. albicans* qui lui permet d'échapper ou de retarder sa reconnaissance par le système immunitaire.

II.2.5 Les protéines pariétales

Les protéines « atypiques »

Ces protéines sont appelées atypiques car, bien qu'elles ne possèdent aucune séquence signal qui leur permettrait de rejoindre la voie de sécrétion classique, elles ont été retrouvées à la surface cellulaire de *C. albicans* ou encore relarguées dans le milieu de culture. Ces protéines avaient été jusqu'à présent décrites comme cytoplasmiques. Il s'agit principalement (i)

d'enzymes de la glycolyse (l'énolase par exemple), (ii) de chaperons telles que Hsp70p et Hsp90p ou encore (iii) de protéines intervenant dans la résistance au peroxide, comme Tsa1p (Burt *et al.*, 2003; Pitarch *et al.*, 2002; Urban *et al.*, 2005).

Ces résultats tendent à montrer qu'il existerait un mécanisme de sécrétion non conventionnel qui permettrait à certaines protéines, sans séquence signal, d'être dirigées vers l'extérieur. Elles exerceraient alors des fonctions différentes de celles attribuées dans le cytosol. Ces protéines pourraient être impliquées dans les interactions avec l'hôte ou dans la dynamique de la paroi (Nombela *et al.*, 2006). Toutefois, ces conclusions sont vivement contestées au sein de la communauté scientifique et la présence de ces protéines pourrait être due à des contaminations survenant lors des extractions de paroi.

Les mannoprotéines

Les mannoprotéines sont des protéines liées de manière covalente à des polymères de mannanes. Ces sucres sont ajoutés lors des modifications post-traductionnelles des protéines : la N- et la O-glycolysation. La N-glycolysation des protéines de la voie de sécrétion est un processus conservé entre *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Le noyau oligosaccharidique dol-P-P-$(GlcNAc)_2$-$(Man)_9$-$(Glc)_3$ est relié par une liaison covalente à l'atome d'azote (N) de la chaîne latérale des résidus asparagine de la protéine naissante dans la lumièredu RE (voir Figure 10-a encadré de gauche). Seuls les asparagines appartenant à une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (X étant différent de la proline) peuvent être glycosylées. Avant le transfert dans l'appareil de Golgi, trois glucoses et un résidu mannose de la structure de base de l'ancre sont clivés. Ces modifications se poursuivent à l'intérieur de l'appareil de Golgi, où sont ajoutés jusqu'à cinq mannoses sur la chaîne principale, puis approximativement 200 autres α1-6 mannoses sont liés à des β1-2 mannoses pour former une chaîne latérale (Figure 10-a, encadré de droite). L'initiation de la synthèse de cette chaîne implique Och1p et son élongation les enzymes Mnn (Cutler, 2001).

La O-glycosylation (ou O-mannosylation) est un mécanisme plus rare que la N-glycosylation. Il varie énormément selon les organismes et il n'est effectué que sur certaines protéines riches en sérine et en thréonine. La O-mannosylation est initiée dans le RE par le transfert d'un résidu mannose grâce à l'action d'une O-mannosyltransférase, Pmt1p et de ses isoformes Figure 10-b (Timpel *et al.*, 1998). Les modifications se poursuivent dans l'appareil de Golgi où trois à quatre résidus mannoses sont ajoutés via les mannosyltransférases Mnt1p et Mnn1p

(Ernst and Prill, 2001; Munro *et al.*, 2005). Une fois ces modifications post-traductionnelles terminées, les protéines sont transportées par des vésicules du Golgi jusqu'à la membrane plasmique puis excrétées pour certaines.

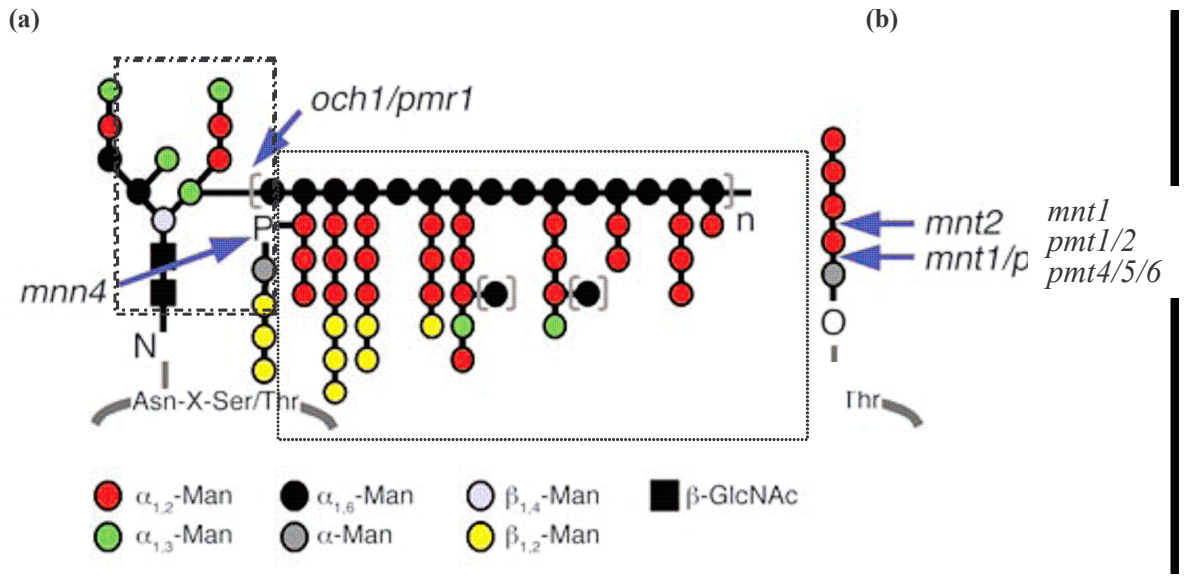


Figure 10 : Structure des glycanes ajoutés lors de la N-glycosylation (a) et de la O-glycosylation (b) et le site d'action des enzymes impliquées dans ces voies de glycosylation. Issu de Netea *et al.*, (Netea *et al.*, 2006). Man pour mannosyl et β-GlcNac pour β N-acetylglucosamine. (a) encadré de gauche : le cœur, encadré de droite : la chaîne latérale.

Les mannoprotéines excrétées

Les mannoprotéines excrétées regroupent essentiellement des adhésines et des enzymes hydrolytiques. Ces protéines sont liées au périplasme ou à la paroi via des liaisons non-covalentes, ou par des ponts disulfures pour certaines. Les adhésines de type I, dotées de propriétés « lectin-like » sont responsables de la plupart des phénomènes d'adhésion aux cellules épithéliales. Les adhésines de type II sont fonctionnellement proches des intégrines des cellules mammifères et reconnaissent les plaquettes et les cellules endothéliales, pour de plus amples informations se référer à Calderone *et al.*, (Calderone, 1993).

Les hydrolases, comme Bgl2p, Exg1p et des chitinases, sont impliquées dans la biosynthèse et le remodelage de la paroi. Elles peuvent également être relarguées dans le milieu de culture. Dans ce cas, il s'agit majoritairement de lipases et de protéinases extra-cellulaires telles que des collagénases, des carboxylprotéinases, des facteurs hémolytiques et des protéinases acides comme les Sap1-8. Les protéinases interviennent dans la dégradation de protéines qui sont, de par leur taille, inaccessibles à la levure. Ces processus de dégradation engendrent souvent des

dommages au niveau des cellules hôtes, les enzymes responsables sont considérées comme des facteurs de virulence.

Les mannoprotéines liées de manière covalente à la paroi

Deux types de glycoprotéines liées de manière covalente à la paroi ont été identifiés : les protéines à ancre GPI (**G**lycosyl**P**hosphatidyl**I**nosytol), appelées GpiP dans la suite du texte, et les protéines Pir (**P**rotein with **I**nternal **R**epeats) (Kapteyn *et al.*, 1999). Les GpiP sont liées via un β1-6 glucane à l'extrémité non réduite d'une molécule β(1-3) glucane (90 % des cas) ou à la chitine (10 %) (Voir Figure 9-c). La biosynthèse et les fonctions de ces protéines seront traitées dans la partie suivante II.3.

Les protéines Pir sont liées directement au réseau de β(1-3) glucane via une liaison inconnue, sensible aux traitements alcalins (ASL pour **A**lkalin **S**ensitive **L**inkage) (Kandasamy *et al.*, 2000). Récemment, cette classe de protéines a été élargie à la classe des ASL-CWP (ASL **C**ell **W**all **P**rotein) puisqu'une protéine non homologue aux Pir, également liée à la paroi grâce à une liaison ASL, a été identifiée. Il s'agit de Scw1p, une β(1-3) glucanosyltransférase (de Groot *et al.*, 2004). Les protéines Pir contiennent (i) une séquence signal, (ii) un site de clivage à l'endoprotéinase Kex2p, (iii) un domaine conservé en C-terminal comprenant 4 résidus cystéines avec des espacements fixes, (iv) des séquences riches en glutamine répétées en nombre variable et (v) des sites de O-glycosylation. Une seule protéine Pir a été identifiée chez *C. albicans*, Pir1p (cf. Figure 11), contrairement à *S. cerevisiae* qui en compte 4 (Martinez *et al.*, 2004; Mrsa *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 2005).

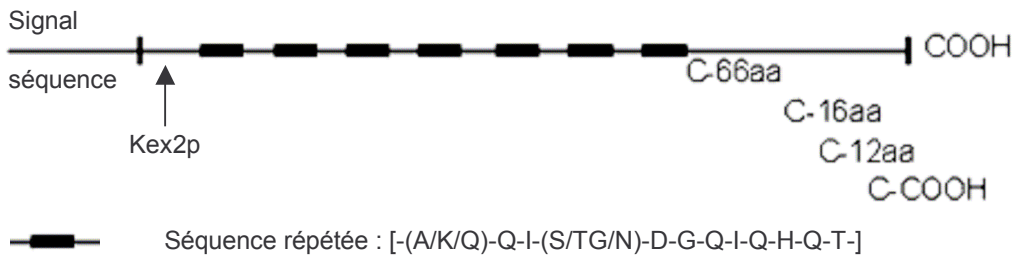


Figure 11 : Représentation schématique de la structure de Pir1p chez *C. albicans*. Issue de Ruiz-Herrera *et al.*, (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). CaPir1p présente 4 résidus cystéines en C-terminal (C-aa), un site de N-glycosylation potentiel.

II.3 Les protéines à ancre GPI chez *C. albicans*

II.3.1 La biosynthèse des GpiP

La structure et la fonction de l'ancre GPI

Le glycosylphosphatidylinositol (GPI) est un glycolipide clé produit par tous les eucaryotes. Le GPI se lie de manière covalente au C-terminal de certaines protéines. Cette modification post-traductionnelle permet la présentation de ces protéines à la surface cellulaire. La synthèse de GPI est essentielle pour (i) la formation de la paroi et la survie de levures telles que *S. cerevisiae*, *C. albicans* et *S. pombe* (Colussi and Orlean, 1997; Grimme *et al.*, 2004; Leidich *et al.*, 1994), (ii) le développement embryonnaire des cellules mammifères (Kawagoe *et al.*, 1996), (iii) la viabilité du parasite *Leishmania mexicana* (Ilgoutz *et al.*, 1999) et (iv) la forme sanguine de *Trypanosoma brucei* (Nagamune *et al.*, 2000).

L'ancre GPI de tous les organismes a une structure de base très conservée. La partie C-terminale de la protéine est liée par une liaison peptidique, via un phosphoéthanolamine (P-EtN), à un tétra-saccharide de séquence : Mannose α(1-2) Mannose α(1-6) Mannose α(1,4) Glucosamine (M3-M2-M1-GlcN). Ce dernier est à son tour lié en α(1-6) à un inositol (cf. Figure 12). Enfin, l'inositol est attaché via un phosphate à un groupement lipidique hydrophobe qui permet à l'ancre de s'enchâsser dans la membrane et d'y former un réseau de liaisons hydrophobes assurant son attachement. Des modifications surviennent ensuite au niveau du groupement des 3 mannoses ou du groupement lipidique en fonction de chaque organisme.

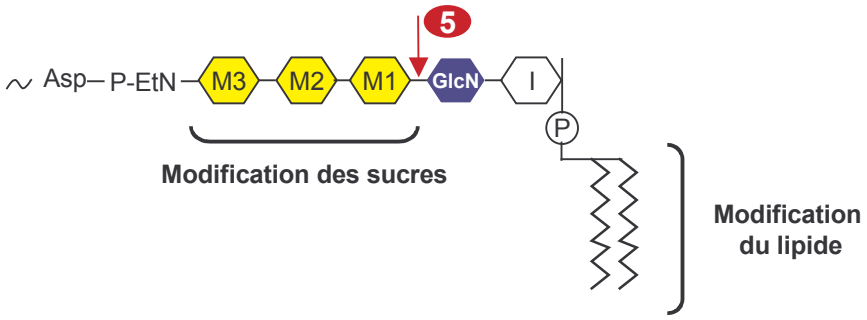


Figure 12 : Représentation schématique de la structure conservée de l'ancre GPI. Les zones de modifications de l'ancre menant à sa maturation sont indiquées par une parenthèse. Le site de clivage des protéines destinées à être pariétales est indiqué par une flèche et correspond à l'étape 5 de la voie de biosynthèse de l'ancre GPI chez *S. cerevisiae* (voir texte).

La synthèse de la structure de base de l'ancre GPI et son transfert sur la protéine

La voie de biosynthèse de l'ancre GPI est également très conservée. En effet, pour pratiquement tous les gènes identifiés chez les cellules mammifères ou *S. cerevisiae*, des orthologues ont été trouvés chez les autres eucaryotes. Dans de nombreux cas, l'expression hétérologue de gènes de la levure dans des cellules mammifères produit des enzymes fonctionnelles, et vice versa (Kang *et al.*, 2005). Certaines modifications au niveau du cœur glucidique sont retrouvées chez l'homme et la levure. Contrairement à l'espèce *C. albicans* pour laquelle très peu d'études ont été réalisées sur cette voie de biosynthèse, chez *S. cerevisiae*, les enzymes requises pour l'addition de presque tous les éléments structurants de l'ancre ont été identifiées. La biosynthèse de l'ancre sera décrite, ci-dessous, à travers cinq grandes étapes (cf. Figure 12 et Figure 13).

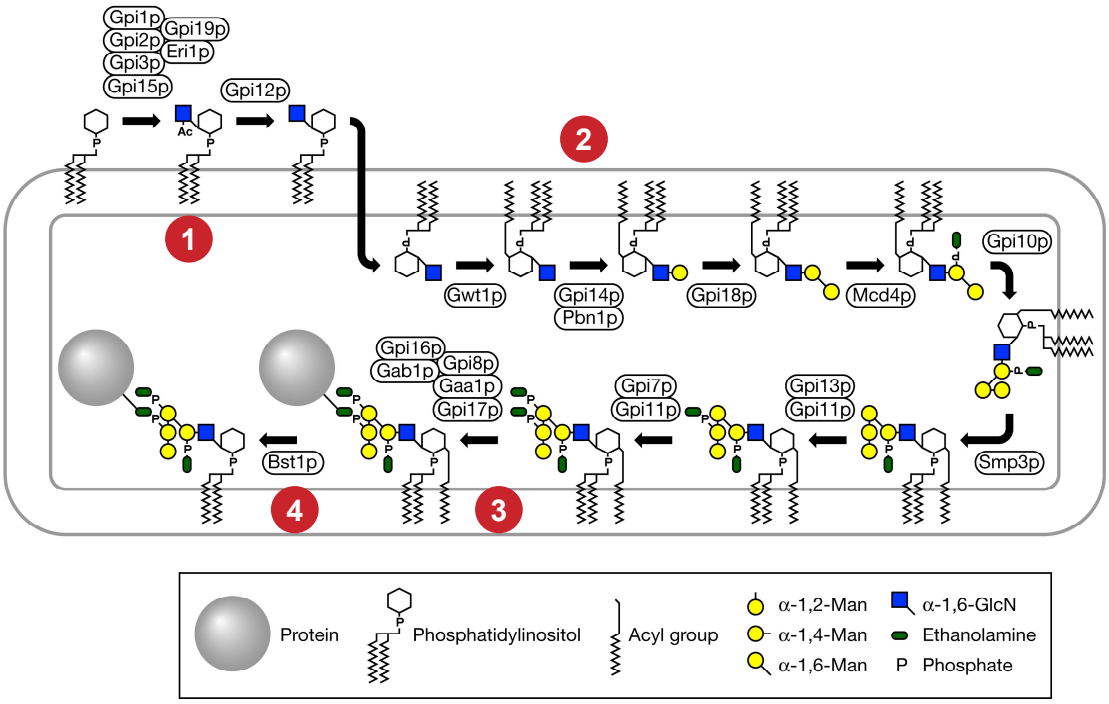


Figure 13 : Schéma de la voie de biosynthèse de l'ancre GPI chez *S. cerevisiae*. Avec l'autorisation de T. Yoko-o (AIST, Japan), Copyright (C) 2006 Takehiko Yoko-o. Tout droit réservé. Les grandes étapes de biosynthèse de l'ancre GPI sont numérotées de 1 à 4 (voir texte).

La 1ère étape de biogenèse de l'ancre a lieu dans la membrane du réticulum coté cytosolique :

– un complexe enzymatique composé de Gpi3p/Gpi1p/Gpi2p/Gpi13p/Gpi19p transfère une N-acétylglucosamine (NAG) à un lipide phosphoinositol (PI) pour former un NAG-PI (Leidich *et al.*, 1995; Newman *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2001), Gpi3p exercerait la fonction

de glycosyltransferase (Kostova *et al.*, 2000). Eri1p a été récemment identifié comme appartenant à ce complexe en interagissant avec Gpi2p (Sobering *et al.*, 2004) ;

– l'activité dé-N-acétylase de Gpi12p permet la formation d'un glucosamine-PI (GlcN-PI) à partir de NAG-PI (Watanabe *et al.*, 1999). Ce précurseur est ensuite transloqué dans le lumen.

La 2nde étape qui se déroule dans la lumière du RE permet la fin de la synthèse de l'ancre et les modifications du groupement des trois mannoses :

– cette étape débute par l'addition d'un acide palmitique sur le second groupement OH de l'inositol, grâce à l'activité de Gwp1p. Un GlcN-Acyl-PI est ainsi formé (Umemura *et al.*, 2003) ;
– l'ajout du premier mannose se fait à partir d'un dolicholphosphate grâce aux actions de Gpi14p et de Pbn1p (Ashida *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2001), l'addition du second mannose est réalisé grâce à Gpi18p (Kang *et al.*, 2005). *PBN1* et *GPI18* sont deux gènes essentiels chez *S. cerevisiae* ;
– *MCD4* est un gène essentiel qui code une enzyme impliquée dans le transfert d'une phosphoéthanolamine (EtN-P) sur le premier mannose (M1) (Gaynor *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 1999).
– L'addition du troisième mannose (M3) est médiée par Gpi10p. La présence du groupement EtN-P sur M1 semble nécessaire à la reconnaissance du précurseur par Gpi10p ainsi qu'aux modifications futures du noyau GPI (Zhu *et al.*, 2006).
– La mannosyltransférase Smp3p ajoute un quatrième mannose (M4) du cœur glucidique, *SMP3* est essentiel chez *S. cerevisiae* mais également chez *C. albicans* où il exerce la même fonction (Grimme *et al.*, 2001; Grimme *et al.*, 2004).
– Un groupement EtN-P est ajouté sur M3 par Gpi13p, cette enzyme est active seulement si un quatrième mannose est lié à son substrat M3. De plus, Gpi13p est probablement stabilisée par Gpi11p (Taron *et al.*, 2000). Cependant, Gpi11p n'est pas indispensable à Gpi13p bien que *GPI11* soit essentiel. Gpi11p exerce donc probablement une autre fonction essentielle à la cellule.
– Gpi7p serait une transférase membranaire du RE clairement impliquée dans l'addition d'un groupement EtN-P sur le M2. Chez *S. cerevisiae*, en l'absence de *GPI7*, les GpiP présentent un défaut de remodelage en dehors de RE et la paroi du mutant *gpi7-* est désorganisée (Benghezal *et al.*, 1995; Huh *et al.*, 2003). Les protéines Gpi7p et Smp3p sont les deux seules enzymes de la voie de biosynthèse de GPI caractérisées chez *C. albicans*. *Cagpi7-/-*

comme *Scgpi7*- présente un défaut d'intégrité de la paroi. De plus, en l'absence de *CaGPI7*, on observe également une baisse de la quantité de certaines GpiP pariétales que l'on retrouve relarguées dans le milieu (Richard *et al.*, 2002).

La 3ème étape permet le transfert de l'ancre sur les protéines cibles : la partie C-terminale de certaines protéines néo-synthétisées, destinées à être des GpiP, est clivée au niveau d'un site appelé ω. Ce site de coupure est composé d'un triplet d'acides animés de petite taille appelé ω, ω+1 et ω+2. Le groupement EtN-P du M3 de l'ancre mature se lie ensuite à l'acide aminé ω (préférentiellement sur un asparagine ou un glycine) via une liaison peptidique. Le transfert de l'ancre sur la protéine est catalysé dans la lumière par un complexe transamidase composé de cinq protéines, toutes essentielles chez *S. cerevisiae* et les mammifères (Benghezal *et al.*, 1996; Fraering *et al.*, 2001; Hamburger *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2003; Ohishi *et al.*, 2001). Ce complexe serait constitué de deux sous unités : Gpi8p/Gpi16p/Gaa1p et Gab1p/Gpi17p. Les mécanismes de coopération, permettant à ces deux sous complexes d'exercer leur activité transamidase, restent encore à déterminer.

Les modifications de l'ancre après son attachement à la protéine et le transfert des GpiP dans le Golgi

Cette 4ème étape se compose des éléments suivants :

– chez la levure le groupement acyle ajouté par Gwt1p (cf. étape 1) est clivé par Bst1p juste après le transfert de l'ancre sur la protéine. Cette réaction permettrait le transport de la protéine à ancre GPI (GpiP) du RE vers le Golgi (Tanaka *et al.*, 2004). Bst1p participe également à la dégradation des GpiP mal repliées dans la lumière (Fujita *et al.*, 2006),
– le cœur lipidique de l'ancre néo-synthétisée chez la levure est composé d'un diacylglycérol (DAG) alors que celui des GpiP matures est généralement une céramide. Bien que les modifications de l'ancre lipidique dans le Golgi soient encore mal connues, ces mécanismes impliquent Gup1p et nécessiteraient la présence du groupement EtN-P en M2 transféré par Gpi7p (cf. étape 2, (Bosson *et al.*, 2006; Imhof *et al.*, 2004).
– un 5ème mannose serait ajouté à 20 à 30 % des GpiP dans le Golgi, les enzymes impliquées restent encore à identifier (Sipos *et al.*, 1995) chez *S. cerevisiae*.

L'export des GpiP jusqu'à la paroi

Les GpiP empruntent la voie classique de sécrétion jusqu'à la membrane plasmique. L'ancre GPI de certaines GpiP (cf. Revue, partie I des résultats) est clivée entre le groupement GlcN et le M1. Cette dernière modification de l'ancre (étape 5, cf. Figure 12-a) permet à la protéine clivée de se diriger vers la paroi où elle se lie aux β glucanes (voir ci-dessus). La nature des acides aminés en amont du site de clivage ω était considérée comme décisive dans l'envoi des GpiP à la paroi, cependant des études récentes montrent les limites de ce modèle (cf. Revue).

Contrairement aux protéines Pir, les GpiP ne sont pas réparties uniformément à la surface de la paroi. Par exemple, Egt2p est impliquée dans la dégradation du septum et la séparation des cellules. Cette protéine est seulement localisée au niveau du septum. Récemment, l'équipe de Fujita a démontré l'implication de Gpi7p dans la localisation correcte de Egt2p (Fujita *et al.*, 2004) ce qui expliquerait le problème de cytokinèse observé chez le mutant *Scgpi7*-. Le mutant g*pi7*-/- chez *C. albicans* présente le même phénotype (Richard *et al.*, 2001).

II.3.2 Les caractéristiques communes aux GpiP

Toutes les protéines destinées à être sécrétées ne sont pas liées à une ancre GPI. Seules les protéines dotées des critères suivants sont clivées puis ancrées à la membrane via un GPI (voir Figure 14) :

- un peptide signal hydrophobe en N-terminal qui permet à la protéine d'être envoyée vers le réticulum ;
- un peptide C-terminal hydrophobe (10-15 aa) qui ancre pendant une courte période la protéine synthétisée dans la membrane du réticulum. Ce peptide sera clivé au cours de l'étape de transfert de l'ancre GPI par le complexe de transamidase ;
- un triplet d'acides animés de petite taille situé au niveau du site de coupure (site ω) puis d'attachement de l'ancre ;
- une distribution particulière des acides aminés au site de clivage GPI qui déterminerait l'envoie ou non de la GpiP à la paroi (cf. Revue, partie I des résultats) ;
- un peptide de raccord hydrophile entre le site ω et la partie hydrophobe (environ 8 aa.).

Figure 14 : Structure commune aux GpiP. Issu de Mayor et Riezman (Mayor and Riezman, 2004).

Les algorithmes développés par de Groot, Eisenhaber et Garcera pour identifier *in silico* des GpiP putatives chez les levures sont basés sur ces caractéristiques (De Groot *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Garcera *et al.*, 2003). Ces études ont permis d'identifier 115 protéines potentiellement liées à une ancre GPI chez *C. albicans* (cf. Revue partie Résultats I).

II.3.3 Le rôle des GpiP

La liaison à une ancre GPI chez les levures n'est pas spécifique à une classe fonctionnelle de protéines mais s'associe à des protéines impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques clés que l'on peut regrouper en quatre grandes catégories :

- Les GpiP de fonction totalement inconnue représentent le groupe le plus important en nombre (66 %). Parmi celles-ci, les protéines identifiées par P. de Groot ont été nommées PGA pour **P**utative **G**PI-**A**nchored proteins (De Groot *et al.*, 2003).
- Les GpiP jouant potentiellement un rôle dans la biosynthèse ou le remodelage de la paroi par homologie avec les protéines connues de même fonction (13 %).
- Les GpiP impliquées dans les interactions/adhésions cellule-cellule par homologie avec les protéines connues de même fonction (11 %).
- Les GpiP exerçant des activités enzymatiques diverses par homologie avec les protéines connues de même fonction (9,5 %).

Une revue centrée sur les GpiP chez *C. albicans* et leur rôle à la surface cellulaire est en cours de correction après soumission à Eukaryotic cell et est présentée dans la partie I des résultats.

III. LES DEFENSES DE L'HOTE FACE A *C. ALBICANS*

Traditionnellement considérée comme la première ligne de défense, l'immunité innée (*i.e.* naturelle) bénéficie d'une attention particulière depuis qu'il a été démontré que cette immunité est capable de distinguer le soi du non soi et d'activer la réponse adaptative via des signaux spécifiques (Fearon and Locksley, 1996). Dans les minutes qui suivent l'invasion de l'hôte par le microorganisme pathogène, les défenses du système immunitaire inné sont déclenchées par des molécules conservées à la surface du pathogène, les PAMPs (**P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**attern). Elles sont identifiées grâce aux récepteurs PRR (**P**attern **R**ecognition **R**eceptors) présents à la surface des cellules de la réponse innée. L'immunité naturelle n'est pas toujours suffisante pour éradiquer le pathogène mais elle est indispensable pour mener à bien une première défense en attendant que l'immunité adaptative prenne le relais (4 à 5 jours).

III.1 Les acteurs de la réponse innée face à *C. albicans*

III.1.1 Les barrières naturelles

Les cellules constitutives des muqueuses épithéliales du système respiratoire, gastro-intestinal et génito-urinaire sont les premières barrières physiques que va rencontrer *C. albicans* lors d'infections. Si le pathogène réussit à franchir ces premiers obstacles, une fois dans le système sanguin, il devra alors adhérer aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et les pénétrer avant de pouvoir envahir les organes profonds.

En plus de leur rôle de barrière naturelle, les cellules endothéliales situées à l'interface sang/tissu vont induire une inflammation en réponse aux dommages causés par *C. albicans*. En effet, en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion, ces cellules participent à la mobilisation de neutrophiles résidents ou au recrutement de neutrophiles élicités au site de l'infection (Filler *et al.*, 1996). Après une étape de roulement et d'étalement sur les cellules endothéliales, les neutrophiles franchissent ces dernières pour rejoindre les tissus via une étape de diapédèse (migration transendothéliale).

III.1.2 Les cellules immunitaires non phagocytaires

Les plaquettes

Outre leur rôle fondamental dans l'hémostase, les plaquettes sont impliquées dans la réponse immunitaire et en particulier dans les étapes d'initiation de la réaction inflammatoire. Grâce à leurs propriétés d'adhésion, les plaquettes se fixent aux cellules endothéliales et permettent la libération de facteurs activant des composants chimiotactiques du complément. Elles possèdent également une activité candicide par la sécrétion de protéines microbicides plaquettaires (PMP) en interagissant avec le fibrinogène. Elles contribuent ainsi à l'élimination de *C. albicans* de la circulation sanguine (Yeaman *et al.*, 1993).

*Les cellules NK (**N**atural **K**iller)*

Les cellules NK sont des lymphocytes cytotoxiques qui participent à l'initiation de la réponse immune par leur production prodigieuse d'interféron IFNγ (Kawakami *et al.*, 2001). Ces cellules jouent un rôle important dans le système immunitaire de la muqueuse intestinale (Kinoshita *et al.*, 2002). Les NK sont capables de tuer des cellules tumorales et certaines cellules infectées par des virus mais à l'heure actuelle, aucune étude n'a pu leur attribuer une quelconque activité antifongique.

III.1.3 Les cellules phagocytaires

Les phagocytes comprennent les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (CD). Ces cellules effectrices représentent une première ligne de défense de l'hôte. Elles contrôlent la propagation du pathogène par inhibition de sa croissance ou en le tuant (cf. Figure 15). Ces cellules représentent un avantage certain pour les défenses de l'hôte puisqu'elles sont disponibles très rapidement et en grand nombre sur le site de l'infection. Quand un phagocyte détecte la présence d'un pathogène, il l'entoure de pseudopodes qui fusionnent et forment un phagosome. Ce compartiment devient mature en fusionnant avec des lysosomes créant ainsi un phagolysosome, un organelle à pH acide rempli de composés antimicrobiens. Dans ces phagolysosomes, les pathogènes sont tués par l'action combinée de mécanismes de destruction oxydatifs et non-oxydatifs (Nathan, 2006). Les mécanismes oxydatifs impliquent la production d'intermédiaires d'oxygène actif, ROI (**R**eactive **O**xygen **I**ntermediate), et d'oxyde nitrique (NO), toxiques pour *C. albicans* (Fang, 2004; Marodi *et al.*, 1991). Les phagocytes sont également doués d'activité lytique intra-cellulaire (dégranulocyte)

et extra-cellulaire permettant la destruction du pathogène ; ces mécanismes non-oxydatifs peuvent être renforcés par l'action de peptides antifongiques tels que les défensines (Tran *et al.*, 2002). L'activité des phagocytes peut être favorisée par l'action d'opsonines (*i.e.* des anticorps, du complément et des collectines) qui facilitent la reconnaissance du pathogène et par les cytokines de cellules T différenciées (Kozel, 1998). Par ailleurs, au sein du foyer inflammatoire, ces cellules sont capables de sécréter un grand nombre de médiateurs de l'inflammation dont les plus importants sont les interleukines (IL-1 et IL-6), le facteur de nécrose tumorale TNF-α, certains facteurs du complément. Ces médiateurs participent ainsi à l'amplification de la réponse inflammatoire (action autocrine et paracrine des cytokines). Ce dernier point sera discuté dans le paragraphe III.3, ci-dessous.

Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent la population de phagocytes la plus abondante. Ils sont très souvent les premières cellules recrutées sur le site de l'infection. En général, après la phagocytose, les neutrophiles sont détruits par apoptose et ensuite éliminés (Savill *et al.*, 1989). Leur activité fongicide est très efficace et joue un rôle essentiel dans le contrôle de la dissémination de *C. albicans* comme l'atteste le développement fréquent de candidose chez les patients neutropéniques (Cohen, 1994; Swerdloff *et al.*, 1993).

Les macrophages

Les macrophages proviennent de la migration tissulaire des monocytes où ils se différencient et acquièrent la plupart des récepteurs de l'immunité innée, on parle alors de macrophages résidents. Les macrophages forment une famille hétérogène regroupant différentes cellules qui pré-existent au niveau de différents tissus ; ainsi ils représentent souvent les premières cellules immunitaires que le pathogène va rencontrer lors d'une infection. Ils possèdent la machinerie nécessaire à la présentation d'antigènes (Steinman, 1991), mais leur contribution principale est probablement l'inhibition et la destruction de *C. albicans* (Vazquez-Torres and Balish, 1997). Une des fonctions importantes du macrophage est sa transformation de l'état de repos à l'état activé, notamment par l'induction de cytokines et des interférons IFNγ (Watanabe *et al.*, 1991). Ses activités phagocytaire et candicide s'en trouvent alors renforcées (Marodi *et al.*, 1993).

Les cellules dendritiques

Les CD, dérivées de cellules souches de la moelle osseuse, sont les phagocytes spécialisés dans la présentation d'antigènes (APC : **A**ntigen-**P**resenting **C**ell). Ces cellules immatures sont recrutées au site d'infection où elles captent l'antigène ; après maturation elles migrent vers les ganglions lymphatiques pour présenter l'antigène aux lymphocytes T (Austyn, 1992; Cumberbatch and Kimber, 1992). Les CD sont capables de différencier les pathogènes entre eux mais également de décoder les informations qui leurs sont associées (voir III.3.1). Les CD sont impliquées dans le recrutement de macrophages et de neutrophiles au site de l'infection via la sécrétion de MIP-2 (**M**acrophage **I**nhibitory **P**rotein) ; ces cellules exercent également une activité candicide (d'Ostiani *et al.*, 2000).

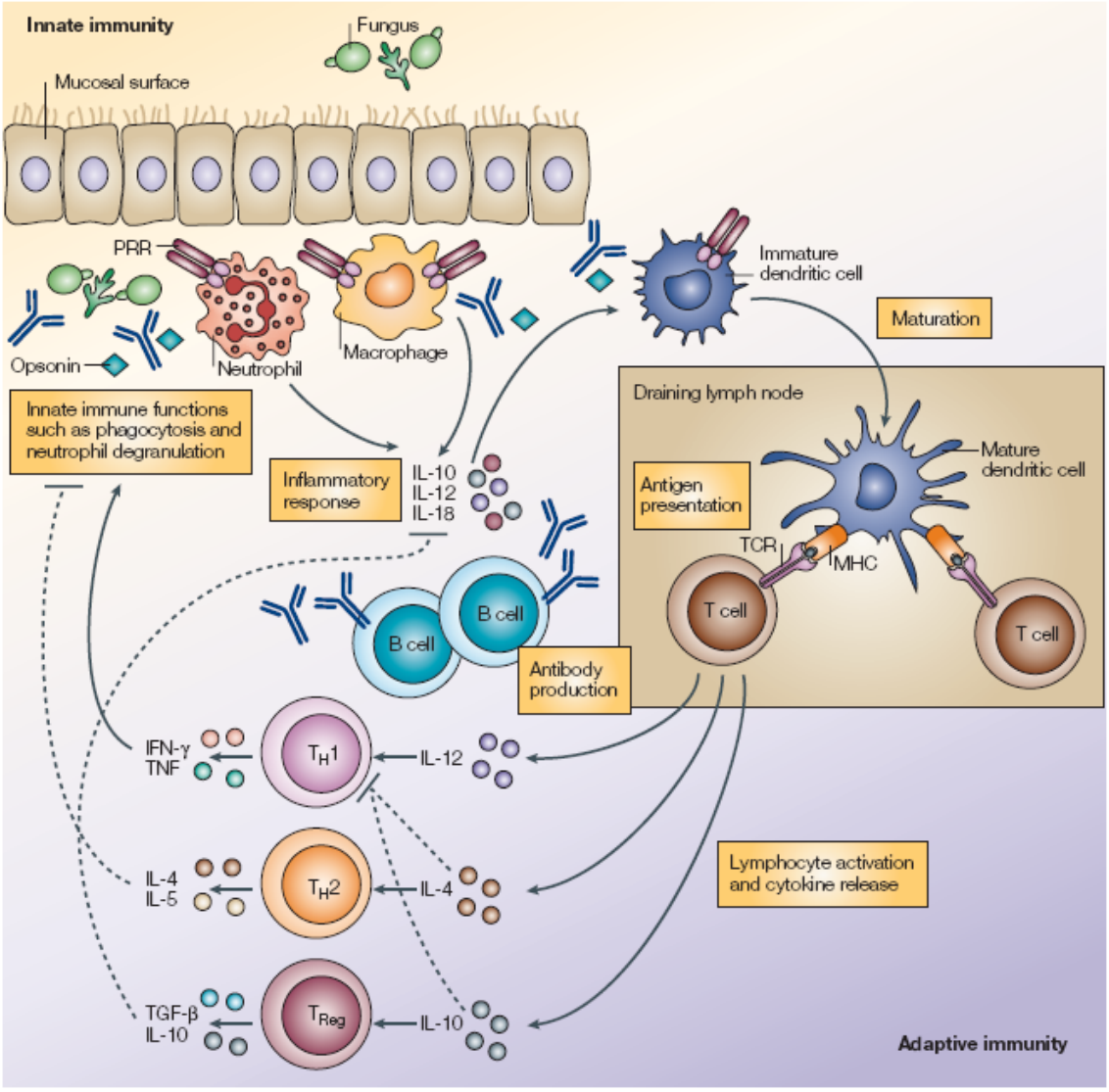


Figure 15 : Coordination de la réponse innée et adaptative face à *C. albicans*. Schéma issu de la revue de Romani (Romani, 2004).

III.2 Les senseurs de l'immunité innée : les PRR

La phagocytose des cellules de *C. albicans* opsonisées par le sérum est réalisée via les récepteurs à complément (CR3 et CR1) et le récepteur à Fc (FcγR). A l'opposé, la reconnaissance de *C. albicans* non-opsonisée est attribuée à d'autres récepteurs PRR. Ces derniers distinguent les cellules du soi et du non soi par la reconnaissance des motifs structuraux et moléculaires, présents sur *Candida* et absents des protéines mammifères, les PAMP. Les différents PRR ainsi que les PAMPs correspondant, identifiés chez *C. albicans*, présentés Figure 16 sont commentés dans cette partie. Ces PRR sont impliqués dans l'initiation de deux activités majeures : la phagocytose et / ou l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoire.

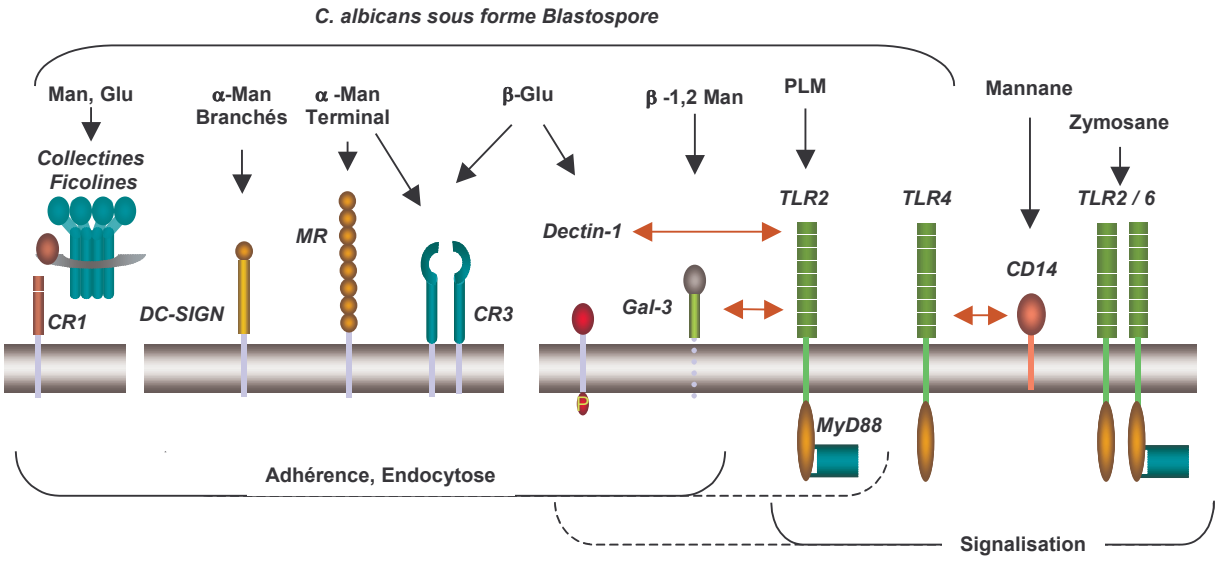


Figure 16 : Les différents récepteurs PRR impliqués dans la reconnaissance de *C. albicans* sous forme blastospore. D'après un schéma de la revue de Poulain et Jouault (Poulain and Jouault, 2004)**.** Man : mannanes, Glu : glucannes et PLM : phospholipomannanes.

III.2.1 Les lectines, des PRR endo-phagocytaires

Les récepteurs à mannose

Le récepteur à mannose (MR) appartient à la famille des lectines de type C, Ca^{2+} dépendante, qui reconnaissent leurs ligands grâce à un domaine de reconnaissance de glucides (Drickamer, 1999). Les MR des macrophages et des CD reconnaissent les **α-oligomannosides** présents à la surface de *C.albicans* et fonctionnent comme un récepteur à endocytose (Sallusto *et al.*, 1995; Stahl and Ezekowitz, 1998). Des expériences *in vitro* ont montré que ce récepteur

reconnaissait préférentiellement *C. albicans* sous forme blastospores (d'Ostiani *et al.*, 2000). La forme filamenteuse serait alors reconnue par les récepteurs CR3 et FcγR. En plus de son rôle dans la phagocytose, de nombreux résultats suggèrent *in vitro* que le MR serait associé à la production de TNFα, IL-1, IL-6 et GM-CSF (**G**ranulocyte-**M**acrophage **C**olony-**S**timulatinf **F**actor) en réponse à *C. albicans* (Dobozy *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2003; Marodi *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1997). Cependant, la survie *in vivo* de souris MR-/- infectées par *C. albicans* n'est pas significativement différente de celle de souris sauvages (Lee *et al.*, 2003).

Les DC-SIGN

Les CD possèdent également un autre PRR appartenant à la famille des lectines de type C : le DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM Grabbing Nonintegrin) qui permet la liaison des CD aux **α-oligomannosides** branchés de *C. albicans* et ainsi l'ingestion de ce dernier (Cambi *et al.*, 2003). Contrairement aux récepteurs MR, DC-SIGN est doté d'une faible activité phagocytaire et a besoin de coopérer avec le récepteur Dectine-1 (voir ci-dessous (Taylor *et al.*, 2004)).

Les récepteurs Gal3

Le galectine 3 (Gal3), une S-lectine, appartient à la famille des galectines qui reconnaissent spécifiquement des galactosides. Cependant, Gal3 est doté d'un domaine de reconnaissance de glucides différent de celui de Gal1, ce qui lui permet de se lier paradoxalement aux **β(1-2)-oligomanannes** présents à la surface de *C. albicans* (Fradin *et al.*, 2000; Kohatsu *et al.*, 2006). Ces récepteurs sont très exprimés chez les macrophages activés et les CD immatures (Dietz *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003), deux types cellulaires dédiés à la reconnaissance de pathogènes lors d'infection, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment. Des études menées très récemment suggèrent que Gal3, seul, ne serait pas essentiel à l'endocytose du pathogène mais induirait, en s'associant avec le « toll like receptor » 2 (TLR2), une très forte production de facteurs de nécrose tumorale (TNFα), en présence de *C. albicans* (Jouault *et al.*, 2006).

Les β1-2 oligomannosides reconnus par ce récepteur sont d'importants immunomodulateurs. Des anticorps IgG3 dirigés contre cet épitope liés aux PPM et aux PLM ont été isolés chez des patients atteints de candidoses (Poulain *et al.*, 1993). Il a également été démontré que la

colonisation par *C. albicans* du tractus digestif de souriceaux pouvait être nettement diminuée par pré-traitement avec des β1-2 oligomannosides (Dromer *et al.*, 2002).

Les récepteurs Dectine-1 et Dectine-2

Dectine-1 est un autre récepteur pour *C. albicans*, présent sur les macrophages et les CD, il reconnaît les **β-glucanes** (Brown and Gordon, 2001). Ces derniers, situés à l'intérieur des couches de la paroi de *C. albicans*, sont masqués ; ils deviennent accessibles à la Dectine-1 uniquement au niveau des cicatrices de bourgeonnement des blastospores, et ils sont absents des hyphes de *C. albicans*. Encore une fois *C. albicans*, sous forme filamenteuse déjoue le système de reconnaissance de l'hôte. Dectine-1 a été décrit comme un co-récepteur qui collabore avec TLR2 ; ensemble, ils coordonnent la réponse inflammatoire en réponse aux β-glucanes par l'augmentation très forte de la sécrétion de TNFα et de IL-12 et par la production de ROI (Brown *et al.*, 2003; Gantner *et al.*, 2003; Suram *et al.*, 2006). Cependant, des expériences récentes tendent à montrer que le récepteur Dectine-1 serait capable, indépendamment du récepteur TLR2, d'induire la production de cytokines en réponse à la reconnaissance des β-glucanes (Gross *et al.*, 2006; McCann *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2005).

Très récemment, McGreal *et al.*, ont démontré que le récepteur Dectine-2, qui se lie au mannose et au fructose, était aussi capable de reconnaître *C. albicans* (McGreal *et al.*, 2006). Ce récepteur, comme Dectine-1, est exprimé chez les macrophages et les CD. Toutefois, la sur-expression de Dectine-2 n'augmente pas la capacité du macrophage à se lier à *C. albicans*. Le rôle de Dectine-2 dans la reconnaissance immunitaire de *C. albicans* reste encore inconnu.

III.2.2 Les TLR des PRR de signalisation

La famille des TLR

A l'origine, *Toll* a été identifié comme un gène de la drosophile important pour l'ontogenèse et la résistance antimicrobienne (Hoffmann and Reichhart, 2002). Par la suite, plusieurs orthologues de Toll nommés « Récepteurs de type Toll » (TLR) ont été identifiés chez les mammifères. Les TLR sont une famille de 10 récepteurs cellulaires spécialisés dans la détection de pathogènes, leur structure est extrêmement conservée chez les mammifères. Les TLR induisent une réponse cellulaire en fonction des PAMPs présents à la surface du pathogène. Ces derniers peuvent être aussi bien de structure lipidique, nucléique ou glycanique. Chacun des TLR, mis à part le TLR3 (Akira *et al.*, 2003), peut induire une voie

de signalisation via l'adaptateur MyD88 qui mène à l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF-kB) (Dunne and O'Neill, 2003; Muzio *et al.*, 1997). Cette étape induit la transcription de gènes de régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Une autre protéine (Mal/TIRAP) sert de molécule adaptatrice pour le TLR3. Mal/TIRAP est également un adaptateur avec ou en complément de MyD88 pour TLR4 (Fitzgerald *et al.*, 2001).

Les TLR impliqués dans la reconnaissance de C. albicans

Comme chez *Aspergillus fumigatus* et *Cryptococcus neoformans* (Dubourdeau *et al.*, 2006; Yauch *et al.*, 2004), les TLR2 et TLR4 sont les TLR principaux de la reconnaissance de *C. albicans* par l'hôte (Bellocchio *et al.*, 2004; Netea *et al.*, 2004; Villamon *et al.*, 2004). En effet, les souris TLR2-/- paraissent plus résistantes aux infections dues à *C. albicans* et présenteraient un profil de production de cytokines pro-inflammatoires non altéré ; par contre, la production de IL-10 de ces souris serait fortement compromise et accompagnée d'une réduction du nombre de cellules régulatrices $CD4^+/CD25^+$ T_{reg} (voir III.3.3) (Netea *et al.*, 2002). A l'opposé, d'autres résultats tendent à montrer que l'inactivation du TLR2 ou du TLR4 n'aurait pas d'effets significatifs sur la survie des souris infectées par des blastospores de *C. albicans*, tandis que l'injection de cellules de *C. albicans* sous forme filamenteuse à ces mêmes souris induirait une forte mortalité (Bellocchio *et al.*, 2004). Dans d'autres expériences, TLR2 est décrit comme essentiel pour la résistance de l'hôte à *C. albicans* en induisant la production de cytokines TNFα et de chemokines MIP-2 en réponse aux deux morphotypes de *C. albicans* (Villamon *et al.*, 2004). Ces résultats contradictoires montrent la complexité des mécanismes impliqués dans la reconnaissance de *C. albicans* : bien que plusieurs récepteurs aient été identifiés au niveau cellulaire, l'influence de chacun de ces récepteurs au niveau de la réponse de l'hôte reste à clarifier. Les expériences menées jusqu'à présent ont surtout identifié des sucres comme ligands des TLR, à l'exception du PLM qui est aussi décrit comme se liant au TLR2 (Jouault *et al.*, 2003). Ce glycolipide serait également impliqué dans l'évasion de *C. albicans* une fois endocytée par les macrophages en induisant l'apoptose de celles-ci (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003).

La coopération des TLR avec d'autres co-stimulateurs

La compréhension de l'implication de chacun des TLR est d'autant plus compliquée que, depuis peu, il a été démontré que ces récepteurs de signalisation s'associent avec des co-stimulateurs pour l'orchestration de la réponse immunitaire. Comme nous l'avons déjà signalé

précédemment, la reconnaissance des β-glucanes présents sur le zymosan (préparation pariétale de *S. cerevisiae*) par les macrophages et sur les CD se produit via Dectine-1, un récepteur endo-phagocytaire. Il semble que cette reconnaissance nécessite la collaboration de Dectine-1 avec le TLR2 qui est recruté au niveau du phagosome (Gantner *et al.*, 2003). Dectine-1 se lierait alors aux β-glucanes et le couple TLR2/CD14 à d'autres composants de la paroi qui restent encore à caractériser. La production de cytokines TNFα et IL-12 via la voie MyD88 dépendante serait ainsi activée. Une association entre TLR2 et TLR6 a également été démontrée en utilisant le zymosan comme PAMP (Underhill *et al.*, 1999). De plus, CD14 est nécessaire à la reconnaissance des mannanes par TLR4 (Tada *et al.*, 2002). Les résultats de Jouault *et al*. suggèrent que les β(1-2) mannosides spécifiques de *C. albicans* seraient reconnus via un mécanisme impliquant à la fois Gal3 et TLR2 (Jouault *et al.*, 2006).

III.3 Le rôle instructif des cytokines dans l'induction de la réponse adaptative

III.3.1 Les CD : à l'interface hôte/pathogène

Les CD acquièrent des antigènes dans les tissus périphériques puis migrent vers les organes lymphoïdes. Nous venons de voir que le système de l'immunité innée utilise un large panel de récepteurs de reconnaissance microbienne qui comprend majoritairement les TLR et les lectines pour identifier des pathogènes potentiels. En fonction des PAMP perçus et des PRR activés, les CD émettront des signaux distincts qu'ils transmettront aux cellules T.

La sous population des lymphocytes T comprend les cellules « CD4 T helper » qui sécrètent des cytokines et les cellules CD8 qui sont principalement des cellules cytotoxiques tueuses. Il existe plusieurs types de cellules CD4, comprenant les cellules « helper » de type 1 (Th1) et de type 2 (Th2). Durant les 20 dernières années, les infections fongiques (et les maladies qui leurs sont associées) ont été expliquées par l'équilibre subtil de la balance Th1-Th2. Cependant cette représentation de la réponse adaptative est aujourd'hui dépassée (McGuirk and Mills, 2002). Il semble désormais que des cellules régulatrices (T_{reg}) contrôlent les réponses inflammatoires Th1 et Th2 (voir ci-dessus et Figure 17).

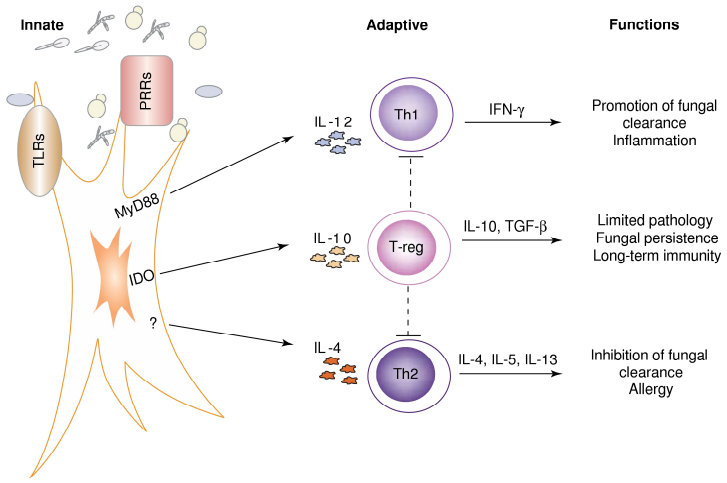


Figure 17 : La réponse adaptative en fonction des cytokines sécrétées par les CD en réponse à *C. albicans*.

Schéma issu de la revue de Romani (Romani and Puccetti, 2006).

III.3.2 La réponse Th1 et Th2

Les cellules Th1 sécrètent des TNFα et des IFNγ qui stimulent la migration, l'adhérence, la phagocytose et l'activité oxydative candicide des neutrophiles et des macrophages. La sécrétion locale de cytokines IL-6, IL-12, TNFα est stimulée et augmente l'activité candicide des phagocytes ; la réponse inflammatoire se propage alors (cf. revue (Rodriguez-Adrian *et al.*, 1998)). IL-12, aidé par IL-18, induit la synthèse d'IFNγ, une cytokine clef dans le contrôle de l'infection fongique chez la souris et chez l'homme (Romani *et al.*, 1997). En effet, la production d'IFNγ par les phagocytes et les NK entretient également la réactivité des cellules Th1 en maintenant la capacité de réponse des cellules T $CD4^+$ à répondre aux IL-12. Ainsi, la réponse Th1 confèrerait une immunité protectrice contre *Candida* en activant la réponse inflammatoire ; d'autre part, l'activation des cellules Th1 CD4 dépendrait de l'IL-12 sécrétée par les cellules phagocytaires (Mencacci *et al.*, 1998).

La production de IL-4 active les cellules Th2 qui, à leur tour, sécrètent des interleukines IL-4, IL-5 et IL-13. Ces cytokines inhibent les fonctions candicides des cellules effectrices ; la réponse Th2 amortit ainsi la réponse protectrice Th1 et favoriserait donc les allergies aux champignons (Delves and Roitt, 2000; Montagnoli *et al.*, 2006).

III.3.3 La réponse adaptative : un équilibre subtil entre Th1, Th2 et Treg

TGF-β (**T**ransforming **G**rowth **F**actor) et IL-10 sont produits lors de candidoses invasives (Letterio *et al.*, 2001). Ils agissent en tant qu'inhibiteur de cytokines pro-inflammatoires comme IL-12 en particulier. Il semblerait que les cellules de régulation T_{reg} soient une source majoritaire, voir principale, de l'interleukine IL-10 en plus (ou à la place) des cellules Th2 et des phagocytes. Il existe différents types de cellules T_{reg}. Parmi ceux-ci, les CD4cCD25c T_{reg} exercent plusieurs modes d'actions suppressives. Comme la sécrétion de cytokines inhibitrices IL-10 et TGF-β. D'autre part, elles favorisent les contacts cellule-cellule via l'antigène associé aux lymphocytes cytotoxiques T (CTLA)-4 (Fallarino *et al.*, 2003; O'Garra and Vieira, 2004). De plus, il a également été démontré que l'induction des cellules CD4cCD25c T_{reg}, lors de candidoses, est dépendante du co-stimulateur B7 et des récepteurs TLR (Netea *et al.*, 2004).

L'induction de ces cellules implique également la voie IFNγ/IDO-dépendante (Bozza *et al.*, 2005; Romani *et al.*, 2006). Des études récentes suggèrent que la réponse inflammatoire fongique serait contrôlée par la voie du catabolisme du tryptophane médié par l'enzyme indole 2,3-dioxygénase (IDO). Lors de candidoses, l'activation de l'IDO au niveau des sites de l'infection, a lieu dans les CD et les neutrophiles via un mécanisme INFγ- / CTLA-4-dépendant. Une inhibition de l'IDO aggrave grandement l'infection fongique ; elle est associée à des pathologies inflammatoires, caractéristique d'une immunité innée et adaptative/régulatrice dérégulées (Romani *et al.*, 2006).

