Hexokinase et glucokinases chez la levure pathogène Candida albicans : implication dans la physiologie et la virulence

Romain Laurian

▶ **To cite this version:**

Romain Laurian. Hexokinase et glucokinases chez la levure pathogène Candida albicans : implication dans la physiologie et la virulence. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1012 . tel-03505905

HAL Id: tel-03505905
https://theses.hal.science/tel-03505905

Submitted on 1 Jan 2022

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.

N°d'ordre NNT : 2020LYSE1012

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° 341
Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation

Spécialité de doctorat : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Discipline : Microbiologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 11/02/2020, par :
Romain Laurian

Hexokinase et glucokinases chez la levure pathogène *Candida albicans* :

Implication dans la physiologie et la virulence

Devant le jury composé de :

M. Bruel Christophe, *Professeur, Université Lyon 1*	Président
M. Di Pietro Antonio, *Professeur, Universidad de Cordoba*	Rapporteur
M. Papon Nicolas, *Professeur, Université d'Angers*	Rapporteur
Mme Dementhon Karine, *Maître de Conférences, Université de Bordeaux*	Examinatrice
Mme Cotton Pascale, *Maître de Conférences, Université Lyon 1*	Directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail, Nicolas Papon, Antonio Di Pietro, Karine Dementhon, Christophe Bruel et Pascale Cotton. Merci à tous d'avoir fait le déplacement depuis vos universités d'origine. J'espère que vous prendrez autant de plaisir à lire ce manuscrit que j'en ai eu à l'écrire.

Je voudrais commencer cette longue liste de remerciement en exprimant toute ma gratitude à Pascale, qui a été durant toutes ces années ma directrice de stage puis de thèse. S'il est des rencontres qui marquent une vie à jamais, tu en fais indéniablement partie. C'est une bien piètre reconnaissance que ces quelques lignes dans ce manuscrit mais sache que je te remercie infiniment pour tout ce que tu as fait pour moi et pour m'aider à en arriver là. Ta disponibilité, ta bienveillance, tes qualités de pédagogie et ta patience font de toi l'excellente directrice de thèse que tu as été pendant mes 3 années de doctorat. Sans toi, rien de tout cela n'aurait été possible. Je pense que dès le début tu as cru en moi bien plus que je ne l'ai fait et cela m'a toujours poussé à donner le meilleur de moi-même. Cela fait déjà 5 ans que je rôde dans ton bureau ou pas très loin. Merci pour ton soutien sans faille, le temps que tu as consacré à la correction de ce manuscrit. Merci pour les petits dîners au restaurant, les longues discussions scientifiques sur l'enfer de la répression glucose et celles plus légères sur la Bretagne, la Corse et les citronniers (#Marie-Claude). Nous avons partagé tant de choses au cours de toutes ces années qu'il me faudrait noircir bien des pages pour tout évoquer. Ces moments de répit entre deux expériences compliquées ou deux pages rédigées étaient une bouffée d'oxygène. Une page se tourne mais quoi qu'il advienne, j'espère continuer à avoir de tes nouvelles et que nous resterons en contact. I'll be back.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe de *Génétique Moléculaire des Levures*, qui m'ont accueilli pendant toutes ces années. Merci à Marc pour le soutien que tu m'as toujours témoigné, et pour m'avoir poussé à surpasser ma timidité en m'envoyant tout seul, parler devant des dizaines de scientifiques en Suède (#TeamICYGMB). Merci aussi pour toutes les petites astuces utiles de laboratoire que tu as su distiller, toujours au moment opportun. Merci à Alexandre, pour les conseils prodigués sur la microscopie, et les discussions intenses sur la répression glucose, autour d'une bonne biè… jus de fruit. Je voudrais aussi remercier Julien qui de par sa maitrise des Western Blot a su me sortir de quelques situations épineuses, merci aussi pour toutes nos discussions plus légères à l'occasion de pique-niques ou des repas de l'unité. Ces petits moments de relâchements sont toujours appréciables au cours du marathon qu'est la thèse.
Je ne pouvais que finir en remerciant la « Reine du Western Blot », Jade. Merci pour ton aide technique qui a été si précieuse pour compléter, parfois dans le rush les manips manquantes. Merci d'avoir continué à assurer la partie technique au moment où j'étais pris dans les rets de la rédaction. Merci pour toutes nos discussions scientifiques ou pas, nos moments de râlerie, de partage de ras le bol, de manips ratées en plein été par 40°C. Comment oublier nos 3 mois de déboires avec les collages de fragments d'ADN et l'appareil PCR qui nous lâche en plein run... Ces moments font aussi parti des bons souvenirs d'une thèse.

Je voudrais aussi remercier chaleureusement les membres de mes deux comités de pilotage qui m'ont permis d'avancer sereinement sur le chemin du doctorat. Merci donc à Anne Vianney, Nathalie Poussereau, Karine Dementhon, et Yvan Rabhe. Les discussions que nous avons eues à ces occasions ont été bénéfiques à plus d'un titre. Merci mille fois pour vos encouragements toujours aussi vifs et précieux, qui dans les périodes plus difficiles ont rassérénés mon cœur et mon esprit.

Le paragraphe qui suit est dédié à une enseignante, membre de mon comité de pilotage, avec qui j'ai eu la chance d'avoir de longues (parfois très longues) discussions au détour d'un couloir ou entre deux escaliers. Je pense qu'à ce stade tu t'es reconnue, n'est-ce pas Anne ? Pendant toutes ces années tu n'as jamais été avare de compliments à mon égard et en particulier pendant mes comités de thèse. Je ne sais pas si j'en méritais autant mais en tout cas je te remercie infiniment pour tes mots d'encouragement et nos discussions très variées, du biofilm à la Bretagne en passant par Berlin et le Canada. Ta gentillesse et ta simplicité sont des rayons de soleil dans le quotidien parfois morose d'un thésard.

Parfois au cours de la thèse la seule envie qui nous habite et celle de s'occuper tranquillement de nos petites (ou grosses) expériences en ne pensant à rien d'autre. Et c'est toujours dans ces moments-là que quelqu'un vient nous proposer de faire un petit séminaire devant l'unité ou d'animer un Journal Club. Devant ce type d'évènement perturbateur, ma première réaction était généralement suffisamment peu gracieuse, pour ne pas être couchée sur papier. D'ailleurs, Pascale je te remercie de m'avoir supporté dans ces instants, où tu étais aux premières loges de mes élans de râleries. Pourtant avec le recul, je me rends compte que ces exercices aussi coûteux qu'ils me fussent ont été indéniablement positifs en me permettant d'ouvrir ma culture scientifique à d'autres techniques, modèles et horizons. Et finalement, c'est toujours avec un plaisir certain que je finissais par présenter le fruit de mon travail. Alors avec ce constat en tête, je te remercie Yvan Rabhe (Monsieur Comm') de m'avoir poussé à sortir de ma zone de confort.

Au cours de mes trois ans de thèse, j'ai eu la chance de me déplacer régulièrement en congrès ou simplement pour assister à des conférences ou symposium. Parmi les voyages les plus marquants, je retiendrai ma visite à Bordeaux pour rencontrer nos collègues travaillant sur les espèces de *Candida* pathogènes. J'étais en première année de thèse et je n'avais encore jamais quitté mon laboratoire d'accueil. Alors je voulais vous remercier Karine et Thierry de m'avoir si gentiment accueilli dans votre laboratoire et d'avoir tout fait pour me mettre en confiance dès mon arrivée. Bien que, mon passage fut bref, j'ai beaucoup appris à vos côtés et au-delà de l'aspect scientifique, j'ai surtout découvert de belles personnes.

Merci à mes amis doctorants, Quentin Blache, Anne-Sophie Godeux et Alexandre Chassard. La distance qui nous séparait n'était pas si grande (un escalier au bas mot), pourtant nos rencontres n'étaient pas si fréquentes. Nous nous croisions subrepticement au coin de la machine à glace, ou près du Nanodrop. L'adage dit que : « La rareté donne du prix à la chose ». Si nos interactions étaient plutôt rares elles n'en étaient pas moins précieuses à mes yeux. C'était pour nous l'occasion de partager nos peurs, nos angoisses, nos élans de désespoirs devant quelques manips ratées. Des bribes de vies échangées sur un pallier ou autour d'un verre. Un marathon ne se court pas seul, alors merci à tous d'avoir été présents.

Cette section est dédiée à deux personnes qui ont bouleversé ma vie. À mes meilleures amies, de la licence jusqu'au doctorat et au-delà : Audrey et Marielle. Huit ans déjà. Huit ans, sans aucune ombre au tableau, humainement parlant je crois que nous défions à nous seuls toutes les études sociologiques et comportementales. Nous avons partagé tellement de choses ensemble, de l'élaboration de nos lois scientifiques totalement saugrenues, tels que le « paradoxe de la valeur Ks » ou encore la « loi d'Andy Warhol » à nos vacances en Ardèche, en passant par nos incalculables sorties ciné. A nos soirées marathon « Harry Potter », « Seigneur des Anneaux », « Hobbit » ou « Cloud Atlas », aux barbecues estivaux, les soirées glaces supplémentées de 1 à 5 ml de Vodka (10 mM, Zubrowka, Poland). Nous avons ri, stressé, pleuré et rêvé ensemble. Notre relation s'étend je le crois bien au-delà de l'amitié, vous avez changé à jamais ma vie. Vous avez toujours été là pour moi dans les moments difficiles et j'espère vous avoir rendu en retour ne serait-ce qu'un dixième de ce que vous m'avez apporté. Aucun discours aussi long soit-il ne pourra exprimer à quel point je vous aime, alors simplement et du fond du cœur ***Merci***. Je sais que ces derniers temps nous n'avons pas eu énormément de temps pour nous retrouver mais je vous promets que nous remédierons à ça très bientôt. À nos prochaines vacances… au Japon.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille. Merci à mes parents de m'avoir poussé sur le chemin des études et de m'avoir encouragé à poursuivre le plus loin possible. La situation aurait sans doute été bien différente si vous ne l'aviez pas fait. Cette réussite je vous la doit. Vous m'avez donné les conditions idéales et propices au travail, vous m'avez soutenu dans les moments plus ardus.

Merci à mes grands-parents de m'avoir accueilli toujours avec bienveillance dans leurs sanctuaires Ardéchois, où l'espace d'un instant, j'ai pu me ressourcer et oublier tous les soucis du quotidien.

Merci à ma sœur Jade et à Louis d'avoir tout fait pour me changer les idées, aussi souvent que cela était nécessaire. Pour nos parties endiablées d'Overwatch®, de Mario Kart® et nos soirées jeux de société, où avouons-le, quel que fut votre niveau de fourberie je finissais toujours par l'emporter.

Enfin, je voudrais remercier particulièrement mon ami et colloc' Ben. Je n'ose imaginer combien de fois tu as pu avoir envie de me mettre dehors, alors que les mois passant et le stress grandissant, mon caractère de cochon (appelons un chat un chat) ne cessait d'empirer. C'est toi, qui au (presque) quotidien a subi mon irritabilité, irascibilité, et autre joyeuseté. Je reconnais avoir parfois été de bien mauvaise compagnie. Et pourtant, jamais tu n'as même élevé la voix. Tu m'as soutenu, écouté, aidé aussi, dans la répétition de mes oraux et dans certaines traductions. Lors de nos soirées avec Audrey, Marielle, Jade et Louis, tu nous as régalé par tes talents culinaires et énervé par (~~ta chance)~~ tes talents de pilote sur MarioKart® et de stratège au Risk®. Tu m'as proposé maintes activités pour me tirer de devant mon ordinateur et me faire changer d'air. Nous avons même été jusqu'à Berlin sur un coup de tête. Alors merci infiniment, pour tout.

À vous tous, cités dans ce manuscrit, je sais que mon stress et mes angoisses ont fait de moi, ces derniers mois, quelqu'un de difficile à supporter. Je m'en suis rendu compte aussi bien que vous alors encore une fois merci à tous d'avoir été là et de m'avoir soutenu malgré mes sautes d'humeurs et mon caractère explosif.

Trois années de doctorat, cela représente une expérience intense, une opportunité unique de vivre la science au quotidien et d'appréhender sous un nouveau jour la recherche. Un temps, si long parfois, mais en même temps si éphémère. Trois ans, et tellement d'émotions contradictoires. Des joies intenses, des périodes d'accalmie, des expériences mettant à rude épreuve mes nerfs demandant un sens de l'organisation strict, des moments de partage, des migraines de réflexion. J'ai vécu les assauts de l'échec, toujours repoussé parfois au-delà du raisonnable mais quand on entrevoit la lumière, le sentiment de satisfaction qui nous envahit est grisant et nous donne l'énergie de continuer. Bien sûr, tout n'est pas rose, j'ai aussi connu certaines de mes pires angoisses pendant ces trois ans et surtout au cours de ces derniers mois consacrés à la rédaction. Un sentiment d'impuissance ineffable qui nous plonge dans l'abîme la plus noire, puis une lutte féroce et acharnée pour sortir petit à petit la tête de l'eau et fournir les ultimes efforts pour gravir pierre après pierre la montagne qui se dresse devant nous. Si en alpinisme l'oxygène se raréfie au cours de la montée, il en va un peu de même pour la thèse, c'est près du but que l'on se sent parfois le plus étouffé. C'est dans ces moments plus que difficiles, que je me suis pleinement rendu compte de la chance que j'ai eu d'être particulièrement bien entouré par mes amis, ma famille, et mes collègues et bien sûr Pascale, qui n'ont jamais douté que je mènerais cette aventure à son terme. Vous avez été ma force, mon moteur, vous m'avez donné l'envie d'avancer et de me surpasser. En dépit de ces moments un peu compliqués, je n'ai pas de regrets et le temps passant je sais que c'est avec une certaine mélancolie que je repenserai à ma vie de doctorant.

« Aux vies qui ont soutenues la mienne je n'ai
qu'un long monologue poudré de neige à partager
Nos vies qui s'écoulent chaque jour saignent
Nous ne sommes reliés qu'à nous-mêmes »

Mylène Farmer

Résumé :

La levure *Candida albicans,* constituant de la microflore pathogène et commensale de l'homme colonise et infecte de nombreux organes. Cette colonisation est permise par la flexibilité métabolique de ce pathogène, dont la survie dépend de l'assimilation de sources carbonées fermentescibles ou non, localement disponibles. Parmi ces ressources, le glucose est présent en faible quantité dans certains sites du corps humain. Cette source de carbone étant préférentiellement utilisée par les microorganismes, sa détection et sa métabolisation optimales sont de première importance pour la survie du pathogène. Les travaux effectués au cours de cette thèse ont été focalisés sur la première étape irréversible de la glycolyse, la conversion du glucose en glucose-6-phosphate par les hexoses kinases, jamais décrites chez *C. albicans*.

Le système des hexose kinases chez *C. albicans* est constitué d'une hexokinase (*Ca*Hxk2*)* et de deux glucokinases *(Ca*Glk1 et *Ca*Glk4). La construction de différentes combinaisons de mutants de délétion, nous a permis de constater que la phosphorylation des hexoses était principalement assurée par l'hexokinase 2. L'analyse de l'expression des gènes codant pour l'hexokinase et les glucokinases a révélé une absence de régulation transcriptionnelle croisée et des mécanismes de régulation différents. Tandis que l'hexokinase est impliquée dans les réponses aux stress oxydant, osmotique et de paroi, les glucokinases sont surexprimées en condition hypoxiques. La phosphorylation des hexoses est une étape clé nécessaire à la transition filamenteuse qui est affectée chez le mutant hexokinase. L'analyse de la virulence des mutants de délétion conduite dans deux pathosystèmes différents (le modèle insecte *Galleria mellonella* et le modèle macrophage de souris (J774)), a révélé l'hypovirulence du mutant hexokinase 2, alors que la délétion des glucokinases ne conduit à aucun phénotype remarquable, posant la question du rôle physiologique de ces enzymes.

Nos travaux ont ensuite exploré le rôle régulateur de l'hexokinase 2 impliquée dans la signalisation glucose, voie de régulation élaborée par les microorganismes pour privilégier l'utilisation du glucose. Chez *C. albicans*, le système de répression glucose a été globalement conservé mais le rôle des différents acteurs et plus particulièrement de l'hexokinase 2 n'a jamais été précisé. Nos travaux ont permis de démontrer qu'en présence de glucose, l'hexokinase 2, *Ca*Hxk2, est relocalisée dans le noyau et régule négativement l'expression des gènes du métabolisme carboné alternatif. Des expériences de délétion ciblées ont permis de mettre en évidence que la fonction catalytique de l'hexokinase 2 était requise pour permettre à l'enzyme d'exercer sa fonction régulatrice.

Parallèlement nous avons mené une étude de transcriptomique par digital droplet PCR, dans le cadre d'un projet technique ciblé sur l'analyse de la transcription des gènes du métabolisme, au cours des phases très précoces de la phagocytose par les macrophages. Nos travaux ont mis en évidence une induction forte des gènes appartenant aux voies du métabolisme carboné alternatif (ß-oxydation, néoglucogenèse, cycle glyoxylique).

Mots-clés : *Candida albicans*, glucose, glycolyse, hexokinase, glucokinases, répression glucose, dimorphisme, virulence

Summary:

The pathogenic yeast *Candida albicans* is both a powerful commensal and pathogen of humans that can infect a wide range of organs and body sites. Metabolic flexibility promotes infection and commensal colonization by this opportunistic pathogen. Yeast cell survival depends upon assimilation of fermentable and non-fermentable locally available carbon sources. Physiologically relevant sugars like glucose and fructose are present at low level in host niches. However, because glucose is the preferred substrate for energy and biosynthesis of structural components, its efficient detection and metabolism are fundamental for the metabolic adaptation of the pathogen. We explored and characterized the *C. albicans* hexose kinase system composed of one hexokinase (*Ca*Hxk2) and two glucokinases (*Ca*Glk1 and *Ca*Glk4). Using a set of mutant strains, we found that hexose phosphorylation is mostly performed by *Ca*Hxk2, which sustains growth on hexoses. Our data on hexokinase and glucokinase expression point out an absence of cross regulation mechanisms at the transcription level and different regulatory pathways. In the presence of glucose, *Ca*Hxk2 migrates in the nucleus and contributes to the glucose repression signaling pathway. In addition, *Ca*Hxk2 participates in oxidative, osmotic and cell wall stress responses, while glucokinases are overexpressed under hypoxia. Hexose phosphorylation is a key step necessary for filamentation that is affected in the hexokinase mutant. Virulence of this mutant is clearly impacted in the *Galleria mellonella* and macrophage models. Filamentation, glucose phosphorylation and stress response defects of the hexokinase mutant prevent host killing by *C. albicans*. By contributing to metabolic flexibility, stress response and morphogenesis, hexose kinase enzymes play an essential role in the virulence of *C. albicans*.

In a second time, we explored the regulatory role of hexokinase 2 involved in glucose signalling, a regulatory pathway developed by microorganisms to promote the use of glucose. In *C. albicans*, the glucose repression system has been maintained overall, but the role of the various actors and more particularly of hexokinase 2 has never been specified. Our work showed that in the presence of glucose, hexokinase 2, *Ca*Hxk2, is relocated in the nucleus and negatively regulates the expression of alternative carbon metabolism genes. Targeted deletion experiments have shown that the catalytic function of hexokinase 2 is required to enable the enzyme to perform its regulatory function.

In parallel, we conducted a transcriptomic study by digital droplet PCR, as part of a technical project focused on the analysis of the transcription of metabolic genes during the very early phases of phagocytosis. Our work revealed a strong induction of genes belonging to alternative carbon metabolism pathways (ß-oxidation, neoglucogenesis, glyoxylic cycle).