Les cellules T_{reg}, probablement activées par l'IDO, semblent avoir un rôle central dans l'activité régulatrice lors d'infections fongiques : elles inhibent certains aspects de la réponse innée et de la réponse adaptative. Les réponses immunes ainsi générées permettraient une défense de l'hôte adéquate sans éliminer nécessairement le pathogène ou sans causer un niveau inacceptable de dommages des cellules hôtes. Cet amortissement de la réponse protectrice Th1 de l'hôte permet le développement de l'immunité mémoire et prévient également les pathologies inflammatoires.

III.3.4 Le rôle du dimorphisme de C. albicans dans la réponse adaptative

Bien que les deux formes de *C. albicans*, filamenteuse et blastospore, soient présentes dans les tissus infectés, il est clair que la virulence de ce pathogène est dépendante de la forme sous

laquelle le pathogène se trouve. Des études suggèrent que la capacité candicide des macrophages, neutrophiles ainsi que des CD serait morphotype dépendante ((Blasi *et al.*, 1995; Mullick *et al.*, 2004; Torosantucci *et al.*, 2002) ; S. Bellocchio communication personnelle). La reconnaissance par les phagocytes des deux formes du pathogène impliquerait des PRR et des TLR différents ; les cytokines sécrétées en conséquences seraient également morphotype dépendantes (Bellocchio *et al.*, 2004; Chiani *et al.*, 2000; van der Graaf *et al.*, 2005; Villamon *et al.*, 2004). Ainsi, les CD reconnaissent les blastospores via les récepteurs MR et CR3 ; les IL-12 sécrétées induisent alors une réponse protectrice de type Th1. A l'opposé la co-ligation des hyphes aux récepteurs CR3 et FcγR des CD induit une réponse immunitaire tolérante Th2/T_{reg} caractérisée par la production de IL-4 et IL-10 (cf. Figure 18, (Romani *et al.*, 2002)).

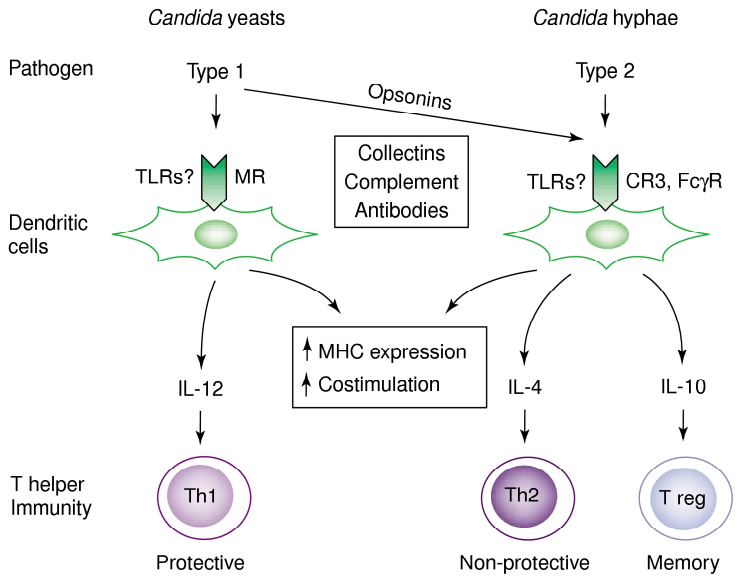


Figure 18 : Activation de la réponse adaptative de l'hôte en fonction du morphotype de *C. albicans*. D'après un article de Romani (Romani *et al.*, 2002).

En favorisant la tolérance et en étant capable d'échapper à la reconnaissance des phagocytes (voir le paragraphe III.2.1 sur la Dectine-1), la forme filamenteuse pourrait contribuer au commensalisme de *C. albicans* sur les muqueuses gastro-intestinale et génito-urinaire de l'hôte. L'équilibre entre la réponse inflammatoire et anti-inflammatoire est un pré-requis pour une interaction hôte/pathogène stable et réussie. Mais cet équilibre est fragile et peut être rompu et mener à l'infection ; ceci est observé chez les patients présentant un système immunitaire défaillant (cf. I.2.2).

PROJET DE THESE

Travaux antérieurs au projet de thèse réalisés au laboratoire

Les travaux menés jusqu'ici au laboratoire portaient non pas sur une protéine à ancre GPI (GpiP) mais sur une enzyme de la voie de biosynthèse de l'ancre GPI, Gpi7p (cf. Introduction II.3.1). Les premières études réalisées montraient que l'absence de Gpi7p affectait l'intégrité de la paroi (formation d'agrégat, hypersensibilité au SDS et au CFW) ainsi que la morphogenèse de *C. albicans* (Richard *et al.*, 2001). Des analyses plus précises de la composition et la structure de la paroi ont mis en évidence que l'addition d'une éthanolamine sur l'ancre GPI par Gpi7p avait un rôle dans l'ancrage des GpiP pariétales. La délétion de *GPI7* se traduit donc par une diminution des mannoprotéines liées à la paroi, en effet ces protéines mal ancrées sont relarguées dans le milieu (Richard *et al.*, 2002) alors qu'il semble que les GpiP membranaires ne soient pas affectées. De plus, une expérience d'infection systémique effectuée avec ce mutant montre que la souche mutante a une virulence réduite par rapport à sa souche de référence. Des expériences *in vitro* montrent également que *gpi7*-/- est plus sensible à la phagocytose des macrophages. Toutes ces données sur *gpi7*-/- renforcent l'idée que la classe des GpiP pourrait avoir un rôle clef dans les interactions de *C. albicans* avec son environnement. A l'heure actuelle, le génome de *S. cerevisiae* posséde 40 % de gènes codant des GpiP putatives en moins que celui de *C. albicans.* D'autre part, 65 % de ces protéines, identifiées par P. de Groot chez ce pathogène, exercent des fonctions inconnues suggérent l'implication des GpiP dans la virulence de ce dernier (cf. Revue).

Objectif du projet

Plus précisément, cette thèse avait pour objectif une meilleure compréhension du rôle des protéines à ancre GPI dans ses interactions de *C. albicans* avec l'hôte. Nous avons abordé cette problématique par deux approches :

1) L'analyse globale des GpiP par l'étude des phénotypes associés à l'interruption individuelle des différents gènes codant une GpiP ;
2) l'étude approfondie du rôle de *gpi7*-/- dans la réponse innée.

Ces connaissances pourraient, à plus long terme, être utilisées pour l'identification de nouvelles cibles pour des antifongiques.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

I.1 Matériel biologique

I.1.1 Souches des différents microorganismes utilisés

La première étape de mon travail consistait en la création d'une banque de mutants, ces derniers sont décrits dans la partie Résultats (I.1.3.). Le Tableau II, ci-dessous liste les souches obtenues par d'autres laboratoires qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail.

Tableau II. Liste des souches utilisées pour ce travail de thèse

Souche	Souche parentale	Description	Référence
Escherichia coli			
JM109		e14$^-$(McrA$^-$) *recA1 endA1* gyrA96 *thi-1 hsdR17* (r_k^- m_k^+) *supE44 relA1* Δ(lac-proAB) [F′ traD36 proAB *lacI^{q}ZΔM15*]	(Yanisch-Perron *et al.*, 1985)
DH5α		F$^-$ ϕ80d *lacZΔM15* Δ*lacZYA-argFU169 recA1 endA1 hsdR17* (r_k- m_k-) *supE44 thi1 gypA relA1*	(Hanahan, 1983)
Saccharomyces cerevisiae			
S288C		*MAT*alpha *SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1*	(Mortimer and Johnston, 1986)
Candida albicans			
ATCC90028		American Type Culture Collection	isolat clinique
SC5314	Isolat clinique	Souche sauvage de *C. albicans*	(Gillum *et al.*, 1984)
BWP17	CaI4[2]	*his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/ arg4::hisG*	(Wilson *et al.*, 1999)
DAY286	BWP17	Δ*ura3::imm434*/Δ*ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG ARG4:URA3 ::arg4::hisG/arg4::hisG*	(Davis *et al.*, 2000)
DAY185	BWP17	Δ*ura3::imm434*/Δ*ura3::imm434 his1::hisG::pHIS1/his1::hisG ARG4: URA3::arg4::hisG/arg4::hisG*	(Davis *et al.*, 2000)
CaI4*	SC5314	Δ*ura3::imm434*/Δ*ura3::imm434*	(Fonzi and Irwin, 1993)
gpi7-/-	CaI4	*gpi7::hisG/gpi7::hisG-CaURA-hisG*	(Richard *et al.*, 2002)

[2] Toutes les souches issues de CaI4 sont Δ*ura3::imm434*/Δ*ura3::imm434*.

gpi7-/- GPI7	CaI4	*gpi7::hisG-CaURA-hisG/pGPI7 ::URA3*	(Richard *et al.*, 2002)

Souche	Souche parentale	Description	Référence
CAS8 *phr1-/-*	CaI4	*phr1::hisG/phr1::hisG*	(Muhlschlegel and Fonzi, 1997)
CFM2 *phr2-/-*	CaI4	*phr2::hisG/phr2::hisG*	(Muhlschlegel and Fonzi, 1997)
sod5-/-	CaI4	*sod5::hisG/sod5::hisG-URA-hisG*	(Fradin *et al.*, 2005)
sap10-/-	CaI4	*sap10::hisG/sap10::hisG-URA-hisG*	(Albrecht *et al.*, 2006)
3054-21 *ssr1-/-*	CaI4	*ssr1::hisG/ssr1::hisG-URA-hisG*	(Garcera *et al.*, 2003)
Bca7-4 *rbt1-/-*	CaI4	*rbt1::hisG/rbt1::hisG-URA-hisG*	(Braun *et al.*, 2000)
Bca18-2 *rbt5-/-*	CaI4	*rbt5::hisG/rbt5::hisG-URA-hisG*	(Braun *et al.*, 2000)
csa1-/-	CaI4	*csa1::hisG/csa1::hisG-URA-hisG*	(Lamarre *et al.*, 2000)
CAH7 *hwp1-/-*	CaI4	*hwp1::hisG/hwp1::hisG-URA-hisG*	(Staab *et al.*, 1999)
pga31-/-	CaI4	*pga31::hisG/pga31::hisG-URA-hisG*	Laboratoire de R. Santendreu (Espagne)
pga59-/-	BWP17 ura+	*pga59::HIS1/pga59::ARG4 ura3/ura3::hisG his1/his1::hisG*	Laboratoire de C. d'Enfert
pga62-/-	BWP17 ura+	*pga62::HIS1/pga62::ARG4 ura3/ura3::hisG his1/his1::hisG*	Laboratoire de C. d'Enfert

I.1.2 Les cellules de mammifères

La lignée cellulaire

La lignée cellulaire utilisée, J774, est issue d'une tumeur de souris BALB/c. Ces cellules matures présentent les principales caractéristiques des macrophages; cependant elles n'expriment pas le récepteur spécifique du mannose (MR, cf. Discussion) (Fiani *et al.*, 1998).

Les macrophages résidents péritonéaux de souris

Les macrophages du péritoine sont isolés à partir de souris (cf. I.1.3) comme décrit dans le paragraphe II.4.2.

Le sang humain

Le sang humain a été prélevé sur de jeunes donneurs sains à l'hôpital « Centro de Salud de Valencia » (Pintor Stolz) de Valence (Espagne).

I.1.3 Les souris

Lors de nos expériences, nous avons utilisé des souris C57BL/6 (Harlan Ibérica, Barcelona, Espagne) comme contrôle ainsi que des souris C57BL/6 ayant le gène *TLR2* (TLR2-/-) (Takeuchi *et al.*, 1999) ou *TLR4* (TLR4-/-) inactivé (Hoshino *et al.*, 1999), fournies par Dr. S. Akira (Université d' Osaka, Japon). Toutes ces souris étaient âgées de 7 à 12 semaines.

I.2 Les plasmides

Pour les étapes de disruption des gènes codant potentiellement des protéines à ancre GPI, des plasmides correspondant à chaque étape de construction de la cassette UAU1 ont été obtenus :

- pGEM-T X : correspondant aux plasmides contenant le cadre ouvert de lecture (ORF) d'un des gènes cibles X.
- pGEM Tn-X : est le plasmide contenant la cassette de disruption pour le gène X correspondant au plasmide pGEM-T X ayant intégré le transposon portant la cassette UAU1 (Tn UAU1) après transposition *in vitro*.

Seuls les plasmides reçus pour cette étude seront décrits ci-dessous dans le Tableau III.

Tableau III. Liste des plasmides utilisés lors de ce travail pour la construction des cassettes de disruption.

Plasmides	Description	Référence
pGEM-T	vecteur permettant le clonage de fragments de PCR	easy vector system (Promega, Madison, USA)
pAED98	plasmide donneur de la cassette UAU1 par transposition, construit à partir de pGPS3	(Davis *et al.*, 2002)
CAGB465	pGEM-T contenant la cassette UAU1 insérée dans Orf19.3638	A. Mitchell

I.3 Produits et enzymes

Les enzymes, sauf indications contraires, ont été achetées chez New England Biolabs (Madison, USA). Tous les produits utilisés sont de qualité pour la biologie moléculaire achetés chez SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Allemagne), sauf indications contraires.

I.4 Milieux de culture

Milieu de culture complet pour E. coli : LB

– 10 g/L bacto tryptone,

– 5 g/L extrait de levure,

– 10 g/L NaCl.

De l'ampicilline et du kanamycine ont été ajoutés en fonction des plasmides manipulés aux concentrations respectives de 100 µg/ml et 20 µg/ml.

Milieu complet de croissance des levures : YPD

– 10 g/L bacto peptone,

– 5 g/L extrait de levure,

– 10 g/L glucose.

Milieu minimum de croissance et de sélection des transformants de C. albicans : SC

– 1,7 g/L mélange d'acides aminés (cf. liste ci-dessous),

– 1,7 g/L YNB (**Y**east **N**itrogen **B**ase) sans sulfate d'ammonium ni acides aminés,

– 5 g /L sulfate d'ammonium,

– 20 g/L glucose.

Mélange d'acides aminés sans histidine, uridine, arginine:

– 0,5 g d'adénine,

– 2 g inositol, proline, alanine, isoleucine, serine, cystéine, thréonine, glutamine, lysine, tryptophane, glycine, méthionine, tyrosine, phénylalanine, valine,

– 10 g leucine.

Suppléments pour complémentation d'auxotrophie (concentrations finales) :

– Uridine 50 mg/L,

– Histidine 2 mg/L,

– Arginine 4 mg/L.

Milieux inducteurs de filamentation chez C. albicans :

– Milieu Spider (1 % « nutrient broth » (Difco, MD, Etats-Unis), 1 % mannitol, 0,2 % K_2HPO_4),

– Milieu Sérum (5% de sérum de veau fœtal, eau).

*Milieu inducteur de formation de chlamydospore chez C. albicans : CMA (**C**orn **M**eal **A**gar)*

– 17 g/L mélange d'agar et de maïs

– 0,033 % de Tween80.

Milieux de culture des cellules mammifères :

– Les macrophages J774 sont cultivés en flacon de 75 cm^2 dans un milieu de culture D10 composé de DMEM (**D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (PAA, Pasching, Autriche), 2 mM de glutamine, 100 µg/ml de streptomycine, 50 µg/ml de pénicilline.

– Les macrophages péritonéaux sont cultivés en plaques de microtitration de 96 puits dans un milieu de culture Mϕ composé de RPMI-1640 (**R**oswell **P**ark **M**emorial **I**nstitute) supplémenté de 5 % de sérum de veau fœtal, 100 µg/ml de streptomycine et de pénicilline, et 5000 Unité/L d'héparine.

Toutes les expériences de culture cellulaire ont été réalisées :

– dans des conditions minimisant la présence d'endotoxine qui contamine les milieux et les solutions utilisées. De l'eau commerciale ainsi que du PBS (**P**hosphate **B**uffered **S**aline) (Gibco, Carlsbad, Etats-unis) sans endotoxines ont été utilisés et les milieux de culture des levures ont été décontaminés en utilisant de l'agar polymyxinB (1 ml / 50 ml YPD à décontaminer). Tous les milieux sont conservés et cultivés dans des récipients en plastique. Un millilitre de polymyxinB est centrifugé, le culot est ensuite lavé deux fois avec 500 µl d'acide desoxicolique 1 %, suivi de deux autres lavages avec de l'eau. Le culot est ensuite resuspendu dans un peu d'YPD, puis ajouté au 50 ml d'YPD. Après une étape de filtration le milieu de culture est stocké dans une bouteille en plastique,

– en utilisant un sérum préalablement décomplémenté par une étape de 30 minutes à 56 °C.

II. METHODES

II.1 Techniques de préparation et d'analyse des acides nucléiques

II.1.1 Préparation d'ADN plasmidique d'E. coli

Les ADN plasmidiques des bactéries recombinantes ont été préparés en utilisant le Kit « QIAprepTM Spin Miniprep » (Qiagen, Hilden, Allemagne) ou le Kit « Montage Plasmid miniprep96 Kit » (Millipore, Bedford USA) quand un nombre important de préparation d'ADN plasmidique pouvait être réalisé en même temps. Toutes ces préparations ont été effectuées en suivant les recommandations des fournisseurs : l'extraction d'ADN se fait par lyse alcaline et la purification des plasmides s'effectue sur des colonnes d'affinité.

II.1.2 Préparation d'ADN génomique de C. albicans

L'ADN génomique de *C. albicans* a été extrait en suivant un protocole légèrement modifié de celui mis au point par Querol (Querol *et al.*, 1992).

- La souche d'intérêt est cultivée la nuit dans 5 ml d'YPD à 30 °C.
- Après centrifugation le culot cellulaire est repris dans 0,5 ml de la solution d'extraction T1 (sorbitol 1 M, EDTA 0,1 M pH 8) auxquels sont ajoutés 4 µg de zymolase 100T (Seikagaku corporation, Tokyo, Japon) afin de former des protoplastes par digestion enzymatique de la paroi.
- Après une heure d'incubation à 37 °C, le mélange est centrifugé, le culot est alors re-suspendu dans une solution T2 (Tris/HCL 50 mM pH = 7,5 ; EDTA 20 mM).
- L'ajout de 50 µl de SDS 10 % est suivi d'une étape d'incubation de 30 min à 65 °C.
- 200µl de K-Acétate 5M est ajouté au mélange, après une étape d'incubation d'au moins 30 min à 0 °C, le mélange est centrifugé.
- L'ADN est précipité avec 0,7 ml d'isopropanol. L'ADN génomique est dilué dans 400 µl d'eau puis reprécipité en présence de 40 µl de NaAcetate 2,5 M et 1 ml d'éthanol 100 %.
- Le culot de centrifugation est re-suspendu dans 100 µl d'eau puis traité à la Rnase (100 µg/ml concentration finale) à 37 °C pendant 15 min.

II.1.3 Amplification d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les PCR sont réalisées dans un thermocycleur à gradient Eppendorf en utilisant de l'ADN polymérase, Taq (Promega, Madison, USA). Toutes les PCR utilisant de l'ADN génomique ou plasmidique comme matrice ont été réalisées en suivant les instructions du fournisseur de la Taq (sauf indications contraires) après optimisation de la concentration de $MgCl_2$.

Le génotype des transformants de *C. albicans* a été vérifié par PCR sur une colonie isolée en utilisant la solution tampon de la Taq HotMaster de chez Eppendorf. Le programme suivant a été utilisé :

1) 5' à 94 °C,
2) ajouter 0,5 µl de Taq par réaction puis une goutte d'huile,
3) 20'' à 94 °C,
4) 20'' à 52 °C
5) 4' à 65 °C,
6) 12' à 72 °C,
7) 10' à 10 °C,

les étapes 3 à 5 sont répétées trente cinq fois.

II.1.4 Ligation de fragments d'ADN

Tous les fragments de PCR sont ligaturés dans un plasmide commercialisé déjà linéarisé, pGEM-T, fourni dans le kit « easy vector system » (Promega, Madison, USA). Ces ligations sont réalisées en suivant les recommandations du fournisseur qui impose l'utilisation d'un fragment de PCR contenant une queue polyA.

II.1.5 Transposition in vitro

Toutes les transpositions *in vitro* ont été réalisées grâce à un kit GPS-Mutagenesis utilisant la transposase TnABC (New England Biolabs, Madison, USA) en suivant les instructions du constructeur. La transposase TnABC est un complexe protéique où la TnsA et la TnsB clivent le fragment d'ADN à transposer ; TnsC interagit avec la TnsB. Cette réaction est possible grâce à la mutation insérée dans la TnsC qui permet de réaliser la transposition sans la TnsD et la TnsE habituellement nécessaires. L'absence de TnD et TnE rend l'insertion du transposon aléatoire. De plus, ce kit utilise le transposon Tn7 qui a l'avantage de ne s'insérer qu'une seule fois par réplicon. Pour chaque réaction, 20 ng du plasmide donneur (pAED98) et

80 ng de plasmide receveur (pGEM-T X) sont incubés en présence de la TnABC pendant une heure à 37 °C. Après l'étape de transposition, la TnABC est inactivée pendant 10 min à 75 °C. Afin d'éliminer les plasmides donneurs intacts, le mélange est incubé pendant 1 h à 37 °C avec PI-SceI, une enzyme à site de restriction rare qui est présent dans le squelette du plasmide donneur. Après une étape d'inactivation de PI-SceI de 10 min à 75 °C, le produit de réaction est transformé dans *E. coli*. L'optimisation de cette méthode a demandé beaucoup de temps et l'utilisation d'eau Sigma et de la souche *d'E. coli* JM109 ont grandement amélioré les rendements de la transposition.

II.1.6 Méthode du Southern Blot

Afin de confirmer les génotypes des mutants prometteurs à l'issue de l'étude phénotypique, des Southern blot ont été réalisés grâce à un transfert d'ADN par capillarité sur membrane nylon N^+ (Amersham, Little Chalfont, UK) en suivant les protocoles de Southern (Southern, 1975) et Sambrook (Sambrook J.E., 1989).

II.2 Techniques de transformation

II.2.1 Transformation de la bactérie E. coli

Toutes les transformations de DH5α par choc thermique on été effectuées en suivant le protocole mis au point par Hanahan *et al*. (Hanahan, 1983).

II.2.2 *Transformation de la levure C. albicans*

Toutes les transformations de *C. albicans* ont été effectuées en utilisant BWP17 comme souche receveuse. La méthode d'acétate de lithium utilisée dérive de celle décrite par Kaiser *et al*. (Kaiser, 1994) :

- Une culture de 50 ml d'YPD, ensemencée à DO_{600nm} 0,1-0,2 à partir d'une pré-culture liquide, est incubée pendant 4-5 h à 30 °C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,4 à 0,8.
- Les cellules sont lavées une première fois dans du tampon TE (0,1 M TrisHcl, 0,01 M EDTA, pH 8), puis dans 1 ml d'une solution fraîche d'acétate de lithium et de TE (4 ml H_20 + 500µl de TE 10X + 500 µl de LiAc 1 M).
- Les cellules sont ensuite concentrées deux fois dans la même solution. La transformation s'effectue en ajoutant 10 µl d'ADN entraîneur (5 mg/ml de sperme de saumon soniqué) et 30 µl d'ADN transformant (environ 1 µg) à 100 µl de cellules compétentes.

– Le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante avant d'y ajouter 700 µl d'une solution de PEG (800 µl de PEG 50 % + 100µl TE 10X + 100 µl de LiAc 1 M).
– Après une étape d'incubation sur la nuit à température ambiante sans agitation, les cellules subissent un choc thermique de 15 minutes à 44 °C.
– Les cellules sont lavées puis resuspendues dans 300 µL d'YNB, 100 µl sont étalés par boîte de milieu minimum SC.

Après 2 jours d'incubation à 30 °C, les transformants apparaissent sur le milieu sélectif.

II.3 Tests phénotypiques

Pour tous les tests phénotypiques, deux clones indépendants de chacun des mutants UAU1 ont été testés et leur croissance sur les différents milieux a été comparée à celle de la souche de référence DAY286. Un seul clone des mutants reçus a été utilisé lors des différents tests effectués, la souche de référence utilisée pour les mutants Ura^+, His^+, Arg^+ obtenus par d'autres laboratoires est DAY185 ou SC5314, tandis que celle utilisée pour les mutants Ura^-, His^+, Arg^+ est CaI4.

II.3.1 Tests en gouttes

Le phénotype de tous les mutants GPI a été étudié en réalisant des tests en gouttes. Les souches sont cultivées une nuit à 30 °C dans 5 ml de YPD et diluées dans de l'eau à une DO_{600nm}= 1. On dépose 5 µl d'une série de six dilutions au dixième sur les milieux suivant :
– YPD contenant 1,25 M NaCl,
– YPD contenant 0,025 % SDS,
– SC tamponné à pH7 contenant 30 µg/ml de Calcofluor White,
– SC tamponné à pH7 contenant 20 mM $FeCl_2$,
– SC tamponné à pH7 contenant 7,5 mM H_2O_2,
– SC tamponné à pH7 contenant 250 µM $CdCl_2$,
– SC tamponné à pH7 contenant 25 mM acide acétique,
– SC tamponné à pH7 contenant 12 µg/ml de caspofungine,
– SC tamponné à pH7 contenant 24 µg/ml de caspofungine,
– SC tamponné à pH7 contenant 36 µg/ml de caspofungine,
– SC tamponné à pH3 en utilisant 50 mM d'acide citrique et citrate de sodium,
– SC tamponné à pH10 en utilisant de la soude et 50 mM de glycine,

– Milieu Spider complémenté en uridine,
– Milieu Sérum 5 % complémenté en uridine (cf. article II.2.3).

Tous ces milieux sont complémentés en histidine, les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C, exception faite pour deux boîtes SC pH7 qui seront incubées à 23 °C et 43,5 °C.

II.3.2 Tests antifongiques en microplaque

La sensibilité *in vitro* des mutants à trois antifongiques (caspofungine, fluconazole et Amphotéricine B) a été déterminée en calculant la concentration minimale d'inhibition (CMI) selon la méthode « microbroth dilution method M27-A2 » (Standards., 2002). La gamme de dilution des différents antifongiques est à réaliser dans la microplaque par des dilutions successives de demi en demi dans du RPMI-1640 pH7. Les gammes finales sont les suivantes :
– fluconazole de 64 µg/ml à 0,125 µg/ml,
– Amphothéricine B de 4 µg/ml à 0,008 µg/ml,
– caspofungine de 2 µg/ml à 0,004 µg/ml.

La première colonne représente le témoin positif sans antifongique et la dernière colonne le témoin négatif sans antifongique ni charge fongique. Les levures sont cultivées sur milieu riche et diluées de telle manière à obtenir une concentration finale dans chaque puits de 0,5 à 2,5 10^3 cellules/ml. Dans chaque plaque la souche ATCC90028 dont la CMI est connue est utilisée comme contrôle. La détermination des CMI se fait au spectrophotomètre à 500 nm après 24 h et 48 h d'incubation à 37 °C. La lecture des résultats varie selon l'antifongique testé :
– pour l'Amphothéricine B la CMI se lit à 48 h et correspond à la plus petite concentration qui inhibe complètement la croissance (100% d'inhibition ou score 0),
– pour les azolés dont le fluconazole, la CMI se lit aussi à 48 h et correspond à la plus petite concentration donnant une réduction significative de la croissance (≥ 50 % d'inhibition, score 2).
– pour la caspofungine, on ne sait pas qu'elle est la valeur la plus pertinente il est donc préférable de lire à 24 h et à 48 h à 100 % et à 50 % d'inhibition. Du fait des difficultés rencontrées avec cet antifongique (cf. article), nous avons décidé de tester le phénotype des mutants en présence de caspofungine par des tests en gouttes (cf. II.3.1).

La CMI de la souche de référence est comparée à celle des mutants. On considère qu'une différence de CMI est significative à partir de deux dilutions de différence.

II.4 Techniques permettant l'étude de la réponse des cellules hôtes

II.4.1 Tests de survie des levures après phagocytose

Test de survie in vitro des levures après phagocytose par les macrophages J774

Cette technique mise au point par T. Jouault (Jouault *et al.*, 1998) a été utilisée dans le but d'identifier dans notre banque des mutants hypersensibles à la phagocytose des macrophages.

Avant chaque test, les cellules macrophagiques de la lignée J774 sont décollées de leur flacon de culture à l'aide d'un grattoir, rincées, comptées et diluées afin d'obtenir une culture cellulaire de $1x10^6$ cellules/ml. Les macrophages sont ensuite transférés dans des plaques 24 puits (500 000 cellules dans 500 µl de D10 par puits). Après 18 h de culture, le milieu est rincé et cinq millions de cellules de *C. albicans* sont ajoutés aux macrophages par puits (ratio 10:1). Dans chaque plaque la souche sauvage de *S. cerevisiae* S288C (viable à 37 °C) ainsi que la souche de référence de chaque mutant de *C. albicans* sont utilisées comme contrôles. Afin d'éliminer les levures n'ayant pas adhéré aux macrophages, deux lavages avec du DMEM sont réalisés à une heure et à deux heures et demie d'incubation (37 °C, 5 % de CO_2). Après l'étape de rinçage au bout des 2h30 de co-culture, on ajoute 500 µl d'H_2O distillée dans chaque puits afin de lyser les macrophages. Les levures phagocytées ainsi libérées sont comptées en cellule de Thomas. Cent levures sont étalées sur milieu riche et après 24 heures d'incubation à 37 °C on compte le nombre d'unités formant colonies CFU (**C**olony **F**orming **U**nit) pour chaque mutant par rapport à celui de sa souche de référence (% $survie_{mutantX}$ = ($CFU_{reference}$*100/$CFU_{mutantX}$).

Deux clones indépendants de chaque mutant UAU1 ont été testés deux fois. Les mutants reçus, pour lesquels nous ne disposions que d'un clone, ont été testés en duplicat dans deux expériences indépendantes. Le pourcentage de survie de chaque mutant représente donc la moyenne de ces quatre données.

Test de survie in vitro des levures après co-culture avec du sang humain

Ce test réalisé avec le mutant *gpi7*-/- consiste à comparer la survie de différentes souches de *C. albicans* dans du sang humain par rapport à leur survie dans du plasma seul.

- Les levures sont préparées à partir d'une culture en phase stationnaire, après deux lavages, le culot cellulaire est repris dans du PBS de manière à obtenir une concentration finale de $75x10^6$ cellules/ml.
- 10 µl de cette suspension de levures sont ajoutés aux 150 µl de sang humain contenu dans un tube eppendorf.
- En contrôle, la même quantité de levures est mise en co-culture avec 150 µl de plasma obtenu à partir du sang du même donneur après une étape de centrifugation de 5 minutes à 1200 rpm afin d'éliminer les cellules du système immunitaire.
- Un échantillon de 50 µl est prélevé dans chaque tube immédiatement après l'ajout des levures ainsi qu'après une heure de co-culture à 37 °C.
- Quatre dilutions successives au dixième de chacun de ces échantillons sont effectuées dans de l'eau.
- 100 µl de la seconde, troisième et quatrième dilutions sont étalés sur milieu riche en duplicat.
- Après 24 h d'incubation à 37 °C, le nombre de CFU est déterminé en tenant compte seulement des dilutions où le nombre de colonies ayant poussé est compris entre 30 et 300.
- Le pourcentage de survie de la souche d'intérêt après co-culture avec du sang ou du plasma se calcule de la manière suivante :
    - $\% \text{ plasma} = CFU_{T1plasma} * 100 / CFU_{T0plasma}$
    - $\% \text{ sang} = CFU_{T1sang} * 100 / CFU_{T0sang}$

Chaque souche a été testée en duplicat trois fois. Le pourcentage de survie de chaque souche représente la moyenne de ces six données.

II.4.2 Production in vitro de cytokines TNFα

Dans le but d'étudier la réponse pro-inflammatoire induite par différentes souches de *C. albicans*, la production *in vitro* de TNFα par des macrophages résidents du péritoine ou des macrophage J774 a été quantifiée en réponse à différents stimuli.

Préparation des stimuli testés

Les deux contrôles positifs suivant ont été utilisés : 10 µg de LPS (**L**ipo**P**oly**S**accharides) d'*E. coli* et / ou 0,5 mg par puits de particules pariétales de levure Zymosan (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Différentes préparations de levures ont été testées :

– 10^6 cellules de *C. albicans* préalablement tuées par la chaleur une heure à 100 °C,
– 10^6 cellules de *C. albicans* préalablement tuées par fixation en utilisant un tampon de fixation contenant 4 % paraformaldéhyde (eBioscience, Diego, USA) pendant 20 min dans l'obscurité,
– 10^6 cellules de *C. albicans* préalablement tuées sous UV comme décrit par Wheeler *et al* ; (Wheeler and Fink, 2006),
– $0{,}25 \times 10^6$ cellules de *C. albicans* vivantes.

L'efficacité des méthodes utilisées pour tuer les levures a été testée en étalant un échantillon d'un million de cellules sur milieu YPD. La survie après étalement était de 10^{-6} pour les traitements à la chaleur et au formaldéhyde et de 10^{-5} pour le traitement par UV.

Préparation des macrophages

Les macrophages de lignée cellulaire J774 sont préparés comme décrit au paragraphe II.4.1. Les macrophages péritonéaux sont isolés à partir de souris. Dans un premier temps, celles-ci sont tuées avec du chloroforme, puis 10 ml de milieu Mϕ leur sont injectés dans la cavité péritonéale. La peau face ventrale de la souris est ouverte puis dégagée, une large incision dans le péritoine permet alors de récupérer le milieu contenant les cellules péritonéales dont les macrophages. Après une étape à 4°C de centrifugation de 10 minutes à 1200 rpm, le culot est resuspendu dans 1 ml de milieu Mϕ. Le nombre de macrophages vivants est évalué avec un hématimètre de Malassez en diluant 10 µl de la suspension cellulaire dans 10 µl du bleu trypan. La suspension cellulaire est diluée de manière à obtenir une concentration finale de $1{,}15 \times 10^6$ cellules/ml. Les macrophages péritonéaux sont alors mis en culture dans des plaques de microtitration 96 puits, chaque puits contient 230 000 macrophages. Après 4h d'incubation à 37°C et 5% CO_2, une étape de lavage permet d'éliminer les cellules péritonéales non adhérentes et certains macrophages mourants n'ayant pas adhéré au plastique.

Mesure de la quantité de TNF produite après co-culture

Après 6 h de co-culture (sauf indications contraires) des macrophages avec les levures et les contrôles, le surnageant est centrifugé afin d'éliminer les levures puis analysé par l'utilisation d'un kit Elisa commercial (eBioscience, San Diego, USA) selon les instructions du constructeur. En contrôle négatif, à chaque expérience, le surnageant d'un puits contenant des

macrophages non stimulés a été mesuré. Chaque expérience a été réalisée en triplicat et répétée au moins deux fois.

II.4.3 Test de recrutement des neutrophiles murins

Afin d'étudier le recrutement des neutrophiles au site d'infection de *C. albicans*, des groupes de trois souris C57BL/6, TLR2-/- et TLR4-/- ont été infectés par injection par voie i.p. (intra-péritonéale) de 100 µl de PBS contenant $5x10^6$ levures tuées par fixation. Quatre heures après l'infection, les cellules du péritoine sont collectées en suivant le même protocole que pour les macrophages péritonéaux (décrit dans la partie I.1.2). Après une étape de lavage suivie d'une étape de fixation (eBioscience, San Diego, USA) de 20 min dans l'obscurité, les cellules sont lavées puis marquées pendant 20 min dans l'obscurité avec un anticorps, dirigé contre les neutrophiles, préalablement dilué au $1/150^{ème}$ (eBioscience, San Diego, USA). La quantité totale de cellules est déterminée par comptage en cellule de Malassez et le pourcentage de neutrophiles dans les échantillons est déterminé par analyse en cytométrie de flux. Chaque souche a été testée en triplicat (trois souris) au moins deux fois, les résultats présentées sont la moyenne des triplicat d'une des expériences représentatives.

II.4.4 Infection de souris par C. albicans par injection en intraveineux

Ce test représentant un modèle de dissémination systémique a pour but de comparer la virulence de plusieurs souches de *C. albicans in vivo*. A partir d'une pré-culture sur la nuit, les souches d'intérêt sont cultivées dans 20 ml du milieu YPD à 30 °C pendant quelques heures jusqu'à une DO_{600nm} = 0,6 - 0,8. Les cellules sont lavées deux fois dans 20 ml de PBS puis diluées dans du PBS de manière à obtenir une concentration finale de $4x10^6$ levures/ml. Des groupes de 10 souris des deux sexes sont infectés par $0,8x10^6$ levures contenues dans un volume de 200 µl. Cette dose a été déterminée après avoir testé différentes concentrations sur un échantillon de cinq souris. L'injection a été réalisée en intraveineux (i.v.) dans la veine angulaire de l'œil. La survie des souris est ensuite suivie pendant 21 jours.

II.4.5 Analyses statistiques

Les différences statistiques ont été analysées en utilisant le t test de Student bilatéral dans le but de comparer deux séries de résultats tels que le recrutement des neutrophiles après injection de SC5314 (série 1 comprennent les trois valeurs des triplicats) avec celui après injection du mutant *gpi7*-/- (seconde série de valeurs). Une différence est considérée

significative pour une valeur de $p < 0.05$. Les courbes de survie *in vivo* ont été analysées par la méthode de Kaplan–Meyer, test du « log-rank ».

RESULTATS

I. ANALYSE *IN SILICO* DES PGIP CHEZ *C. ALBICANS*

Au cours de ce travail de thèse, trois listes de GpiP putatives chez *C. albicans* ont été publiées. Ces différentes études ont suscité, dans notre équipe, la volonté de comparer et de mettre à jour ces résultats ce qui a abouti à la rédaction d'une revue. A l'heure actuelle, nous estimons, chez ce pathogène, le nombre potentiel de GpiP à 115. L'analyse de ces données a permis de discuter de l'appartenance de ces protéines à des familles multigéniques ainsi qu'à certains groupes fonctionnels. La localisation et le rôle des GpiP dans la virulence sont deux thèmes qui ont également été développé dans cette revue.

« A comprehensive analysis of GPI anchored proteins in *Candida albicans* »; (Eukaryotic cell, revue acceptée).

A comprehensive analysis of GPI anchored proteins in *Candida albicans*

Mathias L. Richard*, Armêl Plaine

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INA P-G UMR-INRA1238 UMR-CNRS2585, 78850 Thiverval-Grignon, France.

Abstract

Addition of a GlycosylPhosphatidyl Inositol (GPI) anchor to a protein is one way proteins can be localized to the plasma membrane of an eukaryotic cell. This GPI anchored Protein (GpiP) class has no known function in common, but is known to have a common localization: the cell surface. *Candida albicans* is the most frequently isolated fungal pathogen of nosocomial infections and hemocultures. Studies on the biology of this pathogen have dramatically increased in the last 20 years, and with it our understanding of *C. albicans* has readily improved. Treatments and diagnoses for *Candida* infections, however, are still lagging compared to those of bacteria. Recent advances in the area of antifungal drug development, using drugs like caspofungin for example, have highlighted the potential of the cell wall as a clinical drug target. At least half of the identified GpiPs in *C. albicans* are known to be transferred and covalently linked to the glucans of the cell wall, thereby allowing presentation of the proteins at the cell surface - at the interface between pathogen and host. Although the existence of GpiPs has been known for years, it was only until recently that the scientific community rediscovered them as potential actors of the host-pathogen interplay, thus increasing rapidly the amount of data now available on them in the literature. This review will summarize our current knowledge of GpiPs, and will provide a detailed list of GpiPs identified using three different datasets and the recent release 20 of the *Candida* genome. The function, gene family classification, localization, and role in virulence of these proteins will also be discussed. Thus, this dataset will give a robust starting point for surface proteins analysis in *C. albicans* and the resulting data would provide new and original insights into the fungal surfo-proteome.

Introduction

There are two types of membrane proteins: the integral membrane proteins and the lipids-anchored proteins. Integral membrane proteins contain one or several transmembrane domains that allow the formation of hydrophobic alpha helices, which ultimately embed the protein in a lipid bi-layer. We count 4 types of lipids-anchored proteins divided in two groups: one group generally links the proteins to the internal side of the plasma membrane and the other generally to the outside. In the first group are found the amide-linked myristoyl anchors (calcineurin B (Boutin, 1997)), the (thio)ester-linked fatty acyl anchors and and thioether-linked prenyl anchors (G protein alpha subunits (Dohlman, 2002)). The second group is only composed of the proteins that contain a C terminal signal sequence that allows for linkage to a GlycosylPhosphatidylInositol (GPI) anchor. The anchor of the GPI anchored Proteins (GpiPs) can be removed by the action of specific phospholipases (James *et al.*, 2006), converting the protein into a water-soluble form. GpiPs are thought to associate with lipid rafts, specialized regions of the membrane containing elevated levels of cholesterol and sphingolipids, common to human cells for example (Sharom and Lehto, 2002). Proteins destined to be GPI anchored share conserved features: a N-terminal signal sequence for localization to the endoplasmic reticulum (ER), a C-terminal hydrophobic domain (9 to 24 residues) for transient attachment to the ER membrane, and the so-called ω site, where the protein is cleaved to be ligated to the GPI anchor (Thomas *et al.*, 1990). The ω site is localized 9 to 10 amino acids before the C-terminal hydrophobic domain and its amino acid environment determines whether the protein has a high probability to be GPI anchored. Amino acids at position ω-1 to ω-11 form a linker region usually not charged and without any secondary structure (α–helix, β–sheet). The ω site region is composed of small amino acids to fit the transamidase protease catalytic pocket, and finally the spacer region (ω+3 to ω+9) is comparable to the linker, no charge and flexible (Eisenhaber *et al.*, 2004). Shortly after protein synthesis in the ER, the preformed GPI anchor replaces the C-terminal transmembrane region. The core GPI anchor consists of a lipid group (serving as the membrane anchor), a myo-inositol, a N-acetyl glucosamine, 3 mannose groups, and a phosphoethanolamine group, which ultimately connects the GPI anchor to the protein via an amide linkage (Tiede *et al.*, 1999) (Figure 1). Addition of mannose groups and positioning of side chains like phosphoethanolamine on the GPI anchor contributes to the variety of GPI anchors identified so far (Figure 1). We will not discuss GPI anchor biosynthesis in this review since we decided to focus the review on the proteins only, but it is important to highlight that the GPI anchors are essential for viability in yeast since any deletion of key proteins in GPI biogenesis is lethal (Eisenhaber *et al.*, 2004; Mayor and Riezman, 2004; Tiede *et al.*, 1999).

GPI anchoring is encountered in every eukaryotic cell including unicellular yeast cells, several parasites, and the highly specialized mammalian cells (Bowman *et al.*, 2006; Ilgoutz *et al.*, 1999; Munro *et al.*, 2005). Nevertheless, this wide occurrence does not dictate specific functions, as many types of enzymes are GPI anchored (glucosidase, alpha amylase, aspartyl protease, superoxide dismutase, phospholipase, etc) and many more have unknown functions (Albrecht *et al.*, 2006; de Groot *et al.*, 2004; Fonzi, 1999; Kang *et al.*, 2005). From the human prospective, GpiPs have been under investigation for two specific reasons: 1) a rare defect in the biosynthesis of the GPI anchor itself triggers a disease called paroxysmal nocturnal haemoglobinuria affecting the protection of erythrocytes against complement factors (Hong *et al.*, 2003); 2) PrP* is a GPI anchored protein derivate from the normal PrP(c) that causes various fatal neurodegenerative diseases, such as the well known Creutzfeldt Jacob disease (Mastrangelo and Westaway, 2001). In *Saccharomyces cerevisiae*, of the characterized GpiPs, most are involved in the biosynthesis of cell wall compouns, flocculation, proteolytic activity, sporulation, and mating (Caro *et al.*, 1997).

C. albicans possesses 115 putative GPI anchored proteins

The availability of more and more eukaryotic genome sequences has given us the resources to do large scale comparative genomics on this class of proteins. The only way to anticipate the addition of a GPI anchor is to look for the 3 characteristics described above. However, none of these characteristics are strictly defined, thus confounding our interpretations. In the last 4 years several studies have increased our understanding of the number and functions of these GpiPs. In terms of the human genome, no large scale analysis of GpiPs has been published yet but in B. Eisenhaber laboratory a preliminary survey of potentially GPI modified proteins in *Homo sapiens sapiens* has been done in 2004 (see http://mendel.imp.ac.at/gpi/Hs/hs.html). Higher eukaryotes, such as *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al.*, 2002), and *Caenorhabitis elegans* (Eisenhaber *et al.*, 2004); and microorganisms, such as *Aspergillus nidulans, C. albicans, Candida*

glabrata, Neurospora crassa, S. cerevisiae and *Schizosaccharomyces pombe* (Caro *et al.*, 1997; De Groot *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Sundstrom, 2002; Weig *et al.*, 2004), however, have been subjected to a more thorough analysis. It is notable that *S. cerevisiae* and *S. pombe* seem to possess a smaller number of GpiPs compared to *C. albicans*.

Four different lists of *C. albicans* GpiPs are published in the literature (De Groot *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Garcera *et al.*, 2003; Sundstrom, 2002). In this review we will not include Paula Sundstrom's analysis since her work was done using assembly 6, an incomplete genome sequence. In an attempt to simplify our analysis, we have made a comprehensive list of putative GpiPs by combining the 3 datasets identified from assembly 19 (De Groot *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Garcera *et al.*, 2003). The 3 different teams identified different numbers of putative GpiPs (102, 104 and 169) but a careful analysis of each dataset, allowed us to refine our list (Table 1). Other than the differences in the algorithms used to define GpiPs, the main reasons for the differences between the datasets, were the presence in the datasets of Open Reading Frames (ORFs) that have since been deleted or the presence in the datasets of two alleles coding for the same GpiP. The recent publication online of the release 20, a complete and currated haploid genome sequence of *C. albicans* (http://candida.bri.nrc.ca/candida/index.cfm), allowed the creation of a robust base for further research on this group of proteins in *C. albicans* or for comparison with other organisms.

Our final list consists of 115 putative GpiPs in the *C. albicans* genome (Table 1), 70 of which are common to the 3 published datasets, 6 of which are common to the De Groot and Eisenhaber datasets, 24 of which are specific to the De Groot *et al.* study (De Groot *et al.*, 2003), 9 of which are specific to the Eisenhaber *et al.* study (Eisenhaber *et al.*, 2004) and 6 of which are specific to the Garcera *et al.* study (Garcera *et al.*, 2003). The estimated 115 GpiPs identified in *C. albicans* is almost twice that of *S. cerevisiae* (58 GpiPs), however we should keep in mind that both lists are the results of computerized predictions and can still retain some annotation artefacts.

More than 65% of the GpiPs in *C. albicans* have unknown functions

Looking at each putative GpiP provides us with very little functional information, as a vast majority of them are of unknown function. Nevertheless, newly available genomic sequences and transcriptomic tools now allow us to make informed inferences about genes with unknown function. Thus, in the 115 GpiPs identified in the *C. albicans* genome, 4 classes can be described (Figure 2): 1) the GpiPs with completely unknown function (76 genes representing 66%); 2) the GpiPs with a putative function related to cell wall biogenesis or remodelling (15 genes representing ~13%); 3) the GpiPs with a putative function related to cell-cell adhesion/interactions (13 genes representing ~11%); and 4) the GpiPs with diverse enzymatic properties, such as superoxide dismutase activity, aspartyl protease activity, etc (11 genes representing 9.5% altogether). The largest class, representing 66% of genes with completely unknown function, may be relevant to the future discovery of novel genes involved specifically in *C. albicans* pathogenicity. Firstly because of the putative localization of these proteins at the cell surface, thus in a very good position to be involved in any interaction with the surrounding environment: the host cells. Secondly because *C. albicans* is highly adapted to its environment compared to other opportunistic fungi (pH, oxidation, phagosome, etc) which suggest that it developed during evolution several mechanisms to colonize his host: these original functions might be beard by these surface proteins of unknown function.

Careful analysis of the 76 proteins of unknown function reveals that 41 of them have been reported to be regulated by various transcription factors and conditions (Table 1). Rim101 is the most common regulator of these genes; 22% of them are regulated by Rim101 (9 out of 41). Changes in iron levels, the morphogenetic switch, Nrg1, Tup1, as well as the cell wall regeneration also regulate them: in each case we count 8 genes reported regulated (19.5%), and 6 after caspofungin treatment. Even if it is not statistically robust considering the size of the groups, these data might be worth further attention. For instance, in the literature, two papers report experimental data monitoring the genes regulated by Rim101 (Bensen *et al.*, 2004; Lotz *et al.*, 2004). The results vary between 132 (MLR unpublished results) to 186 genes out of more than 5,000 (Bensen *et al.*, 2004; Lotz *et al.*, 2004), thus around 3% of the genome is regulated by Rim101, which is a much lower amount than the 22% indicated in our dataset. It would suggest that, as well as being involved in pH response, in adaptation to high salt concentrations and in morphogenesis, Rim101 might also play a role in regulating the expression of some GpiPs. Alternatively, it is possible that GpiPs may simply have an important role in the three aforementioned functions. For example, the two glucanosyltransferases Phr1 and Phr2, are both regulated by Rim101 and are essential for growth at

alkaline and acidic pH, respectively (Fonzi, 1999; Torosantucci *et al.*, 2002).

Families within the GPI anchored proteins group

In order to identify gene families within the GpiPs group, we blasted each protein against the entire group. From this analysis, we identified 8 families with only 2 members (Table 2). Interestingly, 2 of these gene couples are adjacent on the chromosome (family 1 and 8), which might be the result of a tandem duplication event during evolution. We identified 6 families with 3 members, 2 families with 4 members and 2 families with at least 8 members: the *ALS* genes and the *HYR*/*IFF* genes. This analysis indicates that within the GpiPs group, more than 50% of the proteins (67 out of 115 proteins) have a paralog. There are at least 2 hypotheses for the utility of a gene family in a genome: 1) the function carried out by the family is essential, thus the redundancy of the gene protects the cell against any lethal loss in functionality; 2) the function carried out requires fine-tuning that only proteins within the family can provide if expressed in different conditions or if their affinity is slightly different for diverse substrates for instance. A good example is the *DFG5* family, where *DFG5* or *PGA51*/*DCW1* genes are dispensable to the cell, but deletion of both genes is lethal in *C. albicans* (Hoyer, 2001) as well as deletion of their respective orthologs in *S. cerevisiae* (Kitagaki *et al.*, 2002), suggesting that the function carried by these proteins is probably essential to the cell.

In addition to families within the GpiPs group, we looked for GpiPs that could be members of gene families in the whole *C. albicans* genome. Our analysis indicated two types of scenarios (Table 2): 1) GpiPs that belongs to an "outside" family (7 families) and 2) GpiPs that are already members of "inside" families, but also have paralogs outside of the GpiPs group (8 families). For example, several gene families already characterized are heterogeneous: *CHT3* is not GPI anchored, while *CHT1* and *CHT2* are; *SAP9* and *SAP10* are GPI anchored, but the 8 other SAP proteins (*SAP1-8*) are not; and *PLB1* and *PLB2* are not GPI anchored, while *PLB3-5* are.

With these heterogeneous families, it is difficult to assess whether the GPI anchor prediction was wrong in these cases or whether the cells use two proteins with similar functions but distinct localizations. Additionally, several GpiPs were found to have no GpiP homologs, but instead 1 to 4 non-GpiP homologs (Table 2).

Our limited understanding of the function or the regulation of these proteins hinders our abilities to interpret how *C. albicans* modulates its genome to end up with such diversity in localization. Nevertheless, it seems that the percentage of gene families is relatively high within GpiPs; with a great deal of heterogeneous families composed of proteins with or without GPI anchors.

One of the most studied GpiP families to date is the *ALS* (Agglutinin Like Sequence) family. The entire *ALS* family was first described in detail by Lois Hoyer in 2001 (Hoyer, 2001) as a family homologous to the alpha agglutinins of *S. cerevisiae*. Since then, numerous research papers have been published on this family; in the last 10 years at least 55 papers discussed the expression or the role of various *ALS* genes in *C. albicans* biology. An entire review would be necessary to discuss the data available for the *ALS* gene family in *C. albicans*, thus we will try here to emphasize just two particularly interesting aspects of this family: the high potential of variability of the *ALS* genes sequence and the role of the *ALS* in virulence (see section "GPI anchored proteins, cell wall and virulence").

Looking closely at the sequences of all of the *ALS* proteins reveals that there is high similarity between *ALS* family members both in nucleotide and peptide sequences, a similarity that also includes the upstream and downstream regions of the ORF. For example, sequences of *ALS2* and *ALS4* appear to be extremely close, as well as sequences of *ALS1*, *ALS3* and *ALS5*.

An interesting point raised by several recent papers is the variability of *ALS* sequences between alleles of the same gene or between strains for the same gene. Zhang *et al.* in 2003 studied *ALS7* in 66 different strains of *C. albicans* and found 60 different forms of *ALS7*, generating 49 different genotypes (Badrane *et al.*, 2005). The domains of high variability in these proteins are the middle stretch of tandem repeats and the C-terminal portion containing VASES repeats. Analysis of the genotype data in parallel with the infection caused by the strains revealed that isolates representing a more pathogenic general-purpose genotype cluster tended to have more tandem repeats than other strains. In another study we learned that, in addition to differences in the highly variable domain of tandem repeats, the two alleles of the same *ALS* gene (here *ALS9*) are variable in the 5' part of the ORF sequence (Zhao *et al.*, 2003).

There is also evidence suggesting that variability in the intragenic repeat number provides the cell a

way to escape host defences. Verstrepen and co-workers studied the variability generated by the intragenic tandem repeats in *S. cerevisiae* and showed that the variation in repeat size, occurring mostly in cell wall proteins, modifies the phenotypes of the strains (Verstrepen *et al.*, 2005). This suggests that these modifications, in addition to altering phenotypes, may also profoundly transform the antigenic properties of the cell, thus allowing the cell to deceive the immune system. Vestrepen *et al*. also proposed that the repeats are the site for recombination, thus favoring genetic reshuffling of domains and thereby creating cell-surface proteins with new functions (Verstrepen *et al.*, 2004).

Sheppard and co-workers examined the structural diversity within the *ALS* protein family (Sheppard *et al.*, 2004). In this study, structural analyses of the sequence variations in the *ALS* family confirmed again that these variations were likely responsible for the functional diversity within the family.

It seems that, even if *C. albicans* genome counts 8 *ALS* genes, in a given population there might be more different *ALS* proteins on the cell surface: the result of slight sequence variations (number of tandem repeats, domain reshuffling, etc). That variability in size, sequence, structure and consequently function might make our results on mutants of *ALS* tightly linked to the strain background we use and probably also the laboratory strain we are working with, since two CAI-4 for instance may have evolved with the time differently from laboratory to laboratory.

The largest gene family present in this GpiPs class, with 12 genes, is the group of genes orthologous to *HYR1* (for HYphally Regulated), also known as the *IFF* genes (for IPF (Individual Protein File) Family F). As we saw above, 10 genes are predicted to have GPI anchors and 2 genes, *IFF10* and *IFF11*, do not have any signal sequences for GPI anchor linkages. Very little is known about this family; only one member has been studied to date: *HYR1* (Bailey *et al.*, 1996). This gene is strongly induced in conditions that trigger the morphogenetic switch. Mutant analysis, however, did not show a strong phenotype under the conditions tested. Analysis of the coding sequences in this family revealed a large N terminal domain of 340 amino acids shared by each member of the family with high homology. The proteins diverge strongly after this domain, both in size and sequence. Phylogenetic analysis of this family shows that the two non GPI anchored proteins Iff10 and Iff11 diverge obviously from the original group, but the other remain united. Interestingly, comparison with *Candida dubliniensis* sequences shows that *C. albicans* has a subgroup of *IFF2*, *3*, *4* and *5*, while *C. dubliniensis* has only one ortholog (Figure 3). The tree representation suggests either that 1) *C. dubliniensis* has lost *IFF2*, *3* and *4* orthologs, but kept the *IFF5* ortholog; or that 2) in *C. albicans*, a gene amplification occurred from an *IFF5* ancestor. In either case such differences might be one of the reasons explaining the difference in virulence of these two very close species (Goldman *et al.*, 1995). One can envision for instance, that theses proteins change the adherence properties of the cells thus modify the capacity to colonize a specific environment.

All these proteins possess serine/threonine rich regions for more than 30% of the sequence, as well as 8 to 48 N-glycosylation sites; these characteristic suggest that these proteins are likely to be transferred to the cell wall. No function so far has been suggested for any of the Iff proteins, but their presence in 12 copies in the genome implies that they perform a useful function in terms of *C. albicans* biology, an idea reinforced again by the fact that *S. cerevisiae* has no clear ortholog.

GPI anchored proteins present at the cell surface

GpiPs in eukaryotes are largely thought to be localized only to the plasma membrane; although alternate hypothesis (lacking direct experimental evidence thus far) is that few of them may stay or be redirected to other cell compartments. A recent study of membrane lipid rafts in *C. albicans* show that amongst the 29 proteins identified only 2 were GpiPs: Ecm33 and a Gas1 homologue (Insenser *et al.*, 2006), which seems surprisingly low compared to what was expected considering the results obtained in higher eukaryotes (Sharom and Lehto, 2002). A study in *Cryptococcus neoformans* however highlights the notion of enrichment of proteins in lipid rafts. A.R. Siafakas and co-workers also found only 2 GpiPs but they were in much greater concentration in lipid rafts than in the membrane (Siafakas *et al.*, 2006). No quantitative data are yet available for *C. albicans* lipid rafts, but the situation might be comparable to *C. neoformans*: high concentration but low diversity.

On the other hand, it has been shown in several fungi, *S. cerevisiae* and *C. albicans* in particular, that part of their GpiPs are released from the GPI anchor and are covalently bound to cell wall sugars, thus being only transiently localized at the plasma membrane (Caro *et al.*, 1997). In *S. cerevisiae*, this cleavage event occurs between the N-acetyl glucosamine group and the first mannose of the

anchor (see Figure 1); the protein with the GPI anchor remnant section is then transported to the cell wall network, and linked to the β1,6 glucans by an unidentified protein or protein complex. Figure 4 summarizes the different stages of synthesis and transport of a fungal GPI anchored protein.

Based on studies in *S. cerevisiae*, there are few known common sequence features between the cell wall GpiPs. Two kinds of signal sequences have been proposed for cellular localization in *S. cerevisiae*: 1) the specific amino acid residues V, I, or L at the site ω-4 or ω-5 upstream of the GPI attachment site (the ω site) and Y or N at the site ω-2 for cell wall localization and 2) dibasic residues, R and K for instance, in the region upstream of the ω site for plasma membrane localization (Terashima *et al.*, 2003). No similar studies have been done in *C. albicans*, given that we can extrapolate from our knowledge of *S. cerevisiae*. We applied these signal sequence rules to the 115 GpiPs presented earlier in the review and to the 58 putative GpiPs published by Caro *et al* (Caro *et al.*, 1997) in *S. cerevisiae* (Table 3). These rules of localization give similar results between *S. cerevisiae* and *C. albicans* with equal percentages of cell wall and membrane-bound proteins. Although in *C. albicans*, the percentage of unclassified proteins is much higher, containing almost half of the 115 proteins (46 proteins, 40%). Such an analysis of *Candida*, however, is not necessarily consistent with experimental data. Dfg5 is such an example, containing several dibasic amino acids upstream of the predicted ω site. However, Spreghini *et al.* showed that Dfg5 is localized to the cell wall after cell fractionation and western blotting (Spreghini *et al.*, 2003). Again, if we try to match the 12 GpiPs identified by a proteomic analysis (see next paragraph) and the prediction, 2 are predicted to be localized to the membrane, 4 are correctly predicted and 6 have no clear prediction (de Groot *et al.*, 2004). Thus, one cannot predict yet with confidence where a GpiP will be localized, and experimental testing is still the only way to clearly know.

Another approach to establish localization of cell wall GpiPs was to directly extract the cell wall, and subsequently identify the GpiPs present. This strategy was used in F.Klis laboratory: they prepared *C. albicans* cell walls cleared of weakly bound or unbound cell wall proteins and digested the glucan network to free the covalently bound cell wall proteins (de Groot *et al.*, 2004). This protein mix was then subjected to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis for protein identification. Interestingly, they only identified 14 proteins, 12 of which are GpiPs, supporting the idea that the "surfo-proteome" is quite reduced. It is indeed highly surprising to identify 12 GpiPs on the cell wall when 115 are coded by the genome, of which 30 to 50% are supposedly cell wall-bound. There are at least three simple hypotheses to explain this finding: 1) the technique in itself needs a large amount of proteins in order to detect them and so the majority of the cell wall bound proteins expressed at low level is not identified from the background noise ; 2) the surfo-proteome is highly dependent on environmental conditions, and so to each condition there is a specific pool of cell wall GpiPs; 3) the last obvious hypothesis is that cell wall localization is a relatively rare event, and that most GpiPs are indeed membrane bound. The first hypothesis is partially dismissed by de Groot and co-workers since they state that their technique allows them to identify cell wall proteins when there are about 500 molecules present per wall (~0.05% of the covalently bound cell wall molecules), which is a rather small amount of protein (de Groot *et al.*, 2004). Concerning the second hypothesis, a study on the stability of cell wall protein pools was done in the laboratory of R. Sentandreu, supporting the idea that the turn over of cell wall proteins is very slow (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). Indeed during their pulse-chase experiments they did not observe any proteins recycling after 4h30 of chase; suggesting that the proteins linked to the cell wall components are very stable. Based on the results of these two publications, it would be interesting to repeat the same type of experiments using a chase under completely different conditions. One may find a cell wall protein turn-over that becomes induced by adaptations to external changes, such as pH or temperature.

GPI anchored proteins, cell wall and virulence

Cell surface proteins and virulence are often linked in the literature in both eukaryotes and prokaryote pathogens. To date several GpiPs have been involved in virulence, but it is not clear whether the effects are direct or not, since subsequent molecular analysis is often missing.

A global survey of the 115 GpiP genes tells us that for 87 genes no mutant exists, 13 mutants have been constructed but not tested in virulence assays and on the 15 mutants tested, 3 exhibit a normal virulence when 12 have a reduce virulence compared to the corresponding reference strain (Table 1). The sample is too small to allow statistical comparison, but still suggests that GpiPs probably support one or several aspects of *C. albicans* virulence traits. The small number of genes tested makes the classification difficult, but the virulence defect of the mutants can be explained by very different reasons, usually indirect

consequences of the gene deletion. We propose the following subdivision:

- *Cell wall biosynthesis and modelling*: Phr1, Phr2, Utr2, Ecm33 and Cht1 are clearly linked to some aspect of the cell wall structure, which is critical in the cell cycle and often has important consequences on the capacity of *C. albicans* to switch from yeast to hyphae or *vice versa*: a well known virulence trait. In addition the modification of the cell wall structure or composition may change the surface epitope recognized by the host and thus modify the virulence.

- *Specific enzymatic functions*: The two aspartyl proteinases Sap9 and Sap10 seem to affect virulence by indirect effects on more essential GpiPs, as it was observed in a *gpi7* null mutant (Richard *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2002) (Gpi7 is responsible of the addition of a side chain to the GPI core structure, see Figure 1). Indeed, by contrast to Sap1-6 that digest proteins surrounding the cell, Sap9 and Sap10 are involved in protein processing and activation, thus regulating their function. When a mutant lacking *GPI7* secretes GpiPs in the medium, mutants lacking *SAP9* and *SAP10* do not process essential proteins, and thus block their function, but the consequences are the same: a defect in cytokinesis and a disorganized cell wall network (Albrecht *et al.*, 2006).

A recent study on the phospholipases B family in *C. albicans* (5 members) showed that strains lacking the GpiP Plb5 have reduced *in vivo* organ colonization (Theiss *et al.*, 2006). It seems however that Plb5 role in pathogenesis is weaker than Plb1, a secreted non GPI anchored phospholipase B since the phenotype is only visible in organ colonization for Plb5 (Green *et al.*, 2004; Leidich *et al.*, 1998). The hypothesis for both proteins is that such secreted or cell-associated enzymes may be especially important while *Candida* is in close contact with host cells for the breakdown of the host cell membranes.

Rbt1 is one interesting target for further research, since the function of this protein is poorly understood, but its relation to infection is still unclear. Braun B.R. and co-workers suggest that it may interact with and impair the immune system of the host, thus the mutant lacking *RBT1* would be cleared more easily during infection (Braun *et al.*, 2000).

- *Oxidant adaptation*: Superoxide dismutase appears to be involved in virulence, by increasing *C. albicans* resistance to the immune system. Mutants lacking *SOD5* are more sensitive to neutrophils (Fradin *et al.*, 2005), but not to macrophage phagocytosis (Martchenko *et al.*, 2004). Since, *sod5*-/- has an attenuated virulence *in vivo*, this suggests that oxidative burst might be an important way to kill *C. albicans* and this also confirms the crucial role of neutrophils in preventing candidiasis.

- *Adherence*: Other than the Als proteins, Hwp1 is one of the most studied proteins, and probably the protein that fits best into the current virulence models. Moreover, Hwp1 and Als proteins both appear to act on the same aspects of *C. albicans* biology: interaction with cells. The ability of *C. albicans* to adhere to various constituents plays an important role in host colonization, and in initiating and maintaining an infection.

The function of Hwp1 in interacting with host cells has been clearly demonstrated, since Hwp1 was shown to be the substrate of human transglutaminases that enable *C. albicans* to be crosslinked to host epithelial cells (Staab *et al.*, 1999). Defects in adherence in this case and maybe in other types of interactions with the host, impair the virulence of the strains.

Amongst the 8 *ALS* genes present in Candida Genome, only *ALS1* (Fu *et al.*, 2002), *ALS3* (Zhao *et al.*, 2004), *ALS4* (Lockhart *et al.*, 2005) and *ALS7* (Nobile *et al.*, 2003) have been disrupted; as for *ALS2*, the gene seems essential to *C. albicans* viability (Lockhart *et al.*, 2005). In the work of Zhao *et al.* in 2003, on *ALS1*, *5* and *9* only heterozygotes were produced, but they did not report the phenotypes (Zhao *et al.*, 2003). Of the four *ALS* genes deleted in *C. albicans*, *als4*-/- has a wild type virulence, *als7*-/- has not been tested and *als1*-/- and *als3*-/- are described as having reduced virulence but in particular models (Fu *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004). The strain lacking *ALS3* is defective in adherence to both endothelial and epithelial cells, reducing destruction of the tissue in an *in vitro* model (Zhao *et al.*, 2004). As for *ALS1*, the deletion strain shows a slightly reduced virulence in a mouse model, and a reduced adherence on mice tongues (Alberti-Segui *et al.*, 2004; Kamai *et al.*, 2002). The relatively weak effect of deleting *ALS1* and *ALS3* may be explained by the redundancy of functions in the *ALS* family.

In each cases, the virulence is tightly link to a phenotype in adherence tests, only *als1*, *3* and *4* mutants have been tested for adherence and were found to be defective, thus confirming the hypothesis that at least part of the functions of the *ALS* family is in cell-to-cell adherence (Fu *et al.*, 2002; Lockhart *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004). Other strategies than deletion were used to confirm the involvement of *ALS* proteins in adhesion

phenomenon : Als5 has been the subject of several studies where the protein was expressed in *S. cerevisiae* resulting in the binding to a variety of substrates, extracellular matrix coatedbeads, human buccal, epithelial cells, various peptides, etc (Gaur *et al.*, 2002; Gaur and Klotz, 2004; Klotz *et al.*, 2004). A recent study deciphered the role of Als proteins domains using again Als5 and *S. cerevisiae*. Rauceo J.M. and co-workers concluded that the N-terminal region contribute to cell adhesion activity through increased binding to fibronectin and that the central domain constituted of threonine rich tandem repeats participate to cell-to-cell interactions (Rauceo *et al.*, 2006). Finally, recent works confirm the role of Als3 in adhesion and in particular its crucial role during biofilm formation, in these studies they interestingly developped *in vitro* and more importantly *in vivo* models for biofilm formation (Nobile and Mitchell, 2005; Nobile *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006).

Conclusion

GPI anchored proteins in *C. albicans* represent an extraordinary group of proteins localized to the cell surface. A variety of phenomenon occur at the plasma membrane or at the outer surface of a cell: molecules and ions transport, ligand-receptor interactions, proteins activation by enzymatic processing, glucan biosynthesis and destruction, and many types of host-pathogen interactions involving proteins and glucans. A thorough analysis of this special class of proteins would not have been possible without all of the recently published data and the availability of the *C. albicans* genome.

There are 70 GPI anchored proteins in *C. albicans* if we count only the ones in common between all the studies discussed, or 115 if we combine the same studies together. In both cases, the count is larger than in *S. cerevisiae*, it does not seem that this increase is only the consequence of amplification of several gene families since between *S. cerevisiae* and *C. albicans* GpiPs, families appear or increase in size but also disappear or reduce in size (for instance, FLO and TIR families in *S. cerevisiae* do not exist in *C. albicans*). This suggests several unique attributes of *C. albicans* likely to be coded by these genes. This idea is reinforced by the high percentage of genes with unknown function in this group: more than 65% for the group of 115 (and almost 65% of the group of 70), in *S. cerevisiae* for instance on the 58 predicted GpiPs (Caro *et al.*, 1997), we only find 36% of these proteins without a known function using SGD tools (*Saccharomyces* Genome Database, http://www.yeastgenome.org/). This comparison between *C. albicans* and *S. cerevisiae* has to be carefully used since it seems that the percentage of proteins of unknown function within the GpiPs is variable between fungi, 60% for *Aspergillus nidulans*, 58% for *Neurospora crassa* and 39% for *Schizosaccharomyces pombe* (Eisenhaber *et al.*, 2004). It is interesting to note that among the proteins of unknown function some are *C. albicans* specific and some are fungal specific: in either case these proteins are of particular interest. The dataset differs greatly in size and composition from *S. cerevisiae* GpiPs lists, so the probability to find targets original and specific to fungi increases. It is thus likely that by studying *C. albicans* GpiPs we will discover genes with function interesting other scientific communities specialized in fungal human or plant pathogens like *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Magnaportae* or *Ustilago*. Genes that we would not have unravel by studying exclusively the model yeast: *S. cerevisiae*.

In this review, we have shown the high heterogeneity of this group on: function prediction, gene family arrangement, and cellular localization. The only general conclusion that we can draw so far is that GpiPs seem involved directly or indirectly in virulence through their functions in cell adhesion/cell recognition or cell wall biosynthesis ad remodelling. Thus, there is still a lot to learn from the GPI anchored proteins that may provide insight into the diagnosis and treatment of *C. albicans* infections. The recent publication on an Als1-based vaccine (Filler *et al.*, 1996; Ibrahim *et al.*, 2005) may give us a little glimpse into what the future will hold for us.

Acknowledgments

We would like to thank Cécile Neuvéglise for assistance with manipulating genome sequences of *C. albicans* and phylogenic tree construction. We are grateful to Clarissa J. Nobile for her critical comments of the manuscript. We also thank the reviewers for their comments that greatly help the improvement of our review. Support for this research was provided by the INRA and Armêl Plaine PhD is granted by a MNERT fellowship funded by the French government.

References

1. Alberti-Segui, C., A. J. Morales, H. Xing, M. M. Kessler, D. A. Willins, K. G. Weinstock, G. Cottarel, K. Fechtel, and B. Rogers. 2004. Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. Yeast 21:285-302.

2. Albrecht, A., A. Felk, I. Pichova, J. R. Naglik, M. Schaller, P. de Groot, D. Maccallum, F. C. Odds, W. Schafer, F. Klis, M. Monod, and B. Hube. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. J Biol Chem 281:688-94.

3. Bailey, D. A., P. J. Feldmann, M. Bovey, N. A. Gow, and A. J. Brown. 1996. The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. J Bacteriol 178:5353-60.

4. Bensen, E. S., S. J. Martin, M. Li, J. Berman, and D. A. Davis. 2004. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. Mol Microbiol 54:1335-51.

5. Borner, G. H., D. J. Sherrier, T. J. Stevens, I. T. Arkin, and P. Dupree. 2002. Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis. Plant Physiol 129:486-99.

6. Boutin, J. A. 1997. Myristoylation. Cell Signal 9:15-35.

7. Bowman, S. M., A. Piwowar, M. Al Dabbous, J. Vierula, and S. J. Free. 2006. Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. Eukaryot Cell 5:587-600.

8. Braun, B. R., W. S. Head, M. X. Wang, and A. D. Johnson. 2000. Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. Genetics 156:31-44.

9. Caro, L. H., H. Tettelin, J. H. Vossen, A. F. Ram, H. van den Ende, and F. M. Klis. 1997. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 13:1477-89.

10. De Bernardis, F., F. A. Muhlschlegel, A. Cassone, and W. A. Fonzi. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. Infect Immun 66:3317-25.

11. De Groot, P. W., A. D. de Boer, J. Cunningham, H. L. Dekker, L. de Jong, K. J. Hellingwerf, C. de Koster, and F. M. Klis. 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. Eukaryot Cell 3:955-65.

12. De Groot, P. W., K. J. Hellingwerf, and F. M. Klis. 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. Yeast 20:781-96.

13. Dohlman, H. G. 2002. G proteins and pheromone signaling. Annu Rev Physiol 64:129-52.

14. Eisenhaber, B., P. Bork, and F. Eisenhaber. 2001. Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. Protein Eng 14:17-25.

15. Eisenhaber, B., S. Maurer-Stroh, M. Novatchkova, G. Schneider, and F. Eisenhaber. 2003. Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins. Bioessays 25:367-85.

16. Eisenhaber, B., G. Schneider, M. Wildpaner, and F. Eisenhaber. 2004. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. J Mol Biol 337:243-53.

17. Ferguson, M. A. 1999. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. J Cell Sci 112 (Pt 17):2799-809.

18. Fonzi, W. A. 1999. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. J Bacteriol 181:7070-9.

19. Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F. C. Odds, and B. Hube. 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. Mol Microbiol 56:397-415.

20. Fu, Y., A. S. Ibrahim, D. C. Sheppard, Y. C. Chen, S. W. French, J. E. Cutler, S. G. Filler, and J. E. Edwards, Jr. 2002. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. Mol Microbiol 44:61-72.

21. Garcera, A., A. I. Martinez, L. Castillo, M. V. Elorza, R. Sentandreu, and E. Valentin. 2003. Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. Microbiology 149:2137-45.

22. Gaur, N. K., S. A. Klotz, and R. L. Henderson. 1999. Overexpression of the *Candida albicans* ALA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. Infect Immun 67:6040-7.

23. Gaur, N. K., R. L. Smith, and S. A. Klotz. 2002. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* expressing ALA1/ALS5 adhere to accessible threonine, serine, or alanine patches. Cell Commun Adhes 9:45-57.

24. Griffith, O. H., and M. Ryan. 1999. Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. Biochim Biophys Acta 1441:237-54.

25. Hamada, K., H. Terashima, M. Arisawa, N. Yabuki, and K. Kitada. 1999. Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. J Bacteriol 181:3886-9.

26. Hoyer, L. L. 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol 9:176-80.

27. Ibrahim, A. S., B. J. Spellberg, V. Avenissian, Y. Fu, S. G. Filler, and J. E. Edwards, Jr. 2005. Vaccination with recombinant N-terminal domain of Als1p improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. Infect Immun 73:999-1005.

28. Inoue, N., Y. Murakami, and T. Kinoshita. 2003. Molecular genetics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Int J Hematol 77:107-12.

29. Insenser, M., C. Nombela, G. Molero, and C. Gil. 2006. Proteomic analysis of detergent-resistant membranes from *Candida albicans*. Proteomics 6 Suppl 1:S74-81.

30. Kamai, Y., M. Kubota, T. Hosokawa, T. Fukuoka, and S. G. Filler. 2002. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. Infect Immun 70:5256-8.

31. Kitagaki, H., H. Wu, H. Shimoi, and K. Ito. 2002. Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol 46:1011-22.

32. Klotz, S. A., N. K. Gaur, D. F. Lake, V. Chan, J. Rauceo, and P. N. Lipke. 2004. Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. Infect Immun 72:2029-34.

33. Leidich, S. D., A. S. Ibrahim, Y. Fu, A. Koul, C. Jessup, J. Vitullo, W. Fonzi, F. Mirbod, S. Nakashima, Y. Nozawa, and M. A. Ghannoum. 1998. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. J Biol Chem 273:26078-86.

34. Lotz, H., K. Sohn, H. Brunner, F. A. Muhlschlegel, and S. Rupp. 2004. RBR1, a novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by RIM101 and activated by NRG1. Eukaryot Cell 3:776-84.

35. Martchenko, M., A. M. Alarco, D. Harcus, and M. Whiteway. 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. Mol Biol Cell 15:456-67.

36. Mastrangelo, P., and D. Westaway. 2001. Biology of the prion gene complex. Biochem Cell Biol 79:613-28.

37. Mayor, S., and H. Riezman. 2004. Sorting GPI-anchored proteins. Nat Rev Mol Cell Biol 5:110-20.

38. McConville, M. J., and A. K. Menon. 2000. Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review). Mol Membr Biol 17:1-16.

39. Morita, T., N. Tanaka, A. Hosomi, Y. Giga-Hama, and K. Takegawa. 2006. An alpha-amylase homologue, aah3, encodes a GPI-anchored membrane protein required for cell wall integrity and morphogenesis in *Schizosaccharomyces pombe*. Biosci Biotechnol Biochem 70:1454-63.

40. Mukherjee, P. K., K. R. Seshan, S. D. Leidich, J. Chandra, G. T. Cole, and M. A. Ghannoum. 2001. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence *in vivo*. Microbiology 147:2585-97.

41. Nobile, C. J., D. R. Andes, J. E. Nett, F. J. Smith, F. Yue, Q. T. Phan, J. E. Edwards, S. G. Filler, and A. P. Mitchell. 2006. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. PLoS Pathog 2:e63.

42. Nobile, C. J., V. M. Bruno, M. L. Richard, D. A. Davis, and A. P. Mitchell. 2003. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. Microbiology 149:3629-37.

43. Nobile, C. J., and A. P. Mitchell. 2005. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. Curr Biol 15:1150-5.

44. Rauceo, J. M., R. De Armond, H. Otoo, P. C. Kahn, S. A. Klotz, N. K. Gaur, and P. N. Lipke. 2006. Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p. Eukaryot Cell 5:1664-73.

45. Richard, M., P. De Groot, O. Courtin, D. Poulain, F. Klis, and C. Gaillardin. 2002. GPI7 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. Microbiology 148:2125-33.

46. Richard, M., S. Ibata-Ombetta, F. Dromer, F. Bordon-Pallier, T. Jouault, and C. Gaillardin. 2002. Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. Mol Microbiol 44:841-53.

47. Ruiz-Herrera, J., A. I. Martinez, and R. Sentandreu. 2002. Determination of the stability of protein pools from the cell wall of fungi. Res Microbiol 153:373-8.

48. Sharom, F. J., and M. T. Lehto. 2002. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Biochem Cell Biol 80:535-49.

49. Sheppard, D. C., M. R. Yeaman, W. H. Welch, Q. T. Phan, Y. Fu, A. S. Ibrahim, S. G. Filler, M. Zhang, A. J. Waring, and J. E. Edwards, Jr. 2004. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. J Biol Chem 279:30480-9.

50. Siafakas, A. R., L. C. Wright, T. C. Sorrell, and J. T. Djordjevic. 2006. Lipid rafts in Cryptococcus neoformans concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. Eukaryot Cell 5:488-98.

51. Spellberg, B. J., A. S. Ibrahim, V. Avenissian, S. G. Filler, C. L. Myers, Y. Fu, and J. E. Edwards, Jr. 2005. The anti-*Candida albicans* vaccine composed of the recombinant N terminus of Als1p reduces fungal burden and improves survival in both immunocompetent and immunocompromised mice. Infect Immun 73:6191-3.

52. Spreghini, E., D. A. Davis, R. Subaran, M. Kim, and A. P. Mitchell. 2003. Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation. Eukaryot Cell 2:746-55.

53. Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. Science 283:1535-8.

54. Sullivan, D., and D. Coleman. 1997. Candida dubliniensis: an emerging opportunistic pathogen. Curr Top Med Mycol 8:15-25.

55. Sundstrom, P. 2002. Adhesion in Candida spp. Cell Microbiol 4:461-9.

56. Theiss, S., G. Ishdorj, A. Brenot, M. Kretschmar, C. Y. Lan, T. Nichterlein, J. Hacker, S. Nigam, N. Agabian, and G. A. Kohler. 2006. Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A(2) activity and attenuates virulence. Int J Med Microbiol.

57. Thomas, J. R., R. A. Dwek, and T. W. Rademacher. 1990. Structure, biosynthesis, and function of glycosylphosphatidylinositols. Biochemistry 29:5413-22.

58. Tiede, A., I. Bastisch, J. Schubert, P. Orlean, and R. E. Schmidt. 1999. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. Biol Chem 380:503-23.

59. Verstrepen, K. J., A. Jansen, F. Lewitter, and G. R. Fink. 2005. Intragenic tandem repeats generate functional variability. Nat Genet 37:986-90.

60. Verstrepen, K. J., T. B. Reynolds, and G. R. Fink. 2004. Origins of variation in the fungal cell surface. Nat Rev Microbiol 2:533-40.

61. Weig, M., L. Jansch, U. Gross, C. G. De Koster, F. M. Klis, and P. W. De Groot. 2004. Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen Candida glabrata. Microbiology 150:3129-44.

62. Zhang, N., A. L. Harrex, B. R. Holland, L. E. Fenton, R. D. Cannon, and J. Schmid. 2003. Sixty alleles of the ALS7 open reading frame in *Candida albicans*: ALS7 is a hypermutable contingency locus. Genome Res 13:2005-17.

63. Zhao, X., K. J. Daniels, S. H. Oh, C. B. Green, K. M. Yeater, D. R. Soll, and L. L. Hoyer. 2006. *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. Microbiology 152:2287-99.

64. Zhao, X., S. H. Oh, G. Cheng, C. B. Green, J. A. Nuessen, K. Yeater, R. P. Leng, A. J. Brown, and L. L. Hoyer. 2004. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. Microbiology 150:2415-28.

65. Zhao, X., S. H. Oh, K. M. Yeater, and L. L. Hoyer. 2005. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. Microbiology 151:1619-30.

66. Zhao, X., C. Pujol, D. R. Soll, and L. L. Hoyer. 2003. Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* ALS5, ALS1 and ALS9. Microbiology 149:2947-60.

Common to the 3 studies

ORF6	ORF19	Genes name	%Identity / %Similarity	Homologues	Localisation	Regulated by	Role in virulence	Function prediction
1115	5741	Als1	26% / 43%	ScSag1	°	Biofilm-induced, Rfg1, Ssk1, growth-regulated	Defect	Involved in cell-cell adhesion
4915	5736	Als5	27% / 45%	ScSag1	°		ND (no mutant published)	By homology involved in cell-cell adhesion
8574	7414	Als6	26% / 44%	ScSag1	°		ND (no mutant published)	By homology involved in cell-cell adhesion
2344	3895	Cht2	43% / 55%	ScCts1	°	Caspofungin, yeast-form cells, Cyr1, Efg1, pH-regulated	ND (not tested)	By homology, Chitinase
1231	2706	Crh11	56% / 71%	ScCrh1	CW (N)	Caspofungin	ND (no mutant published)	By homology cell wall glycosidase of the cell wall
8439	7114	Csa1		NO	CW (V)	Morphogenesis switch, Rim101, Efg1, Cph1	ND (not tested)	Surface antigen on elongating hyphae and buds
7480	2075	Dfg5	50%/70%	ScDcw1	Mb (K,K)	Caspofungin, Morphogenesis switch	ND (not tested)	Unknown
3969	4255	Ecm331	33%/52%	ScEcm33	CW (N)	Caspofungin, Plc1, Rim101, Hog1, Cyr1, Ssn6	ND (no mutant published)	Unknown
6664	2952	Exg2	42% / 57%	ScExg1	Mb (K,K)	Cell wall regenaration	ND (no mutant published)	Putative exo-1,3-beta-glucosidase by homology
4883	1321	Hwp1		NO	CW (I)	Morphogenesis, Opaque and a cell specific	Defect	Hyphal cell wall protein; covalently crosslinked to epithelial cells
857	4975	Hyr1		NO	CW (N, I)	Morphogenesis switch, Rfg1, Efg1, Nrg1, Tup1, Cyr1	ND (not tested)	Unknown
4725	575	Hyr3 / Iff2		NO	CW (I)	Iron	ND (no mutant published)	Unknown
2179	4361	Iff3		NO	CW (Y, I)		ND (no mutant published)	Unknown
8724	7472	Iff4		NO	CW (I)		ND (not tested)	Unknown
297	2879	Iff5		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
2490	4072	Iff6		NO	°	WO switching	ND (no mutant published)	Unknown
8279	3279	Hyr4 / Iff7		NO	CW (N)	Rim101	ND (no mutant published)	Unknown
496	3212	Mid1	36% / 55%	ScMid1	Mb (K,K)		ND (no mutant published)	By homology involved in Ca2+ influx during mating
8973	7625	Pga1	33% / 57%	ScKre1	CW (V)	Cell wall regenaration	ND (no mutant published)	By homology, cell wall glycoprotein involved in beta-glucan assembly
7493	2062	Pga2 / Sod4	41% / 61%	Dh	°	White-opaque switching, Caspofungin	ND (no mutant published)	Superoxyde dismutase domain
7495	2060	Pga3 / Sod5	41% / 58%	Dh	°	Neutrophil contact, Morphogenesis, Caspofungin	Defect	Superoxyde dismutase domain
7448	4035	Pga4 / Gas1	55% / 73%	Dh	Mb (KK)		ND (no mutant published)	By homology, beta 1,3 glucanosyltransferase
4590	4765	Pga6 / Flo9	28% / 45%	ScFlo9	°	Iron, Als2	ND (no mutant published)	Flocculin
6914	5674	Pga10 / Rbt51or 8	46% / 58%	Dh	°	Ketoconazole, Morphogenesis, Rim101	ND (not tested)	Iron uptake using Haemoglobulin
8957	7609	Pga11		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
7834	6420	Pga13		NO	CW (I)	Cell wall regeneration, Caspofungin, Tsa1, Nrg1, Tup1, Cyr1	ND (no mutant published)	Unknown
8217	968	Pga14	46% / 62%	ScYnl190w	Mb (K,R)	Cell wall regeneration, Ssn6	ND (no mutant published)	Unknown
4387	2878	Pga15		NO	Mb (K)		ND (no mutant published)	Unknown
7284	893	Pga17		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
4292	301	Pga18		NO	CW (V)	Nrg1, Tup1	ND (no mutant published)	Unknown
450	535	Pga20 / Rbr1		NO	Mb (K)	Rim101, Nrg1	ND (not tested)	Unknown
6744	532	Pga21 / Rbr2		NO	°	Rim101, WO switching	ND (no mutant published)	Unknown
5468	3738	Pga22		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
83	3740	Pga23		NO	°	Rim101, Cyr1, Ssn6	ND (no mutant published)	Unknown
3288	3618	Pga24 / YWP1	34% / 48%	Dh	Mb (K,K)	Ssk1, Ssn6, Efg1, Efh1, phosphate	Normal	may promote dispersal of yeast forms of *C. albicans*
4960	2475	Pga26		NO	CW (V)	Iron, Cell wall regeneration	ND (no mutant published)	Unknown
311	5144	Pga28		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
8294	5305	Pga29 / Rhd3		NO	CW (V)	Iron, Morphogenesis switch	ND (no mutant published)	Unknown
8292	5303	Pga30		NO	CW (Y,V)		ND (no mutant published)	Unknown
7301	876	Pga33		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
4494	2833	Pga34		NO	Mb (K,K)		ND (no mutant published)	Unknown
6198	5760	Pga36 / Ihd1		NO	°	pH, Morphogenesis switch, Nrg1, Rfg1, Tup1, Tsa1p, Tsa1Bp	ND (no mutant published)	Unknown
4053	3923	Pga37		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
5495	6302	Pga39		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
6116	2906	Pga41		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
6115	2907	Pga42		NO	Mb (K)	Regulated if CDR1 and CDR2 or MDR1 are overexpressed	ND (no mutant published)	Unknown
3113	1714	Pga44		NO	CW (Y)		ND (no mutant published)	Unknown
1247	2451	Pga45		NO	CW (VI)	Caspofungin, Hog1, Ssn6	ND (no mutant published)	Unknown
2753	3638	Pga46		NO	Mb (K)		ND (no mutant published)	Unknown
5354	1401	Pga47 / Eap1		NO	°	Efg1	ND (no mutant published)	gene involved in binding human epithelial cells
5514	6321	Pga48		NO	CW (V)	Iron	ND (no mutant published)	weakly homologue to ScSed1 and ScSpi1
2824	4404	Pga49		NO	Mb (R,R,R)		ND (no mutant published)	Unknown
3431	1824	Pga50		NO	CW (I) AND Mb (K)		ND (no mutant published)	Unknown
799	1911	Pga52	52% / 68%	Sc Yjl171c	Mb (KK)	Fluconazole	ND (no mutant published)	Unknown
305	4651	Pga53		NO	CW (I) AND Mb (K)	Cyr1	ND (no mutant published)	Unknown
N/D	1105.2	Pga56		NO	CW (N)	Morphogenesis switch, Cell wall regeneration, Ssn6	ND (no mutant published)	Unknown
461	4689	Pga57		NO	Mb (R)		ND (no mutant published)	Unknown
1698	4334	Pga58		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
6585	2767	Pga59		NO	°	Ssn6	ND (no mutant published)	Unknown
4430	5588	Pga60		NO	CW (N)	Morphogenesis switch	ND (no mutant published)	Unknown
6196	5762	Pga61		NO	CW (V)		ND (no mutant published)	Unknown
6587	2765	Pga62		NO	°	Fluconazole, Iron, Cell wall regeneration, Cyr1, Ras1	ND (no mutant published)	Unknown
7524	3829	Phr1	55% / 69%	ScGas1	°	Rim101	Defect	By homology, beta-1.3-glucanosyltransferase, required for cell wall assembly
1067	6081	Phr2	59% / 69%	ScGas2	Mb (K)	Rim101, Fluconazole	Defect	By homology, beta-1.3-glucanosyltransferase, required for cell wall assembly
6206	6594	Plb3	53% / 67%	ScPlb1	Mb (K)		ND (no mutant published)	By homology, phospholipase B
4037	5102	Plb5	46% / 63%	ScPlb3	Mb (KKK)		ND (no mutant published)	By homology, phospholipase B
4505	5636	Rbt5		NO	CW (V)	Rfg1, Rim101, Sfu1, Hog1, Tup1, Serum, Iron, Ketoconazole	Normal	Unknown
7314	6928	Sap9	33% / 50%	ScYap3	Mb (R)	Antifungal drugs, Stationary phase, White-phase	Defect	By homology, aspartyl proteinase
7956	7030	Ssr1	57% / 67%	ScCcw14/ScSsr1	°		ND (not tested)	Required for cell wall intergrity
1639	1671	Csf4 / Utr2	42% / 58%	ScUtr2	°	Cell wall regeneration, Yeast form	Defect	By homology, 1,3-1,4-beta-glucanase

Common to Eisenhaber and De Groot studies

ORF6	ORF19	Genes name	%Identity / %Similarity	Homologues	Localisation	Regulated by	Role in virulence	Function
4504	5635	Pga7	51% / 63%	Dh	°	Rim101, Ketoconazole, Planktonic growth	ND (no mutant published)	Unknown
2933	3380	Pga8 / Hwp2		NO	CW (Y, I)	Efg1, Tup1	ND (no mutant published)	By homology, extracellular alpha-1,4-glucan glucosidase
1332	2758	Pga38	26% / 36%	NO	Mb (K,K)	Cell wall regeneration	ND (no mutant published)	Unknown
5166	207	Pga55		NO	°	Morphogenesis, Nrg1, Tup1	ND (no mutant published)	Unknown
4889	1327	Rbt1		NO	CW(I)	Tup1, Serum, Morphogenesis, Farnesol, Alpha factor,, Rim101	Defect	Unknown
2395	2237	Spr1	41% / 57%	ScSpr1	CW (N) AND Mb (K,K)		ND (not tested)	By homology, exo-1,3-beta-glucanase precursor

Specific to De Groot study

ORF6	ORF19	Genes name	%Identity / %Similarity	Homologues	Localisation	Regulated by	Role in virulence	Function
2924	5742	Als9		NO	°		ND (no mutant published)	By homology involved in cell-cell adhesion
N/D	1097	Als2	26%/45%	ScSag1	°	Morphogenesis switch, Ketoconazole, Iron, Cell wall regeneration	Essential?	By homology involved in cell-cell adhesion
1614	1816	Als3	27% / 44%	ScSag1	°	Morphogenetic switch, pH, Nrg1, Rfg1, Tup1	Defect	By homology involved in cell-cell adhesion
3075	4555	Als4	22% / 39%	ScFlo1	°	Vaginal contact	Normal	Involved in cell-cell adhesion
8560	7400	Als7	23% / 40%	ScSag1	CW (LV)	Biofilm	ND (not tested)	By homology involved in cell-cell adhesion
8769	7517	Cht1	51% / 63%	ScCts1	Mb (KR)	pH	ND (not tested)	By homology, Chitinase
N/D	3010.1	Ecm33	29%/43%	ScEcm33	Mb (KK)	Fluconazole induced, caspofungin repressed	Defect	Unknown
4720	570	Iff8		NO	CW (I)		ND (no mutant published)	Unknown
4542	4377	Kre1	sequence too short	ScKre1	CW (N) AND Mb (K)	Caspofungin	ND (no mutant published)	By homology, protein involved in 1,6-beta-D-glucan biosynthesis
3873	3693	Pga5	50% / 65%	Cg	Mb (K,K,K)		ND (no mutant published)	beta 1,3 glucanosyl transferase
4753	2108	Pga9 / Sod6	47% / 64%	Dh	°	Planktonic growth	ND (no mutant published)	Superoxide dismutase domain
8945	7597	Pga12	44% / 59%	Dh	°		ND (no mutant published)	Unknown
901	848	Pga16		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
5972	2033	Pga19		NO	°		ND (not tested)	Unknown
5529	6336	Pga25		NO	°	Fluconazole	ND (no mutant published)	Unknown
5983	2044	Pga27		NO	Mb (K,K,K)		ND (no mutant published)	Unknown
3932	5302	Pga31	38% / 59%	Dh	CW (V) AND Mb (K, K)	White-opaque, Cell wall regeneration	ND (no mutant published)	Unknown
8847	6784	Pga32		NO	°	Iron	ND (no mutant published)	Unknown
3757	4910	Pga35 / Fgr41	30% / 40%	Dh	°		ND (no mutant published)	Unknown
555	1616	Pga40 / Fgr23		NO	CW (N)	Alpha factor	ND (no mutant published)	Unknown
6112	2910	Pga43		NO	Mb (K)		ND (no mutant published)	Unknown
1293	1989	Pga51 / Dcw1	55% / 70%	ScDcw1	CW (L)	Cyr1	ND (no mutant published)	Unknown
4795	2685	Pga54		NO	°	Hog1, Cyr1, Efg1, Ssn6	ND (no mutant published)	Unknown
N/D	1442	Plb4.5	42% / 58%	ScPlb1	CW (VV) AND Mb (K, R)	Hog1, Ssn6	ND (no mutant published)	By homology, phospholipase B

Specific to Eisenhaber study

ORF6	ORF19	Genes name	%Identity / %Similarity	Homologues	Localisation	Regulated by	Role in virulence	Function
3505	3966	Crh1	38% / 53%	Dh	CW (I)	Nrg1, Tup1, Rim101, Cell wall regeneration	ND (no mutant published)	Unknown
7534	3839	Sap10	25% / 38%	ScYap3	Mb (K)	Iron	Defect	By homology, aspartyl proteinase
353	465	Iff9		NO	CW (Y,I)	Iron	ND (no mutant published)	Unknown
129	206	Unknown		NO	CW (N,V)		ND (no mutant published)	Unknown
66	4652	Unkown		NO	Mb (K)		ND (no mutant published)	Unknown
4704	4653	Unkown		NO	°	Iron	ND (no mutant published)	Unknown
4705	4654	Unkown		NO	°		ND (no mutant published)	Unknown
7864	6390	Unkown		NO	Mb (K)		ND (no mutant published)	Unknown
8030	7130	Unkown		NO	CW (Y) AND Mb (R, R)		ND (no mutant published)	Unknown

Specific to Garcera study

ORF6	ORF19	Genes name	%Identity / %Similarity	Homologues	Localisation	Regulated by	Role in virulence	Function
5153	220	Pir1	62% / 49%	Dh	CW (L)	Hog1, Fluconazole, Iron, Efg1, Plc1	ND (not tested)	By homology, involved in cell wall integrity
8954	7606	Unkown		NO	Mb (K,R)		ND (no mutant published)	Unknown
7675	5267	Unkown		NO	°	Caspofungin	ND (no mutant published)	Unknown
7427	4014	Unkown	55% / 35%	ScCdc1	°	induced upon adherence to polystyrene	ND (no mutant published)	Unknown
5522	6329	Unkown		NO	Mb (R, R, K)	Opaque-specific, Fluconazole, Cyr1	ND (no mutant published)	Unknown
8449	7104	Unkown		NO	CW (V)		ND (no mutant published)	Unknown

Table 1: **GPI anchored proteins in *C. albicans***. This final list has been obtained by compiling 3 different *in silico* studies of *C. albicans* genome: De Groot *et al.*, Eisenhaber *et al.* and Garcera *et al.* (De Groot *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Garcera *et al.*, 2003). The number in "**Orf6**" and "**Orf19**" columns refer to the different number given to a same sequence through the step of *C. albicans* sequencing genome project. A systematic search for homologues of the proteins has been done on each genes using the NCBI BLASTP tool (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) in "**Homologues**": NO refers to no hit, Dh refers to a hit in *Debaryomyces hansenii* genome, Cg refers to a hit in *Candida glabrata* genome, the other refer to *S. cerevisiae* genes. The percentage of identity and similarity between *C. albicans* and the corresponding fungi sequences are given in the column "**%Identity/%Similarity**". The results in the "**Localization**" column give the localization prediction: CW for cell wall en Mb for membrane; the residues found in the sequence that permitted the prediction are displayed in brackets. The column "**Regulated by**" gather the literature data extracted from transcriptional analyses, mainly using the CGD web site (http://www.candidagenome.org/). ND in the column "**Role in Virulence**" refers to No Data.

Table 2: Gene families containing GpiPs in *C. albicans*. Predicted GpiPs have a grey background, while the proteins not GPI anchored have a white background. Families have been classified according to BLASTP analysis on *C. albicans* genome sequences.

1	*orf19.4652*	*orf19.4653*										
2	*CHT1*	*CHT2*	*CHT3*									
3	*DFG5*	*PGA51/DCW1*										
4	*ECM331*	*ECM33.3*										
5	*EXG2*	*SPR1*	*EXG1*									
6	*PGA37*	*PGA57*										
7	*PGA59*	*PGA62*										
8	*SAP9*	*SAP10*	*SAP1*	*SAP2*	*SAP3*	*SAP4*	*SAP5*	*SAP6*	*SAP7*		*SAP8*	
9	*CRH1*	*UTR2*	*CRH11*									
10	*PGA2/SOD4*	*PGA3/SOD5*	*PGA9/SOD6*									
11	*PGA15*	*PGA41*	*PGA42*									
12	*HWP1*	*RBT1*	*PGA8/HWP2*									
13	*PGA30*	*PGA31*	*PGA32*	*orf19.1745*								
14	*PLB3*	*PLB4*	*PLB5*	*PLB1*	*PLB2*							
15	*CSA1*	*PGA7*	*PGA10/RBT8*	*RBT5*	*orf19.3117*							
16	*PGA4/GAS1*	*PGA5/GAS2*	*PHR1*	*PHR2*	*PHR3*							
17	*ALS1*	*ALS2*	*ALS3*	*ALS4*	*ALS5*	*ALS6*	*ALS7*	*ALS9*				
18	*HYR1*	*IFF1*	*IFF2*	*IFF3*	*IFF4*	*IFF5*	*IFF6*	*IFF7*	*IFF8*	*IFF9*	*IFF10*	*IFF11*
19	*PGA52*	*TOS1*										
20	*PGA24*	*orf19.3621*										
21	*orf19.4014*	*CDC1*										
22	*KRE1*	*KRE2*										
23	*orf19.220*	*orf19.2783*										
24	*YCK3*	*YCK2*	*HRR25*									
25	*PGA12*	*orf19.7596*	*orf19.6809*	*orf19.2607*								

Table 3: Prediction of GpiPs localization in *S. cerevisiae* and *C. albicans* using the amino acids environment of the ω minus region. The calculation of the percentage have been done using the list of 115 sequences (table 1) of *C. albicans* and the 58 sequences of *S. cerevisiae* extracted from Caro *et al*. study (Caro *et al.*, 1997). We followed the rules of prediction published by Hamada *et al.* (Terashima *et al.*, 2003).

	CW localization	**Membrane localization**	**Both localization**	**No particular residues**
C. albicans	29%	25%	6%	40%
S. cerevisiae	43%	45%	2%	7%

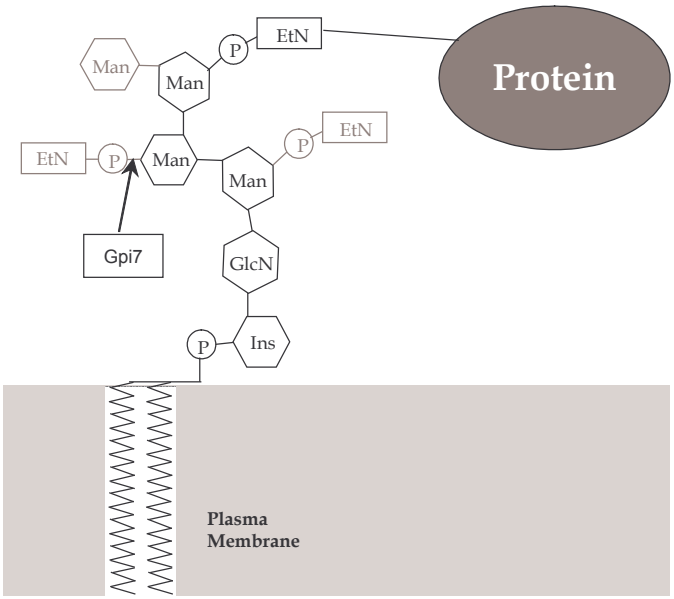


Figure 1: **GPI anchor structure**. The core structure found in any eukaryotic cell is represented in black. The additional grey groups illustrate the side chains added to the GPI anchor in *S. cerevisiae* (side chains are specific to each organism). Gpi7 is a protein involved in the addition of the ethanolamine phosphate side chain to the second mannose group in *S. cerevisiae* and *C. albicans*.

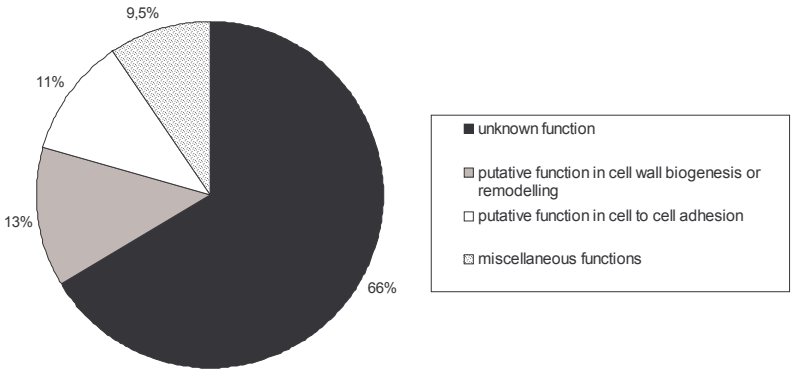


Figure 2: Function repartition within the GPI anchored proteins group (see Table1).

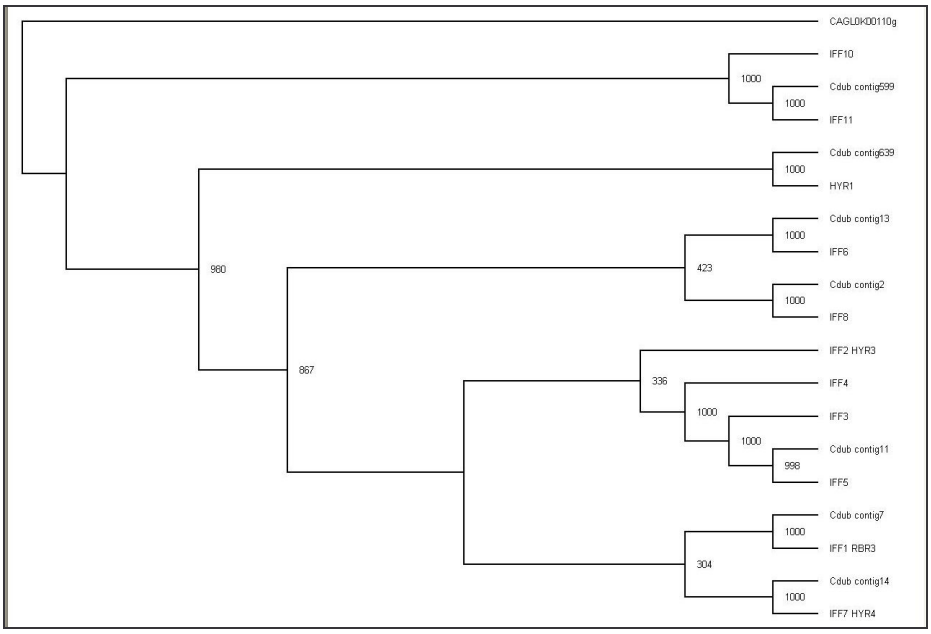


Figure 3: **Phylogenetic tree of the *HYR*/*IFF* gene family**. Phylogenetic tree showing the relationships between Hyr1 and Iff proteins in *C. albicans* and *C. dubliniensis* (Cdub). This tree is based on protein sequence alignments of the first 350 amino acids residues after gap removal. For bootstrap analyses, we constructed this tree by the neighbour-joining method using ClustalX. Bootstrap values based on 1000 replications are shown next to the nodes. An Iff homolog from Candida glabrata was used as out-group.

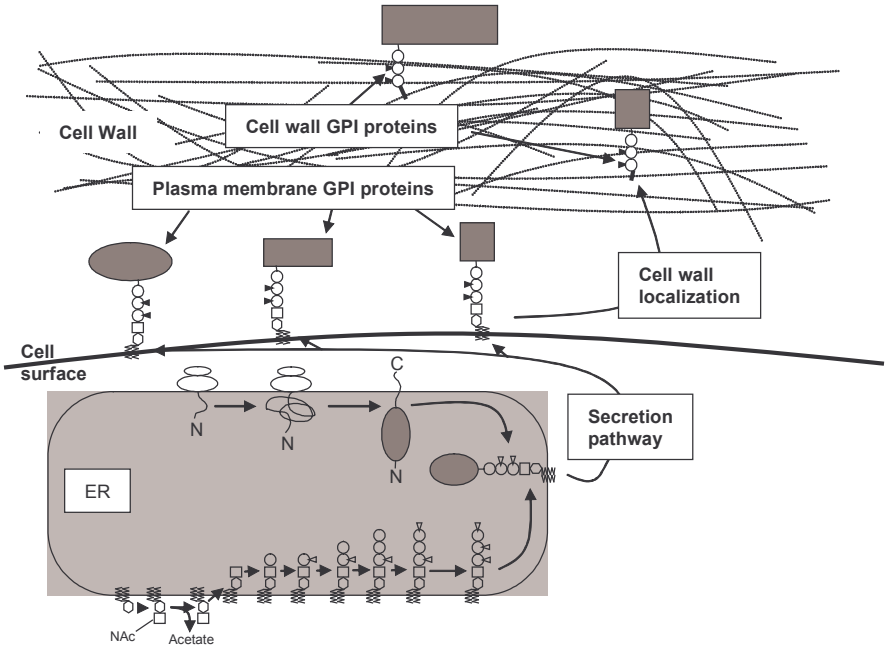


Figure 4: **The different steps of synthesis and transport of a GPI anchored protein in yeasts or fungi.** The first steps of GPI anchor biosynthesis occur in the endoplasmic reticulum (ER) or at its surface: synthesis of the GPI core structure and translation through the ER membrane of the future GpiP. The subsequent attachment of the protein on the GPI anchor takes place in the ER lumen. Then, the GpiPs follow the secretory pathway to be presented at the cell surface. The particularity of some fungi is an additional step in which the GPI anchor is cleaved after the glucosamine and the protein with the remnant part of the anchor is directed to the cell wall and covalently linked to β1,6 glucan.

II. ANALYSE FONCTIONNELLE DES GPIP CHEZ *C. ALBICANS*

La première partie de notre étude sur les rôles des GpiP dans les interactions hôte/pathogène consistait à interrompre un à un les gènes codant une GpiP (II.1), puis à caractériser le phénotype associé à ces inactivations (II.2) et enfin à cribler cette banque de mutants pour une plus grande sensibilité à la phagocytose (II.3). Cette dernière étape devait nous permettre d'identifier des GpiP impliquées dans les mécanismes d'interactions avec les macrophages qui feraient l'objet d'une étude fonctionnelle plus approfondie.

II.1 Création de la banque de mutants UAU1

II.1.1 Choix des gènes à interrompre et méthode utilisée pour y parvenir

Au début de ce travail de thèse, le seul inventaire complet sur des protéines à ancre GPI chez *C. albicans* était celui de de Groot (De Groot *et al.*, 2003). Dans cette étude, le nombre putatif de cadres ouverts de lecture était estimé par outil informatique à 104 chez *C. albicans*. Dans le but d'éviter les redondances fonctionnelles des gènes de même famille, nous avons écarté de la liste de de Groot les familles extrêmement bien conservées et étudiées telles que les ALS. Nous avions alors pour objectif d'interrompre 79 gènes ; une liste exhaustive se trouve en Annexe 1.

La construction de cette mini-banque de mutants a été rendue possible grâce à l'utilisation d'une technique de disruption que nous estimons être, à l'heure actuelle, la plus rapide chez *C. albicans*. La cassette de disruption est construite en insérant une cassette UAU1 par transposition *in vitro* dans un plasmide contenant le gène cible. Cette cassette une fois transformée dans *C. albicans* invalide un premier allèle par double recombinaison homologue (cf. Figure 19). Les transformants hétérozygotes peuvent ensuite devenir homozygotes, pour le gène cible, par homogénotisation de l'allèle marqué par la cassette UAU1. Cette cassette porte potentiellement deux marqueurs de sélection (*ARG4* et *URA3*), l'excision de ARG4 permet de sélectionner l'inactivation du second allèle après une seule transformation de *C. albicans* (Enloe *et al.*, 2000).

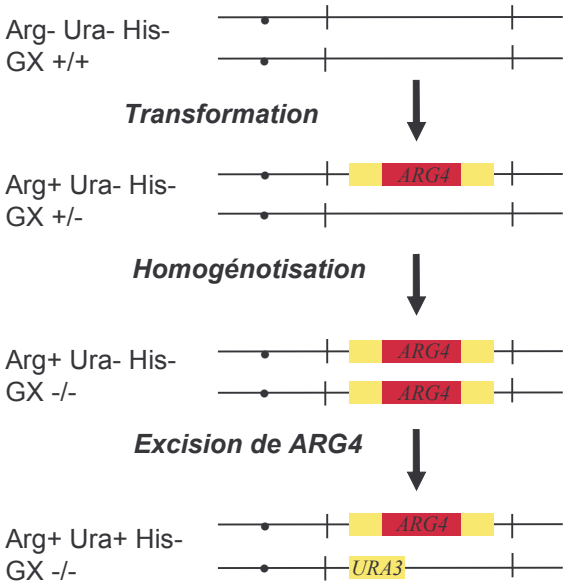


Figure 19 : Principe de la cassette UAU1.

II.1.2 Construction des cassettes de disruption

Choix de la construction

L'inactivation d'un gène peut se faire de deux manières : en interrompant l'ORF par l'insertion d'une séquence ou par délétion d'une partie ou de l'ensemble du gène. Pour des questions de rapidité, nous avons choisi la première approche. Ainsi, dans notre étude les cassettes de disruption contiennent l'ORF X entier dans lequel la cassette UAU1 a été insérée par transposition *in vitro* (*X::Tn-UAU1*).

Création des plasmides receveurs

Toutes les séquences des gènes cibles ont été obtenues sur le site d'annotation du génome de *C. albicans* : http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/. Chaque ORF a été amplifié par PCR puis cloné dans le plasmide vecteur pGEM-T. De part et d'autre du site d'insertion du fragment de PCR, se trouve le site de restriction *Not*I comme indiqué sur la Figure 20. Le plasmide receveur contient par ailleurs un marqueur de résistance à l'ampicilline (Amp). Par souci de gain de temps, l'orientation du fragment cloné n'a pas été vérifiée.