Keywords: *Candida albicans*, glucose, glycolysis, hexokinase, glucokinases, glucose repression, dimorphism, virulence

Table des matières

Introduction *17*

I. Les levures du genre *Candida* **19**
A. Taxonomie et génomes 19
B. Habitat naturel des levures du genre *Candida* 21
C. Morphologie et sexualité 21
D. Les espèces pathogènes du genre *Candida* 25
E. Épidémiologie des Candidoses 25
1. Prévalence et physiopathologie 25
2. Facteurs de prédisposition 26
F. Les traitements antifongiques 26
1. Les composés ciblant la paroi fongique : Les Échinocandines 26
2. Les agents antifongiques ciblant la membrane plasmique. 27
a) Les composés azolés : 27
b) Les polyènes : 27
3. Les inhibiteurs de la synthèse protéique : les analogues de la pyrimidine 28
G. La résistance aux antifongiques : 30

II. *C. albicans* une levure pathogène opportuniste **32**
A. La relation avec l'hôte : entre commensalisme et pathogénicité 32
1. Le rôle du microbiote dans le maintien du commensalisme 32
2. Le rôle du système immunitaire dans le maintien du commensalisme 33
3. Rupture du commensalisme et transition vers l'état pathogène 35
B. Les facteurs de virulence de *C. albicans* 35
1. La transition morphologique 35
a) La voie de l'AMPc-PKA 36
b) La voie MAP Kinase 37
c) Les autres voies de signalisation gouvernant la morphogénèse 38
2. L'adhésion 39
3. Le biofilm 40
4. La sécrétion d'enzymes lytiques 42
5. La production de toxine 44
6. L'échappement au système immunitaire 45
a) Échapper à la phagocytose 45
b) Survie après la phagocytose 47
c) Résistance aux peptides antimicrobiens 48
7. La flexibilité métabolique de *C. albicans* 48

III. Rôle du métabolisme carboné central dans la virulence **49**
A. Le glucose est la source carbonée préférée des microorganismes : détection et transport 49
1. La voie Sugar Receptor Repressor (SRR) chez *S. cerevisiae* 49
2. La voie SRR chez *C. albicans* 50
3. La voie des récepteurs couplés aux protéines G chez S. *cerevisiae* 51
4. La voie des récepteurs couplés aux protéines G chez *C. albicans* 52
B. La métabolisation du glucose et son implication dans la virulence 53
1. La glycolyse 53
a) Première étape : la phosphorylation du glucose 55
b) Du glucose-6-phosphate au pyruvate chez les levures 58
2. Devenir du pyruvate 63
a) En anaérobie : la fermentation 64
b) En aérobie : le cycle de Krebs 65
C. Réseaux de régulation de la glycolyse 68
D. Optimisation de l'utilisation du glucose : la répression glucose 70
1. Les acteurs de la répression glucose chez *S. cerevisiae* 71

2. Les acteurs de la répression glucose chez *C. albicans* 75

IV. La flexibilité métabolique de *C. albicans* : support de la virulence 76

A. L'assimilation de sources carbonées alternatives est essentielle à la virulence de *C. albicans* 76

1. La ß-oxydation des lipides 79

2. Le cycle glyoxylique 81

3. La néoglucogenèse 84

B. La persistance des enzymes métaboliques permet l'adaptation rapide de la levure aux différents microenvironnements 86

Objectifs du projet de thèse 87

Résultats : Partie I 91

Les hexokinases et les glucokinases sont essentielles pour la physiologie et la virulence de la levure pathogène Candida albicans 93

I. Introduction 94

II. Analyse bioinformatique de la région génomique codant les enzymes de phosphorylation des hexoses *Ca*Hxk2, *Ca*Gkl1 et *Ca*Glk4 chez *C. albicans* 97

III. Construction des mutants de délétion des gènes codant les hexoses kinases chez *C. albicans* 100

IV. Contribution de l'hexokinase II et des glucokinases à l'alimentation du flux glycolytique 101

A. Dosage de l'activité hexokinase 101

B. Mesure des constantes cinétiques de l'hexokinase 2 et des glucokinases 1 et 4 103

V. Analyse transcriptionnelle des gènes *CaHXK2*, *CaGLK1* et *CaGLK4* et des enzymes correspondantes 104

A. L'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* dépend de la source carbonée 104

B. Existe-t-il un mécanisme de compensation au niveau transcriptionnel ? 106

C. L'expression des protéines *Ca*Hxk2 et *Ca*Glk1 est constitutive 107

VI. Implication de l'hexokinase II dans le mécanisme de répression glucose chez *C. albicans* 108

VII. Analyse phénotypique des mutants 112

A. L'hexokinase II est requise pour la croissance en présence d'hexose 112

B. L'hexokinase II est requise pour le dimorphisme de *C. albicans* 115

C. L'hexokinase II, mais pas les glucokinases, est essentielle pour permettre l'adaptation de la levure au stress de son environnement 117

D. L'hexokinase II est impliquée dans l'adhésion de la levure aux surfaces abiotiques 121

E. L'hexokinase 2 est nécessaire à la virulence de *C. albicans* en modèle insecte et macrophage 124

VIII. Discussion et perspectives 129

Publication 137

Résultats : Partie II 163

Étude des fonctions « moonlight » de l'hexokinase 2 et de leur implication dans le fitness et la virulence de C. albicans 75

I. Introduction 76

II. Identification des domaines portant les fonctions catalytiques et régulatrices de l'hexokinase 2 chez *C. albicans* et construction de mutants 78

III. L'acide aspartique D210 est-il impliqué dans la phosphorylation des hexoses chez *C. albicans* ? 79

IV. Le décapeptide K^6F^{15} et la thréonine 14 de l'hexokinase 2 sont-ils impliqués dans la répression glucose chez *C. albicans* ? 81

V. Le facteur de transcription *Ca*Mig1 est-il impliqué dans la répression glucose ? 176

VI. Analyse du phénotype des mutants ponctuels 177

A. La filamentation est affectée quand la fonction hexose kinase est perturbée 177

B. La virulence des mutants hexokinase diffère en modèle insecte *G. mellonella* et macrophage de souris (J774) 179

VII. Discussion & Perspectives 182

***Résultats : Partie III* 189**

Étude de la reprogrammation métabolique de la levure C. albicans au cours des phases précoces de la phagocytose par une approche innovante de droplet digital PCR 191

I. Introduction 192

II. Choix de la méthode et des cibles 194

III. Analyse transcriptomique par ddPCR du métabolisme de *C. albicans* au cours des phases très précoces de la phagocytose 196

A. Le métabolisme du glucose 196

B. Le métabolisme carboné alternatif 198

C. Les facteurs de virulence 199

IV. Conclusion et Discussion 200

***Conclusion générale et perspectives* 205**

***Matériels et Méthodes* 215**

I. Souches, milieux et conditions de culture 217

A. Les levures 217

1. Souches 217
2. Milieux 217
3. Conditions de culture 217
   a) Tester le dimorphisme 217
   b) Analyser la croissance au TECAN 217
   c) Analyser la croissance en hypoxie 218
   d) Analyser les variations du niveau d'expression des transcrits 218

B. Les bactéries 219

II. Méthodes de génétique et de biologie moléculaire 220

A. Transformation 220

1. Transformation des levures par la méthode du lithium acétate 220
2. Transformation des bactéries 220
   a) Préparation des cellules compétentes 220
   b) Transformation bactérienne par choc thermique 221

B. Construction des souches mutantes de *C. albicans* 221

1. Construction du mutant *Cahxk2Δ/Δ* 222
2. Complémentation de la mutation *Cahxk2Δ/Δ* 223
3. Construction du mutant *Caglk1Δ/Δ* par « Short Flanking Homology » 223
4. Construction du double mutant *Caglk1glk4Δ/Δ* 223
5. Construction du double mutant *Caglk1hxk2* et du triple mutant *Caglk1glk4hxk2Δ/Δ* 224
6. Construction des mutants *HXK2D210A*, *HXK2T15A et HXK2ΔK6F16* par mutagenèse dirigée 224
7. Construction des souches *CaHXK2*, *CaGLK1* et *CaGLK4* portant un tag GFP en C-terminal 226

C. Extraction, amplification, purification et quantification des acides nucléiques ... 226
1. ADN génomique de levure ... 226
2. ADN plasmidique d'*E. coli* ... 226
3. Amplification de séquence d'ADN par PCR ... 227
4. Extraction des ARNs totaux de levure par la méthode du phénol acide et synthèse des ADNs complémentaires ... 227
a) Extraction des ARNs totaux ... 227
b) Contrôle de la qualité des ARNs extraits ... 228
c) Traitement des ARNs à la DNAse Ambion ... 228
d) Réverse transcription : la synthèse des ADN complémentaires ... 229
5. Quantification des transcrits par qPCR ... 229
a) Principe de la qPCR ... 229
b) La réaction de qPCR ... 230
c) Quantification des transcrits par ddPCR ... 231

III. Techniques de biochimie ... 231
A. Extraction des protéines en conditions natives ... 231
B. Dosage de l'activité hexose kinase ... 232
C. Extraction des protéines en conditions dénaturantes ... 232
D. Western-Blot ... 233
E. Dosage de la concentration en glucose ... 233

IV. Méthodes d'infection ... 233
A. Infection des larves de Galleria mellonella avec *C. albicans* ... 233
B. Infection des macrophages de souris (J774) par *C. albicans* ... 234
1. Préparation des levures et des macrophages en vue de l'infection ... 234
2. Analyse de l'infection des macrophages par cytométrie en flux ... 235
3. Analyse de l'internalisation des levures par fluorimétrie ... 235
4. Extraction des levures internalisées ... 236

V. Méthodes cellulaires : la microscopie à fluorescence ... 236

VI. Protocoles d'adhésion et d'évaluation de la biomasse du biofilm ... 237

Communications ... 243

Références bibliographiques ... 249

Annexes ... 277

Introduction

I. Les levures du genre *Candida*

Le genre *Candida*, regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement polaire ou bipolaire, à paroi globalement bilamellaire et produisant ou non du mycélium ou du pseudomycélium.

A. Taxonomie et génomes

Les *Candida*, sont des microorganismes eucaryotes, appartenant au règne des champignons et au phylum des *Ascomycètes* (Fig. 1). Il y a trois sous-phylum chez les *Ascomycètes*, l'un d'entre eux, le sous-phylum des *Saccharomycotina*, contient la classe des *Saccharomycetes* et l'ordre des *Saccharomycétales* (Suh *et al.,* 2006). Cet ordre est composé de 16 familles dont deux, celle des *Saccharomycetaceae* et celle des *Saccharomycetales incertaes sedis,* qui regroupent respectivement les levures du genre *Saccharomyces* et *Candida*. Ces deux familles ont divergé il y a environ 170 millions d'années (Massey *et al.,* 2003 ; Wolfe and Shields, 1997). Au sein de la famille des *Saccharomycetales incertaes sedis,* un sous-groupe appelé clade CTG, regroupe la majorité des espèces de *Candida* pathogènes. Dans l'ordre des Saccharomycetales, un autre clade peut être distingué, le clade WGD (Whole Genome Duplication) regroupant des levures appartenant à la famille des *Saccharomycetaceae* ayant subit une duplication complète de leur génome, dont *S. cerevisiae* et *C. glabrata* (Diezmann *et al.,* 2004 ; Fitzpatrick *et al.,* 2006 ; Wolfe et Shields, 1997). *C. albicans* et *C. dubliniensis* ont divergé d'un ancêtre commun : *C. tropicalis* il y a environ 20 millions d'années (Fig. 1).

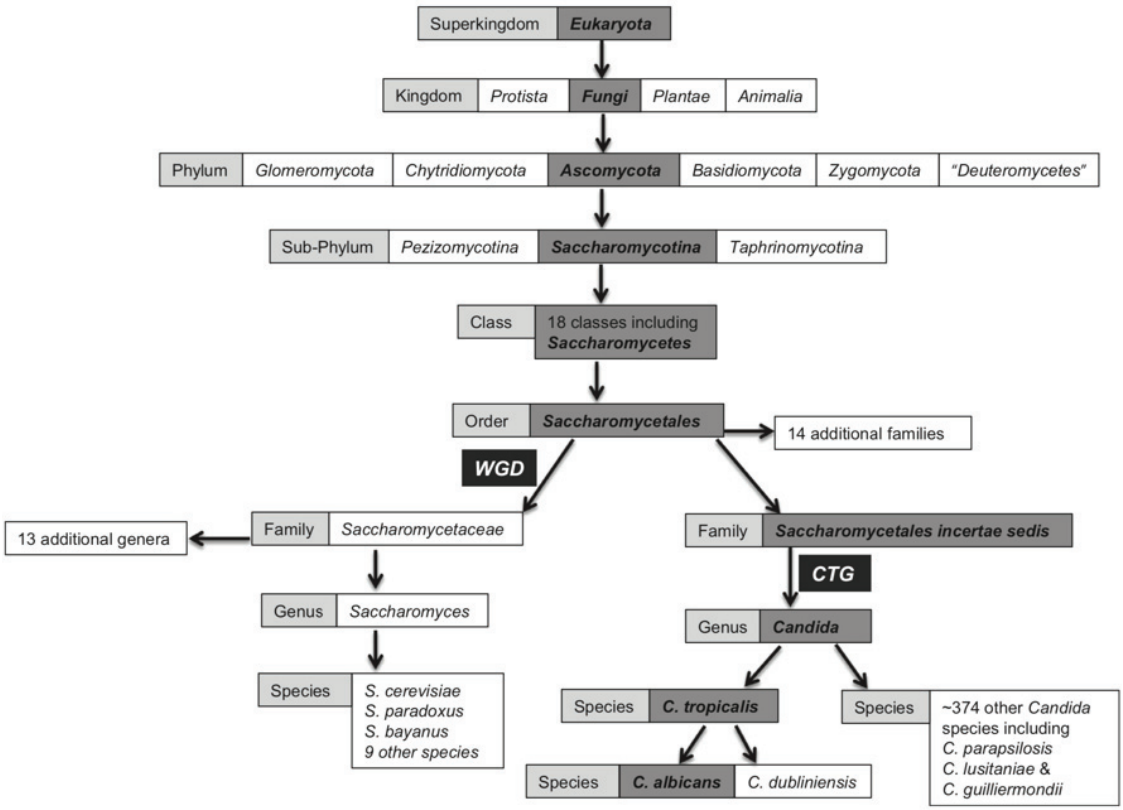


Figure 1 : Position actuelle des levures du genre Candida au sein du règne des champignons d'après McManus et Coleman, 2013.

Au sein du clade CTG, les levures du genre *Candida* possèdent majoritairement un génome diploïde (*C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. albicans*), bien que certaines espèces comme *C. lusitaniae* ou *C. guillermondii* soient haploïdes. La taille du génome des levures appartenant à ce clade, s'échelonne de 10,6 Mb (*C. guillermondii*) à 15,4 Mb (*Pichia stipitis*). Cependant, le nombre global de gènes est relativement similaire et compris entre 6000 et 7000. Chez *C. albicans*, le génome est composé de 8 paires de chromosomes, d'une taille allant de 0,95 Mb à 3,3 Mb. Le génome a une taille de 14,3 Mb et contient environ 6300 gènes (Chibana *et al.,* 2001). Majoritairement diploïde, le génome de *C. albicans* présente une grande plasticité. Des évènements fréquents de perte d'hétérozygotie et de larges réarrangements chromosomiques peuvent conduire à de l'aneuploïdie.

Comme mentionné précédemment, la plupart des levures du genre *Candida* appartiennent au clade CTG. Les membres de ce clade, se caractérisent par un usage alternatif du code génétique, où le codon CUG code pour une sérine au lieu d'une leucine. La première description de cet usage alternatif du codon CUG a été faite chez la levure *C. cylindracea* par Kawaguchi *et al.,* en 1989. Des études ultérieures ont mis en évidence que l'usage dégénéré du codon CUG existe chez 75 espèces de *Candida* (Sugita *et al.,* 1999) ainsi que chez certaines levures évolutivement proches, comme *Pichia stipitis*, *Debaryomyces hansenii* et *Lodderomyces elongisporus* (Fitzpatrick *et al.,* 2006). La capacité des levures du genre *Candida* à traduire le codon CUG en sérine repose sur l'apparition au cours de l'évolution d'un nouvel ARNt spécifique : $ARNt_{CAG}^{SER}$. Des études de génomique comparative et de phylogénie moléculaire ont mis en évidence que ce codon est apparu il y a environ 272 ± 25 millions d'années, soit avant la divergence des genres *Saccharomyces* et *Candida*, il y a 170 millions d'années (Massey *et al.,* 2003). Curieusement, la traduction de ce codon varie entre les espèces du genre *Candida*, suggérant une acquisition différente de ce mécanisme au cours de l'évolution. Chez *C. glabrata* et *C. krusei*, le codon CUG est uniquement traduit en leucine, tandis que *C. cylindracea* le traduit exclusivement en sérine. Chez la plupart des autres *Candida* dont *C. dubliniensis*, *C. zeylanoides* et *C. albicans,* le codon CUG peut indifféremment être décodé en sérine ou en leucine. *In vivo*, il a été démontré chez *C. albicans*, que dans 97% des cas le codon CUG est traduit en sérine et dans environ 3% des cas en leucine (Gomes *et al.,* 2007). Les conditions environnementales, comme les variations de pH sont susceptibles de moduler le taux d'intégration de la leucine sur le codon CUG jusqu'à 5% (Gomes *et al.,* 2007). En 2007, Gomes *et al.,* ont également démontré que *C. albicans* est capable de tolérer une intégration de la leucine à hauteur de 28%. Cet enrichissement en leucine entraine, une instabilité génomique, l'induction de la morphogenèse et la production des lipases et protéinases, qui sont connues pour être des facteurs de virulence (Gomes *et al.,* 2007 ; Miranda *et al.,* 2007). Ainsi, la diversité phénotypique engendrée par la double identité du codon CUG pourrait favoriser la pathogénicité de la levure.

C. albicans a donc élaboré au cours de l'évolution un mécanisme unique en son genre permettant de tirer parti de l'altération du code génétique. La traduction ambiguë du codon CUG a aussi un profond impact sur le protéome de *C. albicans*. En considérant que 2 acides aminés différents peuvent être introduits à chaque codon CUG, et sachant que le génome de *C. albicans* contient environ 13000 codons CUG répartis sur 6384 gènes, ce ne sont pas moins de 283 milliards de protéines différentes qui peuvent être produites (Gomes *et al.,* 2007).

B. Habitat naturel des levures du genre *Candida*

Les levures du genre *Candida* ne présentent aucune limitation dans leur répartition géographique et sont retrouvées sur tous les continents. Ces levures ont colonisé de nombreux écosystèmes tels que le sol, l'air ou l'eau. Certaines espèces sont commensales et se développent en association étroite avec un hôte animal (Homme, primates, oiseaux…) en colonisant les surfaces muqueuses.

C. albicans est une levure naturellement présente dans la flore commensale humaine, elle est notamment retrouvée au niveau du tube digestif, de la cavité orale et des muqueuses urogénitales chez près de 71% de la population mondiale (Ruhnke, 2002). En revanche, elle ne fait pas partie de la flore de la peau saine. *C. albicans* est parfaitement adaptée aux hôtes à sang chaud dans lesquels elle peut se multiplier et proliférer (Hiller *et al.,* 2011 ; Gow *et al.,* 2012). L'absence de réservoir écologique connu suggère que *C. albicans* a, au cours de l'évolution, sélectionné les traits lui permettant de persister de façon optimale au sein d'un hôte animal (Hofs *et al.,* 2016).

C. glabrata est également présente à l'état commensal à la surface des muqueuses digestives et uro-génitales chez 5 à 20% de la population mondiale (Eggiman, 2002 ; Warnock 2007). *C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei, C. kefyr* et *C. guillermondii* sont essentiellement des espèces saprophytes environnementales, mais peuvent secondairement être présentes en tant que commensales à la surface des muqueuses ou associées à l'épithélium cutané.

C. tropicalis a été détectée dans des niches écologiques variées comme le sol ou encore l'eau ainsi qu'en association avec certaines céréales. Cette espèce est également retrouvée dans la flore commensale humaine notamment au niveau du tractus respiratoire (Weinberger *et al.,* 2005) et représente environ 4% des *Candida* isolées chez l'Homme.

C. kefyr est principalement détectée dans les produits industriels issus d'un processus de fermentation. Cependant, lors de la consommation de ces aliments, *C. kefyr* peut s'implanter et coloniser la muqueuse digestive. Elle est plus rarement retrouvée au niveau de la muqueuse urinaire.

C. Morphologie et sexualité

La plupart des *Candida* dont *C. albicans* se caractérisent par une grande variabilité morphologique et peuvent se développer sous forme de blastospore (cellule ovoide), de pseudomycélium, de mycélium vrai ou de chlamydospore.
En laboratoire, dans des conditions classiques de culture, en milieu liquide riche (YPG 2%), *C. albicans* se présente sous la forme d'une cellule ovoïde de 2 à 5 µm de diamètre (blastospore), se multipliant par bourgeonnement (Fig. 2A).

Le pseudomycélium est une forme filamenteuse particulière, produite lorsque le bourgeon d'une cellule mère se développe de façon tubulaire et cylindrique, donnant ainsi naissance à une cellule fille très allongée. Après la formation de la cloison, la cellule fille reste attachée à la cellule mère et bourgeonne à son tour. Il en résulte la formation d'une structure plus au moins longue présentant des étranglements au niveau des sites de septation. Le développement de blastospores par bourgeonnement, au niveau de ces zones de constriction, donne naissance à des ramifications latérales et confère au pseudomycélium un aspect buissonnant (Fig. 2B).

Quelques espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. dubliniensis*) ont aussi la capacité de différencier un mycélium vrai. En présence de signaux inducteurs de la

filamentation, le bourgeon porté par la cellule mère croit rapidement et donne naissance à une structure très allongée appelée tube germinatif. Cette structure mesure 2 à 3 fois la taille de la cellule mère et présente un diamètre régulier d'environ 2 µm. À ce stade, il existe une continuité cytoplasmique entre la cellule mère et le tube germinatif. Le noyau de la blastospore migre dans le tube en formation et entre en mitose. L'un des deux noyaux retourne dans la cellule mère, tandis que le second demeure dans le tube germinatif. La croissance du tube germinatif est polarisée et a lieu exclusivement au niveau apical, où la fusion de vésicules avec la membrane plasmique entraine l'élongation de l'hyphe. Au fur et à mesure de son allongement, l'hyphe se cloisonne et se ramifie ce qui lui confère un aspect arborescent (Fig. 2C). L'hyphe est donc composé d'articles cylindriques uninucléés, séparés par des septa. Ces cloisons ne sont pas totalement imperméables, puisqu'un pore central d'environ 25 nm de diamètre persiste et permet d'assurer la continuité cytoplasmique et l'échange de matériel entre les différents articles de l'hyphe. Contrairement au pseudomycélium, la formation des cloisons ne créée pas de zone de constriction, ainsi le diamètre de l'hyphe est régulier sur toute sa longueur (Fig. 2C).