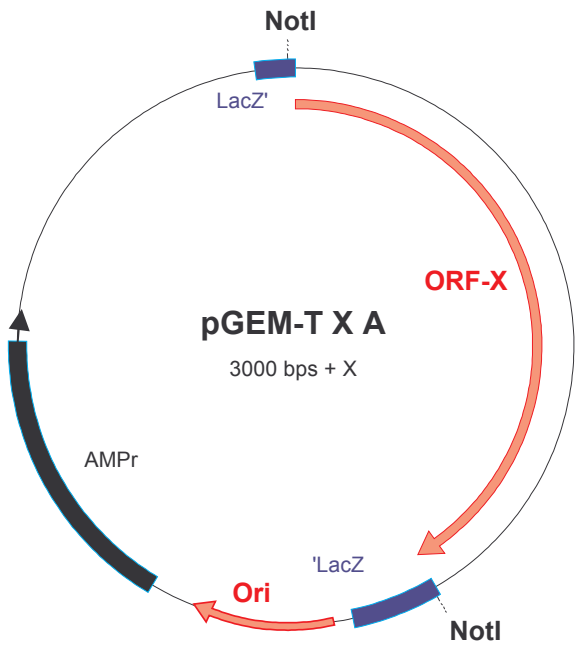


Figure 20 : Carte du plasmide receveur pGEM-T contenant le gène X.

Description du plasmide donneur

Nous avons utilisé le plasmide donneur pAED98 (voir Figure 21.a) (Davis *et al.*, 2002). La partie transposable de pAED98, représentée Figure 21-b, est appelée Tn7-UAU1 et porte les séquences suivantes :

– une cassette UAU1 contenant le marqueur *ARG4*, interrompant *URA3* et nécessaire à la sélection des transformants de *C. albicans*
– le marqueur de résistance à la kanamycine (KANr) nécessaire pour la sélection des produits de transposition,
– un site de restriction rare, *Pme*I, situé quelques paires de bases en amont de l'extrémité Tn7R du transposon.

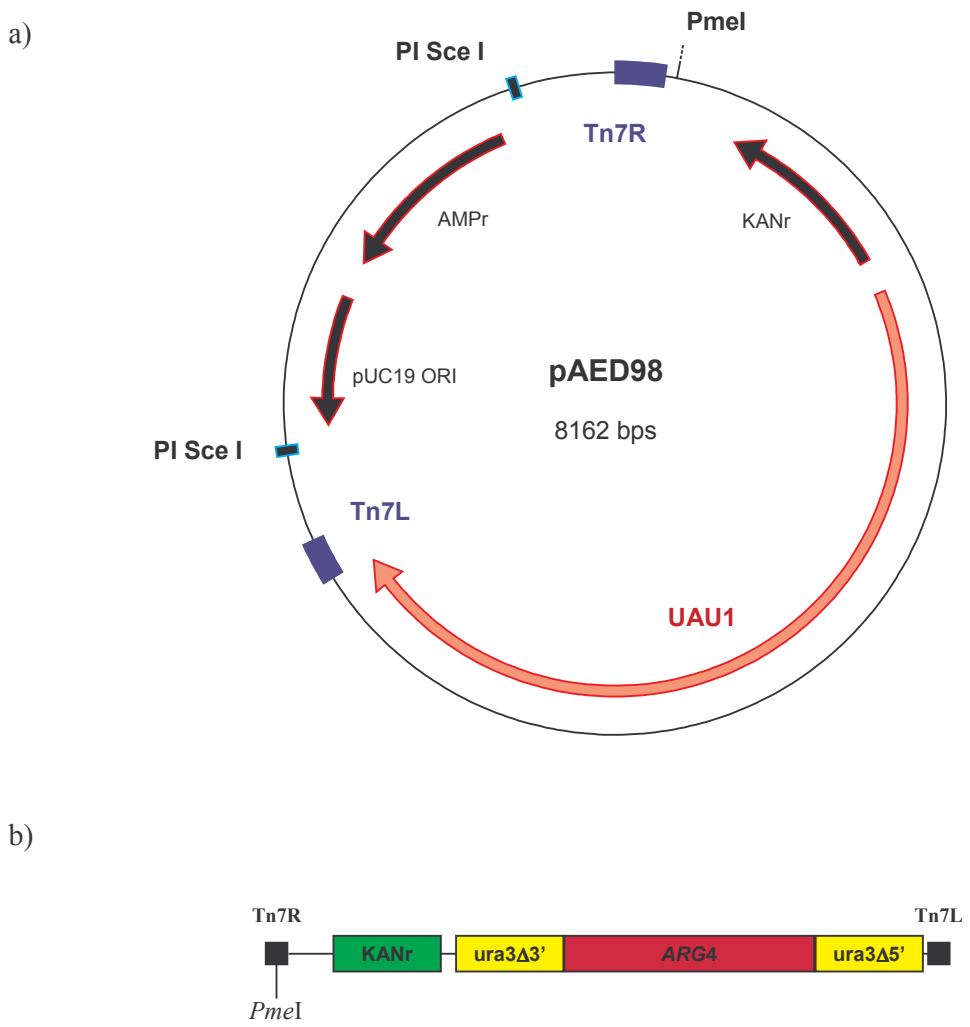


Figure 21 : a) Carte du plasmide donneur pAED98 et b) détail de la partie transposable Tn7-UAU1.

Transposition in vitro et sélection du plasmide contenant la cassette de disruption

La stratégie utilisée pour la construction des cassettes de disruption est la suivante (voir Figure 22 et Matériel et Méthodes II.1.5) :

– Tn7-UAU1 est transposé dans un plasmide receveur pGEM-T X en utilisant la transposase TnsABC fournit par le kit (cf. Matériel et méthodes II.1.5).

– Le produit de transposition est transformé dans la souche *d'E. coli* DH5α ou JM109.

– Grâce à une sélection sur milieu LB + Amp + Kan, les transformants contenant un plasmide receveur ayant intégré le transposon Tn7-UAU1 sont sélectionnés.

– Une double digestion enzymatique par *Not*I et *Pme*I permet de sélectionner les plasmides receveurs ayant intégré le transposon dans l'ORF d'une part et d'autre part de localiser le site d'insertion de Tn7-UAU1 dans l'ORF X.
– L'orientation de l'insertion de l'ORF dans le vecteur n'étant pas connue, on se limite à sélectionner les plasmides receveurs ayant intégré Tn-UAU1 à proximité du milieu de l'ORF cible. Nous avons fait le pari que l'insertion du transposon au milieu de l'ORF rend le gène non fonctionnel dans la plupart des cas. Quoi qu'il en soit, le peptide traduit ne sera pas ancré par une GPI.
– Les plasmides sélectionnés sont digérés par *Not*I.

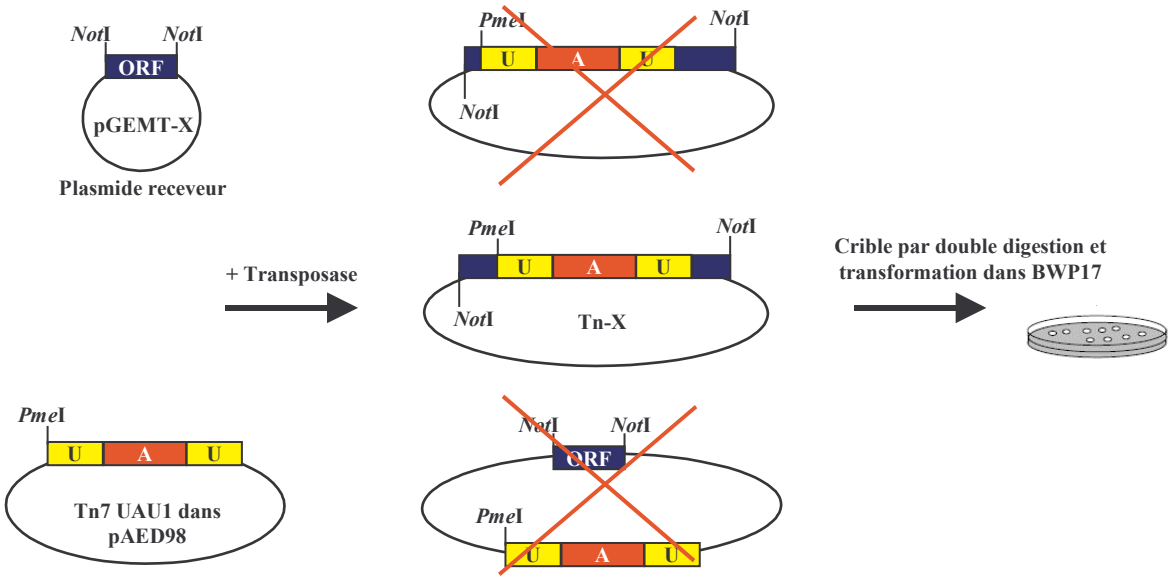


Figure 22 : Construction de la cassette de disruption Tn-X par transposition *in vitro*.

II.1.3 Disruption systématique des gènes codant des GpiP par la méthode UAU1

La cassette UAU1

Comme nous l'avons déjà souligné dans l'introduction, l'utilisation de la cassette UAU1 présente l'avantage de ne nécessiter qu'une seule transformation pour interrompre les deux copies du gène cible, ce qui représente un gain de temps considérable. En effet, cette cassette contient potentiellement deux marqueurs de sélection (*ARG4* et *URA3*) et se décompose comme suit : (i) ura3Δ3', la partie 3' du gène *URA3* non fonctionnel (ii) le gène *ARG4* fonctionnel (iii) ura3Δ5', la partie 5' du gène *URA3* non fonctionnel qui partage 530 bp de séquence identique avec le fragment ura3Δ3'. La Figure 23 présente l'étape de recombinaison

qui rend fonctionnel l'un des marqueurs de sélection au détriment de l'autre. Dans son état initial UAU1 (Arg+ Ura-), cette cassette exprime le gène *ARG4*, mais pas *URA3*. Les répétitions directes de 530 pb entre les deux séquences *URA3* permettent une recombinaison homologue qui a pour conséquence l'excision de *ARG4* rendant le gène *URA3* fonctionnel. La cassette qui en résulte (Arg- Ura+) exprime *URA3* mais pas *ARG4*.

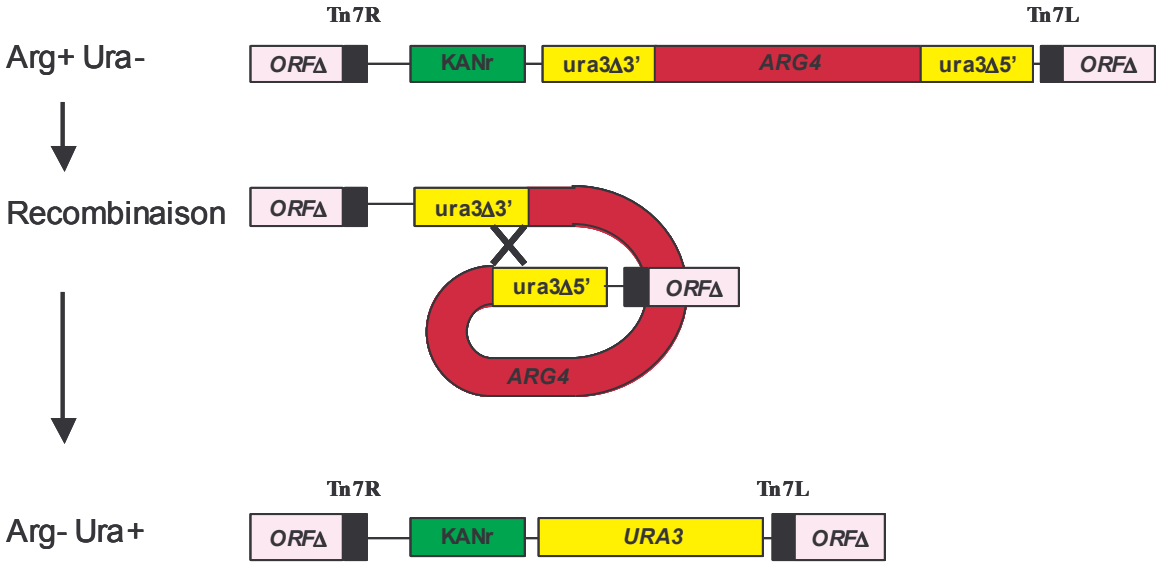


Figure 23 : Etape de recombinaison permettant l'excision du marqueur *ARG4* dans la cassette UAU1.

Transformation de Tn-X dans C. albicans

La Figure 24 représente les différentes étapes de la disruption par la méthode UAU1. La cassette de disruption *X::Tn-UAU1*, contenant la cassette UAU1 flanquée de part et d'autre par l'ORF du gène cible *X* est dans un premier temps transformée dans la souche BWP17 (Ura-, Arg-, His-). Les transformants hétérozygotes Arg+ ont alors un génotype *x::UAU1/X*, ce qui est vérifié par PCR sur colonie. L'insertion sur l'un des deux allèles de UAU1 peut occasionnellement devenir homozygote par une conversion de gène ou un évènement de recombinaison mitotique qui induit la duplication de l'allèle muté aux dépends de l'allèle sauvage. Ces recombinants s'accumulent sur milieu riche ; dans ce but, 24 hétérozygotes indépendants sont repiqués en secteur sur YPD. Une recombinaison entre les répétitions *URA3* permet l'excision du gène *ARG4* à l'intérieur d'une des copies de la cassette UAU1 et la formation d'une copie fonctionnelle d'*URA3*. Une réplique sur velours sur milieu sélectif SC Ura- Arg- permet ensuite d'isoler les transformants homozygotes prototrophes pour l'uracile et l'arginine (*x::Tn-UAU1/x ::Tn-URA3)*. Après 2 jours d'incubation à 30 °C, une colonie par secteur sur SC est repiquée pour être isolée puis testée par PCR sur colonie afin de

vérifier son génotype. Dans le but de travailler avec des mutants homozygotes indépendants, une seule colonie par secteur sera testée.

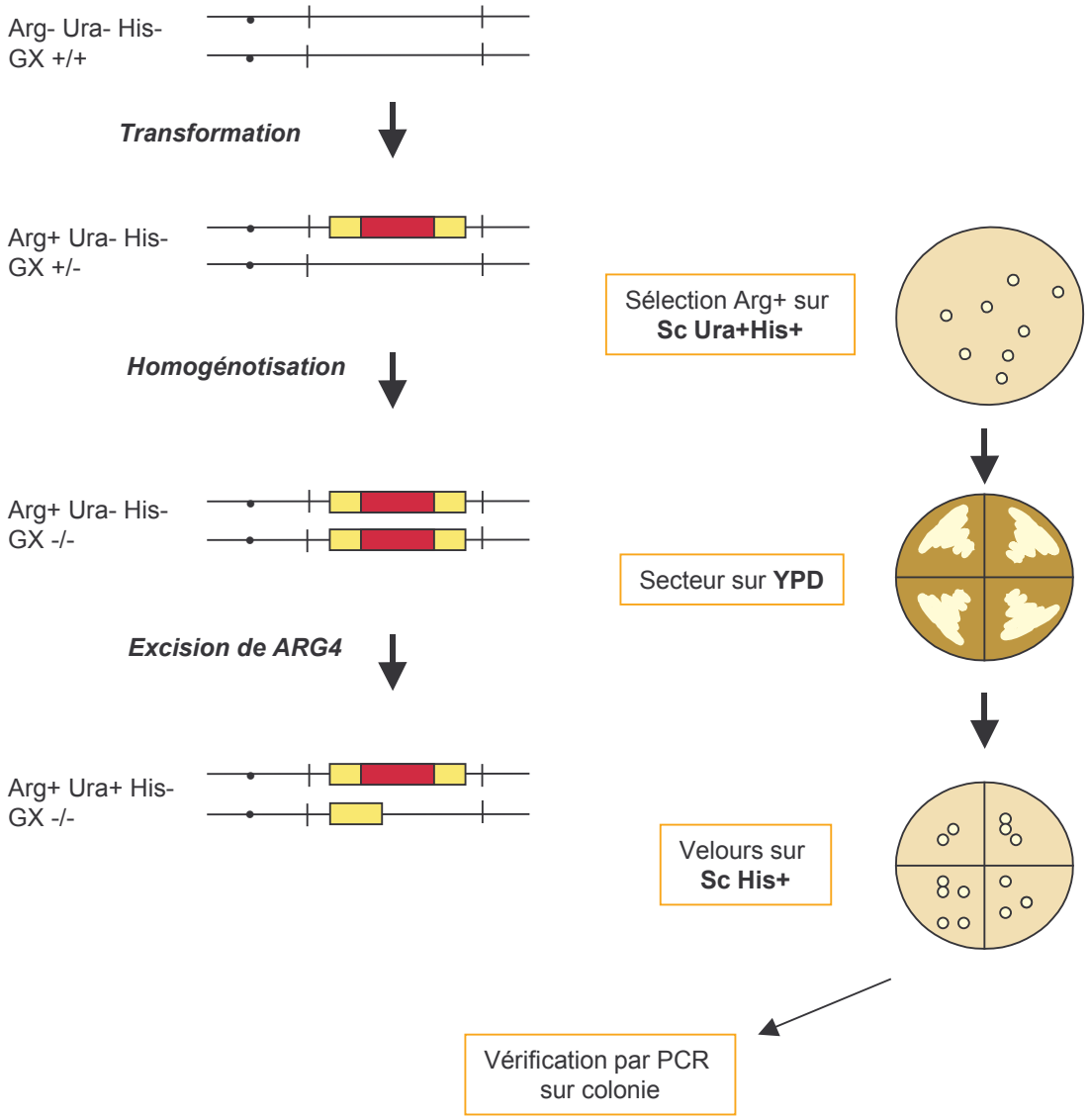


Figure 24 : Méthode de disruption de gène UAU1. (GX) est écrit pour gène X interrompu.

II.1.4 Criblage des mutants par PCR sur colonies

Tous les mutants ont été vérifiés par PCR sur colonie en utilisant 2 amorces spécifiques de l'ORF à interrompre et une troisième amorce spécifique de la cassette UAU1 (Figure 25-a). Ceci a permis de vérifier l'absence du gène sauvage et la présence de la cassette UAU1 après recombinaison et excision de gène *ARG4* comme cela est présenté Figure 25-b. Pour chacun des gènes interrompus, nous avons conservé au moins deux clones indépendants. Pour certains gènes, un repiquage d'hétérozygotes supplémentaires sur milieu riche a été nécessaire

afin d'obtenir deux homozygotes indépendants par gène interrompu. Lorsque le nombre de transformants Arg+ était insuffisant, nous n'avons pas persisté dans l'interruption de ce gène et nous l'avons laissé de côté.

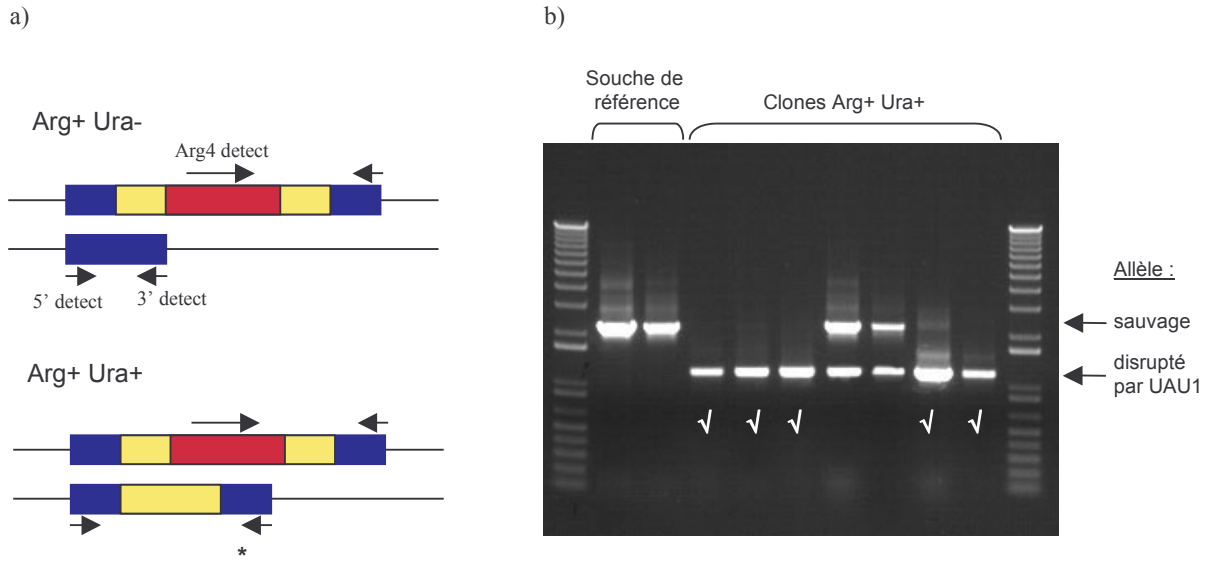


Figure 25 : Stratégie de vérification du génotype des transformants par PCR sur colonie. a) amorces utilisées et b) photo de gel après PCR. *La bande correspondant à l'amplification de l'ORF interrompu par *URA3* est trop grande pour être visible dans nos conditions (> 4 kb). √ : pour les clones bons.

II.1.5 Vérification par Southern du génotype des mutants sortant de cette étude

Idéalement on aurait dû vérifier par Southern le génotype de tous les mutants, mais pour des questions de temps, seul le génotype des mutants ayant un phénotype différent de la souche de référence sur l'un des tests phénotypiques réalisés a été vérifié. En effectuant ces vérifications deux cas de figures se sont présentés, ces résultats suivis d'une conclusion sont présentés ci-dessous.

Tous les clones ont le même phénotype et sont tous homozygotes pour le gène interrompu

Les Southern réalisés pour tous les clones des mutants *sap9*-/-, *sod6*-/-, *dfg5*-/-, *pga4*-/-, *mid1*-/- confirment l'interruption des deux copies du gène cible. L'exemple du mutant *mid1*-/- est présenté Figure 26. En utilisant une sonde marquant le gène cible en 5', la digestion de l'ADN génomique de la souche de référence BWP17 par *Xba*I donne une bande de 4,3 kb. La cassette de disruption UAU1 ne contient pas de site de restriction *Xba*I, l'intégration de cette cassette UAU1 au site cible donne, après digestion de l'ADN génomique des mutants, un

fragment de 9,9 kb et de 7,3 kb si l'excision de *ARG4* à eu lieu (URA+) (Figure 26-a)). Le Southern présenté Figure 26-b montre que la bande sauvage du gène cible a bien disparu chez les trois clones du mutant *mid1*-/- 2/10/12 ; et nous indique que la cassette de disruption est présente sous ses deux états, UAU1 (ARG+) et URA3+.

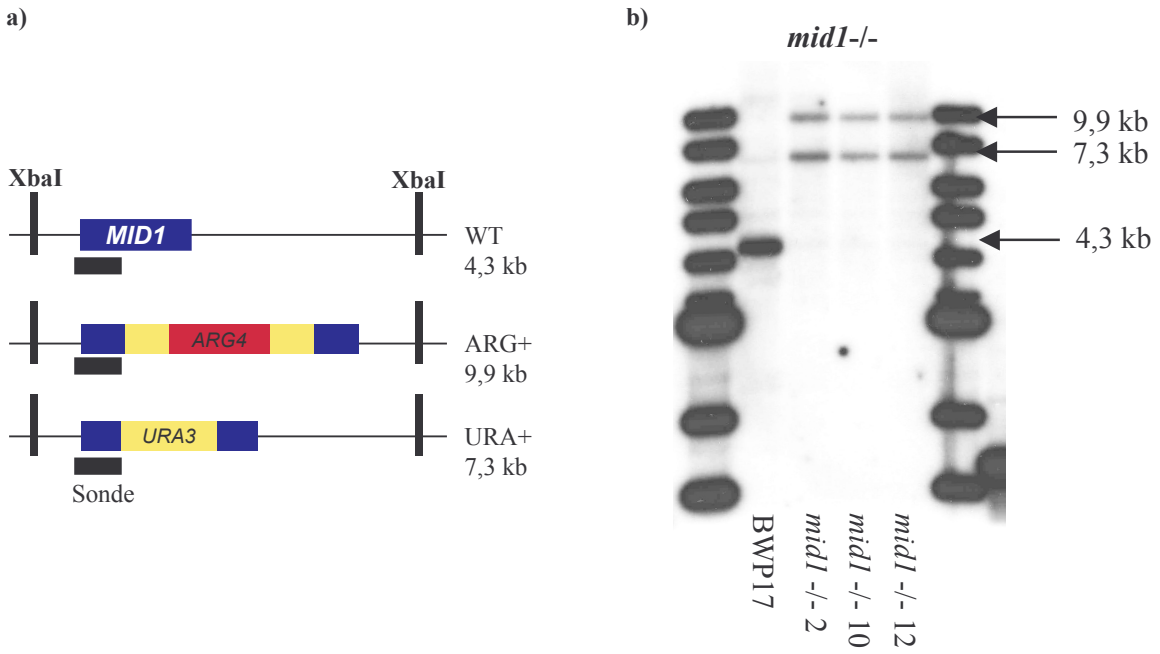


Figure 26 : Vérification du génotype des clones *mid1*-/- par Southern. a) carte de digestion de l'ADN génomique et b) photo du Southern.

Le génotype des mutants *pga62*-/-, *pga31*-/-, *ssr1*-/- et *csa1*-/- n'a pas été vérifié en Southern étant donné qu'ils montraient tous le même phénotype que les mutants correspondants que nous avons reçus (voir Tableau II). Tous les mutants qui nous ont été envoyés ayant été délétés par une méthode différente et vérifiés en Southern, nous avons estimé que le fait que ces mutants montrent le même phénotype que nos mutants UAU1 interrompus pour le même gène, confirmait l'inactivation du gène cible par notre méthode.

Tous les clones sont homozygotes pour le gène interrompu mais ne présentent pas tous le même phénotype

Les enzymes utilisées lors de la digestion d'ADN génomique ainsi que la taille des bandes attendues après révélation du Southern pour les clones du mutant *pga52*-/- sont présentés Figure 27. Il existe un site de restriction *Pst*I dans la séquence d'*ARG4 ;* comme nous ne connaissions pas le sens d'insertion de UAU1 dans l'ORF cible lors de la transposition *in vitro* nous nous attendions à obtenir une bande de 4,6 kb ou de 3,3 kb après révélation du

Southern pour les mutants *pga52*-/-. Nous obtenons les bandes aux tailles attendues pour la souche sauvage ainsi que chez les mutants pour la bande représentant l'insertion de la cassette UAU1 sous sa forme URA3+. Pour certains clones, la bande représentant l'insertion d'UAU1 fait environ 3,3 kb tandis que pour d'autres cette bande est légèrement plus grande ~ 3,5 kb (Figure 27-b).

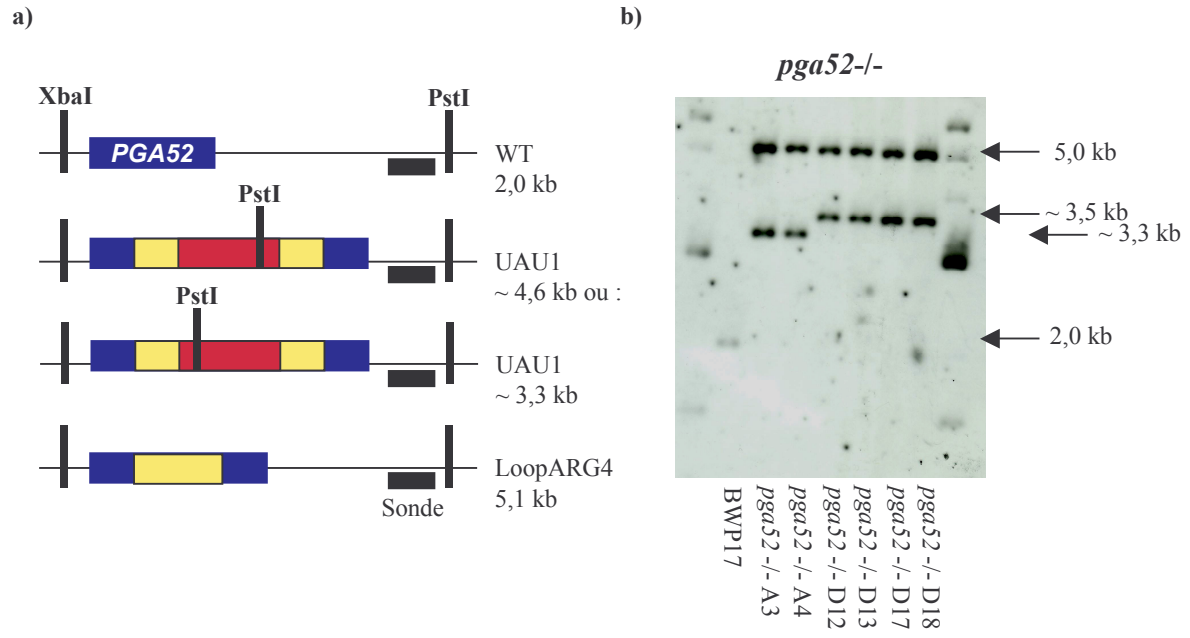


Figure 27 : Vérification du génotype des clones *pga52*-/- par Southern. a) carte de digestion de l'ADN génomique par *Bst*I et *Xba*I et b) photo du Southern après révélation.

Cette différence de taille s'explique par l'utilisation, lors de la transformation de BWP17 de deux casettes de disruption Tn-X issues de deux transpositions différentes (A et D). La cassette UAU1 n'a pas été transposée au même site du gène cible lors de la construction de Tn-X mais à environ 200 pb d'intervalle. Les clones issus de la transformation de BWP17 avec Tn-X (A) sont appelés *pga52*-/- A3 et A4, ceux issus de la transformation avec Tn-X (D) sont appelés *pga52*-/- D12/13/17/18 (Figure 27-b). Les résultats de Southern montrent pour les 6 clones que l'une des deux copies du gène *PGA52* a été interrompue par la cassette de disruption sous forme UAU1 et l'autre par *URA3*.

Pourtant les clones présentent des phénotypes différents sur milieu Spider indépendamment des cassettes de disruption utilisées (A3, D12, D13 sont Fil$^-$; A4, D17 et D18 sont Fil$^+$). Nous pouvons écarter la possibilité que les peptides produits par les mutants *pga52*-/- D12/13/17/18 puissent avoir une activité, contrairement à ceux des mutants A3 et A4 qui sont plus petits. Ces résultats tendent à montrer que le défaut de filamentation de certains mutants *pga52*-/-

n'est pas dû à l'inactivation de *PGA52* mais résulterait d'un effet secondaire de la transformation.

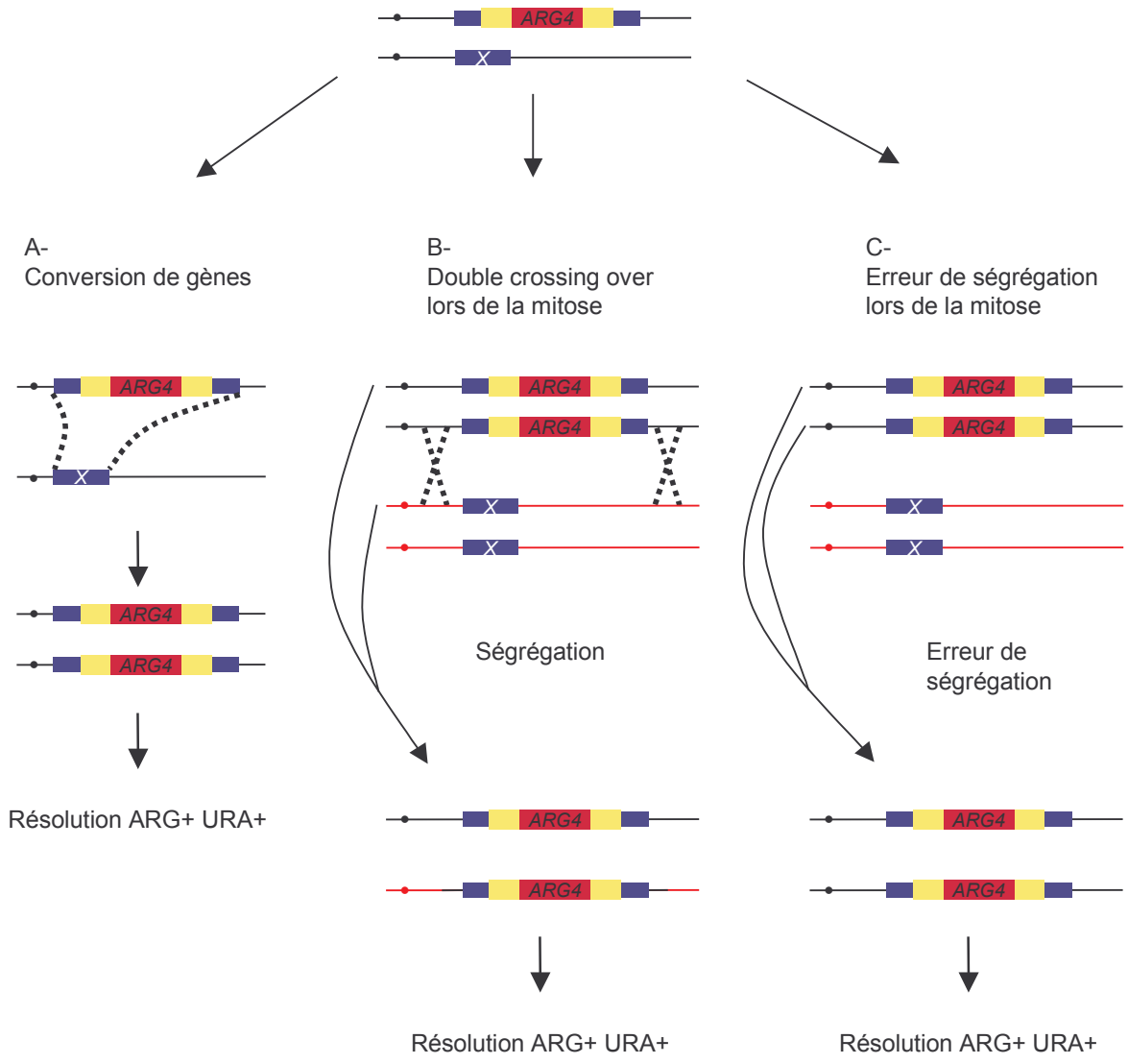


Figure 28 : Les évènements génétiques possibles se produisant lors de l'utilisation de la méthode UAU1 a) une conversion génique non réciproque correspondant à un mécanisme de réparation, en mitose b) un double crossing over concernant une séquence d'ADN variable ou c) tout un chromosome lors d'une erreur de ségrégation

Etant donné le nombre de clones Fil$^-$ (50 %), il est peu probable que ce phénotype soit dû à l'effet mutagène de la transformation. Comme nous l'avons déjà mentionné (cf. Résultats II.1.3) la méthode de disruption UAU1 sélectionne les transformants pour lesquels une conversion de gène, un double crossing over ou une erreur de ségrégation lors de la mitose a rendu la souche homozygote pour la cassette de disruption (cf. Figure 28). L'un de ces

évènements génétiques a également pu rendre homozygote une zone hétérozygote à proximité du gène invalidé *PGA52*. Ainsi, en fonction de l'allèle qui a été interrompu en premier et de l'étendue de la région rendue homozygote, certains mutants *pga52*-/- auront un phénotype sauvage tandis que d'autres présenteront un défaut de morphogenèse qui ne sera dû à l'interruption de *PGA52*. Nous avons donc écarté ces mutants de notre banque. Nous aurions pu vérifier cette hypothèse en comparant les séquences des haplotypes encadrant *PGA52* en amont et en aval (http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/), mais pour des raisons de temps imparti au travail de thèse, cela n'a pas été fait.

Conclusion

Lors de la construction des mutants, une première étape de sélection a été réalisée par PCR sur colonies. Ensuite, le fait d'utiliser pour chacun des tests réalisés deux clones indépendants, nous a permis de détecter certains mutants qui présentaient deux phénotypes différents pour les deux clones testés. Dans le cas où nous ne disposions que de ces deux clones nous les avons tous écartés de la banque (cas rencontré deux fois pour *pga41*-/- et *pga47*-/-). Dans le cas où sur tous les clones testés, un seul clone présentait un phénotype différent nous avons estimé que la transformation avait été mutagène pour ce clone et l'avons écarté de la banque tout en conservant les autres clones (cas rencontré un fois pour *pga40*-/-). Enfin nous avons été confronté une seule fois au cas décrit ci-dessus pour *pga52*-/-, par mesure de précaution nous avons une fois de plus écarté ce mutant de notre banque. En conclusion, en un an, nous avons interrompu 39 mutants par la méthode UAU1. Cette technique est très intéressante car elle permet de construire rapidement et en grand nombre des mutants chez ce diploïde. Les résultats de Southern présentés précédemment pour *Mid1*-/- donnent une bonne vision globale de cette technique : les trois clones vérifiés par Southern étaient corrects comme l'ont été tous les clones testés pour *sap9*-/-, *sod6*-/-, *dfg5*-/-, *pga4*-/- ; ceci démontre l'efficacité de la cassette UAU1 en revanche le cas du mutant *pga52*-/- en montre ses limites. En effet, cette méthode basée sur des évènements génétiques que nous ne maîtrisons pas soulève d'intéressantes questions : quelle est la taille du segment d'ADN qui devient homozygote dans les clones Arg^+ Ura^+ ? À quelle fréquence se produisent ils ? Des zones d'hétérozygoties sont décrites dans des isolats naturels de *C. albicans* (Poulter, 1987; Whelan and Magee, 1981; Whelan and Soll, 1982), ainsi que dans la souche séquencée SC5314 (proche de la notre) où la fréquence moyenne de polymorphisme est d'1 nucléotide sur 237 (Jones *et al.*, 2004). Ces polymorphismes sont répartis inégalement en zones d'hétérozygoties, principalement présentes dans les chromosomes 5 où se trouve le MTL (cf. Introduction I.3.1)

et le chromosome 6. Des exemples de polymorphismes entre différentes souches de *C. albicans* ont également été rapportés et peuvent être mis à profit pour différencier les souches qui affectent les patients (SNPs pour « single nucleotide polymorphism », (Bougnoux *et al.*, 2003)). Il est donc possible que certains des phénotypes observés ne soient pas dus au gène interrompu. Nous pensons que ces effets sont limités : en effet, 4 de nos mutants UAU1 montrent le même phénotype que des mutants délétés par une autre méthode (voir ci-dessus, *pga62*-/-, *pga31*-/-, *ssr1*-/- et *csa1*-/-).

II.1.6 Banque de 47 mutants GPI

En utilisant la technique de disruption UAU1 que nous venons de décrire, nous avons réussi à construire 39 mutants GpiP en un an ; ceci malgré les difficultés techniques rencontrées principalement dues aux problèmes de transposition qui nous ont fait perdre plusieurs mois (cf. Matériel et méthodes II.1.5). Pour chacun d'eux, nous disposons d'au moins deux clones indépendants. L'objectif initial de 79 mutants n'a pas été atteint mais il ne semblait pas raisonnable de consacrer plus de temps à cette première étape du projet. D'autre part, plusieurs mutants GpiP avait déjà était construits dans différents laboratoires. En sollicitant ces équipes, nous avons pu intégrer 12 autres mutants à notre banque. La grande majorité de ceux-ci ont été construits en utilisant la méthode de l'URA Blaster (voir Introduction I.3.2), le génotype ainsi que l'origine de ces mutants sont décrits dans le Tableau II de la partie matériel et méthodes. Parmi ces 12 mutants, quatre ont été également interrompus dans notre étude par la méthode UAU1. La banque de mutants GpiP avec laquelle le reste de l'étude a été réalisée est donc composée des 47 mutants suivants :

39 mutants par insertion UAU1 : *pga4*-/- (orf19.4035), *pga5*-/- (orf19.3693), *pga6*-/- (orf19.4765), *pga7*-/- (orf19.5635), *pga8*-/- (orf19.3380), *pga10*-/- (orf19.5674), *pga17*-/- (orf19.893), *pga23*-/- (orf19.3740), *pga24*-/- (orf19.3816), *pga27*-/- (orf19.2044), *pga30*-/- (orf19.5303), *pga31*-/- (orf19.5302), *pga32*-/- (orf19.6784), *pga33*-/- (orf19.876), *pga36*-/- (orf19.5760), *pga37*-/- (orf19.3923), *pga39*-/- (orf19.6302), *pga40*-/- (orf19.1616), *pga42*-/- (orf19.2907), *pga43*-/- (orf19.2910), *pga45*-/- (orf19.2451), *pga46*-/- (orf19.3638), *pga50*-/- (orf19.1824), *pga55*-/- (orf19.207), *pga57*-/- (orf19.4689), *pga62*-/- (orf19.2765), *csa1*-/- (orf19.7114), *cht1*-/- (orf19.7517), *cht2*-/- (orf19.3895), *dfg5*-/- (orf19.2075), ecm*331*-/- (orf19.4255), *hyr1*-/- (orf19.4975), *mid1*-/- (orf19.3212), *rbt5*-/- (orf19.5636), *sap9*-/- (orf19.6928), spr*1*-/- (orf19.2237), *sod4*-/- (orf19.2062), *sod6*-/- (orf19.2108), *ssr1*-/- (orf19.7030).

12 mutants reçus : *pga31-/-, pga59-/-, pga62-/-*, *csa1-/-*, *hwp1-/-, phr1-/-, phr2-/-, rbt1-/-*, *rbt5-/-, sap10-/-, sod5-/-, ssr1-/-.*

dont quatre mutants également invalidés par nous avec la cassette UAU1 : *pga31-/-, pga62-/-*, *csa1-/-*, *ssr1-/-*.

II.2 Etude phénotypique des mutants GpiP

II.2.1 Catégorisation des mutants en fonction de leur phénotype

La disruption des gènes GpiP est une approche puissante qui nous permet de classifier les mutants par catégorie phénotypique en testant différentes fonctions biologiques telles que :

– la morphogenèse, par des tests sur milieu Spider, sérum et CMA,
– la synthèse de la paroi, par des tests en goutte sur milieu YPD + SDS et YPD + CFW,
– la résistance aux antifongiques, par l'utilisation de microplaque contenant de l'Amphothéricine B, Fluconazole ou par des tests en goutte sur milieu minimum contenant de la caspofungine,
– l'adaptation à différents pH (pH 3 et pH 10) et différentes températures (23 °C et 43,5 °C),
– la réponse au stress testée en présence de chlorure de sodium, d'acide acétique, d'eau oxygénée, de cadmium et de fer.

Pour un total de 17 tests.

Les résultats de cette première étude globale sur les GpiP réalisée chez *C. albicans* montrent dans un premier temps que les GpiP chez *C. albicans* ne sont pas impliquées dans une seule fonction biologique mais dans plusieurs que nous pouvons regrouper en trois grandes catégories fonctionnelles : (i) la morphogenèse (quatre mutants), (ii) la réponse au stress (dix mutants) et (iii) l'intégrité de la paroi et la sensibilité à la caspofungine (neuf mutants). 16 mutants sur les 47 de notre banque montrent un phénotype différent de celui de la souche de référence, ces mutants sont listés dans le Tableau IV. Les 17 tests réalisés sur les mutants de la banque nous ont permis tout d'abord de confirmer et de compléter le phénotype de mutants pour lesquels des études avaient déjà été publiées. Les phénotypes observés chez les mutants déjà caractérisés sont présentés par grande fonction et discutés dans l'article qui se trouve partie II.2.3 des résultats.

Ensuite, dans la partie suivante nous nous attarderons sur le phénotype des 6 mutants dont les gènes interrompus n'avaient été jusqu'alors seulement identifiés *in silico* (en rouge dans le Tableau IV).

Tableau IV. Mutants de la banque montrant un phénotype différent du phénotype de la souche de référence. Les gènes identifiés par cette étude sont en rouge. DC pour défaut de croissance, Fil- pour défaut de filamentation, Fil+/- pour léger défaut de filamentation.

Source	Gène interrompu	Testé sur :												
		Sérum	Spider	pH3	pH10	43,5°C	Cd	$Fe3^+$	CH_3-COOH	NaCl	H_2O_2	SDS	CFW	Caspo
(Richard *et al.*, 2001)	*GPI7*	Fil-								DC		DC	DC	Tolérant
(Staab *et al.*, 1999)	Orf19.1321 *HWP1*	Fil+/-	Fil-									DC	DC	
(Braun *et al.*, 2000)	Orf19.1327 *RBT1*												DC	
(Fradin *et al.*, 2005)	Orf19.2060 *SOD5*									DC				
(Saporito-Irwin *et al.*, 1995)	Orf19.3829 *PHR1*	Fil-	Fil-		DC								DC	Tolérant
(Fonzi, 1999)	Orf19.6081 *PHR2*			DC										
Ce travail	Orf19.6928 *SAP9*						DC							
(Albrecht *et al.*, 2006)	Orf19.3893 *SAP10*								DC					
(Garcera *et al.*, 2003)	Orf19.7030 *SSR1*					DC							DC	DC
Ce travail	Orf19.7030 *SSR1*					DC							DC	DC
(Lamarre *et al.*, 2000)	Orf19.7114 *CSA1*										DC			
Ce travail	Orf19.7114 *CSA1*										DC			
Ce travail	Orf19.2075 *DFG5*	Fil-/+	Fil-/+											Tolérant
Ce travail	Orf19.2108 *SOD6*		Fil-			DC								
Ce travail	Orf19.3212 *MID1*							DC						DC ++
Santendreu	Orf19.5302 *PGA31*							DC		DC		DC	DC	DC
Ce travail	Orf19.5302 *PGA31*							DC		DC		DC	DC	DC
Ce travail	Orf19.4035 *PGA4*													Tolérant
S. Goyard	Orf19.2767 *PGA59*												DC	Tolérant
Ce travail	Orf19.2765 *PGA62*												DC	Tolérant
S. Goyard	Orf19.2765 *PGA62*												DC	Tolérant

II.2.2 Nouveaux gènes identifiés par le crible

L'étude phénotypique de la banque de mutants a permis de catégoriser certains gènes (*PGA4*, *PGA31*, *PGA59*, *PGA62*, *SOD6* et *MID1*) qui avaient été seulement identifiés *in silico* jusqu'alors. Pour la plupart de ces gènes il est possible de les regrouper par petite famille. Pour plus de clarté cette approche a été retenue pour présenter le phénotype des mutants correspondants. Ces résultats seront également discutés dans cette partie afin d'aborder des points plus généraux dans la discussion finale de ce travail de thèse.

La famille des superoxides dismutases Sod4/5/6p

Le premier gène identifié par cette étude, *SOD6,* appartient à la famille des superoxides dismutases qui comprend chez *C. albicans* six protéines (Sod1p-6p). Ces protéines sont des enzymes anti-oxydantes impliquées dans l'élimination d'anions superoxides (O_2^-). Ces radicaux peuvent provenir de la chaîne respiratoire mitochondriale ou peuvent être extracellulaires lorsque le pathogène rencontre des cellules phagocytaires (cf. Introduction III.1.3). Les gènes *SOD1-3* codent des superoxides dismutases cytoplasmiques alors que les produits des gènes *SOD4-6* sont des protéines à ancre GPI potentiellement extracellulaires ; un alignement des trois séquences protéiques de Sod4p, Sod5p et Sod6p est présenté Figure 29.

Au début de ce travail de thèse seul Sod5p avait été caractérisée (Fradin *et al.*, 2005; Martchenko *et al.*, 2004). En effet, des études réalisées par Fradin *et al.*, ont montré que Sod5p était une GpiP pariétale indispensable à la survie du pathogène dans le phagosome des neutrophiles. De plus, des expériences de Northern réalisées par Martchenko et ses collaborateurs avaient également montré que le niveau d'expression de *SOD5* dépendait de plusieurs facteurs tels que la température, le pH, la source de carbone fermentescible, la présence de NaCl ou d'agents oxydatifs (Martchenko *et al.*, 2004). Ces paramètres correspondent aux contraintes rencontrées par *C. albicans* une fois endocyté dans le phagosome du neutrophile. Ces résultats de Northern sont confirmés par nos tests en gouttes puisque le mutant *sod5*-/- présente un défaut de croissance sur milieu YPD + NaCl (voir Tableau IV et article). En revanche, contrairement aux résultats de Martchenko, l'interruption de *SOD5* n'a pas d'effet sur la croissance de la levure sur SC pH7 + 7,5 mM H_2O_2 à 37 °C. Cette différence de résultat entre nos deux laboratoires peut être expliquée par le pH des milieux (pH8 et pH7) ainsi que la température à laquelle les boîtes ont été incubées (30 °C et

37 °C). En effet, les Northern ont démontré que *SOD5* semble être plus exprimé à 30 °C qu'à 37 °C et à pH 8 qu'à un pH plus acide (Martchenko *et al.*, 2004).

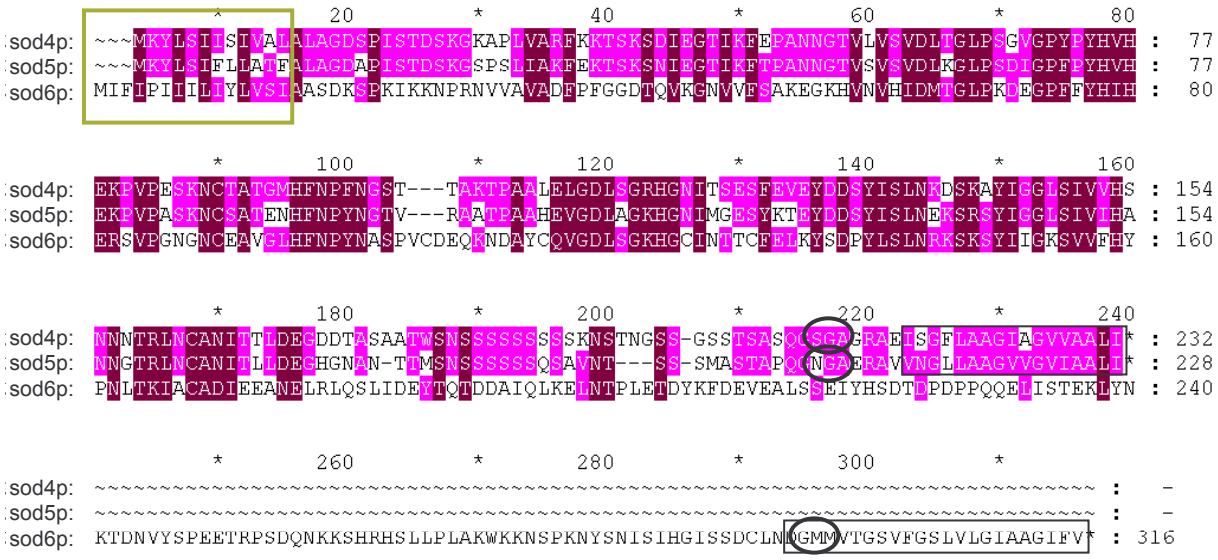


Figure 29 : Alignement des séquences protéiques de 3 superoxides dismutases potentiellement GpiP chez *C. albicans*. Cet alignement a été réalisé en utilisant le logiciel GeneDoc. Plus la couleur est claire plus la similarité entre les séquences est faible. Sod6p (316 aa) présente respectivement 41 % et 43 % d'identité de séquence avec sod5p (228 aa) et sod4p (232 aa). La valeur E limite utilisée pour cet alignement est $1x10^{-27}$. Le site de prédiction des GpiP, http://129.194.185.165/dgpi/DGPI_demo_en.html, a été utilisé pour identifier les séquences signal potentielles (encadrées en vert), les peptides en C-terminal hydrophobes (encadrés en noir) et les sites ω (entourés en noir).

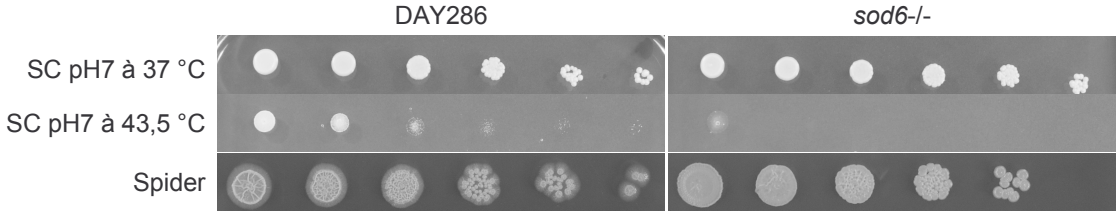


Figure 30 : Défaut de filamentation et thermosensibilité du mutants *sod6*-/- par rapport à sa souche de référence. Tests en gouttes après 2 jours d'incubation à 37 °C pour les milieux SC et 5 jours pour le milieu Spider; dilutions au 1/10ème, à gauche $1x10^5$ cellules ont été déposées et à droite de 1 à 5 cellules.

Malgré le rôle clef joué par Sod5p dans le phénomène d'échappement du pathogène face aux neutrophiles, la virulence du mutant *sod5*-/- n'est que modérément atténuée par rapport à sa souche de référence (Fradin *et al.*, 2005). Il semble en effet que la présence des gènes *SOD4* et *SOD6* compense partiellement l'absence du gène *SOD5*. Notre étude montre cependant que Sod6p ne peut être cantonné à ce seul rôle. En effet, nos résultats mettent en avant l'importance de Sod6p dans la morphogenèse du champignon ainsi que dans sa résistance au choc thermique (voir Tableau IV et Figure 30). *sod6*-/- présente un défaut de croissance sur

un milieu minimum incubé à 43,5 °C et sur le milieu Spider ; de plus, ce mutant est incapable de former des hyphes. Sod6p contient une extension en C-terminale d'une centaine d'acides animés qui n'est pas présente chez Sod5p ni chez Sod4p (voir Figure 29), et pourrait lui conférer une fonction spécifique. Cependant, un blastp (PSI et PHI Blast) de cette séquence ne permet pas d'obtenir plus d'information quant à cette fonction puisque aucune séquence homologue n'a été trouvée. Dans notre étude, le mutant *sod4*-/- présente le même phénotype que la souche de référence dans toutes les conditions testées. Le rôle de Sod4p reste donc à déterminer même si une étude de transcriptomique a démontré que *SOD4* était régulé lors de transition « white-opaque » du champignon (Lan *et al.*, 2002). Dans le but de préciser le rôle de Sod4p et Sod6p, il serait intéressant de tester la survie des mutants *sod4*-/- et *sod6*-/- après une co-culture avec des macrophages, des neutrophiles ou des cellules dendritiques. Ces cellules phagocytaires de l'hôte possèdent en effet des mécanismes de défense différents contre *C. albicans*.

La famille de Pga29/30/31p

Notre étude phénotypique a permis d'identifier une nouvelle GpiP importante pour l'intégrité de la paroi de *C. albicans* : Pga31p. En effet, le mutant *pga31*-/- présente un défaut de croissance sur un milieu minimum supplémenté en SDS ou en CFW ou en caspofungine (voir Figure 31). La caspofungine est un antifongique qui a pour cible une enzyme de la voie de biosynthèse des β(1-3)-glucanes de la paroi (voir Introduction II.2.2). Nos résultats de tests en gouttes effectués sur milieu contenant du NaCl ou du fer, nous montrent que Pga31p est également impliquée dans la réponse au stress (voir Figure 31 et Tableau IV).

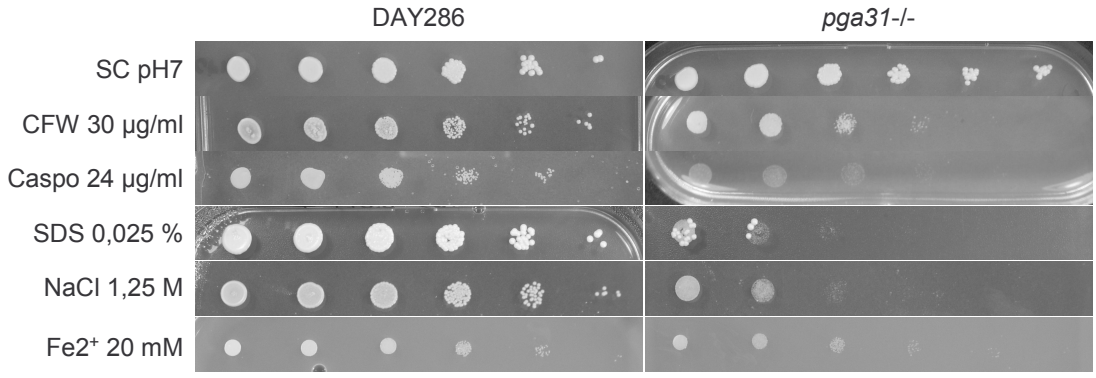


Figure 31 : Phénotypes du mutant *pga31*-/- et de sa souche de référence sur différents milieux testant l'intégrité de la paroi, la résistance au stress et à la caspofungine. Tests en gouttes après 2 jours d'incubation à 37 °C ; dilutions au 1/10ème, à gauche 1x10^{5} cellules ont été déposées et à droite de 1 à 5 cellules.