La forme chlamydospore, caractéristique de *C. dubliniensis* et *C. albicans,* a longtemps été utilisée comme critère d'identification de ces deux espèces en mycologie médicale. Principalement observées *in vitro*, les chlamydospores sont des structures 3 à 4 fois plus massives que les blastospores, se formant généralement à l'extrémité de l'hyphe (Fig. 2D). Ces cellules mesurent 6 à 15 µm de diamètre et présentent une paroi épaissie et réfringente. *In vitro*, le programme génétique conduisant à la formation des chlamydospores est induit par la carence en nutriments et la limitation en O_2 (micro-aérobiose) (Staib et Morschhäuser, 2007). La formation des chlamydospores résulterait d'un processus de condensation d'article mycélien. Le rôle de ces structures dans la physiologie et le fitness de *C. albicans* n'est pas clairement compris. En effet, cette morphologie ne semble pas ou peu impliquée dans la pathogénicité de *C. albicans* (Chabasse *et al.,* 1988, Cole *et al.,* 1991). Les chlamydospores constitueraient une forme de résistance, permettant à la levure de persister dans des environnements défavorables (Staib et Morschhäuser, 2007).

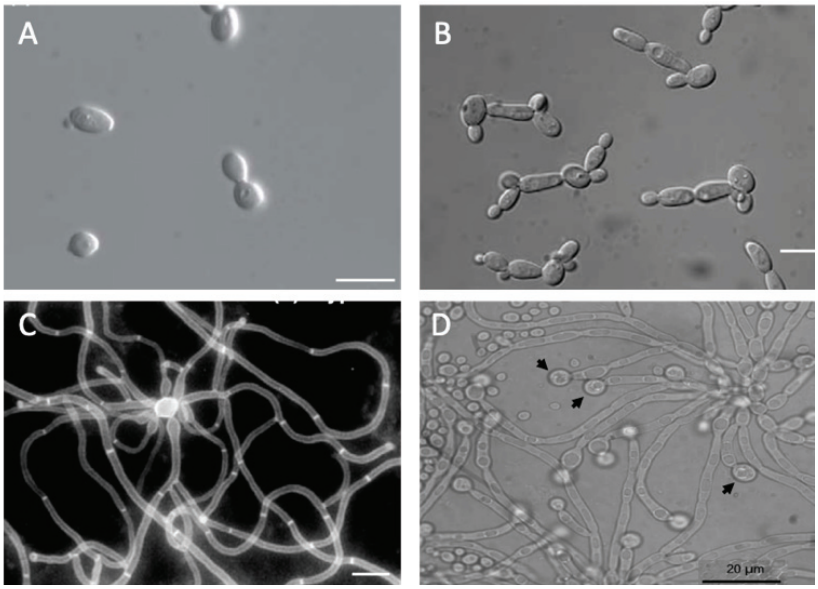


Figure 2 : Vue d'ensemble des différentes formes morphologiques de C. albicans. (A) Aspect microscopique des cellules sous forme blastospore. (B) Aspect microscopique des cellules se développant sous la forme de pseudomycélium. (C) Photographie en microscopie optique de cellules ayant différencié un mycélium vrai. (D) Les flèches noires pointent les chlamydospores formées à l'apex des hyphes de C. albicans. Sauf mention contraire, la barre d'échelle correspond à une longueur de 10 µm. Figure adaptée de Sudbery, Gow et Berman, 2004.

Chez *C. albicans* deux états morphologiques supplémentaires désignés sous les termes « White » et « Opaque » ont été décrits (Srikantha et Soll, 1993). Le phénotype white, désigne des colonies blanches, bombées reposant sur un mycelium qui s'enfonce dans la gélose. Le phénotype opaque désigne des colonies plates et légèrement translucides. Les blastospores opaques sont environ deux fois plus grosses que celles du phénotype white et présentent une plus grande résistance aux antifongiques. La transition white-opaque est un phénomène réversible qui survient naturellement à une fréquence assez faible. Cependant, quelques facteurs environnementaux comme l'élévation de la température et l'anaérobiose sont susceptibles de favoriser la transition (Vinces et Kumamoto, 2007 ; Ramirez-Zavala *et al.,* 2008).

La multiplication des levures du genre *Candida* est principalement asexuée et se fait par simple codiniogenèse blastique, c'est-à-dire qu'une nouvelle spore est formée à partir d'une cellule mère par bourgeonnement. Cependant, chez certaines espèces de *Candida*, une forme de reproduction sexuée a été décrite. Jusqu'au début des années 1999, *C. albicans* est supposée être une levure asexuée se reproduisant exclusivement de façon clonale. Le séquençage du génome (Braun *et al.,* 2005 ; Jones *et al.,* 2004) et les travaux Hull et Jonhson ont permis de mettre en evidence l'existence sur le chromosome 5, des gènes *MTLa* et *MTLα* contrôlant la reproduction sexuée chez *C. albicans* (Hull et Jonhson, 1999). La reproduction sexuée nécessite l'homozygotie à ce locus, ce qui conduit à la fusion des cellules donnant naissance à une levure transitoirement tétraploïde. Une réduction chromatique par perte aléatoire de chromosome permet par la suite de revenir au stade diploïde. Cette reproduction sans méiose et donc sans brassage génétique, est définie sous le terme de parasexualité. Le phénotype opaque de *C. albicans* présente une capacité 1000 fois supérieure à développer ce type de sexualité que le phénotype white.

Comme toutes les cellules fongiques, les levures du genre *Candida* sont entourées par une paroi (Fig. 3). Cette structure située à l'interface avec le milieu extérieur définit la façon dont la levure interagit avec son environnement. Dans le cas des levures pathogènes, la paroi constitue le point de contact avec l'hôte et son système immunitaire. La paroi est une structure rigide ayant pour fonction de maintenir la forme de la cellule et de garantir l'intégrité de la levure, en la protégeant contre les agressions de son environnement (Sheperd, 1987). Trois éléments structuraux majeurs composent cette paroi. Des polymères de mannose (mannanes), de glucose (ß1-3 et ß1-6 glucanes) et de de N-acétylglucosamine (chitine). Ces différents polymères représentent respectivement 40, 60 et 2% du poids sec de la paroi (Sheperd, 1987). L'analyse structurale, en microscopie électronique à transmission, a permis de révéler l'organisation multi-couche de la paroi (Poulain *et al.,* 1978). Les glucanes et la chitine qui forment le « squelette » de la paroi, sont situés dans les couches profondes, à proximité de la membrane plasmique (Fig. 3). Ces polymères s'assemblent par le biais de liaisons hydrogène pour former un réseau tridimensionnel complexe et rigide de microfibrilles. Les couches externes de la paroi sont essentiellement composées de protéines fortement glycosylées. Ces protéines sont directement ancrées aux glucanes constituant la paroi par le biais d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) et sont décorées de polymères de mannoses par le biais de réaction de N et O-glycosylation (Fig. 3). Parmi les protéines pariétales identifiées, des enzymes impliquées dans le remodelage de la paroi (glucanases, protéinases, chitinases), des protéines structurales, des adhésines, des récepteurs, des protéines de choc thermique et des enzymes glycolytiques ont notamment été trouvées. Ces

protéines jouent un rôle essentiel dans l'adhésion, la formation de biofilm et la virulence de *C. albicans* (Klis *et al.,* 2001 ; Hall, 2015).

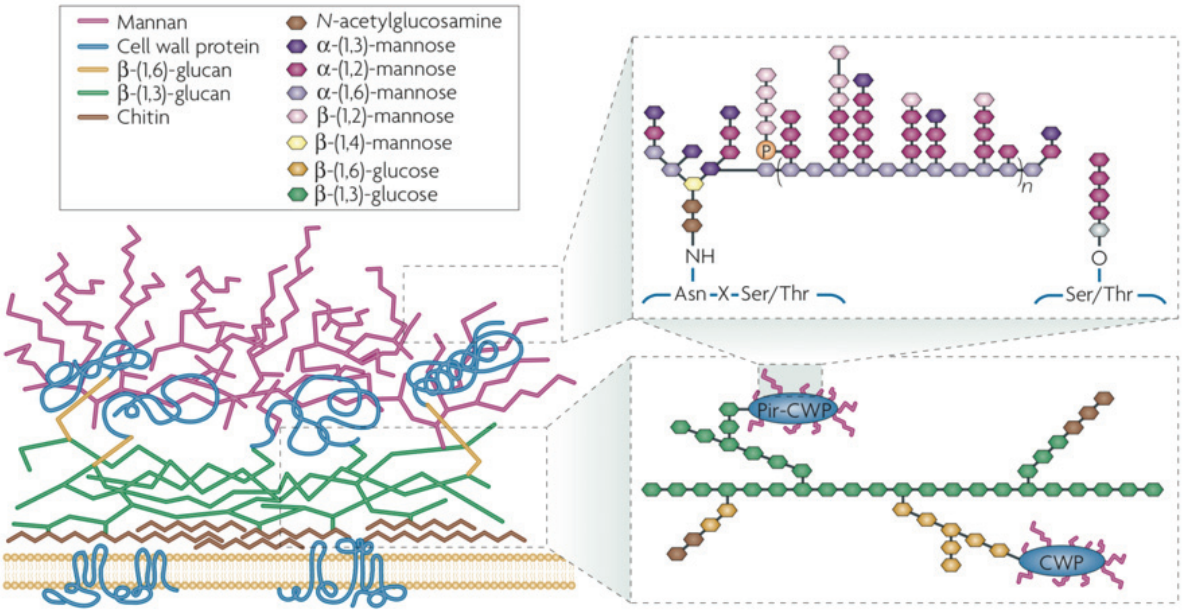


Figure 3 : Représentation schématique des différents éléments constitutifs de la paroi de C. albicans et de leur distribution au sein de cette structure. Les ß-(1-3) glucanes et la chitine constituent le « squelette » de la paroi et sont localisés dans la couche interne de la paroi, proche de la membrane plasmique. La couche externe est enrichie en protéines qui sont attachées au squelette par le biais d'ancre GPI. Les encarts supérieurs et inférieurs montrent respectivement la structure des mannanes et des glucanes (Netea et al., 2008)

La paroi est une structure dynamique dont la composition change en fonction de l'état morphologique et physiologique de la cellule (Staniszewska *et al.,* 2013). Chez *C. albicans* la paroi de l'hyphe est composée de polymères de glucose liés en ß-(3,6) et ß-(2,3), qui sont uniquement retrouvés dans la forme hyphale (Lowman *et al.,* 2014). De plus, de nombreux facteurs environnementaux sont susceptibles de moduler la structure de la paroi ainsi que ses propriétés physico-chimiques (Bensen *et al.,* 2004 ; Hromatka *et al.,* 2005 ; Bruno *et al.,* 2010).

La croissance en présence de lactate, qui est une source carbonée physiologique, présente notamment à la surface des muqueuses, réduit l'épaisseur des couches de chitine, de glucane et de mannane composant la paroi, ce qui a pour conséquences d'augmenter l'élasticité et l'hydrophobicité de la paroi (Ene *et al.,* 2012). *In vivo*, ces modifications se traduisent par une virulence exacerbée de la levure en modèle murin (Ene *et al.,* 2012). Enfin, bien que la chitine n'entre que pour un faible pourcentage dans la composition de la paroi, de subtils changements dans sa concentration modifient drastiquement la physiologie du champignon. Ainsi, une augmentation de la teneur en chitine de 10%, augmente sensiblement la résistance de *C. albicans* aux antifongiques et sa reconnaissance par le système immunitaire (Mora-Montes *et al.,* 2011 ; Lee *et al.,* 2012).

D. Les espèces pathogènes du genre *Candida*

Le genre *Candida* regroupe environ 200 espèces différentes dont une dizaine seulement sont potentiellement pathogènes de l'Homme. Les infections fongiques représentent 15% des infections nosocomiales mondiales (Delaloye *et al.,* 2014) et dans plus de 80% des cas, des levures du genre *Candida* sont impliquées. Au niveau mondial, *C. albicans* est l'espèce la plus fréquemment isolée chez les patients atteints de candidose. Environ deux tiers des candidoses sont liées à cette espèce (Weinberger *et al.,* 2005).

Cependant, au cours des deux dernières décennies, la détection d'autres espèces jusque-là peu impliquées en pathologie humaine a explosé. Une étude menée en collaboration avec plusieurs hôpitaux a mis en évidence que, dans une cohorte de 136 patients souffrant de candidémie, 43 % des cas étaient liés à une espèce non-*albicans* (Delaloye *et al.,* 2014). L'augmentation de la prévalence de ces espèces s'explique en partie par leur résistance intrinsèque à certains antifongiques (Delaloye *et al.,* 2014).

Dans l'hémisphère nord, *C. glabrata* est la deuxième espèce la plus fréquemment isolée chez les patients souffrant de candidose invasive et semble impliquée dans 10 à 20% des candidémies (Eggimann *et al.,* 2003 ; Tortorano *et al.,* 2004). Cette espèce est le plus souvent retrouvée chez des malades ayant un âge avancé (Hajjeh *et al.,* 2004). Curieusement, dans l'hémisphère sud (Amérique latine) la deuxième place est occupée par *C. parapsilosis* (Delaloye *et al.,* 2014). Les autres espèces de *Candida* représentent environ 1% des cas de candidémies annuelles, bien que la prévalence de certaines espèces tende encore à augmenter c'est notamment le cas de *C. lusitaniae* et plus récemment de *C. auris,* une nouvelle espèce de *Candida* identifiée pour la première fois au Japon en 2009 (Satoh *et al.,* 2009).

E. Épidémiologie des Candidoses

1. Prévalence et physiopathologie

Au cours des deux dernières décennies, l'augmentation de la population à risque et l'utilisation massive des thérapies antifongiques ont conduit à l'explosion de la prévalence des infections fongiques. Lorsqu'elle acquiert son comportement pathogène, *C. albicans* peut être responsable d'une large gamme d'infections allant de la candidose superficielle (mycoses) aux candidoses profondes ou systémiques (candidémies) (Sobel, 1988 ; Pfaller et Diekema, 2007).

C. albicans est responsable de près de 95% des candidoses superficielles colonisant des tissus comme la peau, les ongles, les cheveux et les muqueuses orales et génitales. Ce sont des infections fréquentes, localisées et bégnines, touchant les personnes immunocompétentes ou immunodéprimées. La mortalité associée à ces pathologies est très faible de l'ordre de quelques pourcents.

Dans le cas des candidoses systémiques, les tissus profonds sont colonisés par le pathogène et ce dernier est disséminé par voie sanguine. *C. albicans* est impliquée dans la moitié des cas de candidémies, infections qui surviennent chez des personnes fortement immunodéprimées. Ce sont des infections préoccupantes du fait de la mortalité qu'elles engendrent, le taux de létalité s'échelonnant de 40 et 75%. D'après certaines études, un patient restant plus de 7 jours en unité de soins intensifs ou réanimation aurait 6 chances sur 1000 de contracter une candidose profonde. L'introduction de matériel médical dans l'organisme au cours d'actes de

chirurgie augmente le risque de développer une candidémie car les surfaces abiotiques permettent l'adhésion et la dissémination du pathogène.

2. Facteurs de prédisposition

De nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques sont susceptibles de favoriser le développement de candidoses superficielles ou systémiques. Les facteurs intrinsèques sont notamment liés à la condition physiologique de l'hôte. Ainsi, les nouveaux nés et les personnes âgées présentent un risque plus élevé de développer des candidoses. Certains facteurs locaux, comme la transpiration, la macération, le port de vêtements synthétiques, ainsi que les microlésions cutanées, favorisent le développement des candidoses. Enfin, certains états pathologiques sous-jacents, comme un diabète mal équilibré, ou des pathologies affectant le système immunitaire (leucémie, VIH) fournissent un terrain propice au développement des candidoses systémiques. Les facteurs extrinsèques sont essentiellement liés à la prise de thérapie immunosuppressive affaiblissant le système immunitaire de l'hôte (antibiothérapie large spectre au long cours, corticothérapie, chimiothérapie, radiothérapie, …).

F. Les traitements antifongiques

En quelques décennies, les infections fongiques sont passées de cas isolés suscitant la curiosité du corps médical, à un problème de santé publique majeur. L'explosion des cas d'infections fongiques est liée à l'augmentation de la prévalence des terrains à risque et nécessite une prise en charge adéquate pour assurer la survie des patients. L'arsenal d'antifongiques actuellement à la disposition du corps médical permet de traiter efficacement ces infections, bien que de plus en plus de cas de résistance soient décrit. Pour limiter les phénomènes de toxicité croisée, les antifongiques doivent cibler des éléments ou des mécanismes spécifiques des champignons et des levures. Les trois grandes familles d'antifongiques disponibles actuellement ciblent : les stérols de la membrane plasmique, la paroi cellulaire, ou encore des enzymes impliquées dans des voies métaboliques propres à ces microorganismes (Fig. 4).

1. Les composés ciblant la paroi fongique : Les Échinocandines

On désigne sous le terme Échinocandine, une grande famille de molécules à action antifongique, composées à minima d'un noyau hexapeptidique et d'une chaine d'acide gras. Trois échinocandines : la caspofungine, la micafungine et l'anidulfungine sont actuellement disponibles sur le marché. Ces molécules agissent comme des inhibiteurs non compétitifs de la ß-(1,3)-D-glucane synthase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse de la paroi des cellules fongiques. La déplétion en glucane fragilise la paroi cellulaire et conduit à une instabilité osmotique qui finit par entrainer la mort de la cellule (Fig. 4). La ß-(1,3)-D-glucane synthase est une enzyme complexe constituée de 2 sous-unités membranaires, Fks1 et Fks2. Les protéines transmembranaires Mid2 et Wsc1 sondent en permanence l'état de la paroi et déterminent les besoins de synthèse qui seront transmis aux sous-unités Fks. Chez *C. albicans*, la délétion de la sous-unité *Ca*Fks1 conduit à la résistance aux échinocandines suggérant qu'elle est la cible de ces molécules. Les échinocandines présentent une action fongicide/ fongistatique large spectre (Tableau 1).

2. Les agents antifongiques ciblant la membrane plasmique.

Chez les eucaryotes, les membranes sont riches en stérols. Ces derniers jouent un rôle important dans le maintien de la fluidité de ces structures. Le principal stérol constituant la membrane plasmique des champignons et des levures est l'ergostérol, tandis que son équivalent chez les mammifères est le cholestérol. Ces molécules sont synthétisées par des voies métaboliques complexes (Fig. 4) assez bien conservées au cours de l'évolution. Chez les champignons, l'ergostérol possède une activité « hormone-like » et est notamment requis pour la progression du cycle cellulaire (White *et al.,* 1998 et Hitchcock, 1993).

a) Les composés azolés :

Les antifongiques azolés sont des molécules synthétiques composées d'un noyau azole comportant deux (imidazolés) ou trois (triazolés) atomes d'azote. Les dérivés azolés ont tous le même mode d'action, ils altèrent la structure de la membrane fongique en ciblant la voie de biosynthèse de l'ergostérol selon un mécanisme moléculaire largement étudié (Vanden Bossche *et al.,* 1993, 1998, et White *et al.,* 1998) (Fig. 4). Brièvement, le noyau azole se fixe à l'atome de fer contenu dans le site actif de la C-14-α-lanostérol déméthylase (ou P450), inhibant ainsi son activité. Cette enzyme clé, codée par le gène *ERG11*, est requise pour enlever un groupement méthyl sur le lanostérol, et son blocage entraine non seulement une diminution de la biosynthèse d'ergostérol, mais aussi l'accumulation de C-14-méthyl-3,6-diol, toxique pour la cellule (Fig. 4). La déplétion en ergostérol impacte négativement la fluidité de la bicouche lipidique mais aussi l'activité de nombreuses enzymes transmembranaires (Vanden Bossche *et al.,* 1985 ; Barrett-Bee *et al.,* 1991). Les voies de biosynthèse de l'ergostérol et du cholestérol étant relativement proches, les composés azolés de première génération (imidazolés) pouvaient être responsables d'une toxicité croisée non négligeable sur les cellules de l'hôte. Le passage de deux à trois atomes d'azote sur le noyau azole a permis de renforcer la spécificité de ces molécules pour la C-14-α-lanostérol déméthylase des champignons et ainsi diminuer les effets secondaires chez l'Homme. Présentant une activité fongistatique large spectre, et en raison de leur efficacité, les composés azolés ont, pendant plusieurs décennies, été massivement utilisés à la fois de manière curative mais aussi préventive, conduisant à la sélection de nombreuses résistances (Tableau 1).

b) Les polyènes :

Isolés des bactéries du genre *Streptomyces* il y a près de 70 ans, les polyènes demeurent aujourd'hui encore l'une des classes d'antifongiques les plus efficaces pour lutter contre les infections fongiques systémiques. Les principaux représentants de cette famille sont l'Amphotéricine B (Fongizone®) et la Nystatine (Mycostatine®) qui sont respectivement produits par *Streptomyces nodosus* et *Streptomyces nourseï*. Ces molécules possèdent une action fongicide large spectre (Tableau 1). Pendant des années, le dogme a été de considérer que l'action fongicide des polyènes reposait sur leur capacité à établir des liaisons covalentes avec l'ergostérol et à former des pores dans la membrane plasmique, entrainant un déplacement incontrôlé des électrolytes et une perte du potentiel de membrane conduisant à la mort de la cellule (Cass, Finkelstein et Krespi, 1970). Cependant, une récente étude (Anderson *et al.,* 2014) remet en cause ce modèle et suggère que l'Amphotéricine B s'agrègerait à la surface de la membrane plasmique du champignon et agirait comme une

« éponge » en extrayant l'ergostérol de la bicouche lipidique (Fig. 4). L'altération des propriétés biophysiques de la membrane entrainerait alors la mort de la cellule. Bien que très efficaces, ces molécules ne sont pas dénuées d'effets indésirables. En effet, la proximité structurale entre l'ergostérol et le cholestérol est telle, que les polyènes vont aussi agir sur les cellules de l'hôte entrainant des atteintes rénales, parfois fatales. Les avancées médicales ont permis la mise en place de nouvelles formulations réduisant la néphrotoxicité mais augmentant les coûts de production. Pour toutes ces raisons, les polyènes constituent généralement la dernière ligne de défense contre les infections fongiques invasives.

3. Les inhibiteurs de la synthèse protéique : les analogues de la pyrimidine

La 5-fluorocytosine (5-FC, Ancotil®) est un dérivé fluoré synthétique de la cytosine. Cette molécule pénètre dans les cellules fongiques par le biais d'une cytosine perméase, puis est successivement convertie en 5-fluoro-uracile (5-FU) et en 5-fluoro-uridylate (5-FUMP). En fonction du chemin métabolique emprunté, la 5-FUMP, peut être transformée soit en 5-fluoro-UTP (5-FUTP) soit en 5-fluoro-2'-déoxyuridylate (5-FdUMP) responsables respectivement d'un blocage de la synthèse protéique par remplacement de l'uridine dans les ARN et de l'inhibition de la biosynthèse de l'ADN par inhibition de la thymidylate synthétase (Fig. 4) (Papon *et al.,* 2007). Les enzymes nécessaires à la métabolisation de la 5-FC sont présentes chez la plupart des levures pathogènes du genre *Cryptococcus* et *Candida* mais n'ont pas ou peu été conservées chez les champignons filamenteux. Les analogues de la pyrimidine ont donc un spectre d'action plus limité que les autres antifongiques (Georgopapadakou *et al.,* 1996) (Tableau 1). Cependant, leur excellente diffusion tissulaire, y compris à travers la barrière hémato-encéphalique les rendent particulièrement efficaces pour traiter les méningites à *Cryptococcus* et les candidoses profondes (Day JN *et al.,* 2013).

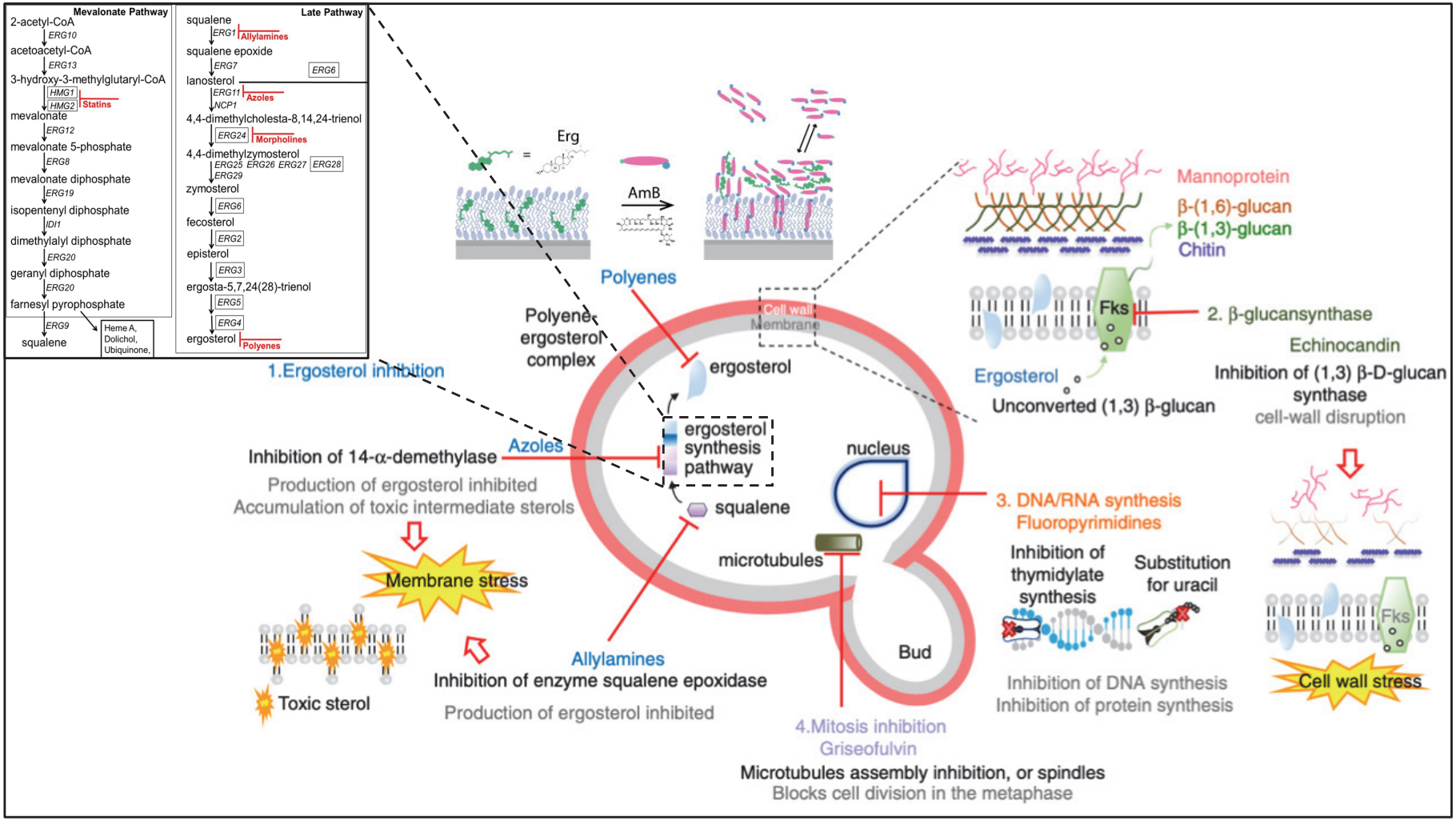


Figure 4 : Mode d'action des principaux antifongiques. Sur la gauche du schéma, sont figurés les antifongiques agissant sur la membrane plasmique des champignons : les polyènes, les composés azolés et les allylamines. Les azolés et les allylamines agissent à différents niveaux sur la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Cette voie métabolique présentée dans l'encart supérieur gauche et les antifongiques ciblant cette voie sont indiqués en rouge. Les polyènes agissent sur le produit final de la voie : l'ergostérol. Les polyènes s'agrègent à la surface de la membrane plasmique et extraient l'ergostérol. La partie supérieure droite du schéma présente le mode d'action des échinocandines, qui inhibent le fonctionnement de la ß-D glucane synthase. Enfin, dans la partie inférieure droite, le mode d'action des analogues de la pyrimidine est récapitulé. Figure adaptée (Martinez et Falson, 2014).

Agents antifongiques														
		Polyène	Dérivés azolés				Echinocandines						Analogue pyrimidine	
		Fongicide	Fongistatiques										Fongicide	
Organismes		AmB	Flu	Itr	Vor	Pos	Cas		Mica		Ani		5-FC	
Aspergillus	*A. flavus*	±	-	++	++	++	Fongistatique	+	Fongistatique	+	Fongistatique	+	-	
	A. fumigatus	++	-	±	++	++		+		+		+	-	
	A. niger	++	-	±	++	++		+		+		+	-	
Candida	*C. albicans*	++	++	++	++	++	Fongicide	++	Fongicide	++	Fongicide	++	±	
	C. glabrata	-	±	±	++	++		+		+		+	++	
	C. krusei	++	-	±	++	++		++		++		++	-	
	C. lusitaniae	-	++	++	++	++		++		++		++	++	
	C. parapsilosis	++	++	++	++	++		++		++		++	++	
Cryptococcus neoformans		++	++	++	++	++	-		-		-		++	
Coccidioides immitis		++	++	++	++	++	-		-		-		-	
Blastomyces dermatitidis		++	+	++	++	++	-		-		-		-	
Histoplasma capsulatum		++	+	++	++	++	-		-		-		-	
Fusarium spp		+	-	+	++	++	-		-		-		-	

Tableau 1 : Spectre d'activité des principaux antifongiques sur les levures et champignons pathogènes de l'Homme. Les symboles ++ et + indiquent que l'antifongique est actif sur l'organisme spécifié. Les signes – traduisent l'absence d'effet de l'antifongique sur l'espèce considérée. Les signes ± indiquent que l'activité de l'antifongique sur l'organisme spécifié est variable (dose dépendante). AmB, Amphotéricine B ; Flu, Fluconazole ; Itr, Itraconazole ; Vor, Voriconazole ; Pos, Posaconazole ; Cas, Caspofungine ; Mica, Micafungine ; Ani, Anidulafungine ; 5-FC, 5-fluorocytosine.

G. La résistance aux antifongiques :

Chez les bactéries, l'utilisation systématique des antibiotiques a conduit à la sélection de clones naturellement résistants à la quasi-totalité de l'arsenal thérapeutique. La grande plasticité des génomes bactériens et la capacité de ces organismes à échanger, par le biais de transferts horizontaux, du matériel génétique ont largement contribué à la diffusion rapide des résistances. Chez les champignons, l'absence de transfert direct de matériel génétique entre espèces laissait présager une propagation plus lente des résistances aux composés antifongiques. Pendant de nombreuses années, les antifongiques ont donc été utilisés de façon massive et déraisonnée, et aujourd'hui le nombre de souches présentant des résistances plus ou moins importantes aux thérapies explose. Les grands mécanismes moléculaires pouvant conduire à l'acquisition de résistances sont :

- Un défaut d'import de la molécule antifongique dans la cellule
- La mise en place de pompe à efflux pour éliminer le composé toxique de la cellule
- Une modification ou disparition de la cible de l'antifongique
- Une surproduction de la cible

Ces différents mécanismes sont décrits de façon synthétique dans la figure 5.

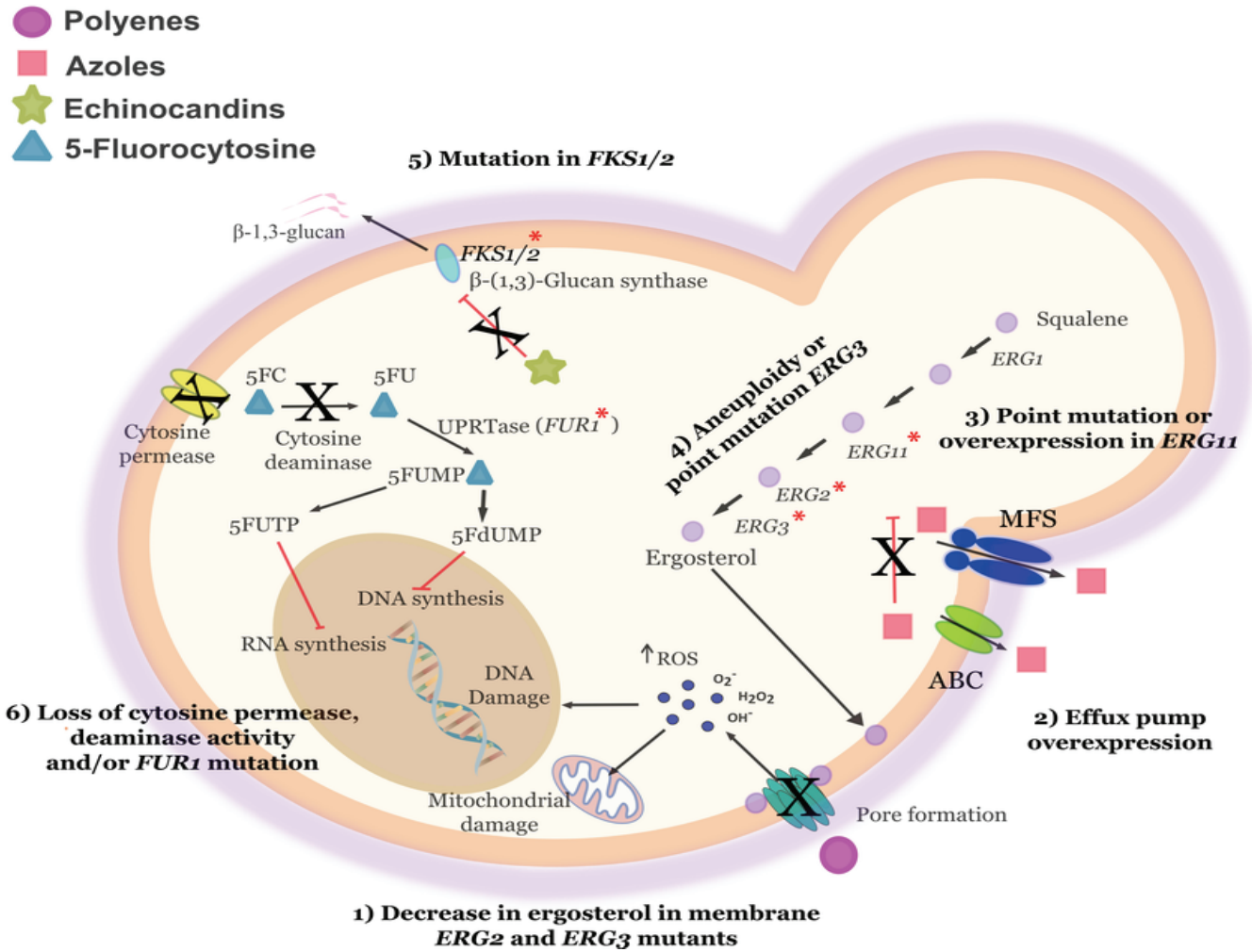


Figure 5 : Schéma présentant les différents mécanismes adoptés par les cellules fongiques pour résister aux antifongiques. Les différentes classes d'antifongiques sont représentées par des symboles colorés. La résistance aux polyènes résulte principalement de la diminution de la proportion d'ergostérol dans la membrane plasmique du champignon. La résistance aux composés azolés implique différents mécanismes (i) la mise en place d'un système actif d'efflux permettant de faire sortir rapidement l'antifongique de la cellule, qui ne peut plus agir sur sa cible (ii) des mutations ponctuelles au niveau la voie de biosynthèse de l'ergostérol, conduisant à l'altération, à la disparition ou à la surexpression de la cible de l'antifongique, (iii) des phénomènes d'aneuploïdie sont également capables de fournir à la cellule une résistances aux azolés. L'acquisition d'une résistance aux échinocandines repose essentiellement sur des mutations ponctuelles des sous-unité Fks de la ß-Glucane synthase, empêchant l'interaction entre l'antifongique et sa cible. Enfin, la résistance à la 5-Fluorocytosine peut être liée (i) à un défaut d'import de l'antifongique dans la cellule par disparition de la cytosine perméase, ou (ii) à la disparition de la cytosine deaminase, responsable de la conversion de la 5-FC en sa forme toxique.

II. *C. albicans* une levure pathogène opportuniste

A. La relation avec l'hôte : entre commensalisme et pathogénicité

Près de 70% de la population mondiale est porteuse asymptomatique de *C. albicans* au niveau de la muqueuse intestinale (Ruhnke, 2002). Chez un individu sain et immunocompétent, l'action combinée de la flore bactérienne endogène et du système immunitaire permettent de maintenir la population fongique à une faible densité et à l'état commensal.

1. Le rôle du microbiote dans le maintien du commensalisme

En tant que commensale ou pathogène, *C. albicans* colonise de nombreuses niches au sein de son hôte. Dans la plupart de ces environnements, des relations antagonistes ou de synergie s'établissent entre *C. albicans* et les bactéries localement présentes. Ces interactions polymicrobiennes ont été particulièrement bien étudiées car elles sont susceptibles de moduler drastiquement la pathogénicité de la levure. Au niveau de la cavité orale par exemple, *C. albicans* interagit avec des bactéries du genre *Streptococcus* (*S. mutans*, *S. salivarius*, *S. gordonii*) (Bagg et Silverwood, 1986 ; Holmes *et al.,* 1996). Ces interactions favorisent le développement hyphal de *C. albicans*, la formation de biofilms, l'adhésion et la colonisation de la muqueuse orale (Bamford *et al.,* 2009). Dans les poumons, *Pseudomonas aeruginosa* produit des composés capables de tuer spécifiquement les cellules hyphales de *C. albicans* (Hogan et Kolter, 2002). Cependant, chez les patients immunodéprimés, l'élastase produite par *P. aeruginosa* endommage les tissus de l'hôte et favorise la dissémination de *C. albicans* (Neely *et al.,* 1986). L'état physiologique de l'hôte est donc un facteur modulant la nature de ces interactions polymicrobiennes. Au niveau du tractus digestif, de nombreuses interactions antagonistes entre *C. albicans* et *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et des bactéries du genre *Lactobacillus* ont été décrites. De nombreuses études cliniques démontrent que dans plus de la moitié des cas de candidose systémique, l'origine de l'infection est une colonisation anormale de la muqueuse intestinale (Nucci et Anaissie, 2001). Ceci suggère que le microbiote intestinal endogène joue un rôle crucial dans le maintien du commensalisme.

Le rôle des lactobacilles dans le contrôle des populations de *C. albicans* a été particulièrement étudié. L'habitat de ces bactéries gram positives est principalement situé au niveau des microbiotes de la muqueuse vaginale et du tube digestif (Felis *et al.,* 2007 ; Watter, 2008). De nombreuses études ont mis en évidence la relation antagoniste entre les lactobacilles et *C. albicans* (Wagner *et al.,* 1997 ; Manzani *et al.,* 2006 ; Khöler *et al.,* 2012 ; Parolin *et al.,* 2015). Les lactobacilles diminuent l'adhésion de *C. albicans* aux cellules de l'hôte, inhibent la formation des hyphes et ont des effets fongicides/fongistatiques. Des mécanismes de compétition pour les nutriments (Basson, 2000) ou pour des sites d'adhésion communs ont été évoqués (Rizzo *et al.,* 2013 ; Donnarumma *et al.,* 2014 ; Parolin *et al.,* 2015). Par ailleurs, dans le tube digestif, les lactobacilles métabolisent des oligosaccharides pour produire de courtes chaines d'acide gras (SCFAs) comme l'acide lactique, acétique, propionique ou butyrique (Hove *et al.,* 1994). La diminution du pH engendrée par ces acides organiques inhibe la filamentation de *C. albicans,* ce qui limite l'invasion des tissus de l'hôte (Buffo *et al.,* 1984). L'acide lactique produit par les lactobacilles, est capable de franchir la membrane plasmique de *C. albicans* conduisant à une acidification du cytoplasme et à la perturbation de

nombreuses fonctions cellulaires (Köhler et., 2012). L'exposition de *C. albicans,* aux acides lactique et acétique induit une diminution de la biogenèse des ribosomes et un ralentissement global de la croissance de la levure (Lastauskiene *et al.,* 2014 ; Cottier *et al.,* 2015). In vivo, en modèle murin, il a été mis en évidence que des concentrations physiologiques d'acide butyrique inhibent la filamentation de *C. albicans* et diminuent sa capacité à coloniser les épithéliums (Noverr *et al.,* 2004 ; Fan *et al.,* 2015). De plus, les SCFAs stimulent l'immunité mucosale en augmentant la production de peptides antimicrobiens, comme les ß-défensines ou les cathélicidines, par les cellules épithéliales (Rizzo *et al.,* 2013 ; Schauber *et al.,* 2003). Les lactobacilles produisent aussi des bio-surfactants et des bactériocines. Les bio-surfactants sont des molécules amphiphiles ayant une activité anti-*Candida*, en diminuant l'adhésion de la levure aux surfaces de l'hôte et par le biais d'une action cytotoxique (Gomaa, 2013). Les bactériocines comme la gassericine A ou les salivaricines (Messaoudi *et al.,* 2013 ; Pandey *et al.,* 2013) sont des petits peptides antimicrobiens actifs sur les *Candida* (Kaewsrichan *et al.,* 2006). Enfin, la métabolisation du tryptophane endogène par les Lactobacilles conduit à la formation d'indole-3-aldéhyde (Zelante *et al.,* 2013). En modèle murin, ce composé stimule la production de l'IL-22, ayant une activité anti-*Candida*.