Ces résultats suggèrent que cette protéine est impliquée dans la biosynthèse de la paroi, l'absence de cette protéine désorganiserait la paroi provoquant ainsi des effets indirects chez ce mutant comme une plus grande sensibilité à la caspofungine et à certains stress.

PGA31 n'a pas d'orthologues, dans d'autres espèces de levures, mais a deux paralogues *PGA29* et *PGA30*. Les alignements des trois séquences protéiques correspondantes sont présentés Figure 32. Pga31p partage environ 50 % d'identité de séquence avec Pga29p et Pga30p. Pga31p est prédite pour présenter une extension en N-terminale de 51 aa pour laquelle aucune séquence homologue n'existe (PHI et PSI Blast). Cependant, en l'absence de détermination du site d'initiation de la transcription, cette extension qui ne porte pas de peptide signal nous paraît peu probable. Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par l'utilisation d'un logiciel statistique permettant de prédire les régions codantes d'une séquence d'ADN (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html).

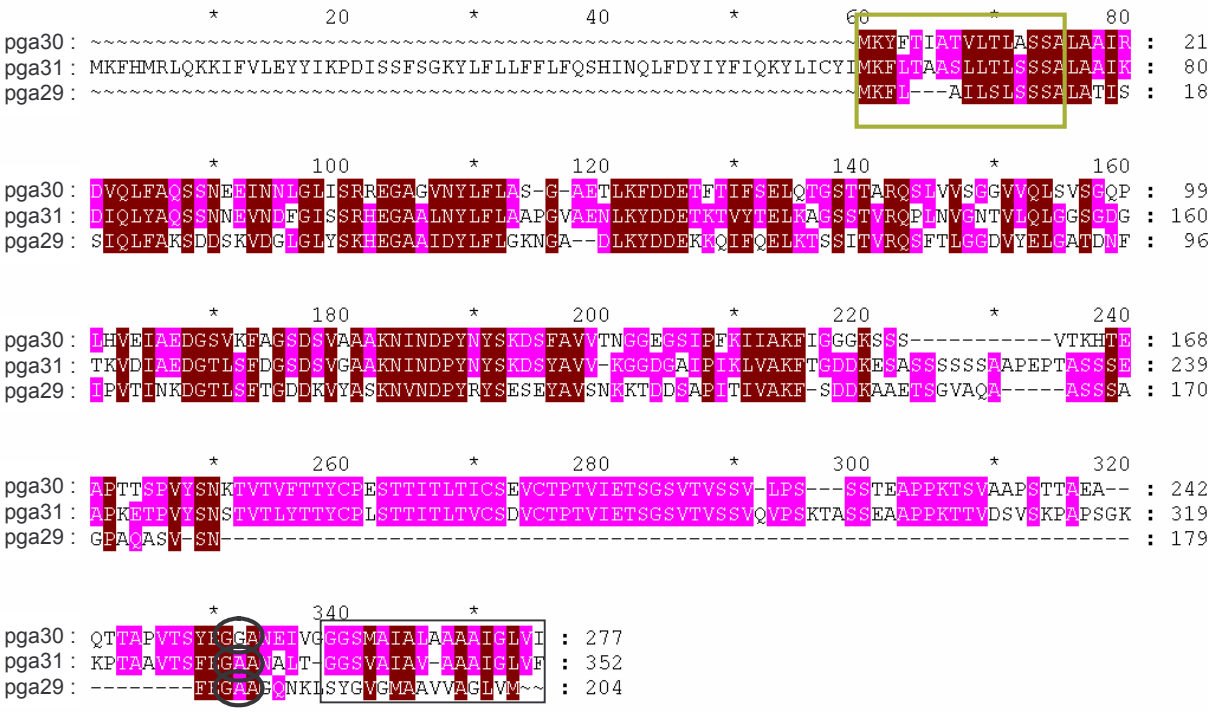


Figure 32 : Alignement des séquences protéiques de 3 paralogues chez *C. albicans* pga29p, pga30p et pga31p. Cet alignement a été réalisé en utilisant le logiciel GeneDoc. Plus la couleur est claire plus la similarité entre les séquences est faible. Pga31p (352 aa) présente, respectivement, 48 % et 50 % d'identité de séquence avec Pga29p (277 aa) et Pga30p (204 aa). La valeur de E limite utilisée pour cet alignement est 1x10-26. Le site de prédiction des GpiP, http://129.194.185.165/dgpi/DGPI_demo_en.html, a été utilisé pour identifier les séquences signal potentielles (encadrées en vert), les peptides en C-terminal hydrophobes (encadrés en noir) et les sites ω (entourés en noir).

La troisième protéine de cette famille Pga29p a été identifiée par spectrométrie de masse comme étant la GpiP pariétale la plus abondante chez *C. albicans* sous forme hyphe (de Groot *et al.*, 2004). En réalisant les mêmes tests en goutte dans des conditions similaires aux nôtres, l'équipe de M. Weig n'a pas observé de différences de phénotype entre le mutant *pga29*-/- et sa souche de référence sur des milieux testant l'intégrité de la paroi, la réponse au stress et la morphogenèse (A. de Boer, communication personnelle). Pourtant en l'absence de cette protéine dans un modèle *in vitro* de candidose orale basé sur un épithélium humain reconstitué, le mutant *pga29*-/- est avirulent. Même si ces trois protéines sont paralogues, leurs fonctions pourraient être différentes puisque Pga29p présente une troncature en C-terminal (cf. Figure 32). Il est également possible que *PGA29* et *PGA30* soient exprimés dans des conditions bien particulières que nous n'avons pas réussi à déterminer. Comme Pga29p, Pga31p sont impliquées dans la virulence de *C. albicans* (Communication personnelle S. Gelis) ; il serait également intéressant de tester la virulence du mutant *pga30*-/-.

Les Pga59/62p

Deux autres GpiP identifiées dans cette étude, Pga59p et Pga62p, forment à elles seules une petite famille. Ces deux paralogues (78 % d'identité) sont deux petites protéines de 113 et 213 acides aminés respectivement. Il est intéressant de préciser qu'aucun orthologue pour ces protéines n'a été trouvé dans les séquences déposées au NCBI (PSI et PHI Blast).

Les mutants correspondants présentent tous les deux un défaut de croissance sur milieu supplémenté en CFW et sont tolérants à la caspofungine, le phénotype de *pga59*-/- est plus marqué que celui de *pga62*-/- (voir Figure 33 et Tableau IV). Nos résultats montrent que ces protéines jouent un rôle dans l'intégrité de la paroi et indirectement dans la réponse à la caspofungine. Il est intéressant de préciser qu'avant cette étude, aucun autre mutant de perte de fonction chez *C. albicans* n'a été publié comme tolérant à cet antifongique.

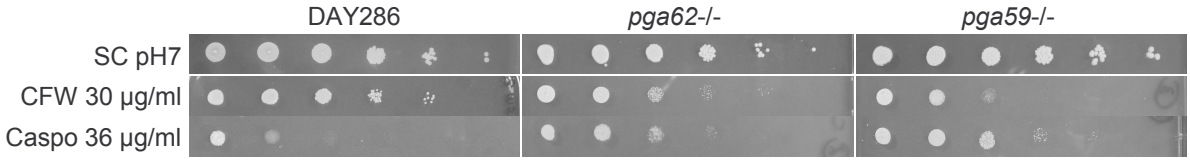


Figure 33 : Hypersenbiblité des mutants *pga59*-/- et *pga62*-/- au CFW et tolérance de ces derniers vis à vis de la caspofungine. Tests en gouttes après 2 jours d'incubation à 37 °C ; dilutions au 1/10ème, à gauche $1x10^5$ cellules ont été déposées et à droite de 1 à 5 cellules.

Chez *S. cerevisiae* il a été démontré que la voie des protéines Kinases C (PKC) (voir Schéma Annexe II) est impliquée dans la tolérance de cette levure à la caspofungine (Reinoso-Martin *et al.*, 2003). De plus, des résultats de transcriptomique ont permis d'étendre ce modèle à *C. albicans* (Liu *et al.*, 2005). Une seconde voie, la voie de la calcineurine a également été décrite comme étant requise pour la tolérance de *C. albicans* à la caspofungine (Sanglard *et al.*, 2003). En effet, en l'absence de la sous-unité catalytique (cna) ou la sous-unité régulatrice (cnb), la levure présente un défaut de croissance sur milieu contenant de la caspofungine (Sanglard *et al.*, 2003). Très récemment, il a été démontré qu'un pré-traitement avec du CFW et du $CaCl_2$, rend le mutant *cna1*-/- tolérant à la caspofungine ; le même phénotype a été observé pour le mutant *mkk1*-/-, un mutant de la voie PKC (C. Munro communication orale lors du troisième congrès sur la biosynthèse de la paroi chez les levures à Heidelberg 2006, voir Annexe 2). Le CFW induit la voie des PKC et le calcium celle de la calcineurine ; un pré-traitement avec ces deux composés induirait l'expression des chitines synthétases et protègerait la cellule de l'action de la caspofungine.

Ainsi, il est possible que l'absence de Pga59p ou Pga62p soit suffisante pour désorganiser la paroi et activer la voie de la calcineurine ou des PKC. Cette hypothèse est également renforcée par d'autres études réalisées par E. Moreno-Ruiz qui ont montré que le contenu en chitine des mutants *pga59*-/- et *pga62*-/- était plus élevé que chez leur souche de référence (E. Moreno-Ruiz[3], communication personnelle). Sur milieu SC sans agent affectant la paroi, ces mutants possèdent une paroi enrichie en chitine les rendant ainsi tolérants à la caspofungine.

Les paralogues de GAS1

PGA4 est également un gène nouvellement identifié par notre étude. Ce gène fait partie de la famille des GAS qui comprend quatre gènes chez *C. albicans* : *PGA4*, *PGA5*, *PHR1* et *PHR2,* un alignement des séquences protéiques correspondantes est présenté Figure 34. Les quatre mutants correspondants font partie de notre banque. *PHR1* et *PHR2* sont exprimés à des pH différents et codent deux β (1-3)-glucosyltransférases (cf. Introduction II.2.2 (Fonzi and Irwin, 1993; Saporito-Irwin *et al.*, 1995)). Pga4p et Pga5p exercent probablement une fonction de glucosyltransférase dans la cellule (78 % d'identité avec ScGas1p) mais ces protéines n'ont jamais été caractérisées.

[3] Le mutant *pga59*-/- n'est pas repris dans l'article et sera publié par E. Moreno-Ruiz

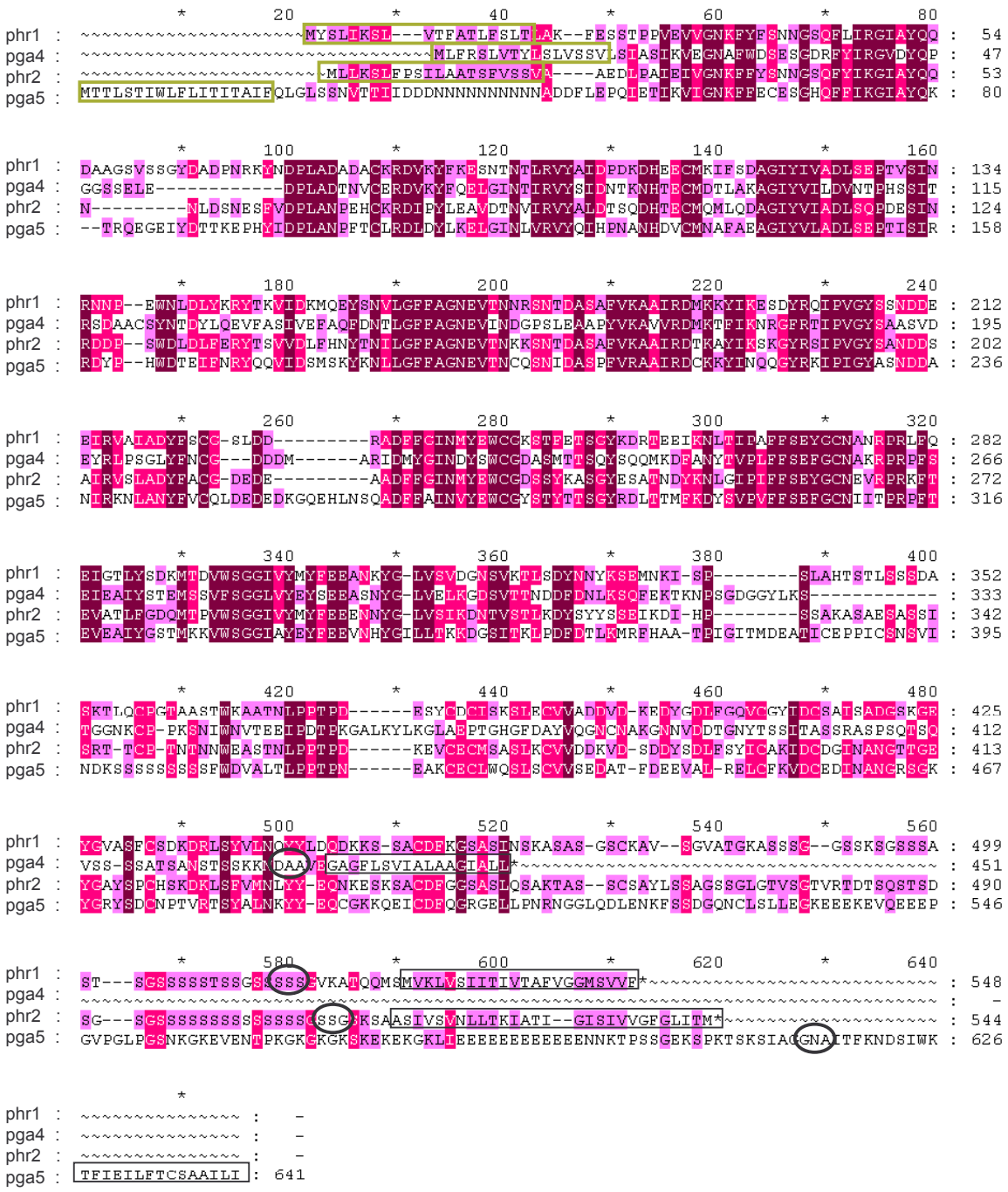


Figure 34 : Alignement des séquences protéiques de quatre paralogues de la famille GAS chez *C. albicans*.

Cet alignement a été réalisé en utilisant le logiciel GeneDoc. Plus la couleur est claire plus la similarité entre les séquences est faible. Pga4p présente entre 42 % et 43 % d'identité avec Pga5p, Phr1p et Phr2p. La valeur de E limite utilisée pour cet alignement est $5{,}7 \times 10^{-63}$. Le site de prédiction des GpiP, http://129.194.185.165/dgpi/DGPI_demo_en.html, a été utilisé pour identifier les séquences signal potentielles (encadrées en vert), les peptides en C-terminal hydrophobes (encadrés en noir) et les sites ω (entourés en noir).

Nous n'avons observé aucun phénotype particulier pour le mutant *pga5*-/- dans les conditions de notre étude. Par contre le mutant *pga4*-/- est plus résistant à la caspofungine que sa souche de référence mais également plus résistant que *pga59*-/- et *pga62*-/- (cf. Figure 35). Il est surprenant et original chez ce mutant de ne pas observer d'autres phénotypes, différents de la

souche de référence, particulièrement en présence de CFW ou SDS. Le mutant *phr1*-/- est légèrement moins résistant que *pga4*-/- à la caspofungine et présente un défaut de croissance sur CFW (voir Tableau IV et article II.2.3). Au pH utilisé pour les tests (pH 7) *PHR2* n'est pas exprimé, comme attendu nous n'avons pas observé de phénotypes particuliers pour *phr2*-/- (sauf pour le test pH 10, voir Tableau IV).

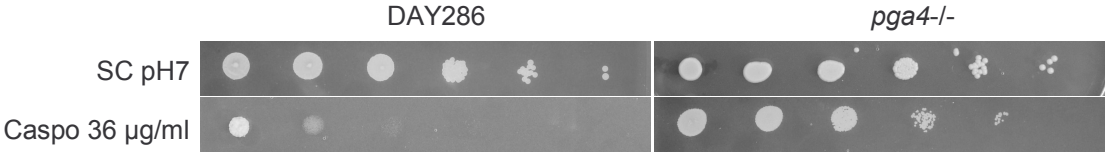


Figure 35 : Forte résistance du mutant *pga4*-/- à la caspofungine. Tests en gouttes après 2 jours d'incubation à 37 °C ; dilutions au 1/10ème, à gauche $1x10^5$ cellules ont été déposées et à droite de 1 à 5 cellules.

Il semble donc que l'absence de Pga4p désorganise légèrement la paroi mais n'induise pas de défaut de croissance chez le mutant sur un milieu contenant 30 µg/ml de CFW. L'intégrité de la paroi serait tout de même suffisamment atteinte pour activer des voies de signalisation requises pour la tolérance de *C. albicans* à la caspofungine telles que la voie de la calcineurine et des PKC (comme nous l'avons vu pour *pga62*-/- et *pga59*-/-).

MID1

Contrairement aux autres gènes identifiés par cette étude phénotypique, Mid1p chez *C. albicans* n'a pas de paralogue. Cependant sa protéine présente respectivement 36 % et 34 % d'identité avec Mid1p de *S. cerevisiae* et Mid1p d'*Aspergillus fumigatus*. La Figure 36 présente un alignement des séquences protéiques de ces trois orthologues. Les valeurs E obtenues pour chaque couple de protéines en Blast bidirectionnel sont comprises entre $2x10^{-81}$ et $2x10^{-34}$. Toutefois, contrairement à Mid1p de *C. albicans*, ses deux orthologues chez *S. cerevisiae* et *A. fumigatus* ne posséderaient pas d'ancrage GPI (cf. Figure 36).

ScMid1p est un canal membranaire perméable au Ca^{2+} impliqué dans la réponse à la calcineurine (Peiter *et al.*, 2005). Nos résultats montrent que CaMid1p est essentiel pour la croissance de *C. albicans* sur un milieu contenant de la caspofungine dès 12 µg/ml (voir Figure 37-a). De plus, le mutant *Camid1*-/- présente comme *Scmid1*-/- (Peiter *et al.*, 2005), une hypersensibilité au fer. Toutefois un hypothétique rôle de Mid1p dans le transport de calcium chez *C. albicans* reste à démontrer.

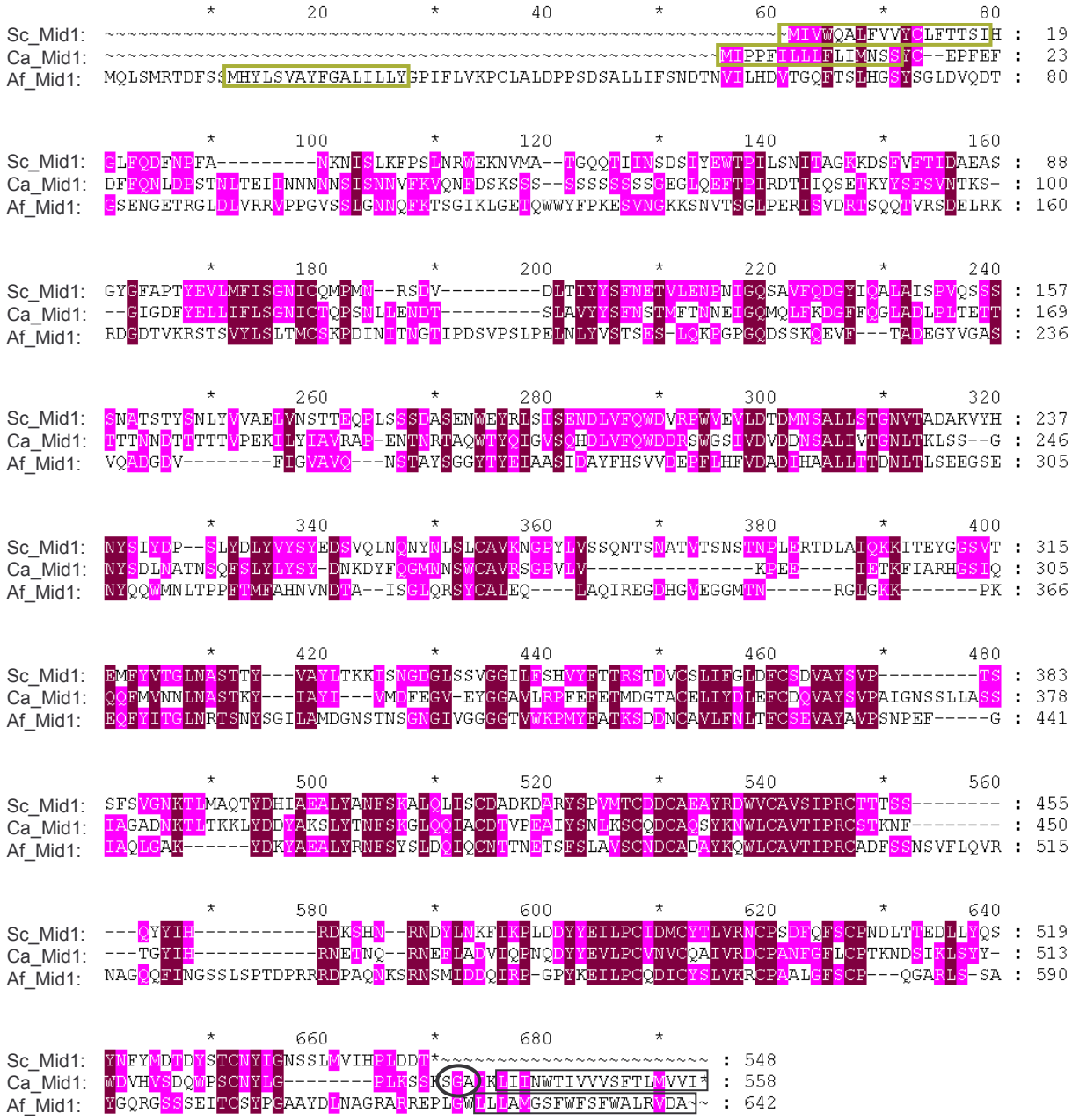


Figure 36 : Alignement des séquences protéiques de Mid1 chez *S. cerevisiae* (Sc), *C. albicans* (Ca) et *Aspergillus fumigatus* (Af). Cet alignement a été réalisé en utilisant le logiciel GeneDoc. Plus la couleur est claire plus la similarité entre les séquences est faible. Le site de prédiction des GpiP, http://129.194.185.165/dgpi/DGPI_demo_en.html, a été utilisé pour identifier les séquences signal potentielles (encadrées en vert), les peptides en C-terminal hydrophobes (encadrés en noir) et les sites ω (entourés en noir). Mid1p chez ***S. cerevisiae*** et ***A.*** *fumigatus* présentent une séquence signale mais ne sont pas préditent comme étant des GpiP par ce site.

Dans cette perspective, nous avons répété chez *C. albicans* une expérience réalisée par E. Peiter *et al*., chez *S. cerevisiae* (Peiter *et al.*, 2005) qui montrait que la sensibilité au fer liée à l'absence du transporteur ScMid1p pouvait être compensée par l'addition de calcium dans le milieu. Comme pour ScMid1p, nos expériences chez *C. albicans* montrent que

l'hypersensibilité de *mid1*-/- au fer est partiellement supprimée par l'addition de calcium au milieu (voir Figure 37-b).

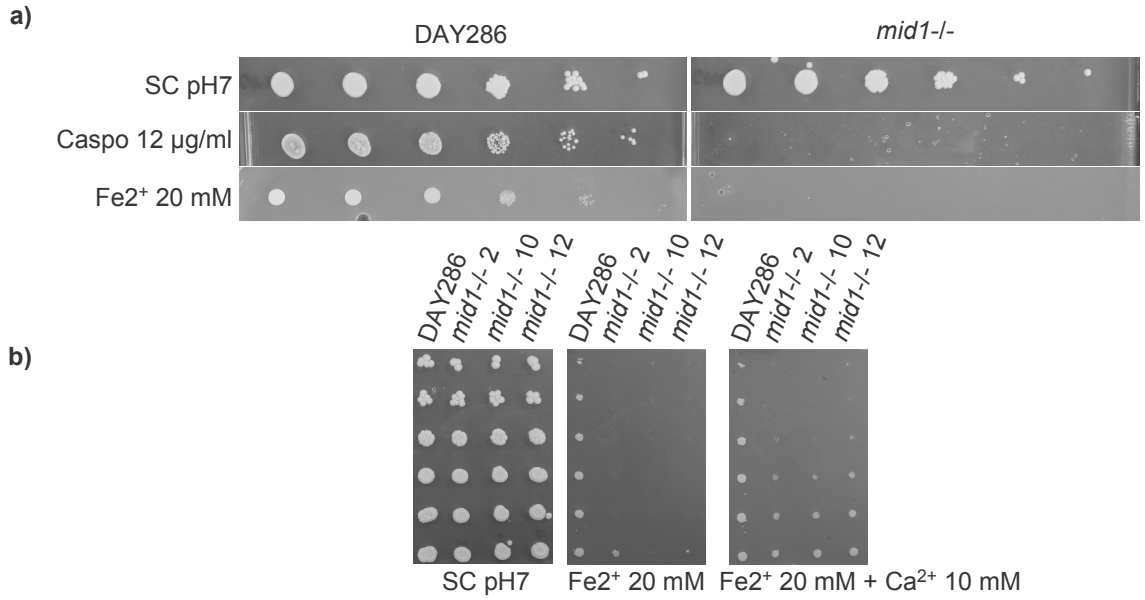


Figure 37 : Phénotype du mutant *Camid1*-/- et de sa souche de référence a) hypersensibilité à la caspofungine et au fer b) CaMid1p est impliqué dans le transport du calcium. Tests en gouttes après 2 jours d'incubation à 37 °C ; dilutions au 1/10ème, à gauche $1x10^5$ cellules ont été déposées et à droite de 1 à 5 cellules. *mid1*-/- 2/10/12 correspondent à trois clones indépendants.

Pourtant le mutant *Camid1*-/- ne présente pas d'hypersensibilité aux azolés (Fluconazole), ni aux agents testant l'intégrité de la paroi (CFW, SDS), ni à différents stress osmotiques (NaCl) comme il a été observé pour les mutants de la voie de la calcineurine (Bader *et al.*, 2003; Blankenship and Heitman, 2005; Sanglard *et al.*, 2003). *MID1* chez *C. albicans* pourrait alors coder un senseur membranaire qui activerait la voie de la calcineurine spécifiquement en réponse à la caspofungine ou en réponse au fer. Ainsi en l'absence de CaMid1p, la calcineurine n'activerait pas l'expression des gènes, codant des protéines pariétales telles que les chitines synthases (voir ci-dessus le paragraphe sur les Pga59/62p) ou la glucane synthase Fks1p (Sanglard *et al.*, 2003), nécessaires à la tolérance à la caspofungine. Cette hypothèse pourrait expliquer l'hypersensibilité de *Camid1*-/- à la caspofungine et sa tolérance au SDS et au CFW.

II.2.3 Article de recherche : « Functional analysis of GPI proteins in C. albicans »

En correction après soumission.

Functional analysis of *Candida albicans* GPI anchored proteins

Armêl Plaine, Grégory Da Costa, Claude Gaillardin and Mathias L. Richard*

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INA P-G, UMR-INRA 1238, UMR-CNRS 2585, 78850 Thiverval-Grignon, France

Abstract

GlycosylPhosphatidylInositol (GPI)-anchored proteins are cell surface proteins identified only in eukaryotic cells that have been connected to a large spectrum of functions. *In silico* analysis suggested that *C. albicans* possessed 104 putative GPI anchored proteins (GpiPs), or almost twice the number reported for *Saccharomyces cerevisiae*. Using these *in silico* predictions, a global approach of the functions associated to GpiPs has been initiated by generating a large number of knockout mutants using the UAU1 method. Our library of 46 insertional mutants was categorized by testing their capacity to form hyphae and chlamydospores, their cell wall integrity (SDS and Calcofluor sensitivity), their response to three antifungal drugs (Fluconazole, Amphotericin B and Caspofungine) and to different stress conditions (NaCl, pH, temperature, H_2O_2, Cd, Fe and acetic acid). Results from this study highlighted the role played by GpiPs in *C. albicans* stress responses and cell wall biogenesis.

Introduction

Candida albicans is the most common fungal pathogen of human. A crucial feature of this microorganism is its ability, as a commensal as well as a pathogen, to survive in the host and infect several anatomically distinct sites. This fungus elaborated numerous mechanisms to adapt to a diversity of niches (mouth, digestive tract, skin, vagina, etc) and usually resides in its host without causing overt disease. But as an opportunistic pathogen, *C. albicans* can also invade immunocompromised hosts and cause life threatening diseases, that may arise as hematogenously disseminated infections or as localized primary diseases of deep organs (Calderone and Fonzi, 2001). Each of these niches imposes diverse stresses on the fungus, including nutrient limitation, temperature shifts, changes of pH and immune system defences. Accordingly, the cell surface has to be adapted and remodelled constantly to cope with these various environmental conditions. In fungi, the cell wall is essential for maintaining the osmotic balance of the cell, for creating and maintaining its shape during morphogenesis and as a primary protection (Klis *et al.*, 2002). In pathogenic fungi, the cell wall and especially cell wall proteins are known to play a key role in the relationship between the fungal cell and the host, participating to host tissues adhesion and to immune response modulation (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

The cell wall is a network composed of β-1,3 and β-1,6 glucans, chitin and cell wall mannoproteins. The major class of cell wall proteins have the sequence features of GlycosylPhosphatidylInositol (GPI)-anchored proteins, including an N-terminal signal sequence and a C-terminus containing the GPI anchor attachment site (ω-site). GPI anchored proteins (GpiPs) are linked to the plasma membrane via a preformed GPI anchor that is added to the protein in the endoplasmic reticulum by a transamidase enzyme complex, before the cell surface localization (Tiede *et al.*, 1999). In fungi, a subset of GPIPs are cleaved from the membrane and driven to the cell wall where they are covalently linked to β-1,6 glucan (Hamada *et al.*, 1999). The current hypothesis is that the amino acids immediately upstream from the ω site serve as the signal determining whether a GPIP localizes preferentially to the cell wall or to the plasma membrane (Frieman and Cormack, 2003). Using an *in silico* approach, 104 putative GPIPs were identified in *C. albicans* genome (De Groot *et al.*, 2003). Strikingly, *C. albicans* possesses almost twice as much putative GPIPs as *S. cerevisiae* and about half of these predicted GpiPs are of unknown function. In addition, we established in a previous study that GpiPs were no longer normally linked to the cell wall in a *C. albicans gpi7-/-* mutant affected in the GPI anchor biogenesis. This mis-localization of numerous cell wall proteins had dramatic consequences on the mutant cell wall composition and on the mutant *in vivo* virulence (Richard *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2002). All together these data highlight the potential role played by the GpiPs at the cell surface of a pathogenic fungus and in the interactions with the host. A better understanding of the functions associated to this class of protein might thus lead to the identification of original targets to impair virulence in *C. albicans*.

To date, several strategies have permitted direct identification of GpiPs in *C. albicans*, including proteomics, functional expression in *S. cerevisiae*, cloning of surface antigens, and identification of *C. albicans* sequence homologs of characterized *S. cerevisiae* GpiPs (de Groot *et al.*, 2004; Lamarre *et al.*, 2000); (Garcera *et al.*, 2003). Here we report on the first systematic analysis of a large number of GpiPs in the human pathogen *C. albicans*. A total of 46 GpiPs mutants were constructed or gathered from different laboratories and submitted to a battery of phenotypic screens. Our results permitted categorisation of several GpiPs of hitherto unknown function and indicated that they are predominantly involved in stress responses and cell wall assembly.

Methods

Strains: *Escherichia coli* DH5α strain was used for plasmid propagation. In this study we interrupted the following genes in *C. albicans*: orf19.207 (*PGA55*), orf19.876 (*PGA33*), orf19.893 (*PGA17*), orf19.1616 (*PGA40*), orf19.1824 (*PGA50*), orf19.2044 (*PGA27*), orf19.2062 (*PGA2/SOD4*), orf19.2075 (*DGF5*), orf19.2108 (*PGA9/SOD6*), orf19.2237 (*SPR1*), orf19.2451 (*PGA45*), orf19.2765 (*PGA62*), orf19.2907 (*PGA42*), orf19.2910 (*PGA43*), orf19.3212 (*MID1*), orf19.3380 (*PGA8*), orf19.3816 (*PGA24*), orf19.3638 (*PGA46*), orf19.3693 (*PGA5*), orf19.3740 (*PGA23*), orf19.3895 (*CHT2*), orf19.3923 (*PGA37*), orf19.4035 (*PGA4*), orf19.4255 (*ECM331*), orf19.4689 (*PGA57*), orf19.4765 (*PGA6*), orf19.4975 (*HYR1*), orf19.5302 (*PGA31*), orf19.5303 (*PGA30*), orf19.5635 (*PGA7*), orf19.5636 (*RBT5*), orf19.5674 (*PGA10*), orf19.5760 (*PGA36*), orf19.6302 (*PGA39*), orf19.6784 (*PGA32*), orf19.6928 (*SAP9*), orf19.7030 (*SSR1*), orf19.7114 (*CSA1*), orf19.7517 (*CHT1*). All mutants are Ura^+, Arg^+ and derive from strain BWP17 (Δ*ura3::imm434/ Δura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG /arg4::hisG*) (Wilson *et al.*, 1999). In all experiments, two independent mutant clones were

tested twice and compared to DAY286 (*ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG pARG4::URA3::arg4::hisG/arg4:hisG*), a Ura^+, Arg^+ derivative of BWP17 (Davis *et al.*, 2000), unless otherwise indicated. Mutants obtained by the classical URA-blaster method (Fonzi and Irwin, 1993) and lacking either *SAP9, SAP10, SOD5, PHR1, PHR2, PGA31, SSR1, HWP1, RBT1* or *RBT5* along with the corresponding complemented strains, were obtained from the groups who isolated them initially (see Table 1). For these last strains, all experiments were performed two to four times and SC5314 or CAI4 (Fonzi and Irwin, 1993) were used as reference strains according to their genetic background. The *gpi7-/-* mutant (*ura3::imm434/ ura3::imm434 gpi7::hisG/gpi7::hisG-URA3-hisG*) (Richard *et al.*, 2002) was used as a control.

Culture media: DH5α was grown at 37 °C in Luria-Bertani medium supplemented with 100µg ampicillin mL^{-1} (Amp) and 20 µg kanamycin mL^{-1} (Kan) when required. *C. albicans* strains were grown in YPD plus uridine (2% dextrose, 2% Bacto peptone, 1% yeast extract and 80µg uridine mL^{-1}) at 30 °C. Following transformation, clones were selected on synthetic medium (SC; 2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acid plus ammonium sulphate, 1.7 g amino acid drop out mix L^{-1}, supplemented for auxotrophic requirements).

Mutant library construction: All *C. albicans* sequences were obtained from the Candida DataBase web site (http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/). The open reading frame (ORF) of all genes to interrupt was amplified by PCR and ligated into the vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) to generate the target plasmid for subsequent *in vitro* transposition using the GPS-M mutagenesis kit (New England Biolabs, Beverly, MA, USA, see Fig. 1). As donor plasmid, we used pAED98 which contains *Tn7*-UAU1 (Davis *et al.*, 2002), a modified *Tn7* transposon carrying the UAU1 cassette (Enloe *et al.*, 2000). *In vitro* transposition was performed using 20 ng of pAED98 and 80 ng of the target plasmid. Transposon-mutagenized plasmids were transformed into DH5α and transformants were selected on LB+Amp+Kan plates. For each transposition, 24 plasmids were isolated from individual colonies using the Millipore Montage miniprep system (Millipore, Bedford USA). In order to map the integration site of the *Tn*7-UAU1 in the target plasmid, we digested the mutagenized plasmid by *Not*I and *Pme*I. For each gene to disrupt, one target plasmid which had integrated the *Tn7*-UAU1 transposon near the middle of the ORF was selected.

Construction of homozygous mutants: Interruption of both gene alleles in *C. albicans* was obtained following the UAU1 method (Enloe *et al.*, 2000). Briefly, the *Tn7*-UAU1 mutagenized plasmid was digested by *Not*I to release the UAU1 disruption cassette which was then used to transform *C. albicans* strain BWP17 (Wilson *et al.*, 1999). Arg^+ transformants were selected. Their genotype was determined by colony PCR to detect the wild-type allele and the *Tn7*-UAU1 insertion (see Fig. 1b). For each plasmid, 24 heterozygous strains were patched onto YPD plates, grown at 30 °C for 2 days. After replication onto SC-Arg-Uri plates, the colonies were screened by colony PCR for the absence of the wild-type allele and the presence of the UAU1 insertion allele. Genotypes of all transformants showing a phenotype different from the control strain were further confirmed by Southern hybridisation.

Drop tests: The phenotype of the 46 GPI mutants was tested using drop tests. All media were supplemented with histidine and uridine was added only to filamentation inducing media. Strains were grown overnight in YPD at 30 °C and diluted with H_2O to an OD_{600} of 1. Then, 5 µl of serial 1/10 dilutions was spotted onto different solid media: YPD supplemented with either 1.25 M NaCl, 0.025% SDS or 30 µg Calcofluor White mL^{-1} (Sigma-ALDRICH, Steinheim Germany), SC (buffered at pH7 with 100mM Hepes) with either 250 µM Cd, 20 mM Fe, 7.5 mM H_2O_2 and SC buffered at either pH3 (50 mM acid citric and sodium citrate) or pH10 (NaOH + 50 mM Glycine). Plates were incubated for two days at 37 °C, except for two SC pH7 plates that were incubated at 23 °C or 43.5 °C. Filamentation on solid 2% agar medium was tested on either Spider medium (1% nutrient broth, 1% mannitol, 0.2% K_2HPO_4) or Serum medium (5% horse serum; Sigma-ALDRICH, Steinheim, Germany), both supplemented with uridine and histidine. Plates were monitored over five days for hyphae formation.

Antifungal tests: The *in vitro* susceptibility of the mutants was tested with caspofungin (CAS), fluconazole (Fluco) and amphotericin B. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined using the microbroth dilution method M27-A2 (NCCLS, 2002). Each drug was obtained from its respective manufacturer as research

powder except for caspofungin, which was provided by M. Cornet (Hôtel-Dieu, 1 place du parvis Notre-Dame, Paris, France). RPMI medium (Sigma-ALDRICH, Steinheim, Germany) buffered at pH 7.0 with morpholinepropanedulfonic acid (MOPS; Sigma-ALDRICH, Steinheim, Germany) was used. Additional tests with caspofungin were performed by on agar plates method using drop tests on SC plates buffered at pH 7.0 with HEPES 150 mM and containing semi-inhibitory concentrations of caspofungin. Plates were incubated for two days at 37 °C.

Results and Discussion

Creation of the library: Mutants were constructed using an insertional mutagenesis strategy (Davis *et al.*, 2002) based on the UAU1 marker cassette (Enloe *et al.*, 2000). The UAU1 cassette (□*ura3-ARG4-*□*ura3*) includes a functional *ARG4* gene that can be excised by recombination between flanking repeats of a disrupted *URA3* gene to regenerate a functional *URA3* gene. This cassette, present in the *Tn7*-UAU1 transposon (see materials and methods), was inserted by *in vitro* transposition into each of the 39 target ORF encoding putative GpiPs (Fig. 1a). We selected insertions where the UAU1 cassette had transposed near the middle of the ORF. Each of the 39 disruption cassettes was transformed into *C. albicans* strain BWP17 after excision from the vector. Following disruption of the first allele, spontaneous recombination events were selected as giving rise to Arg^+ Ura^+ clones in which one allele is disrupted by the *ura3-ARG4-ura3* marker and the other one by the recombined *URA3* marker. After PCR verification, at least two clones per gene were saved (Fig. 1a).

One concern with this approach relates to the mitotic recombination or gene conversion step. The selection for homozygosity of the UAU1 insertion may entail homogenotisation of part or all of the chromosome carrying the cassette. This may unmask recessive alleles and generate phenotypes no at all linked to the interruption of the target gene. We believe nevertheless that this bias might be limited since : (i) we tested at least two independent mutants, (ii) in the case of previously studied genes, the phenotypes we observed on our strains matched the published ones (*DFG5*, *SSR1*); (iii) when strains obtained by the UAU1 method and the classical Ura-Blaster method were compared (e.g. *PGA31, SSR1, SAP9*) identical phenotypes were observed (see Table 1).

Our final library is composed of 46 mutants, 39 UAU1 insertional mutants plus seven mutants sent by different laboratories. As detailed below, this library was screened for various biological functions including morphogenesis, cell wall synthesis, drug resistance, pH and temperature adaptation, and stress responses.

Mutants affecting morphogenesis: We screened the mutants for filamentation defects under two conditions promoting hyphae induction, either serum or nutrient limitation (Spider Medium). A critical issue in the study of filamentous growth in *C. albicans* concerns position effect on *URA3* expression as recently described for a *URA3* insertion in the *HWP1* gene (Sharkey *et al.*, 2005). In this case, the filamentation defect was reversed by adding uridine to the growth medium. We thus screened the entire mutant collection on plates containing uridine. Among the 46 GpiP mutants, 4 presented a defect in filamentation (see Table 1). In agreement with published data, we confirmed that *PHR1*, *HWP1* and *DFG5* were involved in morphogenesis and showed pleiotropic phenotypes. We additionally identified a new GpiP mutant solely affected in hyphae formation: *sod6-/-*.

PHR1: As already published, *PHR1* (pH Responsive) mutants were unable to grow at alkaline pH and exhibited a filamentation defect on Spider and serum media. *PHR1* encodes a pH dependent glycosidase, which participates in the cross linking of β-1,6- and β-1,3-glucans in the cell wall (Fonzi, 1999; Saporito-Irwin *et al.*, 1995) and seems critical for hyphal formation. As shown on Table 1, we further observed that *PHR1* mutants were hypersensitive to CFW and tolerant to caspofungin, confirming a cell wall alteration.

HWP1: As shown on Fig.2; *HWP1* (Hyphal Wall Protein) mutants were affected in filament formation on both serum and Spider media. Hwp1p is a substrate for mammalian transglutaminase possibly mediating stable attachment of *C. albicans* hyphae to human buccal epithelium cells (Staab *et al.*, 1999).We confirmed hypersensitivity of *HWP1* mutants to SDS and observed a growth defect on CFW (see Table 1), both indicative of cell wall alterations. This strongly suggests that Hwp1p participates in cell wall architecture and in hyphal differentiation in addition to its role in adhesion.

DFG5: In the presence of serum or on spider medium, colonies of the *DFG5* (Defective for Filamentous Growth) mutants were able to form peripheral short hyphae, but significantly less than the reference strain, as already reported (Spreghini *et al.*, 2003). *DFG5* has been proposed to be

required for the full expression of hypha-specific genes like *HWP1* and, together with its paralogue *PGA51*/*DCW1*, to perform an essential function in cell wall biogenesis since the double deletion of *DFG5* and *DCW1* is lethal (Kitagaki *et al.*, 2002). We confirmed that *DFG5* mutants were viable and showed that they displayed a mild cell wall alteration characterised by an increased tolerance to caspofungin but no increase in SDS nor CFW sensitivity.

SOD6: *SOD6* (SuperOxide Dismutase) interruption resulted in a filamentation defect on Spider medium and in a temperature sensitive phenotype (see Table 1). Five other *SOD* genes (*SOD1-5)* have been described (Martchenko *et al.*, 2004). While *SOD1-3* encode cytosolic superoxide dismutases, *SOD4-6* encode putative GPI-anchored proteins. Localization or Sod proteins to the cell surface has been interpreted as a protection against the oxidative burst faced by *C. albicans* upon endocytosis by immune cells and is thus deemed to be important for pathogenesis. However, this has been demonstrated only for Sod5p (Fradin *et al.*, 2005). We have presently no interpretation for the defects displayed by *SOD6* mutants, although our results point to a possible involvement of this GPA-SOD in stress responses, a feature possibly shared by the three members of this family. In this respect, we notice that *sod5*-/- and *sod6*-/- have marked but distinct stress resistance phenotypes (see Table 1), whereas *sod4-/-* had a wild type phenotype.

None of the 46 mutants was affected in the formation of chlamydospores.

Mutants hypersensitive to different stress conditions: Mutants were challenged under various stressing conditions, like high salt, hydrogen peroxide, heavy metal, acetic acid, temperature and pH.

Two mutants were hypersensitive to osmotic stress on 1.25 M NaCl, *pga31*-/- and *sod5*-/-.

PGA31: Strains lacking *PGA31* (Putative GPI Anchored protein, (De Groot *et al.*, 2003)) exhibited a growth defects on NaCl, Iron, SDS and CFW containing media. The mutants were also hypersensitive to caspofungin (see Fig. 2), all of which suggested a defect in cell wall biosynthesis. *PGA31* is a member of a three-gene family and shares 59% and 54% sequence similarity with *PGA30* and *PGA29*, respectively. None of the encoded proteins has orthologs in other yeast species, except for a distant relative in *Debaryomyces hansenii*. No mutant lacking *PGA29* is currently available, but the *pga30*-/- mutant was tested and did not display any of the *pga31*-/- phenotypes. This suggests that *PGA31* has a unique function that cannot be compensated by its paralogs.

SOD5: The only phenotype displayed by *sod5*-/- mutants was hypersensitivity to high NaCl concentrations. This fits with the reported induction of *SOD5* expression after an osmotic challenge. Indeed, induction of *SOD5* occurs after osmotic or oxidative stresses (Martchenko *et al.*, 2004), two conditions mimicking interactions of pathogens with phagocytic cells (Reeves and Friedman, 2002). Accordingly, Sod5p has been shown to play an important role in *C. albicans* virulence (Fradin *et al.*, 2005), possibly by enhancing resistance to reactive oxygen species produced in the phagosome: mutants lacking *SOD5* were more sensitive to neutrophiles (Fradin *et al.*, 2005), but not to macrophages (Martchenko *et al.*, 2004). Contrary to published reports however (Martchenko *et al.*, 2004), we could not observe hypersensitivity to hydrogen peroxyde with the *sod5-/-* strain received from B. Hube's group, perhaps as a result of minor differences in the experimental conditions used by other groups.

CSA1: *CSA1* (Candida Surface Antigen) mutants were the only one to display hypersensitivity to H_2O_2. *CSA1* was identified as encoding a mycelial antigen (Lamarre *et al.*, 2000). Current knowledge about Csa1p did not predict its mutant phenotype on H_2O_2.

On growth media supplemented with Fe^{3+}, we identified two mutants more sensitive to iron: *pga31*-/- (see above) and *mid1*-/-.

MID1: *mid1*-/- mutants exhibited two clear hypersensitivity phenotypes, one to iron and one to caspofungin. In *S. cerevisiae*, Mid1p and Cch1p form a high-affinity calcium channel in the cell membrane that mediates calcium uptake, which leads to calcineurin activation under stress condition (Tada *et al.*, 2002). Single orthologs of *MID1* and *CCH1* (orf19.3298) exist in the genome of *C. albicans*. So far, Mid1p has not been studied in *C. albicans*. Our results show that both *S. cerevisiae* and *C. albicans MID1* mutants are hypersensitive to iron. This suggests that *C. albicans* Mid1p has retained some of its ancestral functions while evolving to a GpiP instead of a transmembrane protein.

In the presence of Cadmium, only *SAP9* mutants were affected in their growth. Similarly, screening of the library for hypersensitivity to acetic acid identified the *SAP10* mutants only.

SAP9 and *SAP10*: Sap9p and Sap10p (Secreted Aspartyl Protease), are two GPA-aspartyl proteases, which admittedly regulate other cell wall proteins, while other members of the *SAP* family (*SAP1-8*) act as extracellular proteolytic enzymes (Albrecht *et al.*, 2006). Our results suggest that some of the Sap9p and Sap10p targets might be proteins involved in the response against cadmium or acetic acid stresses. Contrary to published results (Albrecht *et al.*, 2006), mutants lacking *SAP9* or *SAP10* were not hypersensitive to CFW under our conditions; we might have used too mild experimental conditions, although concentrations used by other groups are not available in the litterature.

We also tested the sensibility of the mutants to different growth temperatures and pH conditions (pH3 and pH10). We did not observe differences between mutants grown at 23°C and 37 °C, while *sod6*-/- and *ssr1*-/- mutants were affected in their growth at 43.5°C. As stated above, Sod6p may be involved in stress responses like other GPA-Sod.

SSR1: no function has been described to the corresponding protein, but *SSR1* mutants were CFW and caspofungin hypersensitive (see Table 1) as already reported in the litterature (Garcera *et al.*, 2003). Importantly, proteomics analyses have confirmed that Ssr1p is covalently bound to the β1-6 glucan (de Groot *et al.*, 2004). All these data strongly suggest that Ssr1p might be involved directly or indirectly in cell wall assembly.

Aside from the two well known pH regulated GpiP Phr1p and Phr2p (Fonzi, 1999; Saporito-Irwin *et al.*, 1995); no additional GpiP was identified as being required for adaptation to acidic or alkaline pH. Interestingly, *SOD6* which is a known target of the pH regulator Rim101p (Martchenko *et al.*, 2004) was not required for pH adaptation.

In summary, ten out of the 46 GpiPs tested were required for proper response to a variety of stresses. This was the largest phenotypic class identified in our survey, underscoring the importance of these cell surface proteins in environmental adaptation. There was however no clustering of GpiP mutants in a particular stress response, and each GpiP mutant but one (*PGA31*, see table 1) affected a single stress response. This may not be surprising since no particular enrichment for GpiPs was observed in transcriptome analyses of *C. albicans* stress responses (Enjalbert *et al.*, 2003; Enjalbert *et al.*, 2006).

Mutant affected in cell-wall integrity: To evaluate the contribution of genes encoding putative GpiP to the structural integrity of the cell wall, mutants were tested on the chitin-binding agent CFW (30 $\mu g.ml^{-1}$), as well as on SDS 0.025%. Hypersensivity to CFW is directly related to an increase of the cell wall chitin content in response to cell wall defects as demonstrated in the case of *gpi7*-/- mutants (Richard *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2002). Among the 46 GpiP mutants, seven were identified in this screen, two of which being simultaneously sensitive to SDS and CFW (see Table 1). We confirmed the hypersensitivity of *PHR1* and *SSR1* to CFW (Popolo and Vai, 1999) (Garcera *et al.*, 2003), but failed to detect such a phenotype in the case of *SAP9* or *SAP10* mutants (Albrecht *et al.*, 2006).

We identified four new mutants displaying a significant growth defect on CFW compared to the control strain: *pga31*-/- and *hwp1*-/- (see above), *rbt1*-/- and *pga62*-/-.

RBT1: The only phenotype of *RBT1* (Regulated By Tup1) mutants was hypersensitivity to CFW. Rbt1p has been characterized *in silico* as being cell wall localized (Alberti-Segui *et al.*, 2004) and prior studies indicated that mutants lacking *RBT1* are significantly less virulent (Braun *et al.*, 2000). Interestingly, *RBT1* and *HWP1* share high identity over the entire sequence except in their extracellular domain, which is a substrate for transglutaminases in the case of Hwp1p. Both of these proteins are hyphal induced (Braun *et al.*, 2005) and both may have similar adhesion properties but to different substrates. We show here that inactivation of each gene results in CFW sensitivity, but also that, contrary to *HWP1* mutants, *RBT1* mutants are not hypersensitive to SDS nor affected in hyphal formation. This suggests that the two paralogues perform related, but non redundant functions.

PGA62: *PGA62*, as its paralogue *PGA59*, encodes a GpiPs of unknown function. *PGA62* mutants were hypersensitive to CFW and tolerant to 36 mg caspofungin mL^{-1}. Both phenotypes suggest that Pga62p is involved in a cell wall integrity pathway and that the two paralogues *PGA59* and *PGA 62* perform non redundant functions.

Mutant affected by antifungals: In order to evaluate the *in vitro* susceptibility of the GPI mutants to antifungal agents, MICs of amphothericinB (AmphoB), fluconazole (Fluco) and caspofungin, were determined using the CLSI method M27-A2 (NCCLS, 2002).

No severe MIC differences were seen between the 46 mutants and the reference strain 48h after Fluco or AmphoB treatment. This might have been expected since AmphoB and Fluco target the sterols in the membrane and sterol biosynthesis does not involve GpiPs.

Caspofungin is thought to inhibit synthesis of β-1,3-glucan, which represents the central component to which all other components are cross-linked in the cell wall (Klis *et al.*, 2002). In agreement with prior studies (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003; Stone *et al.*, 2002), we observed that MIC results using the CLSI protocol were not reproducible with caspofungin. We thus screened our mutants on SC-plates containing caspofungin. Among the 46 GPI mutants, three were hypersensitive to caspofungin and four were tolerant to that drug (see Table1).

We found that mutants lacking *MID1*, *SSR1* and *PGA31* were hypersensitive to caspofungin. These results are in line with microarray studies showing that caspofungin induces expression of several cell wall protein and cell wall maintenance genes both in *S. cerevisiae* and *C. albicans* (Bruno *et al.*, 2006; Lesage *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Reinoso-Martin *et al.*, 2003). Northern analyses in *C. albicans* have shown that *orf19.2706*, *PGA13*, *PGA23* and *ECM331* are up-regulated in presence of caspofungin (Bruno *et al.*, 2006). *PGA23* and *ECM331* have been interrupted in the present study, but the corresponding mutants were not affected in caspofungin tolerance.

Interestingly, *SSR1* and *PGA31* mutants were also sensitive to CFW as stated above (see Table2 and Fig.2, categories II and III). We conclude that *SSR1* and *PGA31* functions are not specifically involved in the caspofungin response but are required more generally for cell wall integrity. The role of *MID1*, the gene disrupted in the third mutant conferring hypersensitivity to caspofungin, remains unknown in *C. albicans*. In *S. cerevisiae*, Mid1p is a high Ca^{2+}-permeable channel involved in the calcineurin response (Peiter *et al.*, 2005) which has been demonstrated to be involved in tolerance to antifungals: indeed, the deletion of genes encoding the calcineurin regulatory (*CNB1*) or the catalytic subunit (*CNA*) result in loss of tolerance to several antifungal agents including caspofungin (Sanglard *et al.*, 2003). We were able to suppress the iron susceptibility of *C. albicans mid1*-/- mutants by addition of Ca^{2+} (data not shown) as shown in *S. cerevisiae* in agreement with the proposed role of ScMid1p in Ca^{2+} transport (Peiter *et al.*, 2005). However, in our study mutants lacking *MID1* were not affected by azole treatment, by osmotic stress nor by cell wall disturbing agents as reported for *C. albicans* calcineurin mutants (Bader *et al.*, 2003; Blankenship *et al.*, 2003; Sanglard *et al.*, 2003). All these data point to a specific role of Mid1p in *C. albicans* tolerance to caspofungin, which seems to activate the calcineurin pathway specifically in response to cell wall damage caused by caspofungin. In mutants lacking *MID1*, calcineurin would not be activated and the cell wall protein genes required for caspofungin tolerance would not be induced. This hypothesis could explain the hypersenistivity to casofungin of *mid1*-/- mutants and their tolerance to other cell wall perturbing agents.

We also identified four genes leading to increased caspofungin tolerance when deleted: *PGA62*, *DFG5*, *PHR1* and *PGA4*. In the literature, no other example of a deletion mutant increasing resistance to caspofungin was reported in *C. albicans*. In *S. cerevisiae*, screening of a deletion mutant collection for increased tolerance to caspofungin identified 39 mutants resistant to that drug (Lesage *et al.*, 2004), none of them affecting a GpiP. In our case, the proteins lacking in the four mutants resistant to caspofungin are all playing a role in the cell wall integrity or structure: Pga62p, Phr1p and Dfg5p (as discussed above) and Pga4p an homologue of the *S. cerevisiae* β-1,3-glucosyltransferase Gas1p (Ram *et al.*, 1998). An additional pathway to calcineurin, the Protein Kinase K pathway (PKC), is required for caspofungin tolerance in *S. cerevisiae* (Reinoso-Martin *et al.*, 2003). Microarray studies have permitted to extend this model to *C. albicans* (Liu *et al.*, 2005). One possibility is that the absence of any of these four proteins is sufficient to disorganize the cell wall and to activate the PKC pathway. This would result in overexpression, in the absence of any cell wall perturbing agent, of *FKS1* which encodes one component targeted by caspofungin and thus to caspofungin resistance.

This screening for altered sensitivity to caspofungin highlighted the crucial role of the GpiPs in resistance as well as in susceptibility of the pathogen to that drug. Most of the genes we evidenced were not identified during transcriptional profiling of *C. albicans* response to caspofungin (Bruno *et al.*, 2006; Lesage *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005), underscoring the need for complementary approaches in order to understand antifungal tolerance. Elucidation of the precise role of these proteins in presence of caspofungin might provide future targets for drug development.