Si le rôle du microbiote bactérien dans le contrôle de *C. albicans* a clairement été décrit, des études plus récentes mettent en évidence que le mycobiote intestinal, contribue aussi à réguler la prolifération des espèces pathogènes opportunistes. Par exemple, les champignons du genre *Pichia* produisent des facteurs inhibant la croissance de *C. albicans* (Mukherjee *et al.,* 2014).

Ainsi, en maintenant la densité de *C. albicans* à un niveau basal relativement faible, le microbiote intestinal prévient la transition vers la forme pathogène.

2. Le rôle du système immunitaire dans le maintien du commensalisme

En régulant la densité fongique, le système immunitaire contribue également au maintien de *C. albicans* dans un état commensal. La relation qui s'établit entre la levure et le système immunitaire est complexe. En effet, chez deux tiers de la population, *C. albicans* vit naturellement à la surface des muqueuses de l'hôte dans un état non-pathogène. Sa présence est donc tolérée par le système immunitaire. En revanche, lorsque la levure adopte un comportement pathogène invasif, le système immunitaire de l'hôte est capable de mettre en place une réponse appropriée permettant la clearance du pathogène et le retour à l'état basal. 95% des agents infectieux, pénètrent dans leurs hôtes en franchissant les barrières muqueuses (peau, muqueuse intestinale…) nous allons donc particulièrement nous intéresser au rôle des cellules épithéliales dans la réponse immunitaire anti-*Candida*. Au niveau des muqueuses, les cellules épithéliales constituent la première ligne de défense de l'hôte. Ces cellules sont capables par le biais de récepteurs spécifiques (PRRs) de percevoir les microorganismes et de distinguer l'état commensal de l'état pathogène. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette distinction ne sont pas clairement déterminés, cependant, il a été démontré que la densité de la population fongique ainsi que son état morphologique sont des facteurs critiques déterminant le type réponse mis en place par le système immunitaire de l'hôte (Moyes *et al.,* 2010).

Récemment, Moyes *et al,* (2010) ont mis en évidence que l'activation de la réponse immunitaire des cellules épithéliales était un processus bi-phasique. Lorsque la concentration en levure est faible, *C. albicans* est perçue par les cellules épithéliales par le biais d'un récepteur de nature inconnu (Fig. 6). La stimulation de ce récepteur active deux voies de

signalisation spécifiques. La voie Nf-kB qui aboutit à l'activation du facteur de transcription éponyme, et une voie MAPK conduisant à l'activation du facteur de transcription c-Jun. L'activation de c-Jun est un processus rapide, la forme active étant détectée dans les 5 minutes suivant l'infection (Moyes *et al.,* 2010). En revanche, en l'absence de signaux complémentaires c-Jun est rapidement inactivé et retourne à son état basal. Cette activation rapide et transitoire de c-Jun ne conduit pas à la mise en place d'une réponse immunitaire, ce qui pourrait expliquer la tolérance immunitaire vis-à-vis de la levure. Lorsque le récepteur EphA2, qui détecte les ß-glucanes, perçoit que la densité cellulaire augmente (Swidergall *et al.,* 2018) ou que la levure adopte un mode de développement filamenteux, une seconde cascade de MAPK contrôlant le facteur de transcription c-Fos est activée. Les facteurs Nf-KB et c-Fos agissent en synergie pour activer la production des cytokines et des peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales (Lehrer et Ganz, 1999 ; Peschel et Sahl, 2006). La production de ces molécules vise à ramener la densité fongique à un niveau basal et ainsi à rétablir le commensalisme. Parmi les cytokines produites par les cellules épithéliales, l'interleukine 8 (IL-8) joue un rôle particulier. Cette molécule stimule la différentiation et le recrutement au site d'infection d'autres acteurs de l'immunité que sont les macrophages et les neutrophiles. Ces populations cellulaires appartenant à la famille des phagocytes constituent l'une des principales lignes de défense de l'hôte vis à vis des agents pathogènes. Leur rôle est de reconnaître et d'éliminer par phagocytose les éléments du non-soi. La reconnaissance est médiée par une interaction entre les éléments antigéniques portés par la levure (PAMPs) et les récepteurs localisés à la surface de ces cellules (PRRs).

Ainsi, le système immunitaire surveille et contrôle en permanence l'état de la population fongique. Si un mécanisme de tolérance se met en place lorsque la densité de *C. albicans* est faible, une réponse forte conduisant à l'élimination du pathogène est rapidement mise en place dès la perception de l'acquisition d'un comportement invasif.

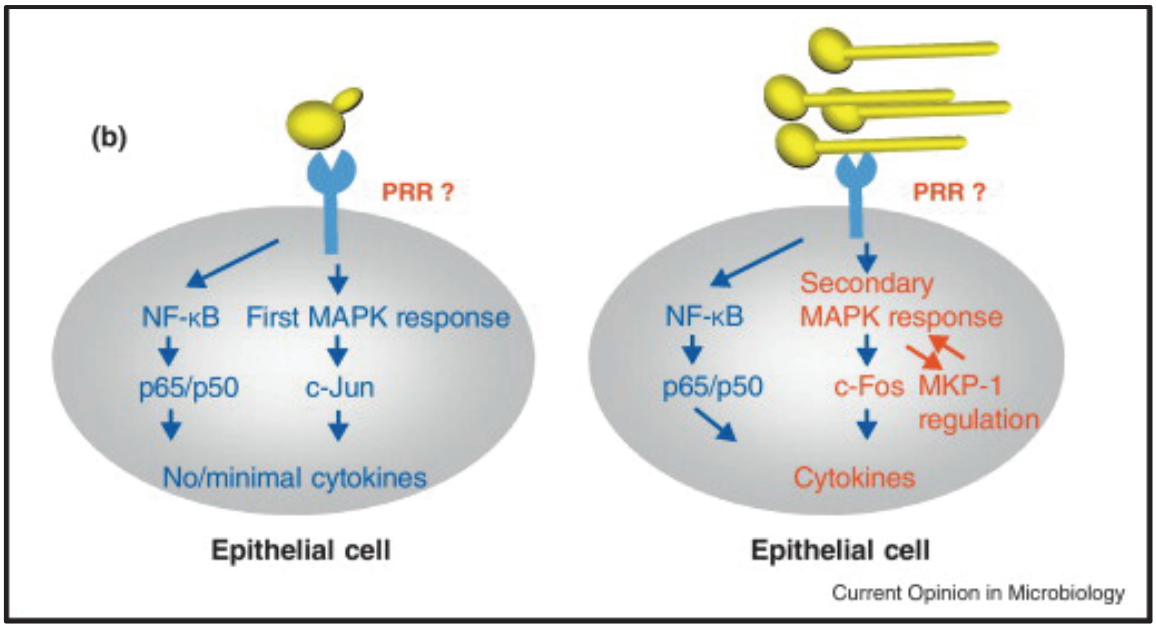


Figure 6 : Les cellules épithéliales sont capables de distinguer la forme levure de la forme hyphale par le biais d'une cascade de MAPK bi-phasique. Une faible charge fongique est détectée par un récepteur inconnu. La stimulation de ce récepteur active le facteur de transcription Nf-kB ainsi qu'une première voie MAPK conduisant à l'activation du facteur c-Jun. L'activation transitoire de ce facteur ne conduit pas à la mise en place d'une réponse immunitaire. Lorsque la charge fongique augmente, une seconde voie MAPK est induite et contrôle l'activation du facteur c-Fos, conduisant à l'expression des cytokines par les cellules épithéliales (Gow et Hube, 2012).

3. Rupture du commensalisme et transition vers l'état pathogène

Le maintien du commensalisme au niveau du tractus digestif, résulte donc d'un fragile équilibre tripartite entre *C. albicans*, le microbiote et le système immunitaire. De nombreux facteurs sont susceptibles de remettre en cause cet état d'équilibre et d'entrainer la transition d'un stade commensal à un stade pathogène (Kim et Sudberry, 2011). Par exemple, l'utilisation d'antifongique large spectre, éliminant les populations bactériennes impliquées dans la modulation du développement de *C. albicans*, favorise la prolifération incontrôlée de la levure. En modèle murin, Zelante *et al.,* (2013), ont démontré que la déplétion de la population de *Lactobacilles* suite à un traitement à l'ampicilline, augmente significativement la colonisation de l'épithélium gastrique par *C. albicans* et réduit drastiquement la survie des souris (Zelante *et al.,* 2013). Un affaiblissement local ou systémique du système immunitaire (VIH, neutropénie, lymphopénie) conduit également à une prolifération anarchique de la population fongique, tandis que la rupture de certaines barrières physiques (épithéliums ou muqueuses) suite à un traumatisme, offre à la levure, une porte d'entrée pour pénétrer et envahir les tissus sous-jacents. Enfin, l'introduction de surfaces artificielles dans l'organisme de type sondes, cathéters ou prothèses fournit également un terrain propice au développement d'infection fongique systémique (Darouiche, 2004 ; Kojic et Darouiche, 2004). La rupture du commensalisme est associée à l'acquisition par la levure d'un comportement pathogène reposant sur l'expression d'un certain nombre de facteurs de virulence.

B. Les facteurs de virulence de *C. albicans*

1. La transition morphologique

C. albicans appartient à la catégorie des champignons polymorphes, qui possèdent la capacité de se développer sous différentes formes (levure, pseudohyphale ou hyphale) (Fig. 2) en fonction des signaux environnementaux perçus (Bastidas and Heitman, 2009). Le dimorphisme est considéré comme l'un des principaux facteurs de virulence des champignons polymorphes (Nemecek *et al.,* 2006). Chez *C. albicans*, la forme hyphale est invariablement liée à une condition pathologique tandis que la forme levure est retrouvée de façon asymptomatique au niveau intestinal chez une large part de la population (Cassone, 2015). Cependant, les mutants bloqués dans l'un ou l'autre des stades morphologiques présentent d'importants défauts de virulence en modèle murin. Ainsi, les deux formes sont importantes pour la pathogénicité de la levure (Jacobsen *et al.,* 2012). Classiquement, il est supposé que la forme levure joue un rôle important dans la dissémination du pathogène par voie hématogène, tandis que l'hyphe constitue une forme plus invasive et contribue à endommager les tissus de l'hôte (Berman and Sudberry, 2002 ; Saville *et al.,* 2003). La forme hyphale est également associée à l'expression d'autres facteurs de virulence, comme les adhésines de la famille Als, les protéases (Saps) ou encore la toxine *Ca*Ece1 (Sudberry, 2011 ; Mayer *et al.,* 2013). L'expression de ces protéines contribue à la virulence de la forme hyphale en favorisant l'adhésion, l'invasion et la lésion des tissus de l'hôte. De plus, la croissance de l'hyphe est un phénomène polarisé contrôlé par le contact avec une surface solide. *C. albicans* pourrait tirer parti de ce phénomène pour identifier les défauts d'intégrités des épithéliums, et favoriser l'invasion par ces points d'entrées (Gow *et al.,* 1994, 2002 ; Grow, 1997 ; Kumamoto and Vinces, 2005).

La température, la présence de sérum ou de N-acétylglucosamine, ainsi que la concentration en CO2 ou encore les variations du pH sont quelques exemples des facteurs environnementaux susceptibles d'induire la transition morphologique de *C. albicans*. Ces signaux sont intégrés par un réseau de senseurs membranaires ou intracellulaires et convergent vers l'une des deux voies de signalisation régulant la transition morphologique chez *C. albicans,* la voie AMPc-PKA et la voie MAPKinase (Fig. 7).

a) La voie de l'AMPc-PKA

Le cœur de cette voie de signalisation est composé de deux éléments, une adénylate cyclase et une protéine kinase A (PKA) (Fig. 7). Chez *C. albicans*, il n'existe qu'une adénylate cyclase, codée par le gène *CaCYR1*. Cette enzyme catalyse la conversion de l'ATP en AMPc, qui est un second messager activant de nombreux processus biologiques dans la cellule. Des mutants *Cacyr1Δ/Δ* présentent un important défaut de formation des hyphes et une virulence atténuée en modèle murin. Le phénotype sauvage peut être restauré par l'ajout d'AMPc exogène dans le milieu, suggérant que l'activation de l'adénylate cyclase *Ca*Cyr1 et le niveau d'AMPc intracellulaire contrôlent l'état morphologique de la cellule chez *C. albicans* (Rocha *et al.,* 2001). Le deuxième acteur de cette voie est la PKA. Cette protéine multimérique est constituée de deux sous-unités régulatrices codées par le gène *CaBCY1* et de deux sous-unités catalytiques codées par les gènes *CaTPK1* ou *CaTPK2*. La fixation de l'AMPc au niveau des sous-unités régulatrices de la PKA, permet de lever la répression qu'elles exercent sur les sous-unités catalytiques ce qui conduit à l'activation de la protéine (Shapiro *et al.,* 2011). Sous sa forme active, la PKA est une sérine/thréonine kinase capable de phosphoryler et d'activer de nombreux facteurs de transcription gouvernant la morphogenèse, dont *Ca*Efg1 (Fig. 7) (Doedt *et al.,* 2004). *Ca*Efg1 est un facteur de transcription appartenant à la famille des APSES protéines. Ces facteurs de transcription, spécifiques des champignons, jouent un rôle important dans le contrôle de la morphogenèse mais sont aussi impliqués dans la régulation fine du métabolisme carboné (Doedt *et al.,* 2004). *Ca*Efg1 est directement activé par la PKA, par phosphorylation de la thréonine 206 (T206). La mutation de ce résidu en une forme non phosphorylable (T206A) est associée à un phénotype d'hypofilamentation, tandis qu'une mutation mimant une phosphorylation constitutive (T206E) conduit à un phénotype d'hyperfilamentation, tous deux associés à un défaut de virulence en modèle murin (Bockmuhl et Ernst, 2001). De plus, la délétion du gène *CaEFG1* conduit à un important défaut de filamentation en réponse à de nombreux signaux extracellulaires (pH, température, CO_2…) (Lo *et al.,* 1997 ; Stoldt *et al.,* 1997). Ceci démontre que la voie de l'AMPc-PKA intègre de nombreux signaux contrôlant la morphogenèse de la levure et identifie *Ca*Efg1 comme l'un des régulateurs majeurs de la transition morphologique (Fig. 7). Cependant, les mutants *Caefg1Δ/Δ* conservent leur capacité de filamentation en présence de sérum et dans les phagocytes (Lo *et al.,* 1997), ce qui implique que la voie de l'AMPc-PKA est capable d'activer d'autres facteurs de transcription contrôlant la morphogenèse.

L'activation de la voie AMPc-PKA dépend directement de l'activation de l'adénylate cyclase *Ca*Cyr1. Chez *C. albicans*, l'adénylate cyclase est supposée être une plateforme multimodale capable de percevoir et d'intégrer de nombreux signaux extracellulaires par le biais de ses différents domaines fonctionnels (Wang, 2013). Certains facteurs environnementaux sont capables de moduler directement l'activité de *Ca*Cyr1. Par exemple, la chaperonne *Ca*Hsp90 qui contrôle le dimorphisme lié à la température, interagit directement avec le domaine riche en leucine (LRR) de *Ca*Cyr1. Ce domaine sert également de senseur pour le peptidoglycane,

un autre inducteur de la filamentation (Xu *et al.,* 2008 ; Shapiro *et al.,* 2009). Le CO_2 et le bicarbonate se lient directement au domaine catalytique de l'adénylate cyclase, au niveau de la lysine 1373 (Hall *et al.,* 2010), pour stimuler la production d'AMPc et promouvoir la filamentation (Klengel *et al.,* 2005). Dans d'autres cas, la protéine *Ca*Cyr1 est activée par le biais d'effecteurs intermédiaires comme la protéine *Ca*Gpa2 (Fig. 7) qui est activée suite à la détection dans le milieu extracellulaire de proline et de méthionine. *Ca*Gpa2 active *Ca*Cyr1 en se liant à un domaine d'interaction G*α* (Maidan *et al.,* 2005a, Maidan *et al.,* 2005b). Enfin, le domaine d'association-Ras (RA) permet l'interaction de *Ca*Cyr1 avec la protéine *Ca*Ras1 (Fig. 7). La délétion de *CaRAS1* conduit à un défaut de formation des hyphes dans de nombreuses conditions. L'addition d'AMPc, ainsi que la surexpression de l'adénylate cyclase ou de la PKA exogène restaure la filamentation chez les mutants, démontrant que *Ca*Ras1 agit en amont de *Ca*Cyr1 et participe à son activation. La protéine *Ca*Ras1 est notamment activée en réponse à la carence en ammonium perçue par l'ammonium perméase *Ca*Mep2 (Biswas and Morschauser, 2005). En marge de la voie on retrouve deux phosphodiestérases *Ca*Pde1 et *Ca*Pde2 qui catalysent la dégradation de l'AMPc en AMP et régulent donc négativement la transition morphologique. Un mutant *Capde2Δ/Δ* présente un phénotype d'hyperfilamentation associé à une diminution de la virulence de modèle murin (Wilson *et al.,* 2001 ; Jung *et al.,* 2003 ; Bahn *et al.,* 2003).

b) La voie MAP Kinase

Il existe chez *C. albicans*, plusieurs voies MAP kinase liées à la morphogénèse. Cependant, la principale et la mieux décrite est celle conduisant à l'activation du facteur de transcription *Ca*Cph1 (Fig. 7). Les défauts morphogénétiques associés à la délétion des composants de cette voie sont généralement moins sévères que ceux associés à la voie de l'AMPc-PKA (Shapiro *et al.,* 2011). Les mutants de la voie MAPK présentent un défaut de transition morphologique sur un milieu pauvre en carbone mais conservent leur capacité de filamentation en réponse au sérum, aux variations de pH et à d'autres stimuli. Ainsi, il est suggéré que la voie MAPK régule la filamentation principalement en réponse à la carence en nutriment (Liu *et al.,* 1994 ; Leberer *et al.,* 1996). Certains éléments activateurs de la voie MAPK sont communs à la voie de l'AMPc-PKA (Fig. 7). Par exemple, en réponse à la carence en ammonium, la protéine *Ca*Ras1 active ces deux voies de signalisation (Feng *et al.,* 1999). Dans la voie MAPK, deux effecteurs agissant en aval de *Ca*Ras1, la Rho-GTPase *Ca*Cdc42 et la Guanine Exchange Factor (GEF) *Ca*Cdc24, qui sont requis pour la croissance hyphale, ont été identifiés (Ushinski *et al.,* 2002 ; Bassilana *et al.,* 2003) (Fig. 7). En aval de ces effecteurs, la kinase *Ca*Cst20 a été identifiée. Les mutants Ca*cst20Δ/Δ* sont incapables de former des hyphes sur un milieu solide en réponse à la carence en nutriments et présentent un phénotype d'hypovirulence (Kohler *et al.,* 1996 ; Leberer *et al.,* 1996). Le cœur de la voie MAPK est constitué d'une cascade de kinases, composée de *Ca*Ste11, *Ca*Hst7 et *Ca*Cek1/Cek2. De façon similaire à *Ca*Cst20, la délétion de *CaHST7* et *CaCEK1* bloque la formation de l'hyphe en milieu carencé (Kohler *et al.,* 1996 ; Leberer *et al.,* 1996). De récentes données démontrent que *Ca*Cek1 pourrait être directement régulée par certains signaux environnementaux. L'activation de *Ca*Cek1 est notamment modulée par le quorum sensing. Le farnésol inhibe la phosphorylation de *Ca*Cek1 et empêche la formation de l'hyphe (Roman *et al.,* 2009), tandis que les effecteurs du quorum sensing de la bactérie commensale *Streptococcus gordonii* favorisent la phosphorylation et l'activation de *Ca*Cek1 (Bamford *et al.,* 2009). Une fois activée, *Ca*Cek1, phosphoryle et active le facteur de transcription *Ca*Cph1 (Liu *et al.,* 1994) (Fig. 7). La délétion de *CaCPH1*, retarde

l'initiation de la croissance hyphale sur milieu solide pauvre en nutriments mais n'affecte pas la filamentation en réponse au sérum.

c) Les autres voies de signalisation gouvernant la morphogénèse

Les variations du pH extracellulaire sont susceptibles d'induire la transition morphologique de *C. albicans* (Fig. 7). Un pH acide aura tendance à inhiber le dimorphisme tandis qu'un pH alcalin favorisera le développement hyphal (Davis *et al.,* 2000 ; El-Barkani *et al.,* 2000). Chez *C. albicans,* le pH est perçu à l'aide des senseurs membranaires *Ca*Rim21 et *Ca*Dfg16 (Fig. 7). Le signal est ensuite transduit par une voie de signalisation complexe qui aboutit au clivage et à l'activation du facteur de transcription *Ca*Rim101. La forme tronquée de *Ca*Rim101 active *Ca*Efg1 indépendamment de la voie de l'AMPc-PKA (Sudbery, 2011) (Fig. 7).

Les cellules engluées dans une matrice d'agar mou sont capables d'adopter un mode de développement filamenteux en activant une voie de signalisation spécifique conduisant à l'activation du facteur de transcription *Ca*Czf1 (Brown *et al.,* 1999) (Fig. 7).

De plus, la communication entre les cellules par le biais de molécules du quorum sensing affecte la morphogenèse de *C. albicans*. Le farnésol est notamment connu pour inhiber la transition vers la forme hyphale lorsque la densité cellulaire est trop importante (>10^7 cellules/ml) (Homby *et al.,* 2001). Cette molécule agit sur la voie des MAP kinase en inhibant l'expression des gènes *CaHST7* et *CaCPH1*, mais aussi sur la voie de l'AMPc-PKA en régulant négativement l'activité de l'adénylate cyclase *Ca*Cyr1 (Hall *et al.,* 2011 ; Davis-Hanna *et al.,* 2008). Enfin, le farnésol active la transcription du gène *CaTUP1* qui code pour un répresseur de la transition morphologique et stabilise le co-répresseur *Ca*Nrg1 (Lu *et al.,* 2014) (Fig. 7).

Le dimorphisme est souvent considéré comme un facteur de virulence majeur de *C. albicans*, car de nombreux mutants hypofilamenteux sont aussi hypovirulents (Lo *et al.,* 1997). Cependant, certains arguments battent en brèche le rôle essentiel du dimorphisme dans la virulence. Premièrement, *C. glabrata*, qui est la deuxième cause d'infection fongique à *Candida* dans le monde, ne forme pas de filaments. Ainsi, la croissance hyphale n'est en principe pas requise pour la virulence. Deuxièmement, dans une collection de 24 mutants récemment générés et présentant un défaut de filamentation, seul un tiers présentent une virulence atténuée en modèle murin (Noble *et al.,* 2010). Enfin, Saville *et al.,* (2003), ont démontré que la forme levure est capable de transiter entre le flux sanguin et les organes et pourrait jouer un rôle dans l'invasion des tissus de l'hôte.

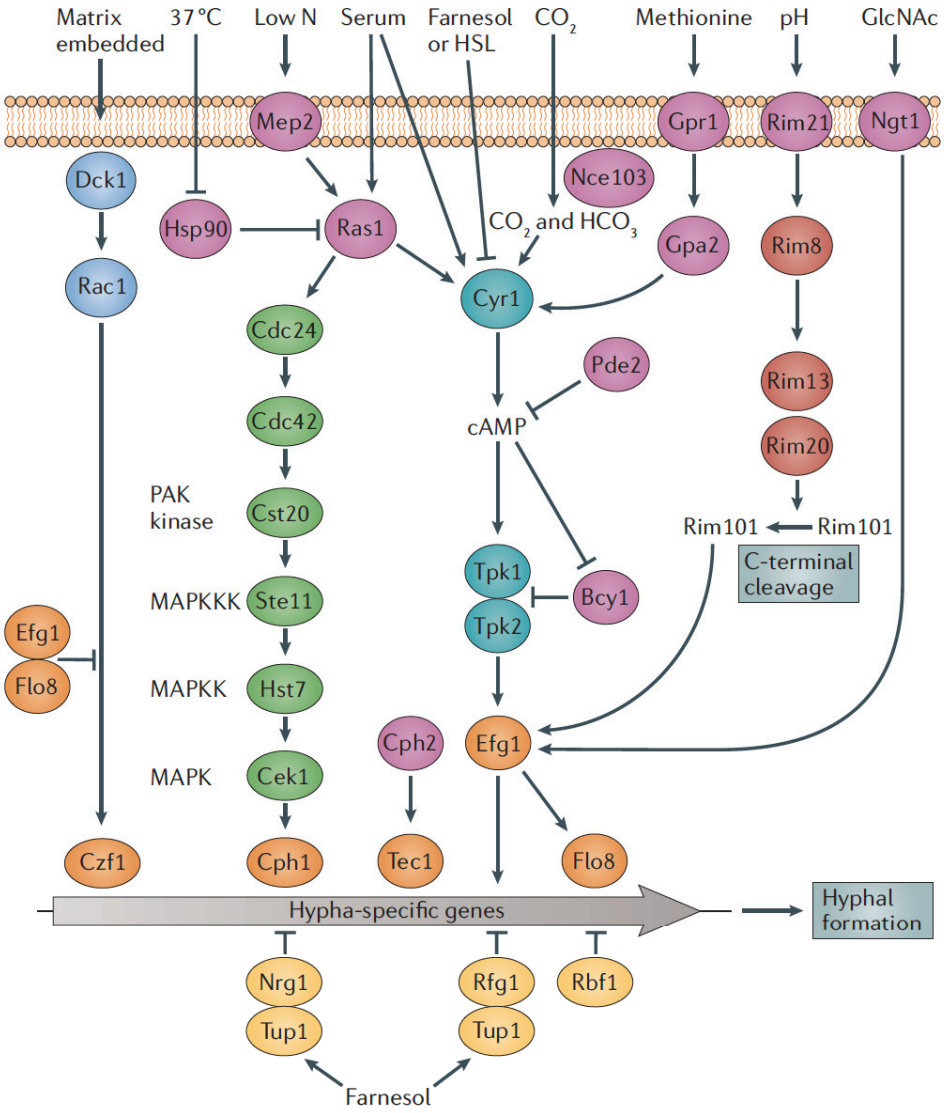


Figure 7 : Vue d'ensemble des voies de signalisation conduisant à l'expression des gènes hyphe-spécifique et à la transition morphologique. Les différents facteurs environnementaux sont perçus par une batterie de senseurs membranaires ou intracellulaires et activent différentes voies de signalisation, dont les plus étudiées sont la voie de l'AMPc-PKA (turquoise) et la voie des MAPK (vert). Les facteurs de transcription régulant positivement ou négativement le développement hyphal sont figurés en orange et jaune respectivement. Les facteurs impliqués dans la transduction des signaux extracellulaires sont présentés en mauve. Enfin, les voies contrôlant la morphogenèse en réponse au pH et à la croissance en profondeur sont respectivement figurées en rouge et en bleu (Sudbery, 2011).

2. L'adhésion

Les levures du genre *Candida* sont capables, par le biais de molécules de surface appelées adhésines, d'adhérer aux cellules épithéliales et à certaines surfaces abiotiques (Chaffin, 2008 ; Moyes *et al.,* 2015). L'adhésion de *C. albicans* aux cellules de l'hôte est une étape nécessaire à la colonisation et la persistance de la levure à la surface des muqueuses. L'adhésion est donc une étape cruciale dans la mise en place du commensalisme (Tronchin *et al.,* 2008). Lors de la transition commensale-pathogène, l'adhésion devient un facteur de virulence en favorisant l'invasion des tissus de l'hôte (Wächtler *et al.,* 2010).

Parmi les adhésines exprimées par le champignon, celles appartenant à la famille des Als (Agglutinin-like sequence), sont les plus étudiées. Chez *C. albicans*, 8 gènes codant pour des Als (*CaALS1-7* et *CaALS9*) ont été identifiés. Les gènes *CaALS1-4* sont spécifiquement exprimés

dans la forme hyphale, tandis que les *Ca*Als5-7 et Als9 sont retrouvées à la surface des blastopores (Modrzewska and Kurnatowski, 2015). Les Als sont ancrées aux ß-(1,6) glucanes, composant la paroi, par le biais d'une ancre GPI (Gaur and Klotz, 1997; Hoyer, 2001; Sheppard *et al.,* 2004). Deux approches complémentaires ont été utilisées pour analyser le rôle des protéines Als dans le processus d'adhésion (i) l'expression hétérologue des gènes *ALS* de *C. albicans* dans une levure non adhérente : *S. cerevisiae*, et (ii) l'analyse du phénotype de mutant homozygote (Fu *et al.,* 2002 ; Zhao *et al.,* 2004 ; 2005 ; 2007a, b). Ainsi, il a été démontré que les *Ca*Als1, 3 et 5 sont impliquées dans l'adhésion à de nombreux constituants de l'hôte comme la fibronectine, les laminines, le collagène de type IV et sont requises pour la colonisation de l'épithélium oral (Gaur *et al.,* 2002 ; Gaur et Klatz, 2004 ; Sheppard *et al.,* 2004 ; Phan *et al.,* 2007 ; Kamai *et al.,* 2002). Tandis que les adhésines *Ca*Als2 et 4 sont impliquées dans l'adhésion aux épithéliums dans un sens plus large (Zhao *et al.,* 2004, 2005). Au cours de l'infection, certaines protéines Als jouent un rôle important dans l'invasion des tissus de l'hôte. Par exemple, *Ca*Als3, en se liant à la E ou N-cadhérine favorise l'endocytose active de la levure par les cellules épithéliales et endothéliales respectivement (Phan *et al.,* 2007). Ce processus d'endocytose favorise subséquemment la dissémination du pathogène via la voie sanguine. Un mutant *Caals3Δ/Δ* présente une capacité d'invasion réduite, et un phénotype similaire a été observé pour un mutant *Caals1Δ/Δ* (Sheppard *et al.,* 2004 ; Phan *et al.,* 2007). Pourtant, la double délétion des gènes *CaALS1* et *CaALS3* affecte modérément la virulence en modèle murin (Q.T. Phan, N.V. Solis, A.P. Mitchell and S.G. Filler, unpubl. data) ce qui peut être lié à la présence d'autres invasines ou à des phénomènes de compensation.

La protéine *Ca*Hwp1 est une autre adhésine spécifiquement associée à la forme hyphale (Staab *et al.,* 2004). En modèle murin, les mutants *Cahwp1Δ/Δ* sont incapables d'établir une candidose oropharyngée ce qui suggère que *Ca*Hwp1 est requise pour coloniser et envahir la cavité orale (Sundstrom *et al.,* 2002). Hwp1 interagit avec les cellules épithéliales en détournant la fonction des transglutaminases humaines. Ces protéines naturellement présentes à la surface des cellules épithéliales, sont notamment impliquées dans la liaison des kératinocytes entre eux. La région N-ter de la protéine *Ca*Hwp1, riche en glutamine, présente une forte homologie structurale avec le substrat naturel des transglutaminases, qui vont donc reconnaitre et lier de façon covalente *Ca*Hwp1 à une protéine de l'hôte encore inconnue (Staab *et al.,* 1999 ; Moyes *et al.,* 2015). *CaHwp*1 peut aussi interagir avec *Ca*Als1 et 3 afin de médier une interaction hyphe-hyphe, requise pour l'architecture du biofilm et éventuellement pour la conjugaison (Nobile *et al.,* 2008 ; Zhu and Filler, 2010). Enfin, d'autres protéines comme *Ca*Eap1 (Li et Palecek, 2003 ; Li *et al.,* 2007) et *Ca*Ecm33 (Martinez-lopez *et al.,* 2004, 2006) pourraient être impliquées dans la colonisation et l'attachement aux tissus animaux et aux surfaces abiotiques.

3. Le biofilm

Un biofilm est une communauté microbienne structurée, attachée à une surface et entourée par une matrice extracellulaire. *C. albicans* est capable de former des biofilms sur des surfaces biotiques, comme l'épithélium oral, mais aussi abiotiques, comme les cathéters veineux, les prothèses dentaires et les valves cardiaques (Fanning et Mitchell, 2012). La formation d'un biofilm mature fait intervenir trois phases successives : l'adhésion initiale, la maturation et la dispersion (Fig. 8).

La première étape cruciale dans la formation d'un biofilm est l'adhésion des cellules sous forme de blastospore à une surface solide (Fig. 8). En 2005, Murillo *et al.,* ont démontré qu'un

contact de 30 minutes entre *C. albicans* et une surface polystyrène, suffisait à initier l'expression un programme génétique spécifique permettant l'adhésion. Bien que la voie de signalisation régissant l'induction de ce programme n'ait pas encore été identifiée, des travaux ont mis en évidence que la MAPK *Ca*Mck1 répondait au contact cellule-surface (Kumamoto, 2005). L'activation de cette kinase située en aval de la voie de l'intégrité de la paroi, suggère que la paroi pourrait servir de senseur de contact (Klis *et al.,* 2006). Les adhésines, ont longtemps été considérées comme étant responsables de l'adhésion initiale du biofilm. En effet, la délétion des gènes *CaALS2*, *CaALS3* et *CaHWP1,* diminue drastiquement la capacité des cellules à former un biofilm *in vivo* et *in vitro* (Nobile *et al.,* 2006ab ; Zhao *et al.,* 2006). Cependant, ces mutants sont capables de produire un biofilm rudimentaire suggérant que ces adhésines ne sont pas impliquées dans les phases précoces de l'adhésion. En 2004, le groupe de Kelly *et al.,* a identifié le facteur de transcription *Ca*Ace2 contrôlant l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines pariétales. Un mutant *Caace2Δ/Δ* présente un sévère défaut d'adhésion aux surfaces abiotiques et est incapable de former un biofilm confluent (Kelly *et al.,* 2004). L'adhésion initiale du biofilm pourrait donc être est sous la dépendance de gènes contrôlés par le facteur *Ca*Ace2.

La maturation du biofilm implique la prolifération des cellules en couche basale puis leur développement sous forme pseudohyphale et hyphale (Fig. 8). La matrice extracellulaire est produite et s'accumule au cours de cette étape de maturation. La maturation du biofilm est contrôlée par un réseau de régulation complexe mettant en jeu six régulateurs transcriptionnels : *Ca*Tec1, *Ca*Bcr1, *Ca*Efg1, *Ca*Ntd80, *Ca*Rob1 et *Ca*Brg1. L'expression d'au moins 1000 gènes est modulée par ces régulateurs transcriptionnels. De plus, chaque régulateur contrôle l'expression des 5 autres pour former un réseau interconnecté.

La délétion d'un seul de ces régulateurs diminue drastiquement la capacité des cellules à former un biofilm mature *in vitro* et *in vivo* en modèle cathéter ou prothèse dentaire (Nobile *et al.,* 2012). Tous ces mutants, sauf *Caefg1Δ/Δ,* sont capables de former des hyphes, excluant ainsi que le défaut de formation du biofilm soit lié à un défaut morphogénétique. La formation des hyphes est une étape importante dans la mise en place du biofilm. La forme hyphale contribue à l'architecture et à la stabilité du biofilm en servant de support aux autres morphologies cellulaires. Au cours de la maturation du biofilm, les cellules sécrètent la matrice extracellulaire (MEC). Cette structure principalement composée de carbohydrates, de protéines, de phosphate et d'hexosamine joue un rôle important dans la protection des cellules et le maintien de la cohésion du biofilm (Nett *et al.,* 2010 ; Mitchell *et al.,* 2015). Chez *C. albicans*, la production de la matrice extracellulaire est stimulée par le flux sanguin (Hawser *et al.,* 1998). Deux facteurs de transcription récemment identifiés, *Ca*Rlm1 et *Ca*Zap1, sont impliqués dans la production de cette matrice. La délétion de *Ca*Rlm1 diminue la production de la MEC (Nett *et al.,* 2011), tandis que la délétion de *Ca*Zap1 entraine une surproduction de matrice, probablement via la surexpression de deux glucosamylases (*Ca*Gca1 et *Ca*Gca2) (Nobile *et al.,* 2009). L'expression régulée de ces deux gènes contrôle l'épaisseur du biofilm et pourrait être impliquée dans sa dispersion.

La dernière étape est la dispersion des cellules du biofilm, (Fig. 8) qui peuvent alors coloniser de nouveaux environnements au sein de l'hôte (Chandra *et al.,*2001 ; Blankenship et Mitchell, 2006 ; Uppuluri *et al.,* 2010 ; Kaneko *et al.,* 2013). Certains facteurs, comme la carence en nutriments ou la présence de glucose en grande quantité sont capable d'induire la dispersion du biofilm. Au niveau transcriptionnel, 3 régulateurs ont été identifiés comme étant impliqués dans la dispersion : *Ca*Ume6, *Ca*Nrg1 et *Ca*Per1 (Fig. 8). La surexpression de *CaUME6* diminue drastiquement la dispersion du biofilm, tandis que la surexpression de

CaNRG1 et *CaPER1* la favorise (Uppuluri *et al.,* 2010ab). La protéine chaperonne *Ca*Hsp90 est également impliquée dans la dispersion du biofilm car les mutants *Cahsp90Δ/Δ* présentent une capacité de dispersion atténuée (Robbins *et al.,* 2011). Enfin, les molécules du quorum sensing de *C. albicans*, le farnésol et le tyrosol sont des acteurs contrôlant la formation et dispersion du biofilm. Ces deux molécules ont des effets antagonistes, le farnésol régule négativement la formation des hyphes et stimule la dispersion du biofilm (Hornby *et al.,* 2001 ; Oh *et al.,* 2001 ; Ramage *et al.,* 2002b), tandis que le tyrosol favorise la croissance hyphale et la formation d'un biofilm (Chen *et al.,* 2004 ; Alem *et al.,* 2006). Bien que le mécanisme moléculaire ne soit pas clairement défini, l'action du farnésol est relayée via l'histidine kinase *Ca*Chk1 (Kruppa *et al.,* 2005). Les cellules issues de la dispersion du biofilm, présentent des capacités d'adhésion et de formation de biofilm accrues ainsi qu'une virulence plus importante en modèle murin (Uppuluri *et al.,* 2010).

La formation de biofilm constitue un problème de santé publique majeur car ces structures présentent une résistance accrue aux antifongiques, au système immunitaire et aux stress physiques. Il est clairement admis, que la plupart des infections à *Candida* survenant dans les unités de soins intensifs sont liées à la formation de biofilm sur les implants médicaux.

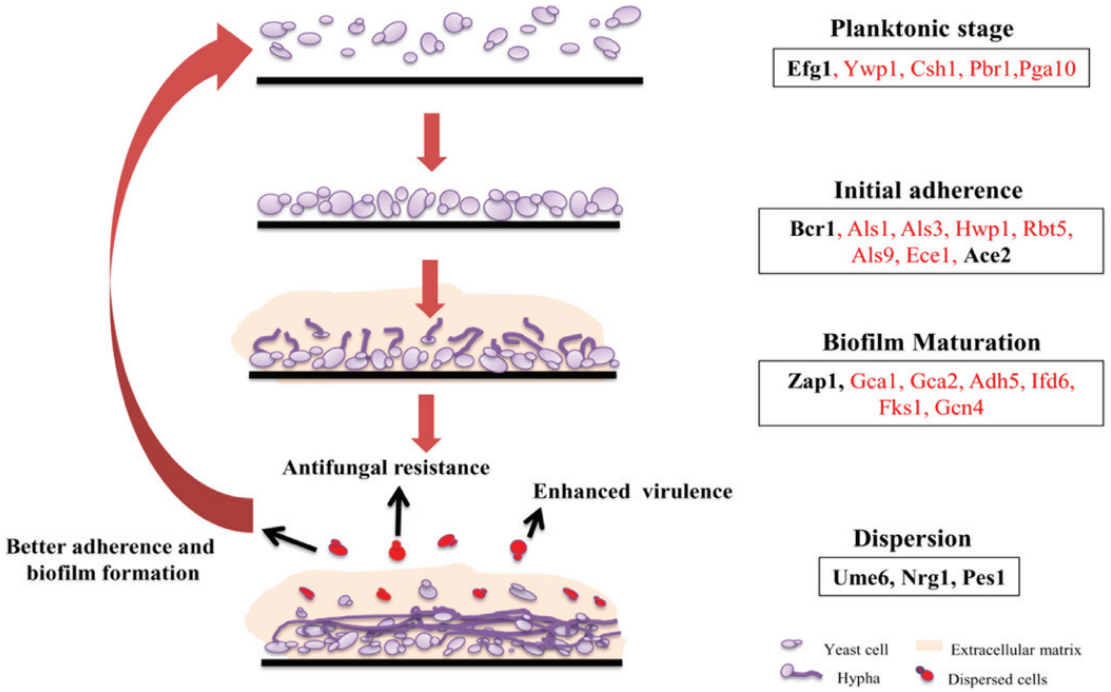


Figure 8 : Vue d'ensemble des différentes étapes du développement d'un biofilm mature et des acteurs moléculaires impliqués. La formation du biofilm commence par la sédimentation des cellules à la surface d'une surface biotique ou abiotique. Par la suite, ces cellules adhèrent à la surface, se multiplient et produisent la matrice extracellulaire entourant le biofilm. Enfin, le biofilm se disperse et les cellules peuvent coloniser de nouvelles niches ou surfaces au sein de l'hôte. Les facteurs de transcription majeurs impliqués dans chacune des étapes sont figurés en noir. En rouge, sont indiquées les protéines jouant un rôle crucial dans les différentes phases de formation du biofilm (Alim et al., 2018).