Conclusion

The ability to disrupt genes efficiently in *C. albicans* provides a powerful approach to study gene function which is critical to understand its biology and pathogenicity. Equivalent strategies have been carried out in order to decipher chlamydospore formation, fluconazole resistance or biofilm formation (Bruno and Mitchell, 2005; Nobile *et al.*, 2003; Nobile and Mitchell, 2005; Richard *et al.*, 2005). Our approach, contrary to previous studies, was not focussed on a specific biological process, but on a particular gene class encoding GPI anchored proteins. Using the UAU1 method, we generated a library of 46 insertion mutants for almost half of the candidate genes identified *in silico* (De Groot *et al.*, 2003).

Mutants were subjected to a battery of phenotypic tests on plates focussed on stress responses, morphogenesis, cell wall integrity or antifungal responses. No mutant with a peculiar phenotype was detected in four of the 17 tests: amphotericin B and fluconazole sensitivity, chlamydospore formation and growth at 23°C. Fifteen only out of the 46 mutants tested displayed a phenotype different from the reference strain under at least one condition. One explanation might be the presence gene families in our library even if we avoided disrupting genes belonging to large families such as the *ALS* genes. Another non exclusive possibility is that some phenotypes were too subtle to be detected by our tests. Nevertheless, we observed distinct phenotypes in mutants disrupted for genes belonging to small families such as *SOD4*/*SOD5*/*SOD6*; *PGA29*/*PGA30*/*PGA31*; *PGA4*/*PGA5*/*PHR1*/*PHR2*; *HWP1*/*RBT1*/*PGA8; SAP9* and *SAP10* suggesting that members of GpiP families have often evolved specific functions.

This preliminary survey in *C. albicans* permitted us to classify GpiPs in three main functional categories: (i) morphogenesis (four mutants), (ii) stress response (ten mutants) and (iii) cell wall integrity and caspofungin sensitivity (nine mutants).

Interestingly, some of these genes (*SOD6, PGA31, PGA4, MID1*) had only been identified *in silico* until now (De Groot *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004). As cited above, *C. albicans* possesses almost twice as much putative GpiPs as *S. cerevisiae*. This observation strongly suggests that unknown GpiPs might play a role in host-pathogen interaction. Screening our mutant collection for survival in the presence of immune host cells may provide additional clues to their function.

Acknowledgments

We wish to thank C. d'Enfert, B. Hube, A.D. Johnson, A. P. Mitchell, F. A. Müschlegel and P. Sundstrom for generously providing *C. albicans* strains. We are very grateful to A.P. Mitchell for plasmids pDDB166 and pAED98. We further acknowledge the availability of DNA sequence information for *C. albicans* in CandidaDB (http://genolist.Pasteur.fr/CandidaDB/). Friendly support and input from our colleagues in the Galar Fungail consortium funded by European Commission (MRTN-CT-2003-504148) is acknowledged. A.P was a recipient of a fellowship from the French Ministry of Research.

References

Alberti-Segui, C., Morales, A. J., Xing, H., Kessler, M. M., Willins, D. A., Weinstock, K. G., Cottarel, G., Fechtel, K. & Rogers, B. (2004). Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast* **21**, 285-302.

Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I. & other authors (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteases of *Candida albicans* Target Proteins Necessary for Both Cellular Processes and Host-Pathogen Interactions. *J Biol Chem* **281**, 688-694.

Bader, T., Bodendorfer, B., Schroppel, K. & Morschhauser, J. (2003). Calcineurin is essential for virulence in *Candida albicans*. *Infect Immun* **71**, 5344-5354.

Blankenship, J. R., Wormley, F. L., Boyce, M. K., Schell, W. A., Filler, S. G., Perfect, J. R. & Heitman, J. (2003). Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryot Cell* **2**, 422-430.

Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X. & Johnson, A. D. (2000). Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**, 31-44.

Bruno, V. M. & Mitchell, A. P. (2005). Regulation of azole drug susceptibility by *Candida albicans* protein kinase CK2. *Mol Microbiol* **56**, 559-573.

Bruno, V. M., Kalachikov, S., Subaran, R., Nobile, C. J., Kyratsous, C. & Mitchell, A. P. (2006). Control of the *C. albicans* cell wall damage response by transcriptional regulator Cas5. *PLoS Pathog* **2**, e21.

Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327-335.

Davis, D., Wilson, R. B. & Mitchell, A. P. (2000). RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **20**, 971-978.

Davis, D. A., Bruno, V. M., Loza, L., Filler, S. G. & Mitchell, A. P. (2002). *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* **162**, 1573-1581.

de Groot, P. W., Hellingwerf, K. J. & Klis, F. M. (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**, 781-796.

de Groot, P. W., de Boer, A. D., Cunningham, J., Dekker, H. L., de Jong, L., Hellingwerf, K. J., de Koster, C. & Klis, F. M. (2004). Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* **3**, 955-965.

Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M. & Eisenhaber, F. (2004). A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans, Candida albicans, Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **337**, 243-253.

Enjalbert, B., Nantel, A. & Whiteway, M. (2003). Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell* **14**, 1460-1467.

Enjalbert, B., Smith, D. A., Cornell, M. J., Alam, I., Nicholls, S., Brown, A. J. & Quinn, J. (2006). Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**, 1018-1032.

Enloe, B., Diamond, A. & Mitchell, A. P. (2000). A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J Bacteriol* **182**, 5730-5736.

Fonzi, W. A. & Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.

Fonzi, W. A. (1999). PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol* **181**, 7070-7079.

Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C. & Hube, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**, 397-415.

Frieman, M. B. & Cormack, B. P. (2003). The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine

distribution between the membrane and the cell wall. *Mol Microbiol* **50**, 883-896.

Garcera, A., Martinez, A. I., Castillo, L., Elorza, M. V., Sentandreu, R. & Valentin, E. (2003). Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology* **149**, 2137-2145.

Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N. & Kitada, K. (1999). Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J Bacteriol* **181**, 3886-3889.

Ihmels, J., Bergmann, S., Berman, J. & Barkai, N. (2005). Comparative gene expression analysis by differential clustering approach: application to the *Candida albicans* transcription program. *PLoS Genet* **1**, e39.

Kitagaki, H., Wu, H., Shimoi, H. & Ito, K. (2002). Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **46**, 1011-1022.

Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 239-256.

Lamarre, C., Deslauriers, N. & Bourbonnais, Y. (2000). Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Mol Microbiol* **35**, 444-453.

Lesage, G., Sdicu, A. M., Menard, P., Shapiro, J., Hussein, S. & Bussey, H. (2004). Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics* **167**, 35-49.

Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., Lee, R. E., Wei, L., Homayouni, R. & Rogers, P. D. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2226-2236.

Martchenko, M., Alarco, A. M., Harcus, D. & Whiteway, M. (2004). Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* **15**, 456-467.

Matsumoto, T. K., Ellsmore, A. J., Cessna, S. G., Low, P. S., Pardo, J. M., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. (2002). An osmotically induced cytosolic Ca2+ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 33075-33080.

Nobile, C. J., Bruno, V. M., Richard, M. L., Davis, D. A. & Mitchell, A. P. (2003). Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* **149**, 3629-3637.

Nobile, C. J. & Mitchell, A. P. (2005). Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol* **15**, 1150-1155.

Peiter, E., Fischer, M., Sidaway, K., Roberts, S. K. & Sanders, D. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Ca2+ channel Cch1pMid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Lett* **579**, 5697-5703.

Popolo, L. & Vai, M. (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 385-400.

Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H., Douwes, J. E., Baginsky, W., Mazur, P., van den Ende, H. & Klis, F. M. (1998). Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol* **180**, 1418-1424.

Reeves, H. L. & Friedman, S. L. (2002). Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* **7**, d808-826.

Reinoso-Martin, C., Schuller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M. & Kuchler, K. (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* **2**, 1200-1210.

Richard, M., Quijano, R. R., Bezzate, S., Bordon-Pallier, F. & Gaillardin, C. (2001). Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast Yarrowia lipolytica. *J Bacteriol* **183**, 3098-3107.

Richard, M., De Groot, P., Courtin, O., Poulain, D., Klis, F. & Gaillardin, C. (2002a). GPI7 affects

cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Microbiology* **148**, 2125-2133.

Richard, M., Ibata-Ombetta, S., Dromer, F., Bordon-Pallier, F., Jouault, T. & Gaillardin, C. (2002b). Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. *Mol Microbiol* **44**, 841-853.

Richard, M. L., Nobile, C. J., Bruno, V. M. & Mitchell, A. P. (2005). *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell* **4**, 1493-1502.

Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E. & Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**, 14-29.

Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J. & Bille, J. (2003). Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* **48**, 959-976.

Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. & Fonzi, W. A. (1995). PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* **15**, 601-613.

Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Krapf, G., Enzinger, S., Presterl, E. & Kuchler, K. (2003). The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol* **48**, 225-235.

Sharkey, L. L., Liao, W. L., Ghosh, A. K. & Fonzi, W. A. (2005). Flanking direct repeats of hisG alter URA3 marker expression at the HWP1 locus of *Candida albicans*. *Microbiology* **151**, 1061-1071.

Spreghini, E., Davis, D. A., Subaran, R., Kim, M. & Mitchell, A. P. (2003). Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation. *Eukaryot Cell* **2**, 746-755.

Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L. & Sundstrom, P. (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**, 1535-1538.

Stone, J. A., Holland, S. D., Wickersham, P. J. & other authors (2002). Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 739-745.

Tiede, A., Bastisch, I., Schubert, J., Orlean, P. & Schmidt, R. E. (1999). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol Chem* **380**, 503-523.

Wilson, R. B., Davis, D. & Mitchell, A. P. (1999). Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**, 1868-1874.

Table1. Mutants of the library showing a phenotype different from the reference strain. (GD: growth defect, Fil-: absence of hyphae and Fil-/+: filamentation forming defect)

Source	Interrupted gene	Tested on:														
		NaCl	H_2O_2	$Fe3^+$	CH_3-COOH	Cd	43,5°C	pH3	pH10	SDS	CFW	Serum	Spider	Caspo	Chlamydo/ 23°C	AmphoB/ Fluco
(Albrecht *et al.*, 2006)	Orf19.3893 SAP10				GD											
This work	Orf19.6928 SAP9					GD										
(Fradin *et al.*, 2005)	Orf19.2060 SOD5	GD														
This work	Orf19.2108 SOD6						GD						Fil-			
(Staab *et al.*, 1999)	Orf19.1321 HWP1									GD	GD	Fil+/-	Fil-			
(Saporito-Irwin *et al.*, 1995)	Orf19.3829 PHR1								GD		GD	Fil-	Fil-	Tolerant		
(Fonzi, 1999)	Orf19.6081 PHR2							GD								
This work	Orf19.2075 DFG5											Fil-/+	Fil-/+	Tolerant		
This work	Orf19.5302 PGA31	GD		GD						GD	GD			GD		
This work	Orf19.5302 PGA31	GD		GD						GD	GD			GD		
This work	Orf19.2765 PGA62										GD			Tolerant		
(Braun *et al.*, 2000)	Orf19.1327 RBT1										GD					
This work	Orf19.4035 GAS1/PGA4													Tolerant		
This work	Orf19.3212 MID1			GD										GD ++		
(Garcera *et al.*, 2003)	Orf.7030 SSR1						GD				GD			GD		
This work	Orf.7030 SSR1						GD				GD			GD		
(Lamarre *et al.*, 2000)	Orf.7114 CSA1		GD													
This work	Orf.7114 CSA1		GD													
(Richard *et al.*, 2001)	GPI7	GD								GD	GD	Fil-		Tolerant		

Table2. Categories of mutants obtained from Calcofluor white and caspofungin screen.

Category	Description of mutant	Name of mutants
I	Hypersensitive to calcofluor	*rbt1-/-, hwp1-/-*
II	Hypersensitive to caspofungin	*mid1-/-*
III	Hypersensitive to calcofluor and caspofungin	*pga31-/-*, ssr1-/-
IV	Hypersensitive to calcofluor and resistant to caspofungin	*pga62-/-, phr1-/-*
V	Only resistant to caspofungin	*dfg5-/-,pga4-/-*

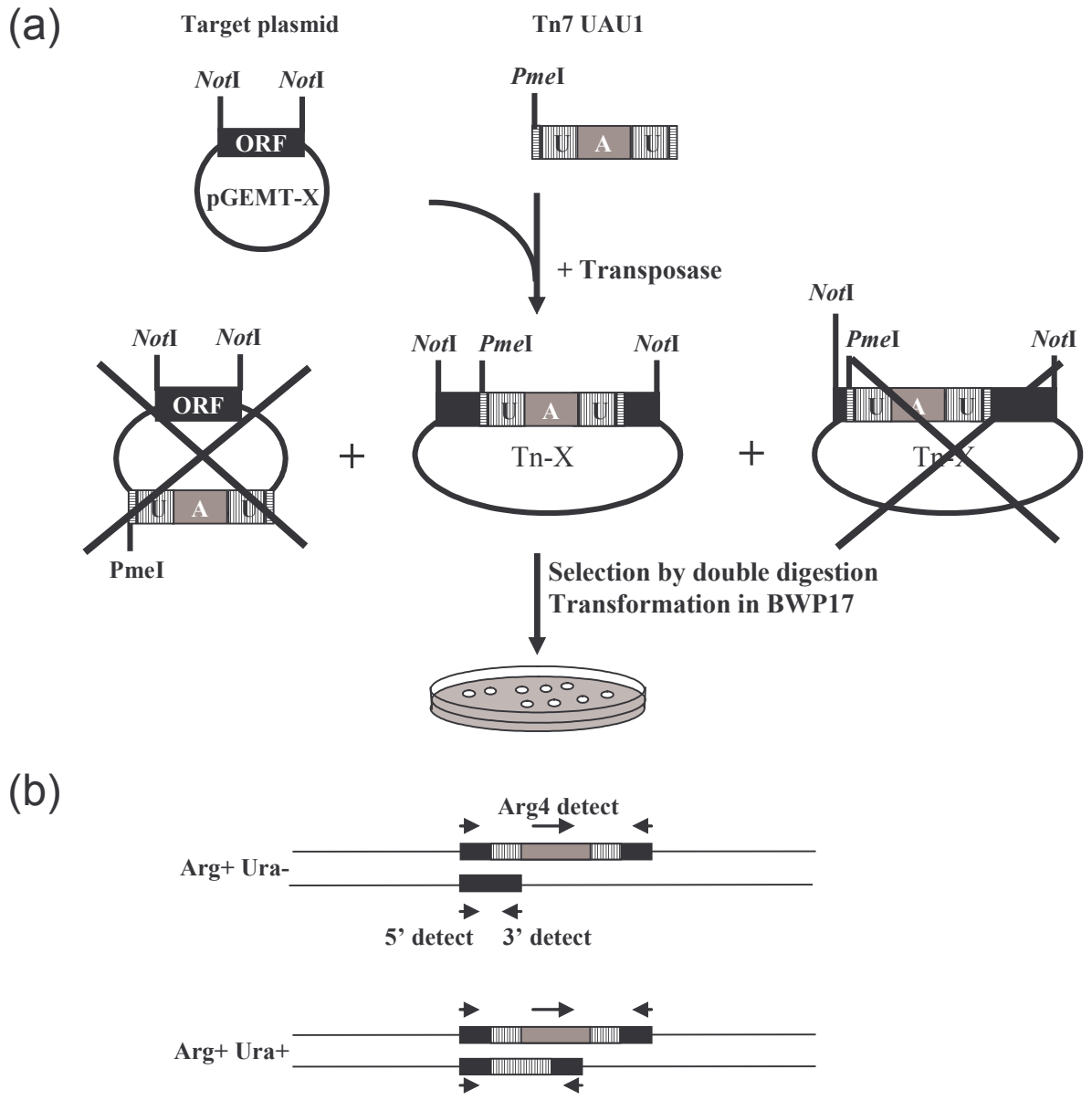


Fig. 1: Strategy used for gene interruptions (the ORF to be disrupted is depicted as a black box, the *ARG4* marker as a grey box, the *URA3* marker as a vertically hatched box and the IR of the Tn7 transposon as horizontally hatched boxes) **1(a)**: **Construction of the disruption cassette by *in vitro* transposition**. The integration site of the *Tn7-UAU1* cassette was estimated by double digestion (*Pme*I and *Not*I). The target plasmid which had integrated the Tn7-UAU1 transposon in the middle of the ORF was selected and transformed in the *C. albicans* strain BWP17. **1(b)**: **Selection of double disruptions by colony PCR.** Colonies isolated on SC-Arg-Ura plates were screened for the absence of the wild-type allele and the presence of the UAU1 insertion allele. Primers 5' and 3' detect were the primers used to amplify the ORF in order to create the target plasmid.

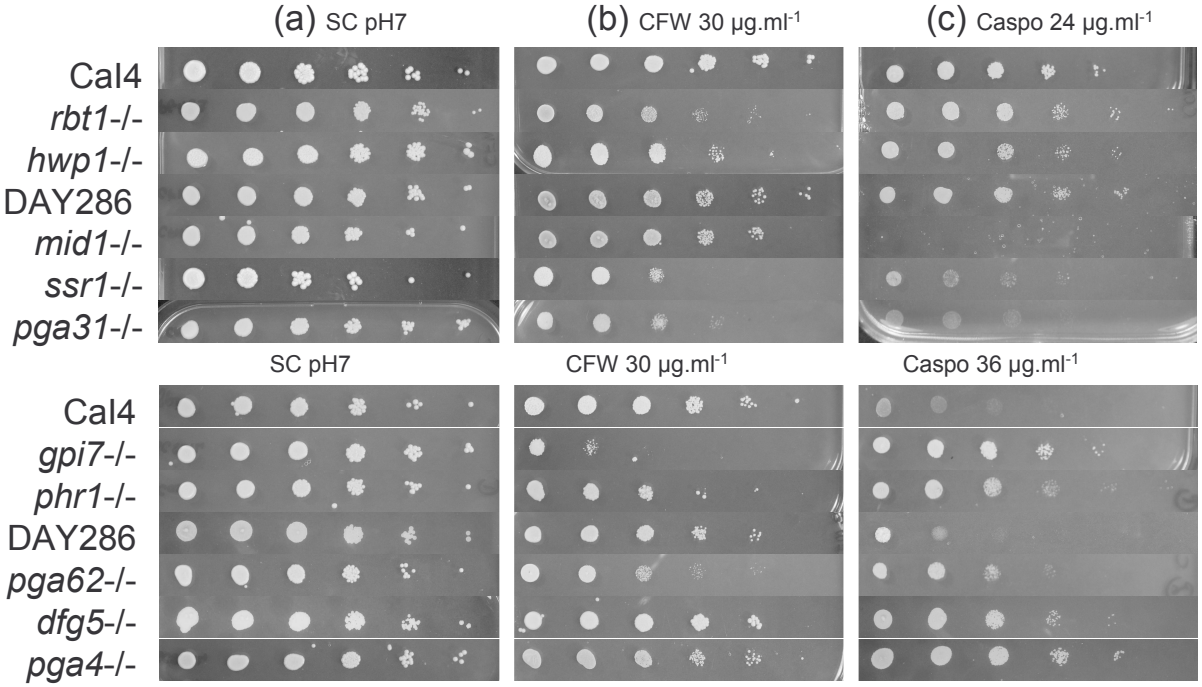


Fig. 2: Phenotype of reference and mutant strains grown on (a) SC buffered at pH7, SC supplemented (b) with Calcofluor or (c) with Caspofungin for 2 days at 37 °C. Only mutant strains with a phenotype different from the reference strain are shown. CaI4 was used as the reference strain for the URA-Blaster mutants and DAY286 for UAU1 mutants.

II.3 Crible interaction hôte pathogène

II.3.1 Crible de la banque pour une plus grande sensibilité à la phagocytose

Cette première étape de classification phénotypique des mutants GpiP terminée, nous voulions identifier des protéines à ancre GPI susceptibles d'intervenir dans la communication avec les cellules du système immunitaire de l'hôte. Nous avons alors effectué un premier crible *in vitro* sur les interactions hôte - *C. albicans* en testant les conséquences de la mutation des protéines à ancre GPI sur la résistance de *C. albicans* face aux macrophages de la lignée J774. Nous avons opté pour un test classique de survie des levures après phagocytose (II.4.1) schématisé Figure 38. Comme contrôles, deux souches ont été utilisées : la souche S288C de *S. cerevisiae* hypersensible à la phagocytose et la souche de *C. albicans, gpi7*-/-, qui a déjà été décrite dans ces conditions comme étant 30 % à 35 % plus sensible à la phagocytose que la souche de référence (Richard *et al.*, 2002).

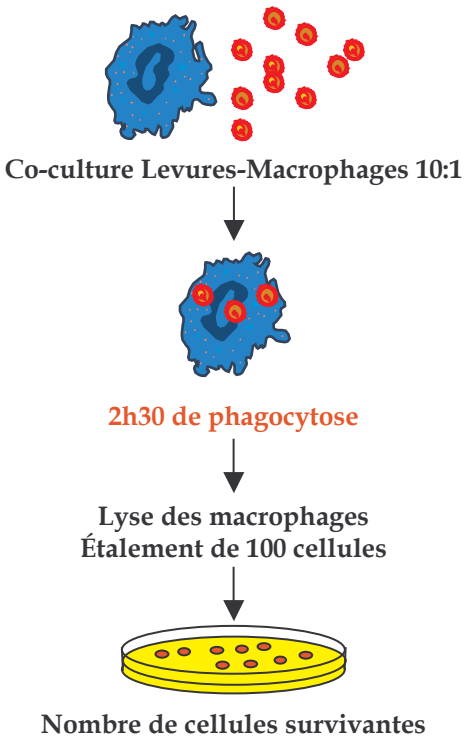
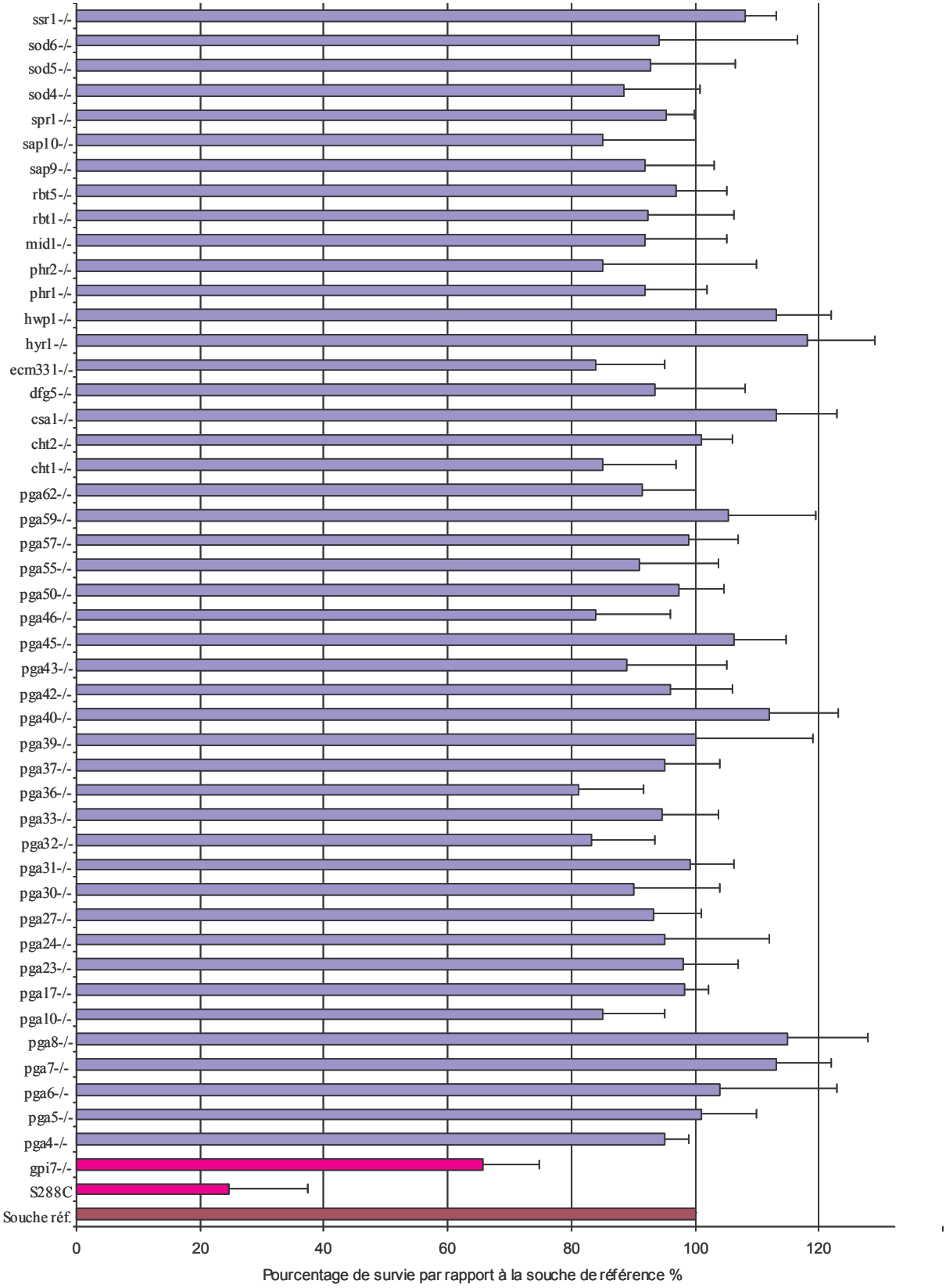


Figure 38 : Différentes étapes du test de survie des levures après co-culture avec macrophages.

Dans ces conditions, mis à part le mutant *gpi7*-/- (66 % de survie), tous les autres mutants survivent à plus de 80 % à la phagocytose des macrophages. Six mutants survivent entre 80 % et 85 % à la co-culture. Il s'agit de mutants déjà identifiés par d'autres tests comme *phr2*-/-, *sap10*-/- ; ou au contraire de mutants jamais identifiés comme *pga36*-/-, *ecm331*-/-, *pga32*-/-, *pga46*-/-, *pga10*-/- (par ordre croissant de pourcentage de survie). Cependant pour ce type de test, on considère généralement qu'une différence entre deux mutants n'est significative qu'à partir de 20 % d'écart, du fait des écartypes obtenus qui sont relativement élevés. Bien qu'on ne puisse écarter le fait que les GpiP ne soient pas ou peu impliquées dans les interactions pathogène – macrophage, il est également possible que les conditions ou les cellules utilisées pour tester la survie des mutants ne soient pas assez stringentes. Ce test permet d'identifier des mutants hypersensibles à la phagocytose comme *gpi7*-/- dont l'ancrage de certaines protéines pariétales dont des GpiP est défectueux (voir la partie Projet de thèse), mais de plus faibles sensibilités semblent difficilement détectables par ce crible.

Tableau V : Pourcentage de survie des mutants GpiP après phagocytose par rapport à leur souche de référence.



III. ANALYSE DE LA REPONSE INNEE INDUITE PAR LE MUTANT *GPI7-/-*

Dans le cadre de l'analyse du rôle des GpiP dans les interactions hôte/pathogène, notre seconde approche consistait à étudier indirectement le rôle de ces protéines dans la réponse innée de l'hôte en utilisant le mutant *gpi7*-/-. Comme nous l'avons déjà souligné, ce mutant présente une paroi désorganisée à la surface de laquelle certaines GpiP pariétales sont absentes car relarguées dans le milieu de culture (cf. Projet de thèse). Nous avons également étudié un possible rôle des récepteurs TLR2 et TLR4 dans la reconnaissance du mutant *gpi7*-/- par les cellules effectrices de l'hôte. Dans ce but, nous avons monté une collaboration avec le laboratoire de M. Gil et D. Gozalbo à Valence (Espagne) au sein duquel j'ai réalisé ces expériences.

III.1 Susceptibilité des souris à des candidoses disséminées induite par le mutant *gpi7-/-*

Des résultats antérieurs ont montré l'implication de *GPI7* dans la virulence de *C. albicans* dans un modèle de candidose disséminée (Richard *et al.*, 2002). Nous avons répété cette expérience en déterminant cette fois-ci l'implication des récepteurs TLR2 et TLR4 dans la survie des souris infectées par *gpi7*-/-. En effet, comme nous l'avons souligné dans l'introduction (voir III.2.2) il est généralement admis que ces récepteurs jouent un rôle crucial dans la reconnaissance de *C. albicans* par l'hôte ; plus particulièrement le TLR2 serait essentiel à la défense des souris contre les candidoses systémiques (Villamon *et al.*, 2004).

Des souris sauvages (C57BL/6), TLR2-/- et TLR4-/- sont infectées par le mutant *gpi7*-/- ou par les deux souches contrôles : SC5314 et la souche complémentée *gpi7*-/- + *GPI7*. La survie de ces trois types de souris est ensuite surveillée pendant 21 jours suivant l'injection. Dans nos conditions, le mutant *gpi7*-/- est également avirulent ; 100 % de souris survivent à l'infection par le mutant *gpi7*-/- ; à l'opposé, seulement 20 % des souris infectées par SC5314 ou par la souche complémentée ont survécu (voir Figure 39). On observe toutefois une différence de survie entre SC5314 et la souche complémentée qui semble montrer un phénotype intermédiaire. Ce cas de figure est souvent observé et peut être attribué au fait qu'une seule copie du gène à été réintroduite dans le mutant *gpi7*-/-.

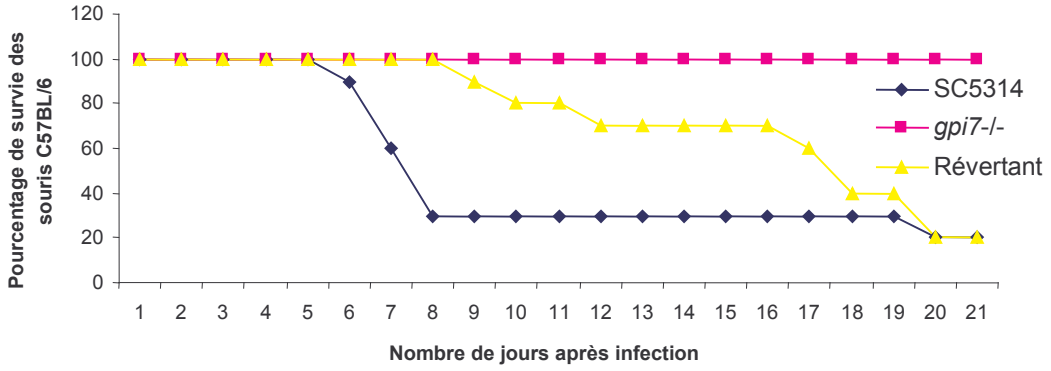


Figure 39 : Survie des souris sauvages (C57BL/6) après injection dans la veine augulaire de l'œil par le mutant *gpi7*-/-, la souche de référence (SC5314) ou par la souche complémentée (Révertant). Les souris ont été injectées en i.v. avec 0,8x10^6 cellules[4] de *C. albicans*. Chaque souche a été injectée à 10 souris.

Les résultats préliminaires présentés ci-dessous Figure 40, indiquent qu'aucune différence significative n'a été observée entre la survie des souris C57BL/6, TLR2-/- et TLR4-/-. Il semblerait donc que la survie des souris après injection du mutant *gpi7*-/- soit indépendante de la reconnaissance des levures *gpi7*-/- par les récepteurs TLR2 ou TLR4.

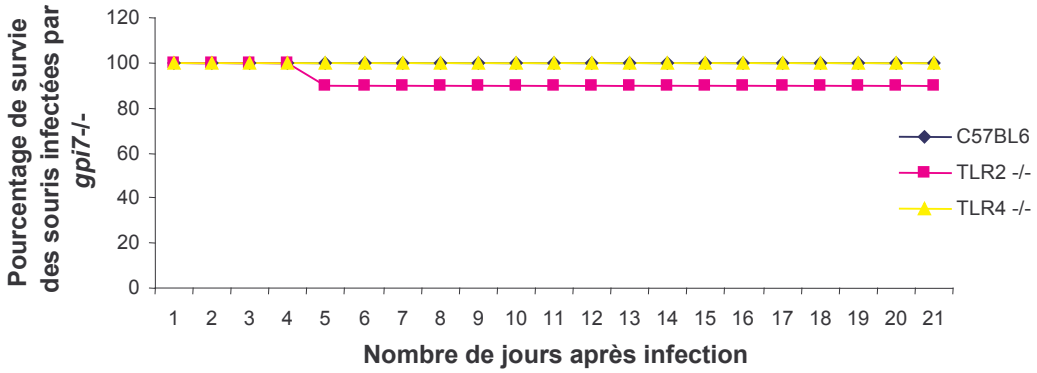


Figure 40 : Survie des souris C57BL/6, TLR2-/- et TLR4-/- après infection par le mutant *gpi7*-/-. Les souris ont été injectées en i.v. avec 0,8 10^6 cellules de *C. albicans*. Chaque souche a été injectée dans 10 souris.

III.2 Production de cytokines TNFα par les macrophages après stimulation par *gpi7*-/-

III.2.1 Le rôle de Gpi7p dans la production de TNFα par les macrophages

Lors de l'invasion de l'hôte par le pathogène, les défenses du système immunitaire inné se déclenchent afin d'éradiquer le microorganisme. La sécrétion de la cytokine TNFα est alors

[4] Du fait du problème de cytokinèse du mutant *gpi7*-/- en milieu liquide (cf.II.3.1) et afin de se mettre dans les conditions les plus stingentes, on a considéré un agrégat de cellules comme une seule cellule lors des comptages précédants les injections en i.v.

essentielle dans l'activation et le développement de cette réponse immunitaire (cf. Introduction III.1.3) ; nous nous sommes demandé si l'absence de Gpi7p modifiait la production de TNFα par les cellules phagocytaires face à *C. albicans*.

Stimulation des macrophages par des levures vivantes

La Figure 41 représente la production de TNFα par les macrophages péritonéaux sauvages en fonction de trois souches de levures différentes. Les cellules vivantes du mutant *gpi7*-/- induisent une production de TNFα significativement plus importante que la souche de référence SC5314 (2,7 fois, p = 0,031) ou la souche complémentée (2,2 fois, p = 0,041). On notera cependant, comme nous l'observons sur les photos présentées Figure 42, que les cellules du mutant *gpi7*-/- forment des agrégats[5] sur les macrophages, contrairement aux cellules des souches contrôles qui sont réparties de façon uniforme sur les macrophages. De plus, les filaments formés par le mutant *gpi7*-/- sont moins développés que celles des souches contrôles ; la croissance du mutant est également légèrement plus lente que celle de SC5314. Les résultats de ce test sont difficiles à interpréter, en autre, à cause des cellules de *gpi7*-/- qui se divisent et se différencient différemment de la souche de référence.

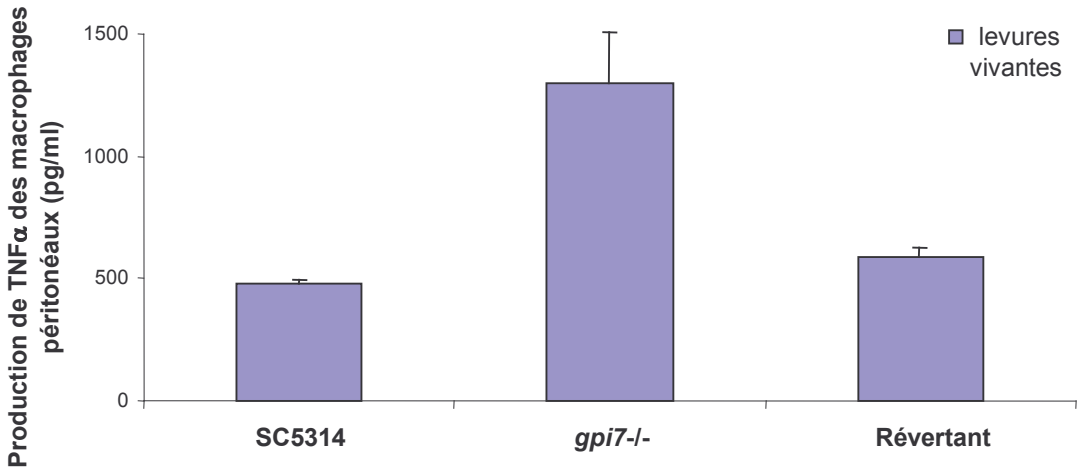


Figure 41 : Production de TNFα par les macrophages résidents du péritoine en réponse à SC5314, *gpi7*-/- et à sa souche complémentée (Révertant). 230 000 macrophages, isolés à partir de souris C57BL/6, sont mis en co-culture pendant 6 h avec 250 000 levures vivantes. Les résultats de ce graphique représentent la moyenne d'une expérience en triplicat parmi les trois expériences représentatives réalisées.

[5] Pour tous les tests *in vitro,* contrairement aux tests *in vivo,* lors des comptages du mutant *gpi7*-/- nous avons considéré un agrégat de cellules comme autant de cellules contenu dans cet agrégat. Plusieurs cellules d'un agrégat pouvaient être reconnues et induire un signal.

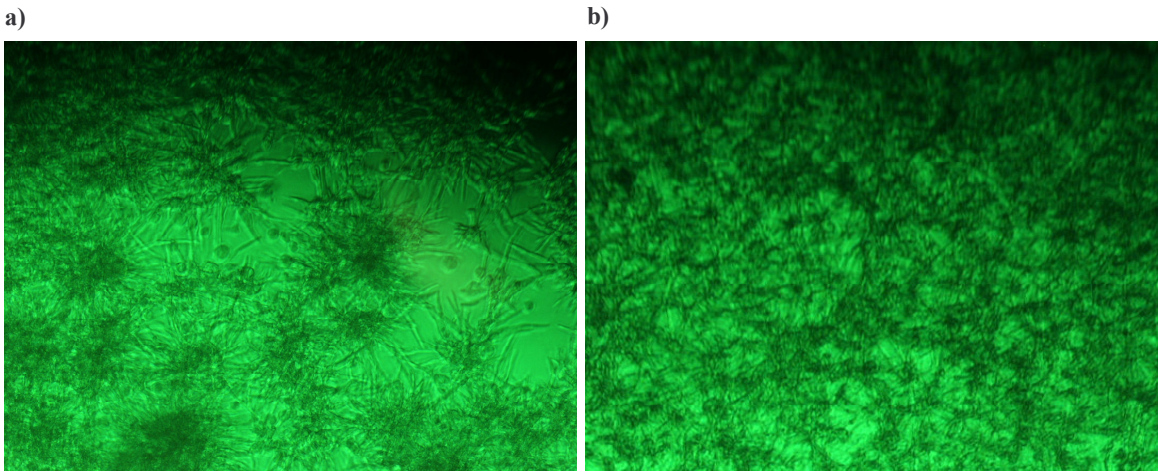


Figure 42 : Photos des macrophages péritonéaux après 6 h de co-culture avec a) le mutant *gpi7*-/- et b) la souche de référence SC5314.

Stimulation des macrophages par des levures mortes

Pour parer d'éventuels biais causés par ces différences phénotypiques, nous avons alors testé deux types de préparation de levure : tuer les levures par le traitement classique, la chaleur ou par fixation au formaldéhyde. En effet, dans notre cas, il s'agit de mutants de la paroi. Nous nous sommes demandés si le traitement thermique n'altérait pas la conformation de la paroi et dans le doute nous avons donc également utilisé le traitement au formaldéhyde. Les résultats ainsi obtenus, présentés Figure 43, sont comparables à ceux observés avec des levures vivantes. Il est intéressant de noter que les cellules du mutant *gpi7*-/- tuées par la chaleur induisent une plus grande production de TNFα par les macrophages stimulés que les cellules de la même souche tuées par fixation au formaldéhyde (2,4 fois plus dans le premier cas ; $p = 0,01$). Nous avons également mesuré la production de TNFα de macrophages d'une lignée cellulaire, J774, stimulés par des levures tuées par fixation au formaldéhyde ou par les UV. Encore une fois, des résultats similaires aux expériences précédentes ont été obtenus (voir Figure 44). En utilisant des levures tuées par fixation, on observe une augmentation de la production 2,5 fois plus importante ($p = 0,01$) de TNFα par les macrophages J774 pour le mutant *gpi7*-/- par rapport à SC5314. Lorsque les levures sont tuées par des UV, ce rapport est de 7,5 ($p = 0,002$; voir Figure 44).

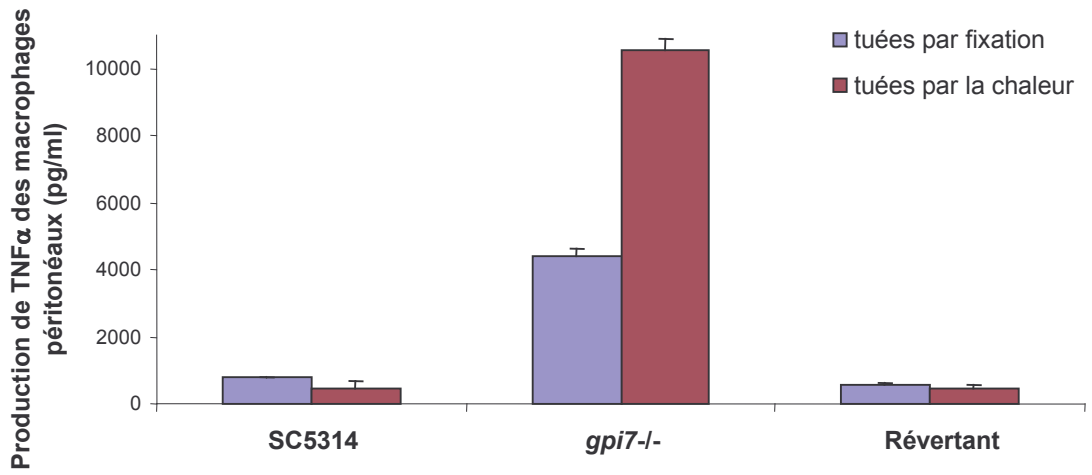


Figure 43 : Production de TNFα par les macrophages résidents du péritoine en réponse à SC5314, *gpi7*-/- et à sa souche complémentée (Révertant). 230 000 macrophages, isolés à partir de souris C57BL/6, sont mis en co-culture pendant 24 h avec 1 million de levures tuées par fixation au formaldéhyde ou par la chaleur. Les résultats de ce graphique représentent la moyenne d'une expérience en triplicat parmi les trois expériences représentatives réalisées.

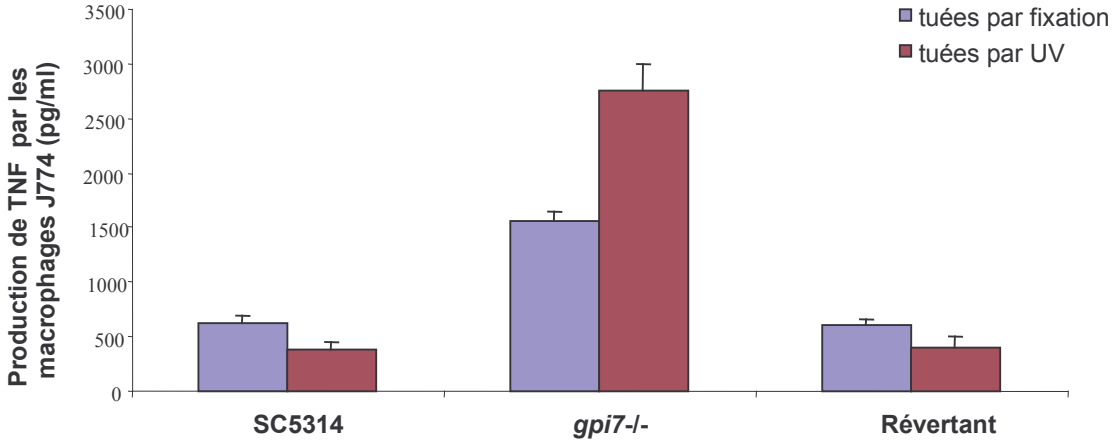


Figure 44 : Production de TNFα par les macrophages J774 en réponse à SC5314, *gpi7*-/- et à sa souche complémentée (Révertant). 500 000 macrophages de lignée cellulaire sont mis en co-culture pendant 24 h avec 1 million de levures préalablement tuées par fixation au formaldéhyde ou par UV. Les résultats de ce graphique représentent la moyenne des 2 expériences réalisées en duplicat.

Conclusion

Bien que les conditions expérimentales influent beaucoup sur la production de TNFα, ces expériences montrent clairement que quel que soit le mode de préparation des levures, le mutant *gpi7*-/- est mieux reconnu par les deux types de macrophages (primaires et de lignée cellulaire) qui produisent alors une plus grande quantité de cytokines TNFα.

Cette production de TNFα est en général plus faible en utilisant des levures vivantes plutôt que mortes, ce qui peut être expliqué par des différences expérimentales (temps de co-culture et quantité de levures plus faible) mais surtout par le fait que les cellules vivantes de *C. albicans* sont capables de se défendre contre la phagocytose des macrophages (cf. les enzymes Sod ci-dessus). D'autre part, il est intéressant de remarquer que dans les mêmes conditions expérimentales les macrophages de lignée cellulaire induisent une plus faible production de cytokines que les macrophages primaires (cf. production de TNFα stimulée par les levures fixées Figure 43 et Figure 44). Cette différence peut en partie s'expliquer par l'absence du récepteur à mannose MR (Fiani *et al.*, 1998), mais également par des différences intrinsèques des deux types de macrophages.

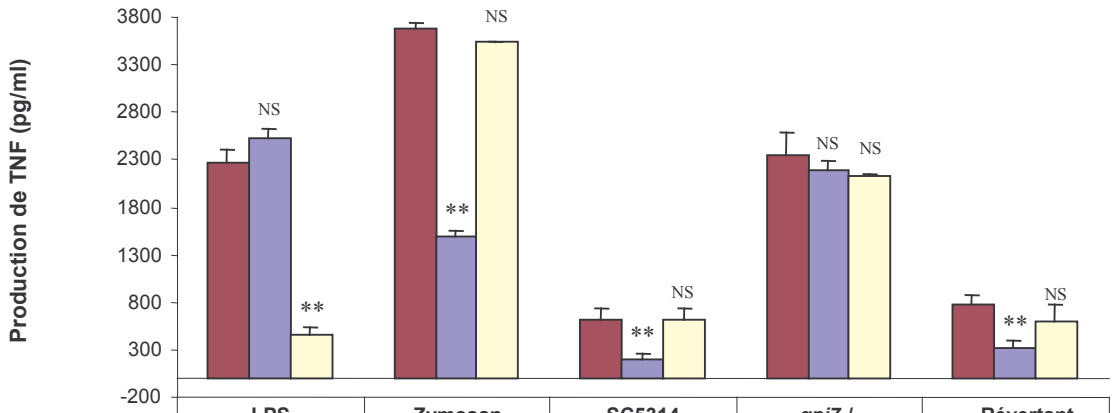
La production de TNF stimulée par les deux souches de référence, SC5314 et la souche complémentée, est en général similaire et reste assez constante entre les différentes conditions expérimentales (entre 450 et 700 pg/ml). A l'opposé, les macrophages stimulés par des cellules du mutant *gpi7*-/- tuées par fixation induisent une production de TNFα d'environ 1500 pg/ml tandis qu'en stimulant ces phagocytes avec des cellules traitées par la chaleur, la concentration de TNFα mesurée est alors supérieure à 10 000 pg/ml (cf. Figure 42 et Figure 43). En effet, le traitement des levures par la chaleur rendrait les β glucanes accessibles au récepteur Dectine-1 ce qui activerait la production de TNFα (Fradin *et al.*, 1996; Gantner *et al.*, 2005). De plus, Wheeler et Fink ont montré que ce n'était pas le cas quand les cellules sont traitées aux UV, ce mode de préparation ne modifie pas l'architecture de la paroi des levures (Wheeler and Fink, 2006). Ainsi, il aurait été judicieux de poursuivre notre étude en utilisant des levures tuées par UV, toutefois nous ne connaissions pas les résultats de Wheeler à ce moment là. Les expériences présentées ci-dessous ont été réalisées en fixant les levures au formaldéhyde; nous pensons cependant que les biais de ce traitement sont limités puisque la production de TNFα mesurée en utilisant des cellules du mutant *gpi7*-/- tuées par fixation est inférieure à celle obtenue avec des cellules tuées par UV (cf. Figure 44).

III.2.2 Le rôle de TLR2 et TLR4 dans la production de TNFα induit par gpi7-/-

Nous avons ensuite voulu tester si cette meilleure reconnaissance du mutant par les macrophages impliquait les deux récepteurs connus pour interagir avec *C. albicans*, le TLR2 et le TLR4. Des macrophages péritonéaux sauvages, TLR2-/- et TLR4-/- ont été co-cultivés

pendant 24 h en présence de levures tuées par fixation au formaldéhyde ; les quantités de TNF produites dans chaque cas de figure sont présentées Figure 45.

L'utilisation d'agonistes des récepteurs TLR4 et le TLR2 (respectivement le LPS et le zymosan) nous permet de vérifier l'efficacité et la spécificité de la réponse des macrophages. En l'absence du TLR2, la production de TNF stimulée par SC5314 est diminuée d'un facteur 3 ($p < 0,05$) par rapport à celle observée pour des macrophages C57BL/6. En l'absence de TLR4, la production de TNFα est similaire à celle observée chez les macrophages contrôles ($p > 0,05$). En stimulant les trois types de macrophages avec la souche complémentée, les résultats sont similaires à ceux observés pour SC5314 (TLR2-/- versus C57BL/6 $p < 0,05$, TLR4-/- versus C57BL/6 $p > 0,05$). Ces données confirment les résultats obtenus par Villamón *et al*., qui avait montré que la production de la cytokines pro inflammatoire TNFα par les macrophages du péritoine est dépendante du récepteur TLR2 (Villamon *et al.*, 2004). A l'opposé, la production de TNF induite par *gpi7*-/- n'est dépendante ni du TLR2 ni du TLR4 ($p > 0,05$). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de production de TNFα induite par *gpi7*-/- par rapport à SC5314 (cf. la partie III.2.1 des résultats) n'implique pas le récepteur TLR2, ni le TLR4.



	LPS	Zymosan	SC5314	*gpi7-/-*	Révertant
C57BL/6	2259	3679	623	2339	779
TLR2-/-	2523	1501	205	2198	312
TLR4-/-	448	3534	613	2130	588

Figure 45 : Production de TNFα par des macrophages résidents du péritoine sauvage, TLR2-/- et TLR4-/- en réponse à *gpi7*-/- et à ses souches contrôles. 230 000 macrophages sont mis en co-culture pendant 24 h avec 1 million de levures préalablement tuées par fixation au formaldéhyde. Les résultats de ce graphique représentent la moyenne de triplicat d'une des deux expériences représentatives réalisées. Student Two tailed t-test (*$p < 0,005$; **$p < 0,001$; NS : non significative).

III.3 Recrutement de neutrophiles dans la cavité péritonéale en réponse à *gpi7-/-*

III.3.1 Le rôle de Gpi7p dans le recrutement de neutrophiles

Les neutrophiles sont dotés d'une activité fongicide très efficace. A ce titre, ces cellules sont recrutées très rapidement au site de l'infection (cf. III.1.3), nous avons donc étudié l'influence de Gpi7p dans cette étape de la réponse inflammatoire. Dans ce but, des groupes de trois souris C57BL/6 ont été injectés par voie i.p. avec $5x10^6$ levures préalablement tuées par fixation au formaldéhyde. Quatre heures après l'injection, les cellules du péritoine sont récoltées, comptées et le pourcentage de neutrophiles élicités parmi cette population est estimé par cytométrie de flux. Les résultats, présentés dans le Tableau VI, montrent que le pourcentage de neutrophiles présents dans la cavité péritonéale après injection du mutant *gpi7*-/- est 1,7 fois plus importante que lorsque les souris C57BL/6 sont infectées avec la souche de référence ($p < 0,01$). De plus, la quantité de cellules présentes dans le péritoine est 3,3 fois plus importante après injection du mutant par rapport à SC5314 ($p < 0,01$). En infectant les souris avec la souche *gpi7*-/- complémentée, des résultats similaires aux résultats obtenus avec la souche de référence sont observés ($p > 0,05$).

Tableau VI : Recrutement des neutrophiles dans les souris C57BL/6 en réponse à SC5314, au mutant *gpi7*-/-et sa souche complémentée (Révertant). 4 h après l'injection en i.p. de 5 millions de levures tuées par fixation, la concentration des cellules ainsi que le pourcentage en neutrophiles de la population présente dans la cavité péritonéale sont quantifiés. Les résultats de ce tableau représentent la moyenne des résultats de deux expériences réalisées en triplicat (lot de trois souris). Le *t*-test précise si les résultats obtenus avec *gpi7*-/- ou révertant *versus* SC5314 sont significativement différents. Student Two tailed t-test (*p < 0,005 ; **p < 0,001 ; NS : non significative).

	Cellules dans le péritoine (10^6 cellules / ml)	Pourcentage de neutrophiles dans le péritoine (%)
SC5314	0,25 ± 0,07	43 ± 4,2
***gpi7*-/-**	0,81 ± 0,15 (**)	75 ± 6,1 (**)
Révertant	0,22 ± 0,01 (NS)	43 ± 1,7 (NS)

Nous concluons que le mutant *gpi7*-/- une fois injecté dans la souris induit une forte production de TNFα qui est accompagnée d'un important recrutement de neutrophiles au site de l'infection.

III.3.2 Le rôle de TLR2 et TLR4 dans le recrutement de neutrophiles induit par gpi7-/-

Les résultats précédents montrent que les TLR2 et TLR4 ne sont pas impliqués dans la plus forte production de TNFα par les macrophages induite par *gpi7*-/- ; les expériences de recrutement présentées ci-dessus ont pour but d'étudier le rôle potentiel de ces récepteurs dans le recrutement des neutrophiles élicités par ce même mutant.

En l'absence de TLR2, le recrutement de neutrophiles péritonéaux après injection de la souche SC5314, est 1,7 fois plus faible que celui obtenu avec des souris sauvages ($p < 0,01$; cf. Figure 46). En l'absence du TLR4, l'infiltration de neutrophiles dans le péritoine induite par cette même souche s'élève à 1,4 fois celle observée sur les souris contrôles ($p < 0,01$). A l'opposé, on n'observe avec le mutant *gpi7*-/- aucune différence significative de recrutement des neutrophiles dans la cavité péritonéale des souris sauvages, TLR2-/- ou TLR4-/- ($p > 0,05$).

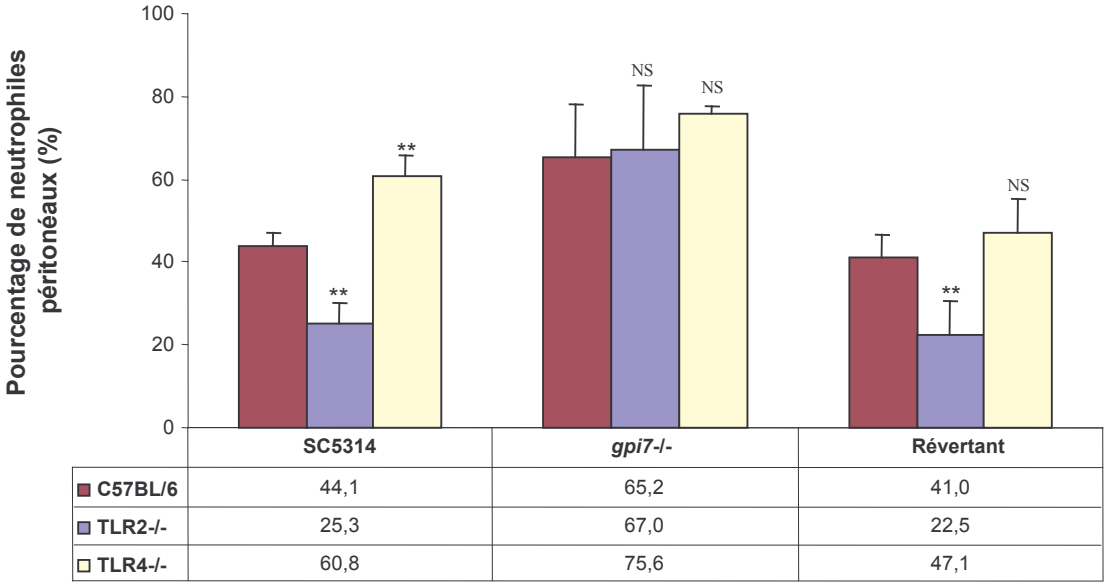


Figure 46 : Recrutement des neutrophiles dans les souris C57BL/6, TLR2-/- et TLR4-/- en réponse au mutant *gpi7*-/- et à ses deux souches contrôles. 4 h après l'injection en i.p. de 5 millions de levures tuées par fixation, le pourcentage de neutrophiles présents dans la cavité péritonéale est quantifié par cytométrie de flux. Les résultats de ce graphique représentent la moyenne des résultats obtenus pour trois souris d'une des deux expériences représentatives réalisées. Un *t*-test précise si les résultats obtenus avec TLR2-/- ou TLR4-/- ver*sus* C57BL/6 sont significativement différents. Student Two tailed t-test (*$p < 0,005$; **$p < 0,001$; NS : non significative).

Le recrutement de neutrophiles élicités par la souche complémentée de *gpi7*-/- donne des résultats similaires à ceux obtenus avec la souche SC5314, excepté pour les souris TLR4-/-

pour lesquelles le recrutement est identique à celui des souris sauvages. L'effet inhibiteur du TLR4 sur le recrutement en cas d'infection par SC5314 est d'ailleurs très surprenant : un résultat similaire à celui obtenu avec les souris sauvages lors des expériences de production de TNFα était attendu. Aucun résultat similaire pour TLR4 n'a été reporté dans la littérature et cet effet n'est pas observé lors des tests de production de TNFα. Afin de vérifier ce résultat surprenant, des expériences supplémentaires pourraient être réalisées.

Ces résultats confirment l'importance du rôle joué par le récepteur TLR2 dans le recrutement de neutrophiles péritonéaux lors d'une infection par une souche sauvage de *C. albicans*, ce qui avait déjà été décrit par Villamón *et al*. (Villamon *et al.*, 2004). Pourtant ce récepteur ne semble pas responsable du plus fort recrutement obtenu en l'absence de Gpi7p par rapport à la souche de référence. De façon très surprenante, le récepteur TLR2 et le récepteur TLR4 ne semblent pas impliqués dans la réponse de l'hôte contre *gpi7*-/- puisqu'on observe le même niveau de production de TNFα et de recrutement de neutrophiles avec les trois types de macrophages et de souris (Figure 45 et Figure 46). Le mutant *gpi7*-/- serait donc reconnu spécifiquement par des récepteurs différents du TLR2 et du TLR4, qui seraient habituellement peu impliqués dans la reconnaissance de *C. albicans*. Le défaut de localisation de certaines protéines pariétales observé dans le mutant *gpi7*-/- semble être à l'origine de la plus forte réponse pro inflammatoire chez l'hôte qui pourrait alors maîtriser la dissémination de *C. albicans*. Cette hypothèse expliquerait la survie des souris infectées par *gpi7*-/- observée dans notre modèle de candidose disséminée (III.1).

III.4 L'activité candicide du sang sur *gpi7-/-*

Nous nous sommes ensuite demandé si ce fort recrutement de neutrophiles induit par *gpi7*-/- était accompagné d'une plus grande capacité des cellules immunitaires à détruire ce mutant. Pour des raisons techniques nous n'avons pas pu purifier des neutrophiles, nous avons alors utilisé du sang de jeunes volontaires sains. La survie des levures après une heure de co-culture dans du sang humain a été comparée à leur survie après une heure d'incubation dans du plasma. La survie du mutant *gpi7*-/- ainsi que des deux souches contrôles (SC5314 et le révertant) dans le plasma varie d'une façon non significative de 93 % à 102 % ($p > 0,05$; voir Figure 47). Par contre, la survie de ces même souches dans le sang est significativement différente ; 60 % des cellules de *gpi7*-/- survivent à la phagocytose dans ces conditions contre seulement 30 % dans le cas de SC5314 ($p < 0,01$). Les résultats obtenus pour la souche *gpi7*-/- complémentée sont similaires à ceux de SC5314 ($p > 0,05$).

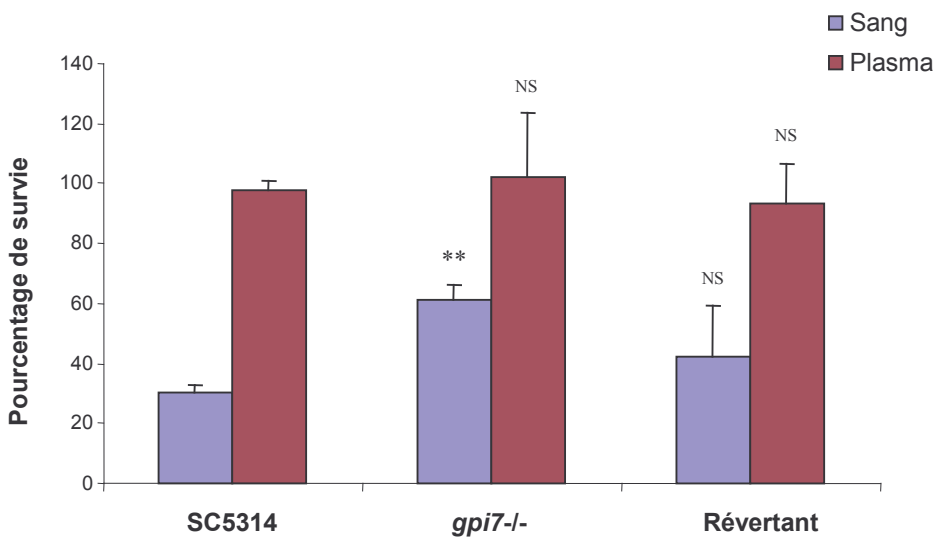


Figure 47 : Survie de SC5314, du mutant *gpi7*-/- et de sa souche complémentée (Révertant) après phagocytose par les neutrophiles. 750 000 levures vivantes sont incubées dans 150 µl de sang et comme contrôle dans 150 µl de plasma. Le pourcentage de survie de chaque souche, estimé par étalement sur boîte après une heure d'incubation dans du sang, est comparé à celui calculé après une heure d'incubation dans du plasma. Les résultats de ce graphique représentent la moyenne des résultats obtenus en duplicat d'une des trois expériences représentatives réalisées. Un *t*-test précise si les résultats obtenus avec *gpi7*-/- ou sa souche complémentée ver*sus* SC5314 sont significativement différents. Student Two tailed t-test (*p < 0,005 ; **p < 0,001 ; NS : non significative).

Ces résultats montrent qu'en l'absence de *GPI7*, les cellules de *C. albicans* sont plus résistantes à l'activité candicide du sang qui est principalement due aux neutrophiles. Ces observations sont surprenantes puisque, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, *gpi7*-/- est plus sensible à la phagocytose des macrophages. Cependant, l'activité candicide de chaque cellule phagocytaire est différente et implique des moyens de défense de la part de *C. albicans* différents (cf. III.1.3). Contrairement à une souche sauvage, *gpi7*-/- n'est pas capable d'induire l'apoptose du macrophage pour échapper à sa phagocytose (Richard *et al.*, 2002). Par contre au regard de nos résultats, il semble que ce mutant soit capable de résister aux mécanismes spécifiques de destruction oxydative des neutrophiles et des autres cellules immunitaires du sang. Il existe d'autres exemples de ce type tels que les mutants *sap4-/-* et *sap6-/-* qui sont également hypersensibles à phagocytose par les macrophages mais sont capables de survivre aux contacts avec des neutrophiles (Borg-von Zepelin *et al.*, 1998; Fradin *et al.*, 2005).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

LES TECHNIQUES UTILISEES

La méthode de disruption

Une banque de mutants représente un outil puissant nous permettant d'étudier la fonction de gènes dans le but d'une meilleure compréhension de la biologie et de la pathogénie de *C. albicans*. Ces dernières années, plusieurs équipes se sont lancées dans la disruption à grande échelle de gènes chez *C. albicans*. Dans le laboratoire de A. Mitchell, une banque de 217 mutants aléatoires et une banque de 83 mutants interrompus pour des facteurs de transcription ont été construites grâce à la cassette UAU1. Ces mutants ont fait l'objet de nombreux cribles et ont permis l'identification (i) de 32 gènes essentiels et (ii) de gènes impliqués dans la filamentation, dans la formation de biofilm, dans la résistance au fluconazole et récemment, dans les dommages des cellules épithéliales et endothéliales (Bruno and Mitchell, 2005; Chiang *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2002; Nobile *et al.*, 2003; Nobile and Mitchell, 2005; Richard *et al.*, 2005). La banque de Uhl *et al.*, rassemble, quant à elle, 1800 mutants hétérozygotes parmi lesquels 146 présentaient un défaut de filamentation ; les cassettes de disruption ont été également construites par transposition *in vitro* mais par insertion aléatoire dans le génome de *C. albicans*. La stratégie de l'anti-sens (De Backer *et al.*, 2001) et de GRACE™ (Roemer *et al.*, 2003) a permis d'identifier respectivement, 86 et 567 gènes essentiels chez *C. albicans.* Cependant ces deux dernières banques n'ont pas fait l'objet d'autres publications.

Nous avons donc décidé d'utiliser la méthode UAU1 qui avait fait ses preuves pour construire notre banque de mutants. De plus, nous pensions que les autres méthodes d'inactivation de gène existantes chez *C. albicans* n'auraient pas permis d'obtenir autant de mutants en un temps aussi limité. Par exemple, la méthode de l'URA-blaster est beaucoup plus longue, car elle nécessite deux transformations et une étape de 4 à 5 jours sur milieu 5-FOA. D'autre part, les techniques utilisant deux marqueurs de sélection, bien que plus rapides, nécessitent la construction de deux cassettes et deux étapes de transformations mutagènes (cf. Figure 6). L'utilisation de longs oligos de 120 pb permet de gagner du temps au niveau de la construction des cassettes. Cependant, ces petites zones d'homologies réduisent l'efficacité

des recombinaisons. Lorsque nous avons rencontré des difficultés avec la méthode de transposition *in vitro*, nous avons essayé cette technique avec les marqueurs *ARG4* et *URA3* alliés à l'utilisation de 120mères. Le nombre de transformants, pour les 6 gènes que nous avons essayé d'interrompre, était toujours très faible lors de la seconde transformation ; bien qu'ayant répété cette étape, nous n'avons réussi à invalider qu'un seul gène. Avec notre méthode UAU1, parmi les 5 gènes restants, nous avons réussi à invalider 3 d'entre eux après une seule transformation. Il existe également des méthodes plus originales n'utilisant pas de marqueurs de sélection de *C. albicans* ; mais elles sont peu répandues et auraient nécessité beaucoup de temps de mise au point dans notre laboratoire (cf. Introduction I.3.2).

Malgré les difficultés techniques rencontrées, la méthode de disruption UAU1 nous a permis de construire 39 mutants en un an, ce qui représente un nombre relativement important. Nous sommes tout à fait conscients que cette banque n'est pas parfaite. Des mutants ayant des phénotypes intéressants ont pu nous échapper pour des raisons inhérentes à la construction de chaque banque de mutants par interruption. En effet, il est possible que certains mutants possèdent encore une copie de l'allèle sauvage puisque, pour une question de temps, nous n'avons pas testé le génotype de tous les mutants par Southern. Cette technique nous aurait également permis de détecter de possibles remaniements au locus du gène cible. De plus, les gènes ont été inactivés par insertion de la cassette UAU1, on ne peut donc pas exclure que certains peptides traduits, bien que mal localisés et certainement peu stables, exercent une fonction. Par ailleurs, l'insertion de la cassette UAU1 au gène cible n'est pas sans conséquences pour le reste du génome : l'invalidation du second allèle cible par la cassette UAU1 est basée sur des évènements génétiques qui peuvent conduire à une perte d'hétérozygotie partielle ou totale du chromosome portant le gène cible (cf. Figure 28). Potentiellement, une mutation silencieuse proche du gène cible a également pu être rendue homozygote et être responsable du phénotype observé ; ce qui est probablement le cas pour *pga52*-/-. Or, comme nous l'avons déjà signalé, le génome de *C. albicans* présente un important polymorphisme (cf. conclusion des Résultats II.1.5). Nous pensons néanmoins avoir limité ces effets en testant à chaque fois deux clones indépendants ce qui nous a d'ailleurs permis d'écarter certains mutants. De plus, 4 de nos mutants UAU1 montrent le même phénotype que des mutants délétés pour le même gène par une autre méthode.

Avec du recul, nous pensons toujours que le choix de la méthode d'interruption utilisée s'est révélé être un bon choix. Au sein du laboratoire, la construction des mutants affectant les GpiP restants est actuellement poursuivie afin d'atteindre notre objectif initial. Les résultats

obtenus grâce à cette banque lors de ce travail de thèse seront discutés dans la partie suivante. Cet outil servira également au sein du consortium Galar Fungail, il a déjà été envoyé au laboratoire de F. Klis (Amsterdam) et de C. d'Enfert.

Toutefois le protocole pourrait encore être amélioré en optimisant, par exemple, l'étape de construction de la cassette pour les gènes plus grands que 1,5 kb. En effet, au lieu de cloner toute l'ORF, il serait préférable de cloner les 1,5 kb en 5' du gène puis d'insérer par transposition la cassette UAU1. Ceci nous permettrait, dans le cas de grands gènes, d'éviter qu'un trop grand peptide ne soit traduit.

Le test de survie des levures après phagocytose

Le crible de notre banque de mutants GpiP pour les interactions macrophages / *C. albicans* ne nous a pas permis d'identifier des gènes impliqués dans la résistance du pathogène à la phagocytose par les macrophages. Le test que nous avons utilisé a été mis au point par T. Jouault (Jouault *et al.*, 1998) et a déjà permis à notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe de D. Poulain, de démontrer l'hypersensibilité à la phagocytose de *gpi7*-/- ; ce phénotype a été confirmé par notre étude. La plupart des tests mesurant l'activité candicide des macrophages utilisent une approche de microbiologie classique par comptage de colonies comme celui que nous avons utilisé. Chacun des tests diffère par le temps de co-culture, le ratio levures/macrophages et le moyen de lyse des macrophages. Ces tests présentent l'avantage d'être peu onéreux, de tester plusieurs souches en même temps et de ne pas exiger de matériel sophistiqué. Bien que nous ne puissions écarter l'hypothèse qu'aucun des mutants GpiP ne soit plus sensible à la phagocytose, nous pensons que les conditions du test utilisées n'étaient pas assez stringentes pour déceler un phénotype moins fort que celui de *gpi7*-/-.

En effet, ce test comporte des étapes de lavage sensées éliminer les levures n'ayant pas été endocytées ; sinon, ces levures pourraient se retrouver dans le lot des levures phagocytées après la lyse des macrophages et donc biaiser le pourcentage de survie. Cependant, ce traitement s'est révélé insuffisant pour enlever toutes les levures qui adhèrent très fortement aux macrophages. D'autre part, le ratio 1 macrophage pour 10 levures est élevé et tend à favoriser la survie des levures même si au début du crible, des tests pilotes nous ont permis d'établir que les différents ratios testés n'influençaient pas le pourcentage de survie de *gpi7*-/-. On peut pourtant supposer dans le cas de mutants légèrement plus résistants à la phagocytose que *gpi7*-/-, que l'activité candicide d'un macrophage est probablement plus efficace contre

une levure plutôt que 10. Un ratio 1 : 1 permettrait de rendre ce test plus sensible. Pour ce faire, nous pourrions également rallonger le temps de co-culture. En effet, certaines levures fragilisées qui survivent aux conditions utilisées pourraient être comptabilisées comme mortes après un temps de co-culture supérieur à 2h30. Finalement, les conditions dans lesquelles nous avons utilisé cette méthode ne tiennent pas compte du phénotype de chaque mutant. Certains mutants GpiP pourraient présenter un défaut d'adhésion ou d'endocytose, ce qui influencerait les résultats sachant que ces derniers sont susceptibles d'être accentués par les lavages. L'ajout dans le protocole d'un puits sans macrophages, en contrôle pour chaque souche, impliquerait, pour un test comme celui-ci, des étapes très lourdes et donc peu réalisables dans le cadre d'un crible. Nous pensons que dans les conditions de ce test de survie, nous observons un stress plutôt que la mort des levures. A l'issue du crible, toutes les suggestions précédemment citées (ratio 1 : 1, temps de co-culture rallongé, etc.) ont été testées dans le but d'améliorer ce protocole, cependant l'activité candicide des macrophages ne semble pas en être accrue.

Il existe d'autres méthodes basées sur la mesure de la survie des levures grâce à un FACS après le marquage des levures au FITC et/ou l'utilisation de marqueurs d'activité métabolique de la levure (par exemple FUN1) (Hobson *et al.*, 2004) ; mais ce type d'appareil ne nous était pas accessible. Certaines méthodes reposent sur le comptage du nombre de levures endocytées sous microscope après coloration des levures (par exemple au Giemsa ou Motchkiss-Macmanus) et l'assimilent au nombre de levures phagocytées (Luongo *et al.*, 2005). A notre avis, ce test représente le pourcentage d'endocytose et ne nous permettrait pas d'identifier des mutants affectés dans leur capacité de résistance à la phagocytose (échappement physique ou induction de l'apoptose du macrophage par *C. albicans*).

Après l'analyse précise du protocole du test de survie et au regard des autres tests existants, le test du « end point dilution » (Rocha *et al.*, 2001) nous semble le plus adapté pour cribler notre banque de mutants. En effet, cette méthode représente une bonne alternative aux tests classiques de survie en comparant la survie d'une souche après phagocytose à sa survie dans les mêmes conditions de culture sans macrophages grâce à un rapide et peu fastidieux comptage de colonies au microscope. Plusieurs dilutions successives d'une suspension de levures cultivée en microplaque 96 puits permettent, après 48 h d'incubation, d'obtenir des colonies isolées dans le puits de la dernière dilution (voir Figure 48). Ce protocole ne comporte pas d'étapes de lavage ni de lyse des macrophages et l'activité candicide des macrophages semble améliorée. En effet, des expériences préliminaires montrent que 60 %

des cellules de SC5314 survivent à ces conditions pour 80 % dans le test utilisé pour le crible ; *gpi7*-/- survit, quant à lui, entre 30 % et 35 % à la phagocytose dans les conditions du « end point dilution » contre 66 % auparavant.

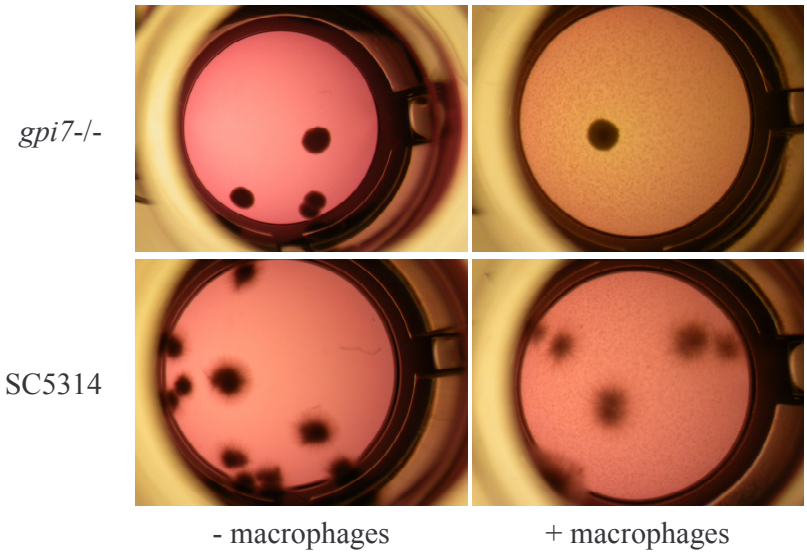


Figure 48 : Résultats préliminaires des tests de survie "end-point dilution". 33 % des cellules du mutant *gpi7*-/- ont survécu à la phagocytose, contrairement à sa souche de référence SC5314 qui survit à 60 % à la phagocytose.

LES RESULTATS

L'étude phénotypique des mutants GpiP

Cette étude a permis de construire une collection relativement importante de mutants GpiP permettant de tester pour ces protéines mal connues des fonctions physiques et physiologiques différentes.

La construction des mutants GpiP nous permet tout d'abord d'affirmer qu'aucun des 39 gènes interrompus par la cassette UAU1 n'est essentiel, même si nous ne nous attendions pas à trouver des GpiP essentielles. En effet, chez *S. cerevisiae*, aucun des gènes codant des protéines à ancre GPI n'est essentiel. Cet outil nous a permis d'étudier le rôle des GpiP chez *C. albicans* aux moyens de divers tests phénotypiques. Cette première étude globale des GpiP montre que ces protéines sont impliquées dans des fonctions biologiques diverses que nous pouvons rassembler en trois grandes catégories fonctionnelles : la morphogenèse (4 mutants), la réponse au stress (10 mutants), l'intégrité de la paroi et la sensibilité à la caspofungine (9 mutants). Ainsi, sur les 47 mutants de la banque, seulement 17 montrent un phénotype différent de celui de la souche de référence. Or, nous nous attendions à obtenir plus de

phénotypes, nous expliquons ces résultats par les raisons suivantes : (i) bien que les plus grandes familles de gènes n'aient pas été intégrées à notre crible, certains des gènes interrompus font partie de familles plus petites. Nous pouvons donc supposer que nous avons pu manquer certains phénotypes à cause de redondance fonctionnelle au sein de certaines familles. Par exemple, les gènes *CSA1*, *RBT5*, *PGA7* et *PGA10* appartiennent à la même famille, parmi les 4 mutants correspondants présents dans notre banque, seul *csa1*-/- présente un phénotype. (ii) Il est possible qu'en testant un plus grand nombre de concentrations de drogues ou en suivant les cinétiques de croissance nous aurions observé plus de différences phénotypiques entre certains mutants et la souche de référence. (iii) Bien évidemment, en multipliant les conditions testées nous aurions pu trouver d'autres phénotypes, certains apparaissent toutefois plus pertinents que d'autres. En effet, l'analyse en spectrométrie de masse de la composition de la paroi de *C. albicans* cultivée dans des concentrations croissantes d' O_2, de 0,01 à 7 %, 6 % CO_2, a identifié 11 GpiP. Parmi elles, certaines étaient seulement présentes à faible concentration en oxygène (G. Sosinska, communication personnelle). Il serait donc intéressant d'étudier le phénotype de nos mutants dans des conditions hypoxiques en les faisant pousser dans une jarre réglée à 99 % N_2 ou en sandwich entre plusieurs couches d'agar. Les mutants GpiP sont d'ailleurs en cours de criblage par G. Sosinska (Laboratoire de F. Klis) dans des conditions mimant les conditions de croissance de *C. albicans* dans le vagin. De même, un suivi de la formation des biofilms aurait pu être intéressant ; ce test est réalisé sur nos mutants par un autre de nos partenaires du projet Galar Fungail (C. d'Enfert). Comme nous l'avons déjà souligné, les GpiP sont impliquées dans l'adhésion (cf. Revue), un test simple d'agrégation pourrait identifier de nouvelles GpiP exerçant cette fonction : vortexer une culture de 5ml, attendre quelques heures puis mesurer la DO du surnageant de chaque culture. (iv) Plusieurs analyses transcriptomiques et protéomiques ont montré le dynamisme des protéines de paroi. Certaines protéines GpiP semblent seulement être incorporées à la paroi de levures sous forme hyphe (de Groot *et al.*, 2004; Pitarch *et al.*, 2002; Sohn *et al.*, 2003). Ainsi, certains mutants GpiP, sous la forme filamenteuse, pourraient présenter une hypersensibilité dans nos conditions testées.

Même si nous avons observé moins de phénotypes qu'escomptés lors de l'étude phénotypique, nous avons cependant catégorisé 6 GpiP qui avaient été jusqu'alors seulement identifiées par outil informatique (Pga4p, Pga31p, Pga59p, Pga62p, Sod6p et Mid1p). Nous avons également pu approfondir la caractérisation de GpiP déjà publiées. Il ressort de cette

étude globale une forte implication des GpiP dans la réponse de *C. albicans* à la caspofungine (8 mutants, cf.Tableau IV).

Pour la première fois, nous avons observé des mutants, de perte de fonction, tolérants à la caspofungine. Sur les 5 mutants plus résistants à cet antifongique, la plupart étaient atteints dans l'intégrité de leur paroi. Comme nous l'avons précisé dans la partie résultats (cf. II.2.2), la voie de la calcineurine et des PKC induiraient l'expression des chitine synthases pour compenser la désorganisation de la paroi due à l'absence de certaines GpiP. La grande quantité de chitine permettrait à la levure de résister à l'inhibition de la synthèse des β glucanes occasionnée par la caspofungine. L'analyse de la composition en chitine de certains mutants, réalisée indépendamment de cette étude, confirme en partie cette hypothèse ; en effet les mutants *phr1-/-*, *pga59-/-*, *pga62-/-* sont résistants à la caspofungine et présentent tous une paroi enrichie en chitine. Récemment, des isolats cliniques résistants à la caspofungine ont été identifiés, ces souches présentaient toutes une paroi extrêmement riche en chitine (898 % d'augmentation, (Stevens *et al.*, 2006)). L'analyse précise de la composition de la paroi (mesure de la quantité de chitine, calcul du rapport de la quantité de glucanes / mannanes) de tous les mutants impliqués dans la réponse à la caspofungine nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes de résistance développés chez *C. albicans*. Ces expériences sont en cours de réalisation en collaboration avec le laboratoire de C. Munro (Aberdeen, Ecosse).

L'étude phénotypique des mutants GpiP nous a permis d'identifier le gène *MID1* essentiel à la résistance de *C. albicans* à la caspofungine. Les résultats d'expériences préliminaires suggèrent que comme son paralogue chez *S. cerevisiae*, Mid1p serait impliqué dans la voie de la calcineurine en facilitant le transport de Ca^{2+} vers la cellule. Cependant, ce mutant ne présente pas les mêmes phénotypes que les mutants connus de la voie de la calcineurine chez *C. albicans*. Il serait intéressant d'approfondir le rôle de Mid1p chez *C. albicans* en réponse à la caspofungine. Son implication dans la voie de la calcineurine pourrait, par exemple, être analysée en comparant l'expression des gènes de la voie de calcineurine, par PCR quantitative en temps réel, dans une souche sauvage par rapport à celle du mutant *mid1-/-*.

Le crible des mutants GpiP pour une plus grande sensibilité à la phagocytose

Notre crible n'a pas permis l'identification de GpiP impliquées spécifiquement dans le dialogue de *C. albicans* avec les macrophages. Mais cela ne signifie pas qu'aucune de ces protéines ne joue un rôle dans les interactions de ce pathogène avec l'hôte.

Dans notre étude, nous avons regardé un aspect du rôle des GpiP dans les interactions hôte / pathogène sur un type cellulaire : la phagocytose par les macrophages. Bien que les conditions du crible soient critiquables, aucun des mutants testés ne présentait d'hypersensibilité prononcée à la phagocytose par les macrophages. Comme décrit précédemment (cf. Revue), l'expression des 104 gènes codant des GpiP et l'incorporation de certaines de ces protéines à la paroi sont peu connues. Toutefois, il semblerait que ces deux étapes soient hautement régulées par les conditions de culture. Seulement 12 GpiP pariétales ont été identifiées alors que 50 % des GpiP sont prédites comme pouvant être liées à la paroi. Il serait donc pertinent de cribler les mutants GpiP pour plusieurs étapes de l'infection de l'hôte par le pathogène. Il existe plusieurs modèles de tissus cellulaires reconstitués sur lesquels la capacité de mutants de *C. albicans* à envahir un tissu peut être testée (Rouabhia *et al.*, 2005). Le RHE, un épithélium buccal humain reconstitué (seul test pour lequel *pga29*-/- montre un phénotype) permettrait de cribler les mutants atteints dans leur capacité d'adhésion, de pénétration au tissu ou de destruction de celui-ci. Le modèle EHOM (engineered human the oral mucosa) est, quant à lui, composé de cellules épithéliales et de fibroblastes. L'équipe de Hube au Robert Koch-Institut (Berlin) a également réalisé des essais d'invasion de *C. albicans* sur un modèle *ex vivo* de foie de porc perfusé. La membrane chorioallantoique d'embryons de poulet a été utilisée pour tester la capacité de mutants de *C. albicans* à envahir (Gow *et al.*, 2003). Toutefois, le test réunissant le maximum de paramètres reste le crible des mutants pour une plus grande survie *in vivo* dans un modèle murin de candidose disséminée ou pour une plus grande capacité des mutants à envahir les organes cibles de ce pathogène.

La réponse innée induite par C. albicans en l'absence de Gpi7p

La seconde partie de ce travail nous a permis d'avancer dans l'étude des mécanismes de reconnaissance et de résistance de *gpi7*-/- par l'hôte. Cette étude suggère qu'en l'absence de Gpi7p, plutôt que la mauvaise localisation des protéines pariétales, des effets indirects de celle-ci (désorganisation de la paroi qui permet une plus grande présentation des β glucanes) seraient responsables de l'induction de la très forte réponse inflammatoire élicitée par *C. albicans*.

En effet, nos expériences montrent très clairement que le mutant *gpi7*-/- induit une très forte réponse inflammatoire de la part de l'hôte, ce qui expliquerait la survie des souris infectées par *gpi7*-/- dans un modèle de candidose disséminée. En effet, ce dernier est mieux reconnu que la souche de référence par les macrophages péritonéaux, ce qui se traduit par une plus

grande production de TNFα (au minimum 2,7 fois supérieure à celle induite par SC5314). Ces cytokines pro-inflammatoires participent en aval au recrutement de neutrophiles au site de l'infection (1,7 fois supérieure au recrutement élicité par SC5314). Bien que le mutant *gpi7*-/- ne soit pas plus sensible à la phagocytose de ces cellules phagocytaires, le nombre important de neutrophiles présents permettrait avec l'action des macrophages péritonéaux de maîtriser très rapidement l'infection due à *gpi7*-/-.

Pourquoi *gpi7*-/- est-il mieux reconnu par l'hôte ? Le défaut de localisation de certaines protéines pariétales observé dans le mutant *gpi7*-/- est-il impliqué dans ce phénomène ? Classiquement, les récepteurs TLR2 et TLR4 sont désignés comme les principaux récepteurs de signalisation induisant la production de TNFα. Cependant, nos résultats montrent que ces deux PRR ne participent pas à la reconnaissance de *gpi7*-/-. D'autres PRR, habituellement impliqués dans l'endocytose et la phagocytose, sont à présent décrits comme PRR de signalisation (cf. Introduction III.2.1 et III.2.2).

Le récepteur MR est impliqué dans la reconnaissance de *C. albicans* mais ne semble pas jouer un rôle majeur dans la reconnaissance de *gpi7*-/-, ceci pour deux raisons. Premièrement, en l'absence de Gpi7p, la composition de la paroi de *C. albicans* en mannose est diminuée de 30 % (Richard *et al.*, 2002). D'autre part, comme nous l'avons déjà souligné, les macrophages de la lignée J774 ne présentent pas de MR à leur surface et produisent pourtant, une fois élicités par *gpi7*-/-, une plus grande quantité de TNFα que lorsqu'ils sont stimulés par SC5314. Cette production est, certes, plus faible que pour les macrophages primaires mais cette différence est également observée avec SC5314.

La participation du TLR6 dans l'induction de la production de TNFα par des macrophages a été démontré en présence de zymosane (Ozinsky *et al.*, 2000). Cependant, cette activation est dépendante du TLR2, cette hypothèse semble donc, dans notre cas, peu vraisemblable.

La participation du récepteur Gal3 dans la reconnaissance de *gpi7*-/- peut également être considérée comme négligeable. Ce récepteur endo-phagocytaire est également capable d'induire, en réponse aux β1-2 mannosidese présents à la surface *C. albicans,* la production de cytokines mais d'une manière TLR2 dépendante (Jouault *et al.*, 2006).

Contrairement à Gal3, le récepteur Dectine-1 a été récemment décrit comme un PRR de signalisation, fonctionnant indépendamment du récepteur TLR2, en réponse aux β glucanes

de *C. albicans* (cf. Introduction III.2.2). L'épaisse et dense couche de mannoprotéines masque habituellement les β glucanes qui ne sont accessibles aux cellules hôtes seulement au niveau des sites de division cellulaire. Cependant, dans la partie Résultats (III.2.1), nous avons vu qu'un traitement par la chaleur modifiait l'architecture de la paroi des levures et exposait artificiellement les β glucanes à la Dectine ; ce qui expliquerait la différence de production de TNFα observée entre les expériences utilisant différents traitements. Wheeler et Fink ont également démontré qu'une paroi désorganisée surexposait à sa surface des β glucanes (Wheeler and Fink, 2006). En effet, chez *S. cerevisiae*, la plupart des mutants identifiés à l'issue d'un crible pour une plus grande exposition de β glucanes, étaient interrompus dans des gènes impliqués dans le remodelage de la paroi (*GAS1*) ou dans les voies de glycosylation des mannoprotéines (*OCH1*, *MNN10*). Dans la grande majorité des cas, ces mutants induisent une très forte production de TNFα via le récepteur Dectine 1 (Wheeler and Fink, 2006). Dans la même étude, des expériences réalisées avec le mutant *phr2*-/- élargissent ces observations à *C. albicans*. Ces résultats nous laissent penser que le récepteur Dectine 1 pourrait être à l'origine de la plus forte production de TNFα élicités par *gpi7*-/-. En effet, des expériences antérieures ont démontré qu'en l'absence de Gpi7p, la paroi de *C. albicans* était plus sensible à de nombreuses drogues testant l'intégrité de la paroi.

Parmi les récepteurs identifiés comme induisant la production de cytokines en réponse à *C. albicans*, le Dectine 1 semble être le récepteur le plus probable impliqué dans la reconnaissance de *gpi7*-/-. Les PAMPs présents à la surface de SC5314 et reconnus par le TLR2 pourraient être modifiés ou absents de la surface *gpi7*-/- ; ce mutant serait alors majoritairement reconnu par le Dectine 1 impliquant un rôle mineur pour le TLR2. Cette hypothèse expliquerait le fait que les productions de TNFα et les pourcentages de recrutement obtenus sont similaires pour les trois types de macrophages et de souris (cf. Figure 45 et Figure 46). A l'heure actuelle, le seul ligand du TLR2 identifié est le PLM (Jouault *et al.*, 2003). Des expériences supplémentaires de production de TNFα utilisant des anticorps anti-β1-2 mannoses ou anti-glucane et de la laminarin, un agoniste du récepteur Dectine 1, nous permettraient de vérifier ces hypothèses.

BIBLIOGRAPHIE

Akira, S., Yamamoto, M., and Takeda, K. (2003) Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* **31**: 637-642.

Alberti-Segui, C., Morales, A.J., Xing, H., Kessler, M.M., Willins, D.A., Weinstock, K.G., Cottarel, G., Fechtel, K., and Rogers, B. (2004) Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast* **21**: 285-302.

Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J.R., Schaller, M., de Groot, P., Maccallum, D., Odds, F.C., Schafer, W., Klis, F., Monod, M., and Hube, B. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteases of Candida albicans Target Proteins Necessary for Both Cellular Processes and Host-Pathogen Interactions. *J Biol Chem* **281**: 688-694.

Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J.R., Schaller, M., de Groot, P., Maccallum, D., Odds, F.C., Schafer, W., Klis, F., Monod, M., and Hube, B. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of Candida albicans target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* **281**: 688-694.

Ashida, H., Hong, Y., Murakami, Y., Shishioh, N., Sugimoto, N., Kim, Y.U., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2005) Mammalian PIG-X and yeast Pbn1p are the essential components of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I. *Mol Biol Cell* **16**: 1439-1448.

Au-Young, J., and Robbins, P.W. (1990) Isolation of a chitin synthase gene (CHS1) from Candida albicans by expression in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Microbiol* **4**: 197-207.

Austyn, J.M. (1992) Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Semin Immunol* **4**: 227-236.

Bader, T., Bodendorfer, B., Schroppel, K., and Morschhauser, J. (2003) Calcineurin is essential for virulence in Candida albicans. *Infect Immun* **71**: 5344-5354.

Badrane, H., Cheng, S., Nguyen, M.H., Jia, H.Y., Zhang, Z., Weisner, N., and Clancy, C.J. (2005) Candida albicans IRS4 contributes to hyphal formation and virulence after the initial stages of disseminated candidiasis. *Microbiology* **151**: 2923-2931.

Bailey, D.A., Feldmann, P.J., Bovey, M., Gow, N.A., and Brown, A.J. (1996) The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J Bacteriol* **178**: 5353-5360.

Barelle, C.J., Priest, C.L., Maccallum, D.M., Gow, N.A., Odds, F.C., and Brown, A.J. (2006) Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* **8**: 961-971.

Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula, S.S., Vecchi, A., Mantovani, A., Levitz, S.M., and Romani, L. (2004) The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* **172**: 3059-3069.

Benghezal, M., Lipke, P.N., and Conzelmann, A. (1995) Identification of six complementation classes involved in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol* **130**: 1333-1344.

Benghezal, M., Benachour, A., Rusconi, S., Aebi, M., and Conzelmann, A. (1996) Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *Embo J* **15**: 6575-6583.

Bennett, R.J., Uhl, M.A., Miller, M.G., and Johnson, A.D. (2003) Identification and characterization of a Candida albicans mating pheromone. *Mol Cell Biol* **23**: 8189-8201.

Bennett, R.J., and Johnson, A.D. (2005) Mating in Candida albicans and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* **59**: 233-255.

Bensen, E.S., Martin, S.J., Li, M., Berman, J., and Davis, D.A. (2004) Transcriptional profiling in Candida albicans reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol* **54**: 1335-1351.

Berman, J., and Sudbery, P.E. (2002) Candida Albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* **3**: 918-930.

Bertram, G., Swoboda, R.K., Gooday, G.W., Gow, N.A., and Brown, A.J. (1996) Structure and regulation of the Candida albicans ADH1 gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast* **12**: 115-127.

Blankenship, J.R., Wormley, F.L., Boyce, M.K., Schell, W.A., Filler, S.G., Perfect, J.R., and Heitman, J. (2003) Calcineurin is essential for Candida albicans survival in serum and virulence. *Eukaryot Cell* **2**: 422-430.

Blankenship, J.R., and Heitman, J. (2005) Calcineurin Is Required for Candida albicans To Survive Calcium Stress in Serum. *Infect Immun* **73**: 5767-5774.

Blasi, E., Pitzurra, L., Chimienti, A.R., Mazzolla, R., Puliti, M., Barluzzi, R., and Bistoni, F. (1995) Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of Candida albicans to proteolytic activity of macrophages. *Infect Immun* **63**: 1253-1257.

Boone, C., Sdicu, A., Laroche, M., and Bussey, H. (1991) Isolation from Candida albicans of a functional homolog of the Saccharomyces cerevisiae KRE1 gene, which is involved in cell wall beta-glucan synthesis. *J Bacteriol* **173**: 6859-6864.

Borg-von Zepelin, M., Beggah, S., Boggian, K., Sanglard, D., and Monod, M. (1998) The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from Candida albicans in murine macrophages. *Mol Microbiol* **28**: 543-554.

Borner, G.H., Sherrier, D.J., Stevens, T.J., Arkin, I.T., and Dupree, P. (2002) Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis. *Plant Physiol* **129**: 486-499.

Bosson, R., Jaquenoud, M., and Conzelmann, A. (2006) GUP1 of Saccharomyces cerevisiae encodes an O-acyltransferase involved in remodeling of the GPI anchor. *Mol Biol Cell* **17**: 2636-2645.

Bougnoux, M.E., Tavanti, A., Bouchier, C., Gow, N.A., Magnier, A., Davidson, A.D., Maiden, M.C., D'Enfert, C., and Odds, F.C. (2003) Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of Candida albicans. *J Clin Microbiol* **41**: 5265-5266.

Boutin, J.A. (1997) Myristoylation. *Cell Signal* **9**: 15-35.

Bowman, S.M., Piwowar, A., Al Dabbous, M., Vierula, J., and Free, S.J. (2006) Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in Neurospora crassa. *Eukaryot Cell* **5**: 587-600.

Bozza, S., Fallarino, F., Pitzurra, L., Zelante, T., Montagnoli, C., Bellocchio, S., Mosci, P., Vacca, C., Puccetti, P., and Romani, L. (2005) A crucial role for tryptophan catabolism at the host/Candida albicans interface. *J Immunol* **174**: 2910-2918.

Braun, B.R., Head, W.S., Wang, M.X., and Johnson, A.D. (2000) Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**: 31-44.

Braun, B.R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., Inglis, D.O., Uhl, M.A., Hogues, H., Berriman, M., Lorenz, M., Levitin, A., Oberholzer, U., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Iouk, T., Zito, R., Frangeul, L., Tekaia, F., Rutherford, K., Wang, E., Munro, C.A., Bates, S., Gow, N.A., Hoyer, L.L., Kohler, G., Morschhauser, J., Newport, G., Znaidi, S., Raymond, M., Turcotte, B., Sherlock, G., Costanzo, M., Ihmels, J., Berman, J., Sanglard, D., Agabian, N., Mitchell, A.P., Johnson, A.D., Whiteway, M., and Nantel, A. (2005) A human-curated annotation of the Candida albicans genome. *PLoS Genet* **1**: 36-57.

Brown, G.D., and Gordon, S. (2001) Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**: 36-37.

Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., and Gordon, S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**: 1119-1124.

Brown, J.L., Kossaczka, Z., Jiang, B., and Bussey, H. (1993) A mutational analysis of killer toxin resistance in Saccharomyces cerevisiae identifies new genes involved in cell wall (1-->6)-beta-glucan synthesis. *Genetics* **133**: 837-849.

Bruno, V.M., and Mitchell, A.P. (2005) Regulation of azole drug susceptibility by Candida albicans protein kinase CK2. *Mol Microbiol* **56**: 559-573.

Bruno, V.M., Kalachikov, S., Subaran, R., Nobile, C.J., Kyratsous, C., and Mitchell, A.P. (2006) Control of the C. albicans cell wall damage response by transcriptional regulator Cas5. *PLoS Pathog* **2**: e21.

Bulawa, C.E., Miller, D.W., Henry, L.K., and Becker, J.M. (1995) Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of Candida albicans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10570-10574.

Burt, E.T., Daly, R., Hoganson, D., Tsirulnikov, Y., Essmann, M., and Larsen, B. (2003) Isolation and partial characterization of Hsp90 from Candida albicans. *Ann Clin Lab Sci* **33**: 86-93.

Calderone, R.A. (1993) Molecular interactions at the interface of Candida albicans and host cells. *Arch Med Res* **24**: 275-279.

Calderone, R.A., and Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of Candida albicans. *Trends Microbiol* **9**: 327-335.

Calderone, R.A. (2002) *Candida and Candidiasis*.

Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J.M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003) The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for Candida albicans on dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**: 532-538.

Cantelli, C., Trinel, P.A., Bernigaud, A., Jouault, T., Polonelli, L., and Poulain, D. (1995) Mapping of beta-1,2-linked oligomannosidic epitopes among glycoconjugates of Candida species. *Microbiology* **141 (Pt 10)**: 2693-2697.

Care, R.S., Trevethick, J., Binley, K.M., and Sudbery, P.E. (1999) The MET3 promoter: a new tool for Candida albicans molecular genetics. *Mol Microbiol* **34**: 792-798.

Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1997) In silicio identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **13**: 1477-1489.

Casadevall, A., and Pirofski, L.A. (2003) Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism. *Trends Microbiol* **11**: 157-158; author reply 158-159.

Chen-Wu, J.L., Zwicker, J., Bowen, A.R., and Robbins, P.W. (1992) Expression of chitin synthase genes during yeast and hyphal growth phases of Candida albicans. *Mol Microbiol* **6**: 497-502.

Chiang, L.Y., Sheppard, D.C., Bruno, V.M., Mitchell, A.P., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G. (2006) Candida albicans protein kinase CK2 governs virulence during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol*.

Chiani, P., Bromuro, C., and Torosantucci, A. (2000) Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of Candida albicans. *Infect Immun* **68**: 5628-5634.

Cohen, M.S. (1994) Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. *Clin Infect Dis* **18 Suppl 2**: S170-179.

Colussi, P.A., and Orlean, P. (1997) The essential Schizosaccharomyces pombe gpil+ gene complements a bakers' yeast GPI anchoring mutant and is required for efficient cell separation. *Yeast* **13**: 139-150.

Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A., Falkow, S., and Brown, A.J. (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP)a reporter of gene expression in Candida albicans. *Microbiology* **143 (Pt 2)**: 303-311.

Cumberbatch, M., and Kimber, I. (1992) Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology* **75**: 257-263.

Cutler, J.E. (2001) N-glycosylation of yeast, with emphasis on Candida albicans. *Med Mycol* **39 Suppl 1**: 75-86.

d'Ostiani, C.F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Romani, L. (2000) Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus Candida albicans. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* **191**: 1661-1674.

Davis, D., Wilson, R.B., and Mitchell, A.P. (2000) RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in Candida albicans. *Mol Cell Biol* **20**: 971-978.

Davis, D.A., Bruno, V.M., Loza, L., Filler, S.G., and Mitchell, A.P. (2002) *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* **162**: 1573-1581.

De Backer, M.D., Nelissen, B., Logghe, M., Viaene, J., Loonen, I., Vandoninck, S., de Hoogt, R., Dewaele, S., Simons, F.A., Verhasselt, P., Vanhoof, G., Contreras, R., and Luyten,

W.H. (2001) An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of Candida albicans. *Nat Biotechnol* **19**: 235-241.

De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M. (2003) Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**: 781-796.

de Groot, P.W., de Boer, A.D., Cunningham, J., Dekker, H.L., de Jong, L., Hellingwerf, K.J., de Koster, C., and Klis, F.M. (2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* **3**: 955-965.

Delbruck, S., and Ernst, J.F. (1993) Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogenic yeast Candida albicans. *Mol Microbiol* **10**: 859-866.

Delves, P.J., and Roitt, I.M. (2000) The immune system. *N Engl J Med* **343**: 37-49.

Dietz, A.B., Bulur, P.A., Knutson, G.J., Matasic, R., and Vuk-Pavlovic, S. (2000) Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 731-738.

Dobozy, A., Szolnoky, G., Gyulai, R., Kenderessy, A.S., Marodi, L., and Kemeny, L. (1996) Mannose receptors are implicated in the Candida albicans killing activity of epidermal cells. *Acta Microbiol Immunol Hung* **43**: 93-95.

Dohlman, H.G. (2002) G proteins and pheromone signaling. *Annu Rev Physiol* **64**: 129-152.

Drickamer, K. (1999) C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 585-590.

Dromer, F., Chevalier, R., Sendid, B., Improvisi, L., Jouault, T., Robert, R., Mallet, J.M., and Poulain, D. (2002) Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast Candida albicans. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3869-3876.

Dubourdeau, M., Athman, R., Balloy, V., Huerre, M., Chignard, M., Philpott, D.J., Latge, J.P., and Ibrahim-Granet, O. (2006) Aspergillus fumigatus induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J Immunol* **177**: 3994-4001.

Dunne, A., and O'Neill, L.A. (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* **2003**: re3.

Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N., and Wenzel, R.P. (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* **29**: 239-244.

Eggimann, P., Garbino, J., and Pittet, D. (2003) Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* **3**: 685-702.

Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M., and Eisenhaber, F. (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans, Candida albicans, Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **337**: 243-253.

Enjalbert, B., Nantel, A., and Whiteway, M. (2003) Stress-induced gene expression in Candida albicans: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell* **14**: 1460-1467.

Enjalbert, B., Smith, D.A., Cornell, M.J., Alam, I., Nicholls, S., Brown, A.J., and Quinn, J. (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen Candida albicans. *Mol Biol Cell* **17**: 1018-1032.

Enloe, B., Diamond, A., and Mitchell, A.P. (2000) A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J Bacteriol* **182**: 5730-5736.

Ernst, J.F., and Prill, S.K. (2001) O-glycosylation. *Med Mycol* **39 Suppl 1**: 67-74.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L., and Puccetti, P. (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**: 1206-1212.

Fang, F.C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**: 820-832.

Fearon, D.T., and Locksley, R.M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**: 50-53.

Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., Sanglard, D., Korting, H.C., Schafer, W., and Hube, B. (2002) Candida albicans hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* **70**: 3689-3700.

Fiani, M.L., Beitz, J., Turvy, D., Blum, J.S., and Stahl, P.D. (1998) Regulation of mannose receptor synthesis and turnover in mouse J774 macrophages. *J Leukoc Biol* **64**: 85-91.

Filler, S.G., Pfunder, A.S., Spellberg, B.J., Spellberg, J.P., and Edwards, J.E., Jr. (1996) Candida albicans stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun* **64**: 2609-2617.

Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., McMurray, D., Smith, D.E., Sims, J.E., Bird, T.A., and O'Neill, L.A. (2001) Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**: 78-83.

Fonzi, W.A., and Irwin, M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in Candida albicans. *Genetics* **134**: 717-728.

Fonzi, W.A. (1999) PHR1 and PHR2 of Candida albicans encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol* **181**: 7070-7079.

Fradin, C., Jouault, T., Mallet, A., Mallet, J.M., Camus, D., Sinay, P., and Poulain, D. (1996) Beta-1,2-linked oligomannosides inhibit Candida albicans binding to murine macrophage. *J Leukoc Biol* **60**: 81-87.

Fradin, C., Poulain, D., and Jouault, T. (2000) beta-1,2-linked oligomannosides from Candida albicans bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* **68**: 4391-4398.

Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C., and Hube, B. (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of Candida albicans in human blood. *Mol Microbiol* **56**: 397-415.

Fraering, P., Imhof, I., Meyer, U., Strub, J.M., van Dorsselaer, A., Vionnet, C., and Conzelmann, A. (2001) The GPI transamidase complex of Saccharomyces cerevisiae contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol Biol Cell* **12**: 3295-3306.

Frieman, M.B., and Cormack, B.P. (2003) The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol Microbiol* **50**: 883-896.

Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Chen, Y.C., French, S.W., Cutler, J.E., Filler, S.G., and Edwards, J.E., Jr. (2002) Candida albicans Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* **44**: 61-72.

Fujita, M., Yoko-o, T., Okamoto, M., and Jigami, Y. (2004) GPI7 involved in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is essential for yeast cell separation. *J Biol Chem* **279**: 51869-51879.

Fujita, M., Yoko, O.T., and Jigami, Y. (2006) Inositol deacylation by Bst1p is required for the quality control of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Biol Cell* **17**: 834-850.

Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**: 1107-1117.

Gantner, B.N., Simmons, R.M., and Underhill, D.M. (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of Candida albicans yeast but not filaments. *Embo J* **24**: 1277-1286.

Garcera, A., Martinez, A.I., Castillo, L., Elorza, M.V., Sentandreu, R., and Valentin, E. (2003) Identification and study of a Candida albicans protein homologous to Saccharomyces cerevisiae Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology* **149**: 2137-2145.

Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M., and d'Enfert, C. (2004) Candida albicans biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* **3**: 536-545.

Gaur, N.K., Smith, R.L., and Klotz, S.A. (2002) Candida albicans and Saccharomyces cerevisiae expressing ALA1/ALS5 adhere to accessible threonine, serine, or alanine patches. *Cell Commun Adhes* **9**: 45-57.

Gaur, N.K., and Klotz, S.A. (2004) Accessibility of the peptide backbone of protein ligands is a key specificity determinant in Candida albicans SRS adherence. *Microbiology* **150**: 277-284.

Gaynor, E.C., Mondesert, G., Grimme, S.J., Reed, S.I., Orlean, P., and Emr, S.D. (1999) MCD4 encodes a conserved endoplasmic reticulum membrane protein essential for glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in yeast. *Mol Biol Cell* **10**: 627-648.

Geber, A., Williamson, P.R., Rex, J.H., Sweeney, E.C., and Bennett, J.E. (1992) Cloning and characterization of a Candida albicans maltase gene involved in sucrose utilization. *J Bacteriol* **174**: 6992-6996.

Gillum, A.M., Tsay, E.Y., and Kirsch, D.R. (1984) Isolation of the Candida albicans gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of S. cerevisiae ura3 and E. coli pyrF mutations. *Mol Gen Genet* **198**: 179-182.

Goldman, R.C., Sullivan, P.A., Zakula, D., and Capobianco, J.O. (1995) Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the BGL2 gene. *Eur J Biochem* **227**: 372-378.

Gonzalez, M.M., Diez-Orejas, R., Molero, G., Alvarez, A.M., Pla, J., Nombela, C., and Sanchez-Perez, M. (1997) Phenotypic characterization of a Candida albicans strain deficient in its major exoglucanase. *Microbiology* **143 (Pt 9)**: 3023-3032.

Gow, N.A., Robbins, P.W., Lester, J.W., Brown, A.J., Fonzi, W.A., Chapman, T., and Kinsman, O.S. (1994) A hyphal-specific chitin synthase gene (CHS2) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of Candida albicans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6216-6220.

Gow, N.A., Brown, A.J., and Odds, F.C. (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* **5**: 366-371.

Gow, N.A., Knox, Y., Munro, C.A., and Thompson, W.D. (2003) Infection of chick chorioallantoic membrane (CAM) as a model for invasive hyphal growth and pathogenesis of Candida albicans. *Med Mycol* **41**: 331-338.

Green, C.B., Cheng, G., Chandra, J., Mukherjee, P., Ghannoum, M.A., and Hoyer, L.L. (2004) RT-PCR detection of Candida albicans ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology* **150**: 267-275.

Grimme, S.J., Westfall, B.A., Wiedman, J.M., Taron, C.H., and Orlean, P. (2001) The essential Smp3 protein is required for addition of the side-branching fourth mannose during assembly of yeast glycosylphosphatidylinositols. *J Biol Chem* **276**: 27731-27739.

Grimme, S.J., Colussi, P.A., Taron, C.H., and Orlean, P. (2004) Deficiencies in the essential Smp3 mannosyltransferase block glycosylphosphatidylinositol assembly and lead to defects in growth and cell wall biogenesis in Candida albicans. *Microbiology* **150**: 3115-3128.

Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Forster, I., and Ruland, J. (2006) Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**: 651-656.

Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Vande Berg, J., Hu, J., Messer, S., Herwaldt, L., Pfaller, M., and Diekema, D. (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* **37**: 1172-1177.

Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N., and Kitada, K. (1999) Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J Bacteriol* **181**: 3886-3889.

Hamburger, D., Egerton, M., and Riezman, H. (1995) Yeast Gaa1p is required for attachment of a completed GPI anchor onto proteins. *J Cell Biol* **129**: 629-639.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.

Herrero, A.B., Magnelli, P., Mansour, M.K., Levitz, S.M., Bussey, H., and Abeijon, C. (2004) KRE5 gene null mutant strains of Candida albicans are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties. *Eukaryot Cell* **3**: 1423-1432.

Hobson, R.P., Munro, C.A., Bates, S., MacCallum, D.M., Cutler, J.E., Heinsbroek, S.E., Brown, G.D., Odds, F.C., and Gow, N.A. (2004) Loss of cell wall mannosylphosphate in Candida albicans does not influence macrophage recognition. *J Biol Chem* **279**: 39628-39635.

Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M. (2002) Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* **3**: 121-126.

Hong, Y., Maeda, Y., Watanabe, R., Ohishi, K., Mishkind, M., Riezman, H., and Kinoshita, T. (1999) Pig-n, a mammalian homologue of yeast Mcd4p, is involved in transferring phosphoethanolamine to the first mannose of the glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* **274**: 35099-35106.

Hong, Y., Ohishi, K., Kang, J.Y., Tanaka, S., Inoue, N., Nishimura, J., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2003) Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. *Mol Biol Cell* **14**: 1780-1789.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**: 3749-3752.

Hoyer, L.L. (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 176-180.

Huang, G., Wang, H., Chou, S., Nie, X., Chen, J., and Liu, H. (2006) Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in Candida albicans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12813-12818.

Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691.

Hull, C.M., and Johnson, A.D. (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast Candida albicans. *Science* **285**: 1271-1275.

Hull, C.M., Raisner, R.M., and Johnson, A.D. (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast Candida albicans in a mammalian host. *Science* **289**: 307-310.

Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P.A., Poulain, D., and Jouault, T. (2003) Role of phospholipomannan in Candida albicans escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 573-576.

Ibrahim, A.S., Spellberg, B.J., Avenissian, V., Fu, Y., Filler, S.G., and Edwards, J.E., Jr. (2005) Vaccination with recombinant N-terminal domain of Als1p improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. *Infect Immun* **73**: 999-1005.

Ilgoutz, S.C., Zawadzki, J.L., Ralton, J.E., and McConville, M.J. (1999) Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of Leishmania mexicana. *Embo J* **18**: 2746-2755.

Imhof, I., Flury, I., Vionnet, C., Roubaty, C., Egger, D., and Conzelmann, A. (2004) Glycosylphosphatidylinositol (GPI) proteins of Saccharomyces cerevisiae contain ethanolamine phosphate groups on the alpha1,4-linked mannose of the GPI anchor. *J Biol Chem* **279**: 19614-19627.