4. La sécrétion d'enzymes lytiques

La sécrétion d'enzymes lytiques est l'une des principales stratégies utilisées par les pathogènes microbiens pour coloniser et infecter leur hôte (Dubin *et al.,* 2013). De nombreuses études ont démontré la corrélation entre sécrétion des Secreted Aspartyl Proteases (SAP) et la pathogénicité de *C. albicans*, les souches les plus virulentes étant les plus productrices (Rüchel, 1992). Produites sous la forme de pré-protéines inactives, les protéases

de cette famille se caractérisent par la présence dans leur séquence d'un peptide signal, adressant la protéine au système de sécrétion (Pfeffer *et al.,* 1987), de nombreux résidus cystéines stabilisant la structure 3D de la protéine et de deux acides aspartiques dans leur site actif. Chez *C. albicans*, 10 gènes codant pour des aspartyls protéases, notés *CaSAP1* à *CaSAP10* ont été caractérisés. Les Saps 1 à 8 sont sécrétées sous forme d'enzymes solubles, tandis que, les Saps 9 et 10, qui possèdent dans leur partie C-ter un motif de fixation pour un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont ancrées dans la membrane plasmique ou la paroi (Hube *et al.,* 2001). Toutes les Saps ne sont pas exprimées simultanément. Certaines sont spécifiques d'un stade morphologique. Par exemple les gènes *CaSAP1* à *CaSAP3* sont principalement exprimés par la forme levure, tandis que les gènes Ca*SAP4 à CaSAP6* sont majoritairement exprimés dans la forme hyphale (Schweizer *et al.,* 2000). De plus, dans un modèle d'infection systémique, les mutants délétés de *CaEFG1*, principal régulateur du dimorphisme (Stoldt *et al.,* 1997), présentent un défaut de production des hyphes associé à une diminution drastique de l'expression des gènes *CaSAP4*, *CaSAP5* et *CaSAP6* (Felk *et al.,* 2002). Le développement de l'hyphe et l'expression de cette sous-famille de protéases sont donc des mécanismes co-régulés. La diminution de l'expression de ces protéases est corrélée à une forte atténuation de la virulence en modèle murin (Sanglard *et al.,* 1997).

La morphologie de la cellule n'est pas le seul paramètre influençant l'expression des *SAPs*. L'état des interactions entre *C. albicans* et son hôte (commensales ou pathogènes) modifie aussi le profil d'expression des protéases. Au niveau de la cavité orale, les gènes *CaSAP2*, et *CaSAP4* à *CaSAP7* sont détectés chez les porteurs sains et les patients au cours de la colonisation de l'épithélium tandis que les gènes *CaSAP1* et *CaSAP3*, associés à l'apparition des lésions, sont seulement détectés chez les patients lors de l'invasion du tissu épithélial (Schaller *et al.,* 1999).

Des travaux *in vitro* menés sur des modèles d'épithélium humain reconstitué (RHE) ont permis de mettre en évidence que l'ordre d'expression des *SAP* était largement différent selon le tissu considéré (Schaller *et al.,* 1998, 1999, 2000 et 2003). Cependant, dans tous les cas, le rôle prépondérant des protéases *Ca*Sap1, *Ca*Sap2 et *Ca*Sap3, dans la mise en place des infections superficielles a été mis en évidence. L'expression différentielle des *SAPs* au cours de l'infection laisse également supposer qu'elles n'ont pas toutes les mêmes fonctions. L'aspartyl protéinase *Ca*Sap2, connue pour avoir un large spectre d'activité, dégrade de nombreuses protéines humaines dont celle de la matrice extracellulaire : kératine, collagène, vimentine et laminine (Morschhäuser *et al.,* 1997). Cette dégradation permet d'une part de fournir des nutriments au pathogène, mais aussi de révéler de potentiels sites de fixation, afin d'améliorer l'adhésion, la colonisation et la pénétration dans les tissus de l'hôte (Klemba *et al.,* 2002).

Au cours du processus infectieux, *C. albicans* sécrète d'autres enzymes lytiques comme des phospholipases (PLs). Le rôle de ces enzymes dans l'infection n'est pas clairement connu, cependant, il a été démontré qu'elles favorisent l'adhésion aux cellules épithéliales et la pénétration des tissus de l'hôte (Pugh et Cawson, 1977 ; Barrett-Bee *et al.,* 1985). Dans un modèle RHE, les phospholipases sont requises pour l'invasion (Jayatilake *et al.,* 2005).

Les PLs les plus étudiées sont celles appartenant à la sous-famille B (PLB). Cinq gènes codant pour des PLB ont été identifiés dans le génome de *C. albicans* (*CaPLB1-5*) (Ghannoum, 2000 ; Schaller *et al.,* 2005). La délétion de *CaPLB1* et *CaPLB5* atténue la virulence des cellules dans un modèle murin de candidose systémique et intestinale (Leidich *et al.,* 1998 ; Ghannoum *et al.,* 2000, Theiss *et al.,* 2006).

Enfin, une troisième catégorie d'enzymes hydrolytiques, les lipases, sont produites au cours de l'infection. Dix représentants de cette famille *CaLIP1* à *CaLIP10* ont été identifiés chez *C. albicans*. Des orthologues ont été retrouvés dans le génome d'autres *Candida* pathogènes comme *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei* (Fu *et al.,* 1997). La plupart des lipases sont exprimées au cours de la transition morphologique (Hube *et al.,* 2000), suggérant un rôle de ces enzymes dans la pathogénicité. À ce jour, seul le rôle de *Ca*Lip8 dans la virulence a été démontré, en effet, le mutant *Calip8Δ/Δ* est hypovirulent dans un modèle murin de candidose systémique (Gacser *et al.,* 2007).

5. La production de toxine

Parmi les nombreux facteurs de virulence exprimés par les microorganismes pathogènes, il en est un : la production et la sécrétion de toxine, qui a longtemps été considéré comme propre aux bactéries pathogènes. La sécrétion de ces toxines est souvent associée à l'apparition de dommages cellulaires et tissulaires chez l'hôte, liés à l'action cytotoxique de ces molécules. Chez *C. albicans*, la formation de l'hyphe au cours de l'infection des muqueuses, est corrélée à l'apparition des lésions tissulaires (Moyes *et al.,* 2014, Murciano *et al.,* 2005). Cependant, le mécanisme moléculaire sous-jacent responsable de la cytotoxicité de l'hyphe n'a été que très récemment élucidé. En 2016, Moyes *et al,* ont identifié chez *C. albicans* le gène *CaECE1* (Extent of Cell Elongation). Les souches délétées de ce gène conservent leur capacité à adhérer et à envahir les épithéliums, mais sont incapables d'induire des lésions épithéliales. *CaECE1* code pour une protéine de 271 acides aminés. L'analyse moléculaire de la séquence de la protéine *Ca*Ece1p a révélé la présence (i) d'un peptide signal qui permet l'adressage de la protéine au système de sécrétion, (ii) de 7 motifs dibasiques lysine-arginine (KR). In vitro, il a été démontré que *Ca*Ece1p était un substrat de la protéine *Ca*Kex2p, une endoprotéinase qui reconnait et clive les protéines après un motif lysine-arginine (KR) ou arginine-arginine (RR) (Bader *et al.,* 2008). *Ca*Ece1p possédant 7 motifs KR, ce sont 8 peptides différents qui vont être produits sous l'action de la protéinases *Ca*Kex2p. Ces 8 peptides, notés *Ca*Ece1p-I à *Ca*Ece1p-VIII, ont tous été retrouvés dans le sécrétome de l'hyphe au cours de l'invasion des muqueuses. Cependant, seul le peptide *Ca*Ece1p-III, renommé « candidalysine » possède une activité cytotoxique (Moyes *et al.,* 2016).

La candidalysine est un peptide amphiphatique d'une longueur de 31 acides aminés, se caractérisant par une partie N-terminale hydrophobe organisée en hélice alpha, et une partie C-terminale hydrophile. L'organisation générale de la candidalysine est similaire à celle d'autres toxines cytolytiques comme la melittine, composant le venin de l'abeille (*Apis mellifera*), ou la magainine produite par certaines grenouilles (*Xenopus laevis*) (Moyes *et al.,* 2016). L'action cytolytique de la melittine est dose dépendante. À faible concentration la toxine est inactive, mais lorsque la concentration augmente, les peptides subissent une rotation, s'oligomérisent et s'insèrent perpendiculairement à la membrane pour former des pores toroïdaux, responsables de la lyse des cellules (Jamasbi *et al.,* 2015). De façon analogue, l'action cytotoxique de la candidalysine a été mise en évidence aux fortes concentrations (Moyes *et al.,* 2016). Le cholestérol présent dans les membranes des cellules de l'hôte favoriserait l'interaction toxine-membrane (Mitchell, 2016). L'association de la toxine et de sa cible entraine une perméabilisation rapide et transitoire des cellules s'accompagnant d'un flux entrant d'eau et de calcium, ce qui est cohérent avec la formation de pores membranaires (Fig. 9).

Au cours du processus infectieux, l'hyphe adhère à la surface de l'épithélium par le biais de la protéine *Ca*Hwp1 et de l'adhésine *Ca*Als3. Une autre protéine pariétale, *Ca*Ssa1 est impliquée dans la liaison aux N et E cadhérine de l'hôte et favorise l'endocytose de l'hyphe (Sun *et al.,* 2010). Il se forme alors une « poche d'invasion » dans laquelle l'hyphe sécrète la candidalysine (Fig. 9). La formation de cette structure permet de concentrer en un seul point la sécrétion de la toxine dont l'action cytotoxique augmente en même temps que sa concentration.

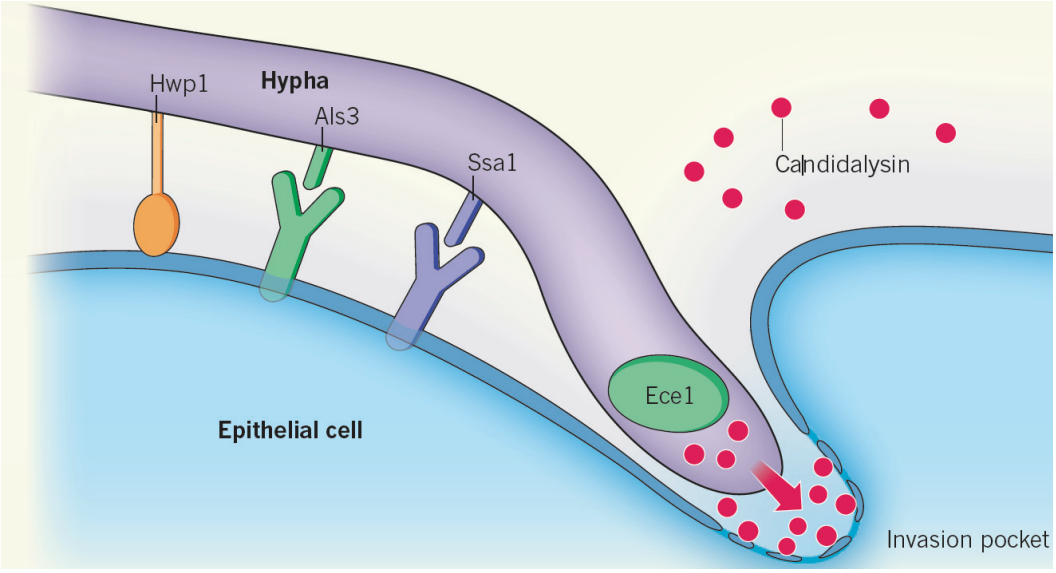


Figure 9 : Le champignon pathogène C. albicans infecte son hôte par la formation de structures filamenteuses appelées hyphes. L'adhésine CaHwp1, et les invasines CaAls3 et CaSsa1 entrent en contact avec la cellule hôte directement ou par l'intermédiaire des protéines réceptrices pour favoriser l'adhésion de l'hyphe et la formation d'une poche d'invasion. La candidalysine, agit comme une toxine qui s'accumule dans la poche d'invasion et dégrade la membrane de la cellule hôte, conduisant à la perméabilisation de la membrane et l'induction des défenses de l'hôte (Mitchell, 2016).

Récemment, il a également été suggéré que cette toxine pourrait favoriser la captation du fer par *C. albicans* au cours de l'infection des muqueuses (Brown *et al.,* 2019). La formation de pore membranaire par la candidalysine pourrait conduire à la libération de la ferritine, qui serait alors captée par l'adhésine *Ca*Als3 dont l'implication dans l'assimilation du fer a été bien documentée (Almeida *et al.,* 2008).

6. L'échappement au système immunitaire

a) Échapper à la phagocytose

L'initiation de la réponse immunitaire nécessite la détection du pathogène par les cellules immunitaires. Cette détection est effectuée grâce à la reconnaissance d'éléments spécifiques du champignon, les PAMPs, par des récepteurs localisés à la surface des cellules de l'hôte (PRR) (Fig. 10). L'interaction PAMP-PRR conduit à l'activation de la réponse immunitaire et à la phagocytose du corps étranger par les macrophages et les neutrophiles.

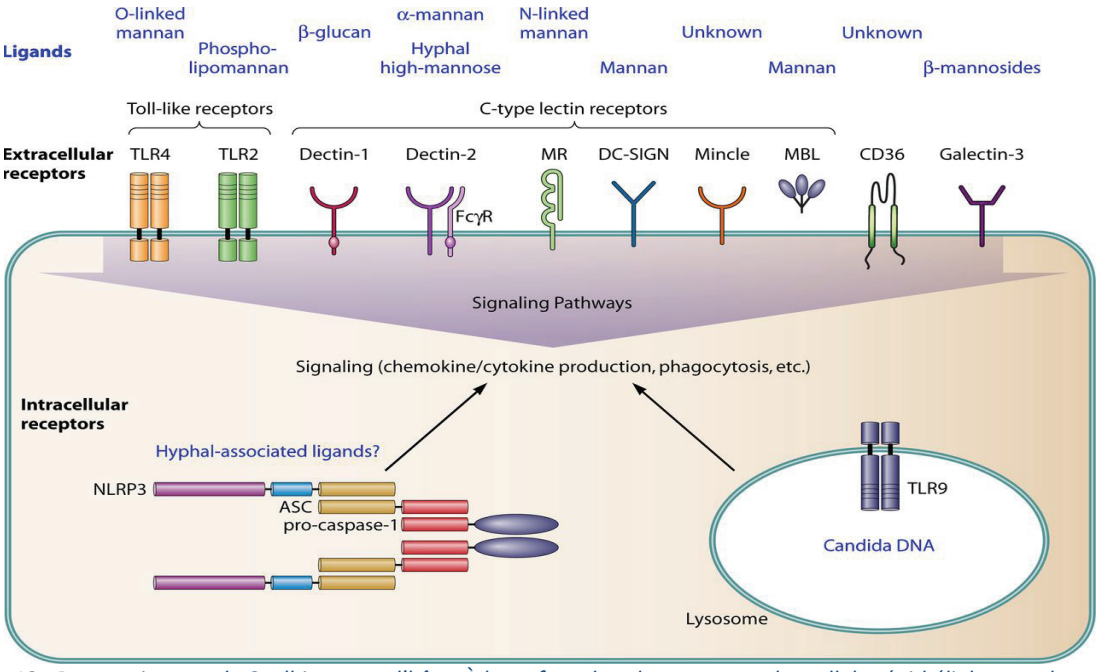


Figure 10 : Reconnaissance de C. albicans par l'hôte. À la surface des phagocytes et des cellules épithéliales, une batterie de récepteurs appartenant à la famille des Toll-like récepteurs ou des C-type lectine récepteurs (PRR) sont dédiés à la reconnaissance des éléments antigéniques portés par la levure (PAMPs). La stimulation de ces récepteurs conduit à l'activation de la réponse immunitaire et notamment à la production de cytokines et chémokines, et induisant la phagocytose de l'élément étranger (Cheng et al., 2012).

L'une des stratégies pour échapper au système immunitaire consiste donc à masquer les éléments immunogènes (Fig. 11). Chez *C. albicans*, les ß-glucanes, principaux éléments antigéniques de la paroi reconnus par la Dectin 1, sont masqués par une épaisse couche de mannoprotéines. Ainsi en diminuant l'exposition des ß glucanes, le champignon n'est pas détecté par le système immunitaire de l'hôte. La paroi fongique, qui se trouve à l'interface entre le champignon et son hôte, joue un rôle fondamental dans la protection de la levure notamment au phénomène de phagocytose. Les levures présentant une paroi altérée (traitement aux échinocandines ou protéases de l'hôte) sont plus facilement phagocytées par les macrophages, de même que les mutants présentant une déficience en mannanes. La transition white-opaque joue aussi un rôle dans l'échappement au système immunitaire. En effet, Geiger *et al.,* (2004) ont démontré que le phénotype white de *C. albicans* libère dans son environnement des molécules agissant comme des chimio-attractants pour les neutrophiles, tandis que la forme opaque n'en produit pas. Le groupe de Sasse *et al.,* 2013 ont démontré que dans une population mixte de levures, contenant des cellules white et opaque, les neutrophiles phagocytent spécifiquement les cellules white. Ainsi les cellules présentant le phénotype opaque sont « invisibles » pour les neutrophiles.

Une autre stratégie pour échapper à la phagocytose consiste à dégrader le facteur du complément C3b, qui est responsable de l'opsonisation. La dégradation de ce facteur empêche la reconnaissance et la capture des microorganismes. En 2009, Gropp *et al.,* ont mis en évidence que la dégradation des facteurs, C3b, C4b et C5, du complément était médiée par les Saps (1,2 et 3) produites par *C. albicans*. Le facteur H, qui est un contrôleur critique du complément peut être ciblé et dégradé par *Ca*Sap2, empêchant aussi la phagocytose du champignon. En outre, *C. albicans* est capable de produire directement des inhibiteurs du complément, comme la protéine *Ca*Pra1, régulée par le pH. Elle peut se lier à certains composants plasmatiques comme le facteur H inhibant l'activation du complément et du facteur C3 (Luo *et al.,* 2009, 2010, 2011).

Enfin, la matrice extracellulaire du biofilm, en agissant comme une barrière protectrice contribue intrinsèquement à l'échappement au système immunitaire en protégeant le pathogène de la phagocytose par les leucocytes (Chandra *et al.,* 2007 ; Hirschfeld, 2014).

b) Survie après la phagocytose

Quand elle est phagocytée, la levure est capable d'adopter un mode de développement filamenteux. Cette transition morphologique est induite par la production de CO_2 et le pH alcalin régnant à l'intérieur du macrophage (Marcil *et al.,* 2002 ; Ghosh *et al.,* 2009 ; Vylkova *et al.,* 2011). Ces signaux activent la voie de l'AMPC/PKA conduisant à l'activation du facteur de transcription *Ca*Efg1 (Fig. 7). La croissance hyphale entraine une rupture de l'intégrité membranaire des phagocytes conduisant à l'activation des voies de mort cellulaire programmée (Fig. 11).

C. albicans est aussi capable de moduler le trafic membranaire à l'intérieur du macrophage en inhibant la fusion du lysosome et du phagosome en délogeant de la membrane plasmique les marqueurs nécessaires à la maturation du phagosome (LAMP-1) et en inhibant l'acquisition de certains marqueurs LBP1 et vATPase (Fernandez-Arenas *et al.,* 2009) (Fig. 11). Ce mécanisme n'est pas exclusif à *C. albicans* et a été décrit chez d'autres pathogènes humains comme *Salmonella*, *Rhodococcus* et *Mycobactérium* (Brumell *et al.,* 2001 ; Vieira *et al.,* 2004 ; Fernandez-Mora *et al.,* 2005). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents responsables de la perte de ces marqueurs ne sont pas connus.

Dans les phagocytes, *C. albicans* est capable d'empêcher l'acidification du phagosome en libérant de l'ammonium. *In vitro*, l'addition de Bafilomycine A1, un inhibiteur chimique de l'acidification du phagosome, réduit drastiquement la capacité des phagocytes à éliminer *C. albicans*. Ainsi, maintenir un pH favorable dans le phagosome est une stratégie importante de survie pour le pathogène (Fernandez-Arenas *et al.,* 2009). Au cours de l'interaction hôte-pathogène, les phagocytes produisent rapidement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui aident à éliminer les microbes (Dinauer, 1993 ; Morgenstern *et al.,* 1997) et activent des voies de signalisation multiples dédiées à la défense de l'hôte (Torre, 2002 ; Netea *et al.,* 2008). La production des ROS est corrélée à l'activation de la NADPHoxydase dans les phagocytes (Babior 2004), ce qui conduit à la formation d'anions superoxyde $O2^-$ (Schrenzel *et al.,* 1998) rapidement convertis en H_2O_2, OH^- et en acide hypochloreux (uniquement dans les neutrophiles). Pour contrer le burst oxydatif, *C. albicans* dispose d'une catalase *Ca*Cat1 codée par le gène *CaCAT1*, qui protège les cellules des effets négatifs de H_2O_2 en décomposant ce composé en oxygène et en eau. Les mutants *Cacat1Δ/Δ* sont hypovirulents en modèle murin (Chauhan *et al.,* 2006). En plus d'une catalase, 6 gènes codant pour des superoxides dismutases (*SOD*) ont été identifiés dans le génome de *C. albicans*. Ces enzymes sont présentes dans tous les compartiments cellulaires, *Ca*Sod1 et 3 sont retrouvées dans le cytoplasme, tandis que *Ca*Sod2 est mitochondriale. Enfin les *Ca*Sod4, 5 et 6 sont présentes à la surface de la cellule via une ancre GPI (Chauhan *et al.,* 2006 ; Fradin *et al.,* 2005). La délétion de *CaSOD1* et *CaSOD5* réduit drastiquement la virulence de *C. albicans* en modèle murin (Hwang *et al.,* 2002), suggérant que l'adaptation au burst oxydatif est requis pour la survie et virulence de la levure.

c) Résistance aux peptides antimicrobiens

Au niveau des muqueuses orales, intestinales et vaginales, *C. albicans* est exposée à l'action de peptides antimicrobiens produits par les cellules épithéliales. La résistance à ces composés met en jeu plusieurs mécanismes, comme la sécrétion de protéases ou encore le développement de pompes à efflux. Par exemple, les protéases *Ca*Sap9 et *Ca*Sap10 ancrées dans la membrane par une ancre GPI contribuent à la dégration de l'histatine 5, principal peptide antimicrobien présent dans la cavité orale (Meiller *et al.,* 2009). De plus, le glycodomaine de la protéine membranaire *Ca*Msb2, libéré dans le milieu extracellulaire sous l'action d'une protéase inconnue, participe activement et de façon dose dépendante à la défense de *C. albicans* contre les peptides antimicrobiens, dont l'histatine 5, la cathélicidine LL-37 et la ß-défensine 1 (Puri *et al.,* 2012 ; Swidergall *et al.,* 2013 ; Szafranski-Schneider *et al.,* 2012). En effet, les mutants déficients en *Ca*Msb2 sont beaucoup plus sensibles à l'activité antifongique de ces peptides (Swidergall and Ernst, 2014). La résistance à ces composés peut aussi passer par le biais de mécanismes d'efflux actif. Ainsi, la polyamine perméase *Ca*Flu1, qui appartient à la famille des transporteurs MDR, joue un rôle important dans l'élimination cytoplasmique de l'histatine 5 (Li *et al.,* 2013).