Insenser, M., Nombela, C., Molero, G., and Gil, C. (2006) Proteomic analysis of detergent-resistant membranes from Candida albicans. *Proteomics* **6 Suppl 1**: S74-81.

James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G.H., Johnson, D.,

O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schussler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lucking, R., Budel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W., and Vilgalys, R. (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822.

Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N., Magee, P.T., Davis, R.W., and Scherer, S. (2004) The diploid genome sequence of Candida albicans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7329-7334.

Jouault, T., Fradin, C., Trinel, P.A., Bernigaud, A., and Poulain, D. (1998) Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. *J Infect Dis* **178**: 792-802.

Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P.A., Sacchetti, P., Lefebvre, P., Akira, S., and Poulain, D. (2003) Candida albicans phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis* **188**: 165-172.

Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martinez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P.A., Chamaillard, M., Trottein, F., and Poulain, D. (2006) Specific Recognition of Candida albicans by Macrophages Requires Galectin-3 to Discriminate Saccharomyces cerevisiae and Needs Association with TLR2 for Signaling. *J Immunol* **177**: 4679-4687.

Kaiser, C., Michaelis, S., and Mitchell, A. (1994) (1994) Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics.

Kamai, Y., Kubota, M., Hosokawa, T., Fukuoka, T., and Filler, S.G. (2002) Contribution of Candida albicans ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* **70**: 5256-5258.

Kandasamy, R., Vediyappan, G., and Chaffin, W.L. (2000) Evidence for the presence of pir-like proteins in Candida albicans. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 239-243.

Kang, J.Y., Hong, Y., Ashida, H., Shishioh, N., Murakami, Y., Morita, Y.S., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2005) PIG-V involved in transferring the second mannose in glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* **280**: 9489-9497.

Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H., and Klis, F.M. (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 373-383.

Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Muller, W.H., Andel, A., Verkleij, A.J., Makarow, M., Van Den Ende, H., and Klis, F.M. (2000) The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**: 601-611.

Kawagoe, K., Kitamura, D., Okabe, M., Taniuchi, I., Ikawa, M., Watanabe, T., Kinoshita, T., and Takeda, J. (1996) Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **87**: 3600-3606.

Kawakami, K., Kinjo, Y., Yara, S., Koguchi, Y., Uezu, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Saito, A. (2001) Activation of Valpha14(+) natural killer T cells by alpha-galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with Cryptococcus neoformans. *Infect Immun* **69**: 213-220.

Kim, K., Mayer, E.P., and Nachtigal, M. (2003) Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1641**: 13-23.

Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., Park, E.J., and Kiyono, H. (2002) Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J Immunol* **169**: 6187-6192.

Kitagaki, H., Wu, H., Shimoi, H., and Ito, K. (2002) Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Microbiol* **46**: 1011-1022.

Klis, F.M., de Groot, P., and Hellingwerf, K. (2001) Molecular organization of the cell wall of Candida albicans. *Med Mycol* **39 Suppl 1**: 1-8.

Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 239-256.

Klotz, S.A., Gaur, N.K., Lake, D.F., Chan, V., Rauceo, J., and Lipke, P.N. (2004) Degenerate peptide recognition by Candida albicans adhesins Als5p and Als1p. *Infect Immun* **72**: 2029-2034.

Kohatsu, L., Hsu, D.K., Jegalian, A.G., Liu, F.T., and Baum, L.G. (2006) Galectin-3 Induces Death of Candida Species Expressing Specific beta-1,2-Linked Mannans. *J Immunol* **177**: 4718-4726.

Kondoh, O., Tachibana, Y., Ohya, Y., Arisawa, M., and Watanabe, T. (1997) Cloning of the RHO1 gene from Candida albicans and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* **179**: 7734-7741.

Kostova, Z., Rancour, D.M., Menon, A.K., and Orlean, P. (2000) Photoaffinity labelling with P3-(4-azidoanilido)uridine 5'-triphosphate identifies gpi3p as the UDP-GlcNAc-binding subunit of the enzyme that catalyses formation of GlcNAc-phosphatidylinositol, the first glycolipid intermediate in glycosylphosphatidylinositol synthesis. *Biochem J* **350 Pt 3**: 815-822.

Kozel, T.R. (1998) Complement activation by pathogenic fungi. *Res Immunol* **149**: 309-320; discussion 514-305.

Kumamoto, C.A., and Vinces, M.D. (2005) Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to Candida albicans virulence. *Cell Microbiol* **7**: 1546-1554.

Kvaal, C., Lachke, S.A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., and Soll, D.R. (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of Candida albicans confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* **67**: 6652-6662.

Kvaal, C.A., Srikantha, T., and Soll, D.R. (1997) Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of Candida albicans affects switching and virulence. *Infect Immun* **65**: 4468-4475.

Lachke, S.A., Lockhart, S.R., Daniels, K.J., and Soll, D.R. (2003) Skin facilitates Candida albicans mating. *Infect Immun* **71**: 4970-4976.

Lamarre, C., Deslauriers, N., and Bourbonnais, Y. (2000) Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Mol Microbiol* **35**: 444-453.

Lan, C.Y., Newport, G., Murillo, L.A., Jones, T., Scherer, S., Davis, R.W., and Agabian, N. (2002) Metabolic specialization associated with phenotypic switching in Candidaalbicans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14907-14912.

Laprade, L., Boyartchuk, V.L., Dietrich, W.F., and Winston, F. (2002) Spt3 plays opposite roles in filamentous growth in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans and is required for C. albicans virulence. *Genetics* **161**: 509-519.

Lee, S.J., Zheng, N.Y., Clavijo, M., and Nussenzweig, M.C. (2003) Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect Immun* **71**: 437-445.

Leidich, S.D., Drapp, D.A., and Orlean, P. (1994) A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem* **269**: 10193-10196.

Leidich, S.D., Kostova, Z., Latek, R.R., Costello, L.C., Drapp, D.A., Gray, W., Fassler, J.S., and Orlean, P. (1995) Temperature-sensitive yeast GPI anchoring mutants gpi2 and gpi3 are defective in the synthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol. Cloning of the GPI2 gene. *J Biol Chem* **270**: 13029-13035.

Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y., and Ghannoum, M.A. (1998) Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of Candida albicans. *J Biol Chem* **273**: 26078-26086.

Lesage, G., Sdicu, A.M., Menard, P., Shapiro, J., Hussein, S., and Bussey, H. (2004) Analysis of beta-1,3-glucan assembly in Saccharomyces cerevisiae using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics* **167**: 35-49.

Letterio, J.J., Lehrnbecher, T., Pollack, G., Walsh, T.J., and Chanock, S.J. (2001) Invasive candidiasis stimulates hepatocyte and monocyte production of active transforming growth factor beta. *Infect Immun* **69**: 5115-5120.

Leuker, C.E., Sonneborn, A., Delbruck, S., and Ernst, J.F. (1997) Sequence and promoter regulation of the PCK1 gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen Candida albicans. *Gene* **192**: 235-240.

Li, R.K., and Cutler, J.E. (1993) Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on Candida albicans. *J Biol Chem* **268**: 18293-18299.

Liu, T.T., Lee, R.E., Barker, K.S., Lee, R.E., Wei, L., Homayouni, R., and Rogers, P.D. (2005) Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in Candida albicans. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2226-2236.

Lockhart, S.R., Daniels, K.J., Zhao, R., Wessels, D., and Soll, D.R. (2003) Cell biology of mating in Candida albicans. *Eukaryot Cell* **2**: 49-61.

Lockhart, S.R., Wu, W., Radke, J.B., Zhao, R., and Soll, D.R. (2005) Increased virulence and competitive advantage of a/alpha over a/a or alpha/alpha offspring conserves the mating system of Candida albicans. *Genetics* **169**: 1883-1890.

Lorenz, M.C., and Fink, G.R. (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**: 83-86.

Lorenz, M.C., Bender, J.A., and Fink, G.R. (2004) Transcriptional response of Candida albicans upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* **3**: 1076-1087.

Lotz, H., Sohn, K., Brunner, H., Muhlschlegel, F.A., and Rupp, S. (2004) RBR1, a novel pH-regulated cell wall gene of Candida albicans, is repressed by RIM101 and activated by NRG1. *Eukaryot Cell* **3**: 776-784.

Luongo, M., Porta, A., and Maresca, B. (2005) Homology, disruption and phenotypic analysis of CaGS Candida albicans gene induced during macrophage infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*.

Maeda, Y., Watanabe, R., Harris, C.L., Hong, Y., Ohishi, K., Kinoshita, K., and Kinoshita, T. (2001) PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the lumenal side of the ER. *Embo J* **20**: 250-261.

Magee, B.B., and Magee, P.T. (2000) Induction of mating in Candida albicans by construction of MTLa and MTLalpha strains. *Science* **289**: 310-313.

Malani, P.N., Bradley, S.F., Little, R.S., and Kauffman, C.A. (2001) Trends in species causing fungaemia in a tertiary care medical centre over 12 years. *Mycoses* **44**: 446-449.

Marodi, L., Forehand, J.R., and Johnston, R.B., Jr. (1991) Mechanisms of host defense against Candida species. II. Biochemical basis for the killing of Candida by mononuclear phagocytes. *J Immunol* **146**: 2790-2794.

Marodi, L., Schreiber, S., Anderson, D.C., MacDermott, R.P., Korchak, H.M., and Johnston, R.B., Jr. (1993) Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest* **91**: 2596-2601.

Martchenko, M., Alarco, A.M., Harcus, D., and Whiteway, M. (2004) Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* **15**: 456-467.

Martinez, A.I., Castillo, L., Garcera, A., Elorza, M.V., Valentin, E., and Sentandreu, R. (2004) Role of Pir1 in the construction of the Candida albicans cell wall. *Microbiology* **150**: 3151-3161.

Mastrangelo, P., and Westaway, D. (2001) Biology of the prion gene complex. *Biochem Cell Biol* **79**: 613-628.

Masuoka, J., and Hazen, K.C. (2004) Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in Candida albicans serotype A and B strains. *Infect Immun* **72**: 6230-6236.

Mayor, S., and Riezman, H. (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 110-120.

McCann, F., Carmona, E., Puri, V., Pagano, R.E., and Limper, A.H. (2005) Macrophage internalization of fungal beta-glucans is not necessary for initiation of related inflammatory responses. *Infect Immun* **73**: 6340-6349.

McGreal, E.P., Rosas, M., Brown, G.D., Zamze, S., Wong, S.Y., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., and Taylor, P.R. (2006) The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* **16**: 422-430.

McGuirk, P., and Mills, K.H. (2002) Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* **23**: 450-455.

Mencacci, A., Cenci, E., Bistoni, F., Bacci, A., Del Sero, G., Montagnoli, C., Fe d'Ostiani, C., and Romani, L. (1998) Specific and non-specific immunity to Candida albicans: a lesson from genetically modified animals. *Res Immunol* **149**: 352-361; discussion 517-359.

Meyer-Lindenberg, A., Mervis, C.B., Sarpal, D., Koch, P., Steele, S., Kohn, P., Marenco, S., Morris, C.A., Das, S., Kippenhan, S., Mattay, V.S., Weinberger, D.R., and Berman, K.F. (2005) Functional, structural, and metabolic abnormalities of the hippocampal formation in Williams syndrome. *J Clin Invest* **115**: 1888-1895.

Miller, L.G., Hajjeh, R.A., and Edwards, J.E., Jr. (2001) Estimating the cost of nosocomial candidemia in the united states. *Clin Infect Dis* **32**: 1110.

Miller, M.G., and Johnson, A.D. (2002) White-opaque switching in Candida albicans is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293-302.

Mio, T., Yabe, T., Sudoh, M., Satoh, Y., Nakajima, T., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1996) Role of three chitin synthase genes in the growth of Candida albicans. *J Bacteriol* **178**: 2416-2419.

Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y., Tabuchi, H., Inoue, S.B., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Watanabe, T., and Yamada-Okabe, H. (1997) Cloning of the Candida albicans homolog of Saccharomyces cerevisiae GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* **179**: 4096-4105.

Mio, T., Yamada-Okabe, T., Yabe, T., Nakajima, T., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1997) Isolation of the Candida albicans homologs of Saccharomyces cerevisiae KRE6 and SKN1: expression and physiological function. *J Bacteriol* **179**: 2363-2372.

Montagnoli, C., Fallarino, F., Gaziano, R., Bozza, S., Bellocchio, S., Zelante, T., Kurup, W.P., Pitzurra, L., Puccetti, P., and Romani, L. (2006) Immunity and tolerance to Aspergillus involve functionally distinct regulatory T cells and tryptophan catabolism. *J Immunol* **176**: 1712-1723.

Morgan, J. (2005) Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Curr Infect Dis Rep* **7**: 429-439.

Morschhauser, J., Michel, S., and Hacker, J. (1998) Expression of a chromosomally integrated, single-copy GFP gene in Candida albicans, and its use as a reporter of gene regulation. *Mol Gen Genet* **257**: 412-420.

Morschhauser, J., Michel, S., and Staib, P. (1999) Sequential gene disruption in Candida albicans by FLP-mediated site-specific recombination. *Mol Microbiol* **32**: 547-556.

Mortimer, R.K., and Johnston, J.R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35-43.

Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M., and Tanner, W. (1997) Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **13**: 1145-1154.

Muhlschlegel, F.A., and Fonzi, W.A. (1997) PHR2 of Candida albicans encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol* **17**: 5960-5967.

Mullick, A., Elias, M., Harakidas, P., Marcil, A., Whiteway, M., Ge, B., Hudson, T.J., Caron, A.W., Bourget, L., Picard, S., Jovcevski, O., Massie, B., and Thomas, D.Y. (2004) Gene expression in HL60 granulocytoids and human polymorphonuclear leukocytes exposed to Candida albicans. *Infect Immun* **72**: 414-429.

Munro, C.A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J.M., Brown, A.J., Bulawa, C.E., and Gow, N.A. (2001) Chs1 of Candida albicans is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol* **39**: 1414-1426.

Munro, C.A., Whitton, R.K., Hughes, H.B., Rella, M., Selvaggini, S., and Gow, N.A. (2003) CHS8-a fourth chitin synthase gene of Candida albicans contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth. *Fungal Genet Biol* **40**: 146-158.

Munro, C.A., Bates, S., Buurman, E.T., Hughes, H.B., Maccallum, D.M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M.A., Bain, J.M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L.M., Brown, A.J., Odds, F.C., and Gow, N.A. (2005) Mnt1p and Mnt2p of Candida albicans are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem* **280**: 1051-1060.

Muzio, M., Ni, J., Feng, P., and Dixit, V.M. (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**: 1612-1615.

Nagamune, K., Nozaki, T., Maeda, Y., Ohishi, K., Fukuma, T., Hara, T., Schwarz, R.T., Sutterlin, C., Brun, R., Riezman, H., and Kinoshita, T. (2000) Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for Trypanosoma brucei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10336-10341.

Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M., and Aoki, Y. (2000) Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus Candida albicans. *Infect Immun* **68**: 6712-6719.

Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**: 173-182.

Netea, M.G., Van Der Graaf, C.A., Vonk, A.G., Verschueren, I., Van Der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2002) The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* **185**: 1483-1489.

Netea, M.G., Van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2004) Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense. *Trends Microbiol* **12**: 484-488.

Netea, M.G., Gow, N.A., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., Jacobs, L., Buurman, E.T., Gijzen, K., Williams, D.L., Torensma, R., McKinnon, A., MacCallum, D.M., Odds, F.C., Van der Meer, J.W., Brown, A.J., and Kullberg, B.J. (2006) Immune sensing of Candida albicans requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* **116**: 1642-1650.

Newman, H.A., Romeo, M.J., Lewis, S.E., Yan, B.C., Orlean, P., and Levin, D.E. (2005) Gpi19, the Saccharomyces cerevisiae homologue of mammalian PIG-P, is a subunit of the initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Eukaryot Cell* **4**: 1801-1807.

Nobile, C.J., Bruno, V.M., Richard, M.L., Davis, D.A., and Mitchell, A.P. (2003) Genetic control of chlamydospore formation in Candida albicans. *Microbiology* **149**: 3629-3637.

Nobile, C.J., and Mitchell, A.P. (2005) Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the C. albicans transcription factor Bcr1p. *Curr Biol* **15**: 1150-1155.

Nobile, C.J., Andes, D.R., Nett, J.E., Smith, F.J., Yue, F., Phan, Q.T., Edwards, J.E., Filler, S.G., and Mitchell, A.P. (2006) Critical role of Bcr1-dependent adhesins in C. albicans biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog* **2**: e63.

Noble, S.M., and Johnson, A.D. (2005) Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen Candida albicans. *Eukaryot Cell* **4**: 298-309.

Nombela, C., Gil, C., and Chaffin, W.L. (2006) Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol* **14**: 15-21.

O'Garra, A., and Vieira, P. (2004) Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* **10**: 801-805.

Ohishi, K., Inoue, N., and Kinoshita, T. (2001) PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. *Embo J* **20**: 4088-4098.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13766-13771.

Peiter, E., Fischer, M., Sidaway, K., Roberts, S.K., and Sanders, D. (2005) The Saccharomyces cerevisiae Ca2+ channel Cch1pMid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Lett* **579**: 5697-5703.

Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C., and Gil, C. (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus Candida albicans cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics* **1**: 967-982.

Popolo, L., and Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 385-400.

Poulain, D., Faille, C., Delaunoy, C., Jacquinot, P.M., Trinel, P.A., and Camus, D. (1993) Probable presence of beta(1-2)-linked oligomannosides that act as human immunoglobulin G3 epitopes and are distributed over a Candida albicans 14- to 18-kilodalton antigen. *Infect Immun* **61**: 1164-1166.

Poulain, D., Slomianny, C., Jouault, T., Gomez, J.M., and Trinel, P.A. (2002) Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in Candida albicans and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun* **70**: 4323-4328.

Poulain, D., and Jouault, T. (2004) *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* **7**: 342-349.

Poulter, R.T. (1987) Natural auxotrophic heterozygosity in Candida albicans. *Crit Rev Microbiol* **15**: 97-101.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., and Ramon, D. (1992) Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2948-2953.

Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R., and Klis, F.M. (1994) A new approach for isolating cell wall mutants in Saccharomyces cerevisiae by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**: 1019-1030.

Ram, A.F., Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Caro, L.H., Douwes, J.E., Baginsky, W., Mazur, P., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1998) Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in Saccharomyces cerevisiae results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol* **180**: 1418-1424.

Rauceo, J.M., De Armond, R., Otoo, H., Kahn, P.C., Klotz, S.A., Gaur, N.K., and Lipke, P.N. (2006) Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the Candida albicans adhesin Als5p. *Eukaryot Cell* **5**: 1664-1673.

Reeves, H.L., and Friedman, S.L. (2002) Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* **7**: d808-826.

Reinoso-Martin, C., Schuller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., and Kuchler, K. (2003) The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* **2**: 1200-1210.

Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., and Morschhauser, J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in Candida albicans. *Gene* **341**: 119-127.

Richard, M., Quijano, R.R., Bezzate, S., Bordon-Pallier, F., and Gaillardin, C. (2001) Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast Yarrowia lipolytica. *J Bacteriol* **183**: 3098-3107.

Richard, M., De Groot, P., Courtin, O., Poulain, D., Klis, F., and Gaillardin, C. (2002) GPI7 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Microbiology* **148**: 2125-2133.

Richard, M., Ibata-Ombetta, S., Dromer, F., Bordon-Pallier, F., Jouault, T., and Gaillardin, C. (2002) Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. *Mol Microbiol* **44**: 841-853.

Richard, M.L., Nobile, C.J., Bruno, V.M., and Mitchell, A.P. (2005) Candida albicans biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell* **4**: 1493-1502.

Rocha, C.R., Schroppel, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M., and Leberer, E. (2001) Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus Candida albicans. *Mol Biol Cell* **12**: 3631-3643.

Rodriguez-Adrian, L.J., Grazziutti, M.L., Rex, J.H., and Anaissie, E.J. (1998) The potential role of cytokine therapy for fungal infections in patients with cancer: is recovery from neutropenia all that is needed? *Clin Infect Dis* **26**: 1270-1278.

Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., Ketela, T., Veillette, K., Breton, A., Tandia, F., Linteau, A., Sillaots, S., Marta, C., Martel, N., Veronneau, S., Lemieux, S., Kauffman, S., Becker, J., Storms, R., Boone, C., and Bussey, H. (2003) Large-scale essential gene

identification in Candida albicans and applications to antifungal drug discovery. *Mol Microbiol* **50**: 167-181.

Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L., Brown, G.D., and Reis e Sousa, C. (2005) Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**: 507-517.

Romani, L., Puccetti, P., and Bistoni, F. (1997) Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **10**: 611-636.

Romani, L., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2002) Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* **10**: 508-514.

Romani, L., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2003) Adaptation of Candida albicans to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol* **6**: 338-343.

Romani, L. (2004) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4**: 1-23.

Romani, L., Bistoni, F., Perruccio, K., Montagnoli, C., Gaziano, R., Bozza, S., Bonifazi, P., Bistoni, G., Rasi, G., Velardi, A., Fallarino, F., Garaci, E., and Puccetti, P. (2006) Thymosin {alpha}1 activates dendritic cell tryptophan catabolism and establishes a regulatory environment for balance of inflammation and tolerance. *Blood* **108**: 2265-2274.

Romani, L., and Puccetti, P. (2006) Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol* **14**: 183-189.

Rooney, P.J., and Klein, B.S. (2002) Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol* **4**: 127-137.

Rouabhia, M., Schaller, M., Corbucci, C., Vecchiarelli, A., Prill, S.K., Giasson, L., and Ernst, J.F. (2005) Virulence of the fungal pathogen Candida albicans requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect Immun* **73**: 4571-4580.

Ruhnke, M., and Maschmeyer, G. (2002) Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer -- review of the literature. *Eur J Med Res* **7**: 227-235.

Ruiz-Herrera, J., Elorza, M.V., Valentin, E., and Sentandreu, R. (2006) Molecular organization of the cell wall of Candida albicans and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**: 14-29.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**: 389-400.

Sambrook J.E., F.F., Maniatis T., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbour Laboratory Press NY.

Sanglard, D. (2001) Integrated antifungal drug discovery in Candida albicans. *Nat Biotechnol* **19**: 212-213.

Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J., and Bille, J. (2003) Calcineurin A of Candida albicans: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* **48**: 959-976.

Sanz, M., Carrano, L., Jimenez, C., Candiani, G., Trilla, J.A., Duran, A., and Roncero, C. (2005) Candida albicans strains deficient in CHS7, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology* **151**: 2623-2636.

Saporito-Irwin, S.M., Birse, C.E., Sypherd, P.S., and Fonzi, W.A. (1995) PHR1, a pH-regulated gene of Candida albicans, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* **15**: 601-613.

Sarthy, A.V., McGonigal, T., Coen, M., Frost, D.J., Meulbroek, J.A., and Goldman, R.C. (1997) Phenotype in Candida albicans of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology* **143 (Pt 2)**: 367-376.

Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., and Haslett, C. (1989) Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* **83**: 865-875.

Saville, S.P., Lazzell, A.L., Monteagudo, C., and Lopez-Ribot, J.L. (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of Candida albicans during infection. *Eukaryot Cell* **2**: 1053-1060.

Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Krapf, G., Enzinger, S., Presterl, E., and Kuchler, K. (2003) The Candida albicans Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol* **48**: 225-235.

Sharkey, L.L., Liao, W.L., Ghosh, A.K., and Fonzi, W.A. (2005) Flanking direct repeats of hisG alter URA3 marker expression at the HWP1 locus of Candida albicans. *Microbiology* **151**: 1061-1071.

Sharom, F.J., and Lehto, M.T. (2002) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol* **80**: 535-549.

Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., Waring, A.J., and Edwards, J.E., Jr. (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of Candida albicans. *J Biol Chem* **279**: 30480-30489.

Shibata, N., Ichikawa, T., Tojo, M., Takahashi, M., Ito, N., Okubo, Y., and Suzuki, S. (1985) Immunochemical study on the mannans of Candida albicans NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch Biochem Biophys* **243**: 338-348.

Siafakas, A.R., Wright, L.C., Sorrell, T.C., and Djordjevic, J.T. (2006) Lipid rafts in Cryptococcus neoformans concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. *Eukaryot Cell* **5**: 488-498.

Sipos, G., Puoti, A., and Conzelmann, A. (1995) Biosynthesis of the side chain of yeast glycosylphosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **270**: 19709-19715.

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., and Soll, D.R. (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in Candida albicans. *J Bacteriol* **169**: 189-197.

Smits, G.J., Kapteyn, J.C., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1999) Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**: 348-352.

Sobering, A.K., Watanabe, R., Romeo, M.J., Yan, B.C., Specht, C.A., Orlean, P., Riezman, H., and Levin, D.E. (2004) Yeast Ras regulates the complex that catalyzes the first step in GPI-anchor biosynthesis at the ER. *Cell* **117**: 637-648.

Sohn, K., Urban, C., Brunner, H., and Rupp, S. (2003) EFG1 is a major regulator of cell wall dynamics in Candida albicans as revealed by DNA microarrays. *Mol Microbiol* **47**: 89-102.

Soll, D.R., Morrow, B., and Srikantha, T. (1993) High-frequency phenotypic switching in Candida albicans. *Trends Genet* **9**: 61-65.

Soll, D.R., Lockhart, S.R., and Zhao, R. (2003) Relationship between switching and mating in Candida albicans. *Eukaryot Cell* **2**: 390-397.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.

Spreghini, E., Davis, D.A., Subaran, R., Kim, M., and Mitchell, A.P. (2003) Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation. *Eukaryot Cell* **2**: 746-755.

Srikantha, T., Klapach, A., Lorenz, W.W., Tsai, L.K., Laughlin, L.A., Gorman, J.A., and Soll, D.R. (1996) The sea pansy Renilla reniformis luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in Candida albicans. *J Bacteriol* **178**: 121-129.

Srikantha, T., Borneman, A.R., Daniels, K.J., Pujol, C., Wu, W., Seringhaus, M.R., Gerstein, M., Yi, S., Snyder, M., and Soll, D.R. (2006) TOS9 Regulates White-Opaque Switching in Candida albicans. *Eukaryot Cell*.

Staab, J.F., Bradway, S.D., Fidel, P.L., and Sundstrom, P. (1999) Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of Candida albicans Hwp1. *Science* **283**: 1535-1538.

Stahl, P.D., and Ezekowitz, R.A. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* **10**: 50-55.

Standards., N.C.f.C.L. (2002) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard*.

Steinman, R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**: 271-296.

Stevens, D.A., Ichinomiya, M., Koshi, Y., and Horiuchi, H. (2006) Escape of Candida from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3160-3161.

Stone, J.A., Holland, S.D., Wickersham, P.J., Sterrett, A., Schwartz, M., Bonfiglio, C., Hesney, M., Winchell, G.A., Deutsch, P.J., Greenberg, H., Hunt, T.L., and Waldman, S.A. (2002) Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 739-745.

Sudoh, M., Nagahashi, S., Doi, M., Ohta, A., Takagi, M., and Arisawa, M. (1993) Cloning of the chitin synthase 3 gene from Candida albicans and its expression during yeast-hyphal transition. *Mol Gen Genet* **241**: 351-358.

Sundstrom, P. (2002) Adhesion in Candida spp. *Cell Microbiol* **4**: 461-469.

Suram, S., Brown, G.D., Ghosh, M., Gordon, S., Loper, R., Taylor, P.R., Akira, S., Uematsu, S., Williams, D.L., and Leslie, C.C. (2006) Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. *J Biol Chem* **281**: 5506-5514.

Suzuki, A., Takata, Y., Oshie, A., Tezuka, A., Shibata, N., Kobayashi, H., Okawa, Y., and Suzuki, S. (1995) Detection of beta-1,2-mannosyltransferase in Candida albicans cells. *FEBS Lett* **373**: 275-279.

Swerdloff, J.N., Filler, S.G., and Edwards, J.E., Jr. (1993) Severe candidal infections in neutropenic patients. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 2**: S457-467.

Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., Ohno, N., Tamura, H., Shibata, K., Akashi, S., Miyake, K., Sugawara, S., and Takada, H. (2002) Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* **46**: 503-512.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**: 443-451.

Tanaka, S., Maeda, Y., Tashima, Y., and Kinoshita, T. (2004) Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. *J Biol Chem* **279**: 14256-14263.

Taron, C.H., Wiedman, J.M., Grimme, S.J., and Orlean, P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects in Gpi11p- and Gpi13p-deficient yeast suggest a branched pathway and implicate gpi13p in phosphoethanolamine transfer to the third mannose. *Mol Biol Cell* **11**: 1611-1630.

Taylor, P.R., Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., and Gordon, S. (2004) The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol* **172**: 1157-1162.

Terashima, H., Hamada, K., and Kitada, K. (2003) The localization change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI-associated protein, from the plasma membrane to the cell wall, affecting the cellular function. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 175-180.

Theiss, S., Ishdorj, G., Brenot, A., Kretschmar, M., Lan, C.Y., Nichterlein, T., Hacker, J., Nigam, S., Agabian, N., and Kohler, G.A. (2006) Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type Candida albicans reduces cell-associated phospholipase A(2) activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol*.

Thomas, J.R., Dwek, R.A., and Rademacher, T.W. (1990) Structure, biosynthesis, and function of glycosylphosphatidylinositols. *Biochemistry* **29**: 5413-5422.

Tiede, A., Bastisch, I., Schubert, J., Orlean, P., and Schmidt, R.E. (1999) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol Chem* **380**: 503-523.

Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K., and Ernst, J.F. (1998) Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen Candida albicans. *J Biol Chem* **273**: 20837-20846.

Torosantucci, A., Chiani, P., De Bernardis, F., Cassone, A., Calera, J.A., and Calderone, R. (2002) Deletion of the two-component histidine kinase gene (CHK1) of Candida albicans contributes to enhanced growth inhibition and killing by human neutrophils in vitro. *Infect Immun* **70**: 985-987.

Tran, D., Tran, P.A., Tang, Y.Q., Yuan, J., Cole, T., and Selsted, M.E. (2002) Homodimeric theta-defensins from rhesus macaque leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities, and bacterial binding properties of the cyclic peptides. *J Biol Chem* **277**: 3079-3084.

Trick, W.E., Fridkin, S.K., Edwards, J.R., Hajjeh, R.A., and Gaynes, R.P. (2002) Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* **35**: 627-630.

Trinel, P.A., Plancke, Y., Gerold, P., Jouault, T., Delplace, F., Schwarz, R.T., Strecker, G., and Poulain, D. (1999) The Candida albicans phospholipomannan is a family of glycolipids presenting phosphoinositolmannosides with long linear chains of beta-1,2-linked mannose residues. *J Biol Chem* **274**: 30520-30526.

Trinel, P.A., Maes, E., Zanetta, J.P., Delplace, F., Coddeville, B., Jouault, T., Strecker, G., and Poulain, D. (2002) Candida albicans phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* **277**: 37260-37271.

Trinel, P.A., Delplace, F., Maes, E., Zanetta, J.P., Mille, C., Coddeville, B., Jouault, T., Strecker, G., and Poulain, D. (2005) Candida albicans serotype B strains synthesize a serotype-specific phospholipomannan overexpressing a beta-1,2-linked mannotriose. *Mol Microbiol* **58**: 984-998.

Tsong, A.E., Miller, M.G., Raisner, R.M., and Johnson, A.D. (2003) Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts. *Cell* **115**: 389-399.

Uhl, M.A., and Johnson, A.D. (2001) Development of Streptococcus thermophilus lacZ as a reporter gene for Candida albicans. *Microbiology* **147**: 1189-1195.

Uhl, M.A., Biery, M., Craig, N., and Johnson, A.D. (2003) Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen C.albicans. *Embo J* **22**: 2668-2678.

Umemura, M., Okamoto, M., Nakayama, K., Sagane, K., Tsukahara, K., Hata, K., and Jigami, Y. (2003) GWT1 gene is required for inositol acylation of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. *J Biol Chem* **278**: 23639-23647.

Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D., and Aderem, A. (1999) Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14459-14463.

Urban, C., Xiong, X., Sohn, K., Schroppel, K., Brunner, H., and Rupp, S. (2005) The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in Candida albicans. *Mol Microbiol* **57**: 1318-1341.

van der Graaf, C.A., Netea, M.G., Verschueren, I., van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2005) Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by Candida albicans blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* **73**: 7458-7464.

Vazquez-Torres, A., and Balish, E. (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 170-192.

Verstrepen, K.J., Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2004) Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol* **2**: 533-540.

Verstrepen, K.J., Jansen, A., Lewitter, F., and Fink, G.R. (2005) Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet* **37**: 986-990.

Villamon, E., Gozalbo, D., Roig, P., O'Connor, J.E., Fradelizi, D., and Gil, M.L. (2004) Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against Candida albicans infections. *Microbes Infect* **6**: 1-7.

Wach, A. (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in S. cerevisiae. *Yeast* **12**: 259-265.

Watanabe, K., Kagaya, K., Yamada, T., and Fukazawa, Y. (1991) Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant gamma interferon. *Infect Immun* **59**: 521-528.

Watanabe, R., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N., and Kinoshita, T. (1999) Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem J* **339 (Pt 1)**: 185-192.

Weig, M., Jansch, L., Gross, U., De Koster, C.G., Klis, F.M., and De Groot, P.W. (2004) Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen Candida glabrata. *Microbiology* **150**: 3129-3144.

Wheeler, R.T., and Fink, G.R. (2006) A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* **2**: e35.

Whelan, W.L., and Magee, P.T. (1981) Natural heterozygosity in Candida albicans. *J Bacteriol* **145**: 896-903.

Whelan, W.L., and Soll, D.R. (1982) Mitotic recombination in Candida albicans: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Mol Gen Genet* **187**: 477-485.

Wilson, R.B., Davis, D., and Mitchell, A.P. (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874.

Yamamoto, Y., Klein, T.W., and Friedman, H. (1997) Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of Candida albicans to macrophages. *Infect Immun* **65**: 1077-1082.

Yan, B.C., Westfall, B.A., and Orlean, P. (2001) Ynl038wp (Gpi15p) is the Saccharomyces cerevisiae homologue of human Pig-Hp and participates in the first step in glycosylphosphatidylinositol assembly. *Yeast* **18**: 1383-1389.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Yauch, L.E., Mansour, M.K., Shoham, S., Rottman, J.B., and Levitz, S.M. (2004) Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen Cryptococcus neoformans in vivo. *Infect Immun* **72**: 5373-5382.

Yeaman, M.R., Ibrahim, A.S., Edwards, J.E., Jr., Bayer, A.S., and Ghannoum, M.A. (1993) Thrombin-induced rabbit platelet microbicidal protein is fungicidal in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 546-553.

Yin, Q.Y., de Groot, P.W., Dekker, H.L., de Jong, L., Klis, F.M., and de Koster, C.G. (2005) Comprehensive proteomic analysis of Saccharomyces cerevisiae cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* **280**: 20894-20901.

Yu, L., Lee, K.K., Ens, K., Doig, P.C., Carpenter, M.R., Staddon, W., Hodges, R.S., Paranchych, W., and Irvin, R.T. (1994) Partial characterization of a Candida albicans fimbrial adhesin. *Infect Immun* **62**: 2834-2842.

Zhao, X., Pujol, C., Soll, D.R., and Hoyer, L.L. (2003) Allelic variation in the contiguous loci encoding Candida albicans ALS5, ALS1 and ALS9. *Microbiology* **149**: 2947-2960.

Zhao, X., Oh, S.H., Cheng, G., Green, C.B., Nuessen, J.A., Yeater, K., Leng, R.P., Brown, A.J., and Hoyer, L.L. (2004) ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a Candida albicans adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* **150**: 2415-2428.

Zhao, X., Daniels, K.J., Oh, S.H., Green, C.B., Yeater, K.M., Soll, D.R., and Hoyer, L.L. (2006) Candida albicans Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology* **152**: 2287-2299.

Zhu, Y., Vionnet, C., and Conzelmann, A. (2006) Ethanolaminephosphate side chain added to glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor by mcd4p is required for ceramide remodeling and forward transport of GPI proteins from endoplasmic reticulum to Golgi. *J Biol Chem* **281**: 19830-19839.

Zordan, R.E., Galgoczy, D.J., and Johnson, A.D. (2006) Epigenetic properties of white-opaque switching in Candida albicans are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12807-12812.

ANNEXES

ANNEXE 1: LISTE DES ORF IDENTIFIES PAR DE GROOT COMME CODANT PUTATIVEMENT DES PROTEINES A ANCRE GPI.

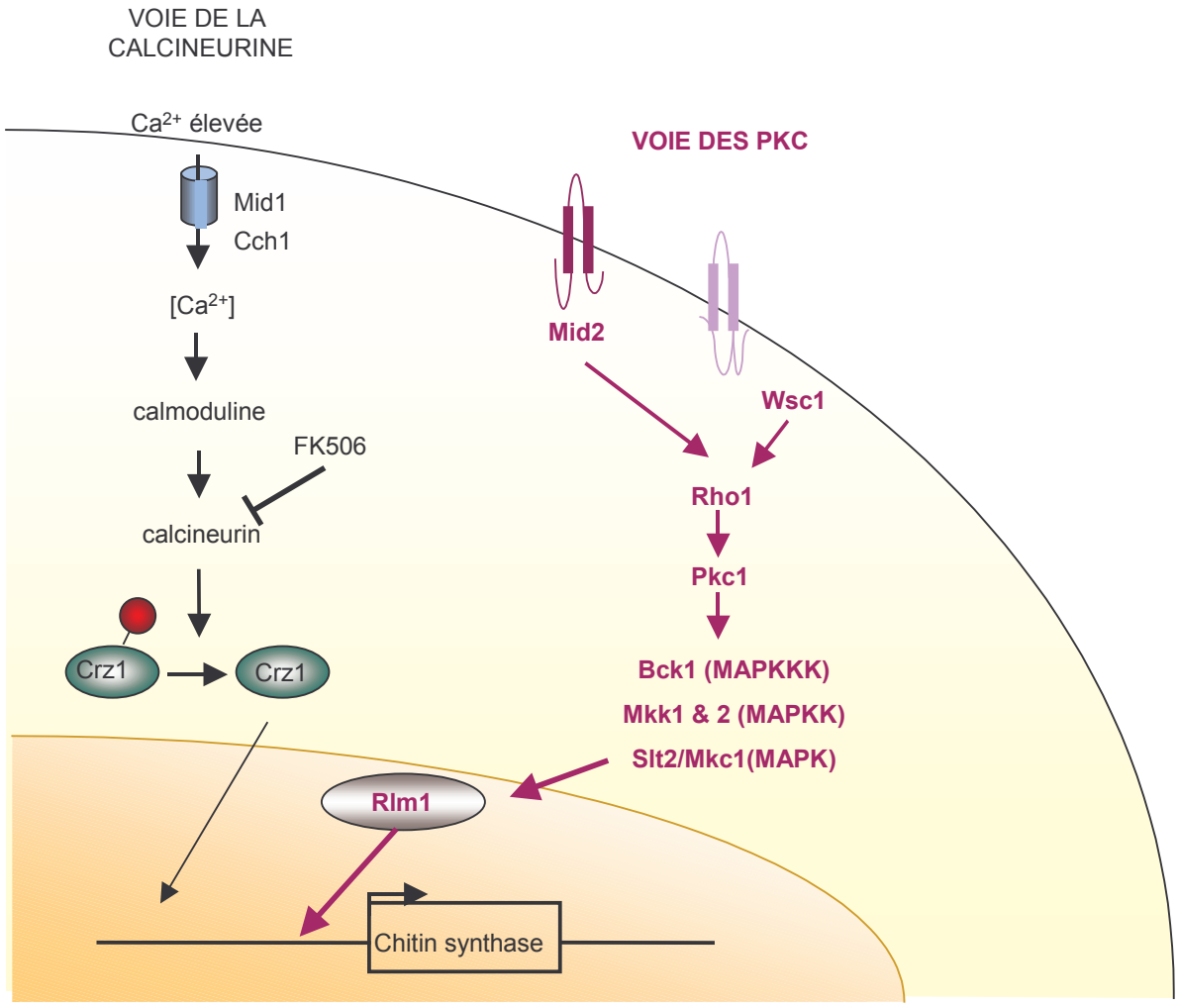
Le tableau, sur les deux pages suivantes, présente (i) sur fond violet les gènes écartés de notre étude, (ii) sur fond rose les gènes qui ont été interrompus dans cette étude.

Stanford orf19 nr. allele 1	allele 2	***Candida* DB name**	**Size (aa)**	**NCBI BLAST result**
orf19.5745	orf19.13168	Als11.5f + Als11.3f	952+949	Agglutinin-like sequence
orf19.1816	orf19.9379	Als3.5eoc + Als3.3eoc	886+111	Agglutinin-like sequence
orf19.5741	orf19.13163	Als1.5eoc + Als1.3eoc[c]	658+828	Agglutinin-like sequence
orf19.1443	orf19.9018	Plb4.5f + Plb4.3f	394+304	Phospholipase B
orf19.6336	orf19.7542	Pga25 / IPF5723.5'+3' / IPF331	361+897	
orf19.5302	orf19.12761	Pga31 / IPF8535	293	
orf19.4556		Als4.5f + Als4.3f	1593+546	Agglutinin-like sequence
orf19.2122	orf19.9670	Als12.5eoc3f + Als12.3f	1068+220	Agglutinin-like sequence
orf19.1127	orf19.2221	Yck3.5f + Yck3.3f	378+142	Casein kinase I
orf19.7400		Als7	2000	Agglutinin-like sequence
orf19.2355	orf19.9891	Als10	1586	Agglutinin-like sequence
orf19.7472		Iff4	1526	Similarity with Hyr1
orf19.7414		Als6	1366	Agglutinin-like sequence
orf19.5736		Als5	1347	Agglutinin-like sequence
orf19.2879	orf19.10397	Iff5	1311	Similarity with Hyr1
orf19.575	orf19.8206	Iff2	1249	Similarity with Hyr1
orf19.3279	orf19.10789	Iff7	1225	Similarity with Hyr1
orf19.207	orf19.7838	Pga55 / IPF15911	1176	
orf19.1616	orf19.9183	Pga40 / IPF12624	1114	
orf19.4072	orf19.11553	Iff6	1087	Similarity with Hyr1
orf19.7114		Csa1	1018	Mycelial surface antigen
orf19.4361	orf19.11839	Iff3	941	Similarity with Hyr1
orf19.4975	orf19.12440	Hyr1	937	Hyphally regulated protein
orf19.3380	orf19.10888	Pga8 / IPF14331	908	Similarity with Rbt1
orf19.5102	orf19.12568	Plb5	754	Phospholipase B
orf19.301	orf19.7933	Pga18 / IPF3844	753	
orf19.5588	orf19.13035	Pga60 / IPF20103	741	
orf19.4404	orf19.11882	Pga49 / IPF14598	734	
orf19.570	orf19.8201	Iff8	714	Similarity with Hyr1
orf19.1327	orf19.8907	RBT1	714	Repressed by Tup1 protein 1
orf19.1401	orf19.8979	Pga47 / IPF14145	653	
orf19.3693	orf19.11177	Pga5 / IPF10714	641	Gas/Phr family, CAZy family 17
orf19.1321	orf19.8901	Hwp1	634	Hyphal cell wall protein
orf19.6594		Plb3	632	Phospholipase B
orf19.3895	orf19.11376	Cht2	583	Chitinase, CAZy family 18
orf19.3212	orf19.10724	Mid1	559	Ca^{2+}-permeable channel protein
orf19.893	orf19.8512	Pga17 / IPF3674	557	
orf19.3829	orf19.11310	Phr1	548	Gas/Phr family, CAZy family 17
orf19.6081	orf19.13500	Phr2	544	Gas/Phr family, CAZy family 17
orf19.6928	orf19.14190	Sap9	544	Aspartyl protease
orf19.3618	orf19.11101	Pga24 / IPF5185	533	
orf19.2759	orf19.10272 /10273	Pga38 / IPF11998	517	
orf19.2237	orf19.9779	Spr1	510	Glucan 1,3-β-glucosidase, CAZy family 5
orf19.2044	orf19.9592	Pga27 / IPF7451	485	
orf19.2952	orf19.10469	Exg2	479	Glucan 1,3-β-glucosidase, CAZy family 5
orf19.1671	orf19.9240	Utr2	470	Crh1 family, CAZy family 16
orf19.7517		Cht1	462	Chitinase, CAZy family 18[d]
orf19.2451	orf19.9987	Pga45 / IPF14109	462	
orf19.6420	orf19.13778	Pga13 / IPF1341	456	
orf19.2706	orf19.10221	Crh11	453	Crh1 family, CAZy family 16

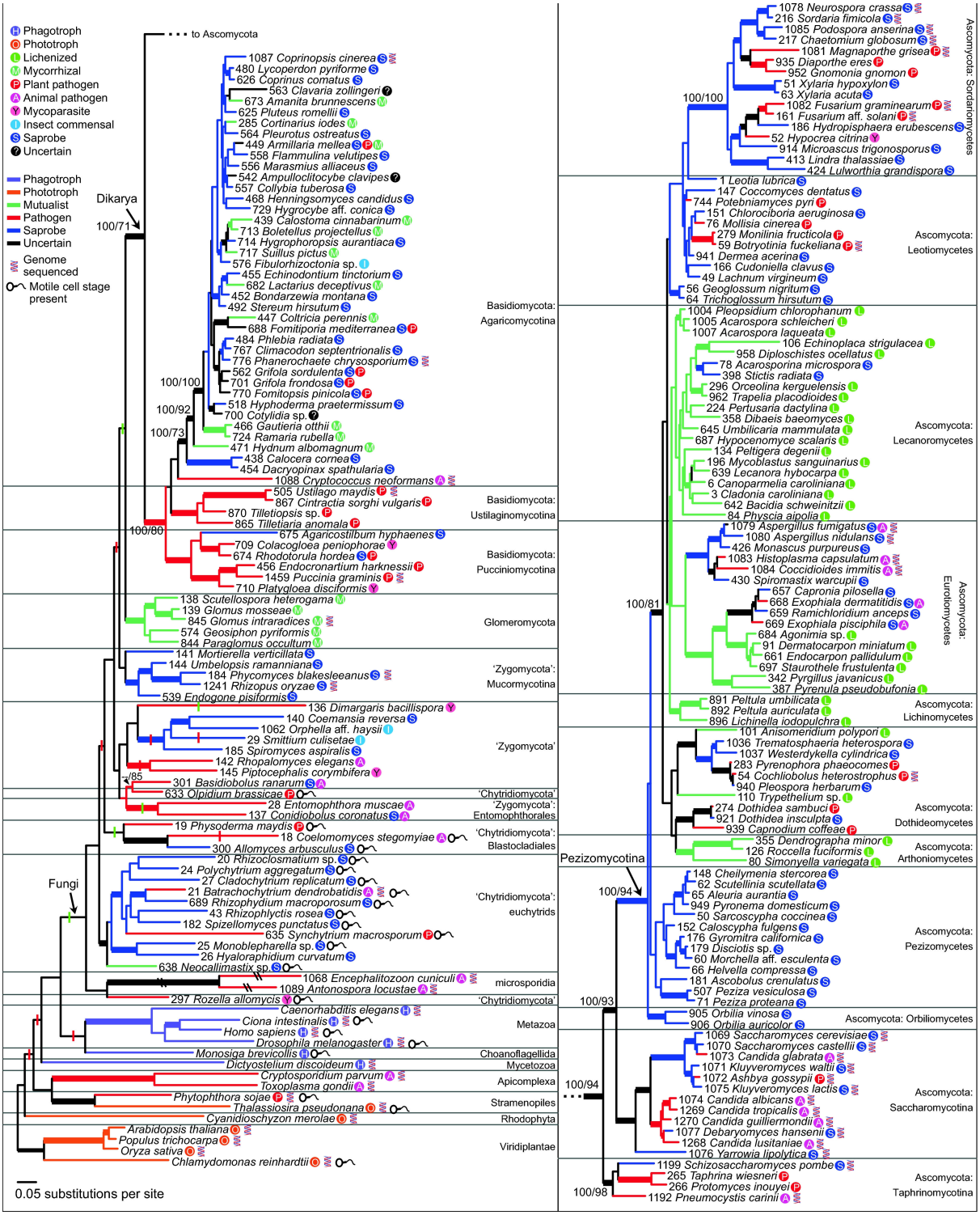
Stanford orf19 nr.		*Candida* DB name	Size (aa)	NCBI BLAST result
orf19.1989	orf19.9540	Pga51 / IPF15224	452	
orf19.2075	orf19.9622	Dfg5	451	Sim.ScDfg5/Dcw1, CAZy family 76
orf19.4035	orf19.11518	Pga4 / IPF8796	451	Gas/Phr family, CAZy family 17
orf19.6784	orf19.14076	Pga32 / IPF8930	430	
orf19.4255	orf19.11730	Ecm331	413	Ecm33 family, cell wall biogenesis
5366.2[b,f]		Ecm33.3	412	Ecm33 family, cell wall biogenesis
orf19.5760	orf19.13183	Pga36 / IPF10662	392	
orf19.1911	orf19.9467	Pga52 / IPF15442	384	
orf19.2685	orf19.10200	Pga54 / IPF15870	342	
orf19.3638	orf19.11120	Pga46 / IPF14126	332	
orf19.2108	orf19.9656	Pga9 / IPF15423	316	Cu/Zn superoxide dismutase
orf19.7597		Pga12 / IPF672	315	
orf19.1824	orf19.9383	Pga50 / IPF14706	309	
orf19.1714	orf19.9282	Pga44 / IPF14081	307	
orf19.2906	orf19.10424	Pga41 / IPF13070	296	
orf19.6302	orf19.13679	Pga39 / IPF12221	281	
orf19.5303	orf19.12763	Pga30 / IPF8532	277	
orf19.3740	orf19.11225	Pga23 / IPF4724	271	
orf19.876	orf19.8495	Pga33 / IPF9020	262	
orf19.5674	orf19.13119	Pga10 / IPF20169	250	Similarity with Csa1/Rbt5
orf19.4910	orf19.12376	Pga35 / IPF9616	250	
orf19.5636	orf19.13081	Rbt5	241	Repressed by Tup1 protein 5, sim. Csa1
orf19.4334	orf19.11809	Pga58 / IPF19706	240	
orf19.2910	orf19.10428	Pga43 / IPF13139	236	
orf19.7030		Ssr1	234	N-term. has similarity with ScSsr1
orf19.2062	orf19.9609	Pga2 / IPF1218	232	Cu/Zn superoxide dismutase
orf19.2033	orf19.9581	Pga19 / IPF4123	229	
orf19.2060	orf19.9607	Pga3 / IPF1222	228	Cu/Zn superoxide dismutase
orf19.2907	orf19.10425	Pga42 / IPF13135	227	
orf19.5144	orf19.12609	Pga28 / IPF8129	226	
orf19.5762	orf19.13185	Pga61 / IPF20148	223	
orf19.4765	orf19.12229	Pga6 / IPF10919	219	Similarity with ScFlo1
orf19.5635	orf19.13080	Pga7 / IPF12101	219	Similarity with Csa1/Rbt5
orf19.4689	orf19.12158	Pga57 / IPF19267	214	Similarity with Pga39/IPF10922
orf19.2765	orf19.10281	Pga62 / IPF20161	213	
orf19.3923	orf19.11405	Pga37 / IPF10922	208	
orf19.5305	orf19.12765	Pga29 / IPF8527	204	
orf19.2833	orf19.10351	Pga34 / IPF9101	197	
orf19.3738	orf19.11223	Pga22 / IPF4722	169	
orf19.532	orf19.8165	Pga21 / IPF4303	168	
orf19.2878	orf19.10396	Pga15 / IPF3233	165	
orf19.4651	orf19.12120	Pga53 / IPF15581	139	
orf19.7625[e]		Pga1 / IPF618	132	ScKre1 homolog
orf19.968	orf19.8583	Pga14 / IPF1580	131	
orf19.2475	orf19.10012	Pga26 / IPF7204	131	
orf19.4377	orf19.11855	Kre1	130	ScKre1 homolog
orf19.7609		Pga11 / IPF647	124	
orf19.2767	orf19.10283	Pga59 / IPF20008	113	
orf19.535	orf19.8168	Pga20 / IPF4299	111	
orf19.6321		Pga48 / IPF14295	108	
orf19.848	orf19.8468	Pga16 / IPF3416	105	
CandidaDB nr.15957.2[b]		Pga56 / IPF15957	84	

ANNEXE 2 : VOIES DE REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE LA PAROI IMPLIQUEES CHEZ *S. CEREVISIAE* DANS LA TOLERANCE A LA CASPOFUNGINE.

La figure suivante est adaptée à partir d'un schéma de C. Munro (Aberdeen, Ecosse).



ANNEXE 3 : TAXONOMIE DU REGNE DES CHAMPIGNONS D'APRES JAMES *ET AL.*, (JAMES *ET AL.*, 2006).



ABSTRACT

Candida albicans is the fungal pathogen isolated most frequently in nosocomial infections and in hemocultures. Our proposal in this thesis was to extend our knowledge on one particular class of cell surface proteins: GPI (Glycosyl Phospho Inositol)-anchored proteins (GpiP). Gpi7p has been demonstrated by our group to participate in the proper anchoring of GPI-dependent cell wall proteins to the cell wall and also suggested that GPI anchored proteins (GAP) might be involved in macrophage interactions especially in fungal survival after phagocytosis. In the *C. albicans* genome, 104 putative GPI anchored proteins have been identified but the role of about half of them remains unknown. These observations altogether suggest that GAPs might be excellent targets to study host-pathogen interactions. For this study we used two approaches. The first strategy was to generate null mutants of the putative GPI anchored proteins, then characterize their phenotype *in vitro* and finally screen each of the mutants for its interaction with macrophages. This global approach was conducted on the 47 mutants gathered and permitted us to classify GAPs in three main functional categories: (i) morphogenesis, (ii) stress response and (iii) cell wall integrity and caspofungin sensitivity. The screen for mutant altered in their resistance to phagocytosis did not give any clear results, probably because the conditions tested were too mild. In the second approach, we used the mutant *gpi7*-/- to study the effects of some cell wal proteins mislocalisation in the interaction of the fungus with the innate host defences. We found that in the absence of Gpi7p, *C. albicans* elicited a stronger *in vitro* TNF-α production by macrophages and a stronger recruitment of neutrophils *in vivo* at the site of infection. These findings suggest the strongly modified cell wall of *gpi7*-/- is better recognized by the immune system inducing a stronger proinflammatory response. None of these effects seem to be mediated by the TLR2 and TLR4 receptors.

RESUME

Candida albicans est le premier pathogène fongique chez l'homme (avec 78 % des infections). Nous avons choisi d'étudier, chez cette levure diploïde, les protéines de surface ancrées à la membrane et/ou à la paroi par une ancre Glycosylphosphatidylinositol (GPI). Des expériences antérieures au laboratoire ont montré que l'absence de Gpi7p (une enzyme de la voie de biosynthèse de l'ancre GPI) affectait l'ancrage des protéines à ancre GPI (GpiP) pariétales, l'intégrité de la paroi et la virulence de *C. albicans*. Outre le fait d'être localisées à la surface, plus de 60 % des 104 GpiP n'ont pas d'orthologue connu. Toutes ces données nous laissent penser que cette classe de protéines pourrait jouer un rôle clé dans les interactions de *C. albicans* avec son environnement. L'étude, présentée dans cette thèse, a été menée selon deux approches. La première consistait à interrompre un maximum de gènes codant des GpiP, puis à étudier le phénotype associé à ces invalidations pour ensuite cribler ces mutants GpiP pour les interactions macrophage-*C. albicans in vitro*. Cette approche globale nous a permis de construire une banque de mutants relativement importante ; son étude phénotypique montre que les GpiP sont impliquées dans trois grandes catégories fonctionnelles : (i) la morphogenèse, (ii) la réponse au stress et (iii) l'intégrité de la paroi avec la sensibilité à la caspofungine. Le crible pour des mutants atteints dans leur résistance à la phagocytose ne nous a pas permis d'obtenir des résultats clairs, probablement à cause des conditions testées qui n'étaient pas assez stringentes. La seconde approche consistait à étudier l'impact de la mauvaise localisation de certaines protéines pariétales, en utilisant le mutant *gpi7*-/-, sur la réponse innée de l'hôte face à *C. albicans*. Nos expériences montrent très clairement que le mutant *gpi7*-/- induit une très forte production de TNFα par les macrophages accompagnée d'un recrutement accru de neutrophiles au site de l'infection. Cette étude suggère qu'en l'absence de Gpi7p, la paroi de *C. albicans* serait mieux reconnue par les phagocytes mais que cette reconnaissance n'impliquerait pas les récepteurs TLR2 et TLR4.