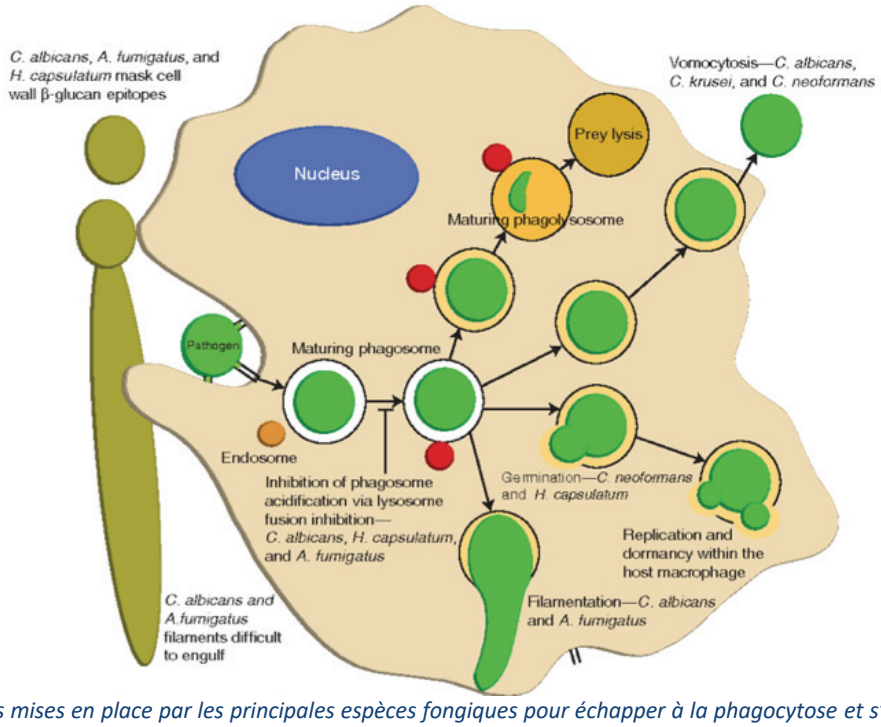


Figure 11 : Stratégies mises en place par les principales espèces fongiques pour échapper à la phagocytose et s'échapper du phagosome. C. albicans, masque les ß-glucanes composant sa paroi sous une couche de mannoprotéine, bloque la maturation du phagosome, s'échappe de celui-ci en adoptant un mode de développement filamenteux (Gilbert, Wheeler et May, 2014).

7. La flexibilité métabolique de *C. albicans*

Au cours d'une infection systémique, *C. albicans* est capable, par le biais de mécanismes actifs mettant en jeu le développement des hyphes, ou passifs en induisant sa phagocytose par les cellules épithéliales et endothéliales, de gagner la circulation sanguine (Phan *et al.,* 2007 ; Wächtler *et al.,* 2012). Ce passage dans le flux sanguin, lui permet de se disséminer efficacement dans son hôte et de coloniser de nombreux organes comme le cœur, le foie, les reins, ou encore le cerveau. Dans ces environnements particuliers, les conditions physico-

chimiques et les nutriments disponibles varient en quantité et en qualité. Pour assurer sa survie et mettre en place une infection, la levure doit être capable de détecter et d'assimiler les ressources carbonées localement disponibles. Dans les systèmes biologiques complexes, comme un hôte humain, les sources carbonées physiologiques principalement disponibles sont les acides gras, le lactate, l'acétate et les hexoses (glucose, galactose, fructose …). Ces ressources sont respectivement assimilées via les voies de la ß-oxydation, du cycle du glyoxylate, de la néoglucogenèse et de la glycolyse. Ces voies métaboliques, ainsi que les conséquences de leur invalidation sur la physiologie et la virulence de la levure seront abordées en détail dans les chapitres suivants.

III. Rôle du métabolisme carboné central dans la virulence

A. Le glucose est la source carbonée préférée des microorganismes : détection et transport

Le glucose est le monosaccharide le plus abondant sur terre et sert de source d'énergie à la plupart des microorganismes (Towle *et al.,* 2005). Bien que ces derniers soient capables d'utiliser une large gamme de sources de carbone, le glucose est préférentiellement assimilé par l'ensemble des êtres vivants et en particulier par les levures qui ont perfectionné de nombreux réseaux de régulation permettant la détection, l'acquisition et l'utilisation de ce sucre (Santangelo, 2006 ; Dashko *et al.,* 2014 ; Zhao et Keating, 2007). Chez la levure modèle *S. cerevisiae*, deux voies de signalisation, largement étudiées, sont dédiées à la perception du glucose extracellulaire : la voie SRR (Sugar Receptor Repressor) et la voie des récepteurs couplés aux protéines G (Conrad *et al.,* 2014) (Fig. 12 A et B).

Chez *C. albicans*, ces voies semblent avoir été conservées, mais très peu de données moléculaires sont disponibles concernant les différents acteurs. Je détaillerai donc dans un premier temps ce qui est connu chez *S. cerevisiae*, puis présenterai l'état des connaissances chez *C. albicans*.

1. La voie Sugar Receptor Repressor (SRR) chez *S. cerevisiae*

Cette voie de signalisation contrôle l'expression des perméases qui vont permettre l'entrée du glucose dans la cellule (Fig. 12 A). Chez *S. cerevisiae*, 17 perméases ayant des affinités et des propriétés cinétiques différentes ont été identifiées (Ozcan et Johnston, 1995). La structure générale de ces perméases est conservée et toutes sont constituées de 12 traversées transmembranaires, formant un pore dans la membrane et permettant l'entrée du glucose par diffusion facilitée (Ozcan et Johnston, 1999). Initialement classés parmi les perméases, les senseurs du glucose *Sc*Snf3 et *Sc*Rgt2, ne présentent que très peu d'homologie (25%) avec les autres perméases. Bien que possédant les 12 traversées membranaires caractéristiques des perméases, les senseurs sont incapables de transporter le glucose. Ils sont caractérisés par la présence d'une longue extension cytosolique en C-ter d'environ 200 acides aminés, supposée jouer un rôle important dans la transduction du signal en réponse à la perception du glucose (Marshall-Carlson *et al.,* 1990). En effet, la délétion de cette extension abolit la signalisation glucose. Des expériences de délétion ont permis d'identifier la partie fonctionnelle de cette extension qui semble être une région de 25 aa répétée 2 fois chez

*Sc*Snf3 et 1 fois chez *Sc*Rgt2 (Ozcon *et al.,* 1998). Ces deux senseurs ont des propriétés biochimiques différentes. *Sc*Rgt2 est un senseur de faible affinité activé par les fortes concentrations en glucose. La stimulation de *Sc*Rgt2 génère un signal autorisant l'expression des transporteurs de faible affinité comme *ScHXT1* et *ScHXT3* (Ozcon *et al.,* 1996). À l'inverse, *Sc*Snf3 est un senseur de forte affinité percevant les traces de glucose et contrôlant l'expression des perméases de forte affinité comme *ScHXT2* et *ScHXT4* (Ozcan et Johnston, 1995 ; Boles *et al.,* 1997).

En réponse à la fixation du glucose sur les senseurs, les yeast caséines kinases *Sc*Yck1/2 sont activées (Fig. 12A). Ces protéines, ancrées dans la membrane plasmique par le biais d'un groupement palmitoyl, sont des sérines kinases reconnaissant le motif consensus 5'-SXXS- 3. Une fois activées ces kinases participent à la phosphorylation des corépresseurs transcriptionnels *Sc*Std1 et *Sc*Mth1 (Fig. 12) (Schmidt *et al.,* 1999 ; Lafuente *et al.,* 2000).

En absence de glucose, ces deux corépresseurs sont localisés dans le noyau et interagissent avec le répresseur transcriptionnel *Sc*Rgt1, pour inhiber l'expression des gènes *ScHXT* codant les perméases au glucose (Van Ende *et al.,* 2019). Le modèle classiquement établi décrit qu'en présence de glucose, les répresseurs transcriptionnels *Sc*Mth1 et *Sc*Std1 sont recrutés au niveau de l'extension cytosolique des senseurs où ils sont phosphorylés par les yeast caséine kinases *Sc*Yck1/2 (Schmidt *et al.,* 1999 ; Lafuente *et al.,* 2000) (Fig. 12A). Le changement de conformation des corépresseurs résultant de cette phosphorylation expose des résidus lysine qui seront ubiquitinés par l'ubiquitine ligase SCF^{GRR1}(Flick *et al.,* 2003 ; Kim *et al.,* 2006) (Fig. 12A). L'ubiquitination des co-répresseurs *Sc*Mth1 et *Sc*Std1 conduit à leur adressage et à leur dégradation au niveau du protéasome 26S (Moriya et Johnston, 2004). Cependant, une récente étude a mis en évidence que la localisation de *Sc*Mth1 ainsi que sa dégradation en réponse à la perception du glucose était exclusivement nucléaire (Pasula *et al.,* 2010). Ainsi la façon dont le signal est transduit des senseurs aux corépresseurs n'est pas clairement définie.

La dégradation des corépresseurs *Sc*Mth1 et *Sc*Std1, en présence de glucose, déstabilise le complexe répresseur. Le répresseur transcriptionnel *Sc*Rgt1 se détache de l'ADN ce qui autorise l'expression des perméases au glucose (Fig. 12A). Les fonctions de ScRgt1 sont complexes et dépendent de son état de phosphorylation. En absence de glucose, *Sc*Rgt1 est hypophosphorylé. Sous cette forme, il se lie au niveau des promoteurs des gènes codant pour les perméases au glucose par le biais de son domaine en doigt de zinc ($Cys6Zn_2$) et recrute avec l'aide de *Sc*Mth1 le complexe répresseur général de la transcription *Sc*Tup1-Ssn6 (Roy *et al.,* 2013). Ensemble, les différents acteurs de ce complexe répriment l'expression des perméases au glucose.

En présence de glucose, la PKA, qui est activée par une seconde voie de signalisation est relocalisée dans le noyau et phosphoryle *Sc*Rgt1 (Fig. 12A et B). En 2006, Kim et Johnston ont identifié dans la séquence de *Sc*Rgt1, 4 sérines (146, 202, 283 et 284) pouvant être phosphorylées par la PKA. Si la phosphorylation d'un seul de ces résidus suffit à modifier drastiquement les fonctions de *Sc*Rgt1, qui devient alors un activateur transcriptionnel des gènes *ScHXT*, la phosphorylation des quatre résidus est nécessaire pour lever complètement les fonctions de répression de *Sc*Rgt1 (Kim et Johnston, 2006).

2. La voie SRR chez *C. albicans*

Chez *C. albicans*, une vingtaine de transporteurs d'hexose, dont l'expression varie en fonction de la concentration en glucose, a été identifiée (Fan *et al.,* 2002). Parmi eux, le gène *CaHGT4*, orthologue fonctionnel des gènes *ScSNF3/ScRGT2*, code pour un senseur du glucose

extracellulaire (Brown *et al.,* 2006) (Fig. 12A). Localisé à la membrane plasmique, *Ca*Hgt4 est capable, par le biais de son extension cytosolique d'initier une cascade de signalisation permettant l'expression des gènes *CaHGT/HXT* impliqués dans le transport du glucose (Brown *et al.,* 2006). Chez le mutant Ca*hgt4Δ/Δ*, la croissance en présence de glucose est fortement affectée, ainsi que, la régulation par le glucose de certains gènes codants les perméases au glucose (*CaHXT10*, *CaHGT12* et *CaHGT7*) (Brown *et al.,* 2006). L'expression de Ca*HGT4* est réprimée par les fortes concentrations en glucose et induite par des concentrations similaires à celle du sérum humain (5mM). Ensemble, ces données suggèrent que Ca*HGT4* code pour un senseur de forte affinité capable de percevoir les traces de glucose (Van Ende *et al.,* 2019). La délétion du senseur *Ca*Hgt4, conduit à un phénotype d'hypofilamentation et d'hypovirulence en modèle murin, indiquant que la perception du glucose via *Ca*Hgt4 est impliquée dans la transition morphologique et la virulence de *C. albicans* (Brown *et al.,* 2006).

Dans un modèle murin de candidose orale, les gènes *CaHGT6* et *CaHGT12* sont fortement exprimés au cours de l'infection (Fanning *et al.,* 2012). *CaHGT7,* quant à lui, est induit dans un modèle de candidose intestinale (Cheng *et al.,* 2013). Enfin, la transcription des gènes *CaHGT2*, *CaHGT4*, *CaHGT7*, *CaHGT12* et *CaHGT17* est séquentiellement activée au cours du processus infectieux dans un modèle de candidose disséminée (Wenjie *et al.,* 2015). Ces résultats mettent en évidence que l'expression des perméases au glucose est niche-spécifique et suggèrent que la détection et le transport du glucose sont des mécanismes importants dans la mise en place de l'infection.

Si le rôle du senseur *Ca*Hgt4 a été bien décrit chez *C. albicans*, les étapes concernant la caséine kinase, la dégradation et la localisation du co-répresseur *Ca*Std1, et la phosphorylation de *Ca*Rgt1 n'ont jamais été décrites et sont déduites du modèle *S. cerevisiae* (Brown *et al.,* 2009) (Fig. 12A). En plus de son rôle supposé dans la voie SRR (Brown *et al.,* 2009), une récente étude a mis en évidence que la yeast caséine kinase *Ca*Yck2 était chez *C. albicans*, aussi impliquée dans la morphogenèse, la formation du biofilm, et l'intégrité pariétale (Jung *et al.,* 2017). *In vitro*, en présence de cellules épithéliales et endothéliales, il a été démontré que la délétion du gène *CaYCK2* diminue drastiquement les capacités de la levure à générer des lésions cellulaires (Jung *et al.,* 2017).

Chez *C. albicans*, des analyses globales du transcriptome du mutant *Cargt1Δ/Δ* ont révélé, qu'en absence de glucose, ce dernier est impliqué dans la répression de l'expression de nombreux gènes codant les transporteurs d'hexoses (Sexton *et al.,* 2007). Chez le double mutant *Cahgt4rgt1Δ/Δ*, l'expression des perméases au glucose est restaurée, suggérant, de façon analogue à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae* que *CaRgt1* agit en aval de *CaHgt4* (Brown *et al.,* 2006) (Fig. 12A). La mutation de *CaRGT1*, tout comme celle de *CaSTD1*, provoque l'hyperfilamentation de *C. albicans* et supprime le phénotype hypofilamenteux du mutant *Cahgt4Δ/Δ,* indiquant que le senseur *Ca*Hgt4 affecte la filamentation en modulant l'import du glucose et le métabolisme via le répresseur *Ca*Rgt1.

3. La voie des récepteurs couplés aux protéines G chez S. *cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, une deuxième voie de signalisation mettant en jeu un récepteur couplé à une protéine G (RCPG) est impliquée dans la perception du glucose extracellulaire (Fig. 12B). Cette voie de signalisation fait intervenir deux acteurs moléculaires majeurs : le récepteur *Sc*Grp1, constitué d'une seule chaine polypeptidique traversant 7 fois la membrane plasmique, et la petite protéine G *Sc*Gpa2 (Fig. 12B). Le récepteur *Sc*Gpr1 est un senseur de faible affinité capable de percevoir les fortes concentrations (≥ 20mM) de glucose et de

sucrose (Thevelein, 1999 ; Rolland *et al.,* 2000). La fixation du glucose sur *Sc*Gpr1, modifie la conformation tridimensionnelle du récepteur. Les traversées membranaires 3 et 7 initialement liées par une liaison covalente, se séparent, tandis que la traversée 6 subit une rotation de 30°. Ce changement de conformation révèle le site de fixation de la protéine G *Sc*Gpa2, qui, en se liant à *Sc*Gpr1, sera activée. Le passage de la forme inactive à active se fait par échange de nucléotide GDP vers GTP (Fig. 12B). *Sc*Gpa2-GTP active alors l'adénylate cyclase *Sc*Cyr1 qui catalyse la formation d'AMPc à partir d'ATP (Uno *et al.,* 1985 ; Nakafuku *et al.,* 1988 ; Mitts *et al.,* 1990 ; Kraakman *et al.,* 1999) (Fig. 12B). L'augmentation du niveau d'AMPc intracellulaire subséquent à l'activation de l'adénylate cyclase, entraine l'activation de la PKA. La PKA est une protéine multimérique composée de sous-unités régulatrices codées par le gène *ScBCY1* et de sous-unités catalytiques codées par les gènes *ScTPK1*, *ScTPK2* et *ScTPK3*. La fixation de l'AMPc au niveau des sous-unités régulatrices entraine la libération et l'activation des sous-unités catalytiques de la PKA (Fig. 12B). Cependant, plusieurs groupes ont mis en évidence que, l'import et la métabolisation du glucose étaient requis pour l'activation complète de la PKA (Rolland *et al.,* 2000 ; Thevelein *et al.,* 2000). Le mécanisme moléculaire sous-jacent, est longtemps resté mal compris. Mais récemment, Peeters *et al.,* 2017 ont mis en évidence que le fructose 1,6-biphosphate, un intermédiaire de la glycolyse, est capable d'interagir avec la protéine *Sc*Cdc25, puis d'activer la protéine *Sc*Ras. Sous sa forme active (*Sc*Ras-GTP), cette protéine interagit avec l'adénylate cyclase *Sc*Cyr1 conduisant à l'activation de la PKA (Toda *et al.,* 1985 ; Jacquet, 1997) (Fig. 12B). Les deux voies de signalisation agissant en amont de l'adénylate cyclase *Sc*Cyr1, sont requises pour l'activation complète de la PKA. Une fois activée, la PKA participe à la phosphorylation du corépresseur *Sc*Rgt1. Cette voie de signalisation contribue donc directement au contrôle de l'expression des perméases au glucose (Fig. 12 A et B).

4. La voie des récepteurs couplés aux protéines G chez *C. albicans*

Des analyses par blast dans le génome de *C. albicans* ont permis de mettre en évidence la présence de gènes orthologues codant respectivement pour le récepteur *Ca*Gpr1 et la petite protéine G *Ca*Gpa2 (Fig. 12B). La structure générale du récepteur, notamment les 7 traversées membranaires est conservée (Miwa *et al.,* 2004) et *Ca*Gpr1 présente 43% d'identité avec son homologue chez *S. cerevisiae*. Cependant, de façon inattendue, chez *C. albicans* le niveau d'AMPc intracellulaire en réponse au glucose n'est pas affecté chez le mutant *Cagpr1Δ/Δ*, alors qu'il l'est chez le mutant *Caras2Δ/Δ*. Ceci suggère que le récepteur *Ca*Gpr1 n'est pas impliqué dans la perception du glucose chez cette levure et que l'activation de la synthèse d'AMPc est principalement permise par le module *Ca*Cdc25 et *Ca*Ras2 (Maiden *et al.,* 2005).

Chez *C. albicans*, cette voie de signalisation semble être impliquée dans le contrôle de la morphogenèse de la levure. En effet, la délétion de *Ca*Gpr1 et de *Ca*Gpa2 entraine un défaut de formation des hyphes en milieu inducteur (Maidan *et al.,* 2005). L'ajout d'AMPc exogène dans le milieu, l'expression d'une forme constitutivement activée de *CaGPA2*, ainsi que la surexpression de la sous-unité catalytique de la PKA : *CaTPK1,* restaure un phénotype de filamentation normal. Ceci suggère que le récepteur *Ca*Gpr1 et la protéine G *Ca*Gpa2 agissent en amont de la PKA. Se pose alors la question du ligand capable d'activer ce récepteur. Au travers de deux études, le groupe de Van Djick (2005 ; 2018) a pu mettre en évidence que la méthionine était un bon candidat. Premièrement, il a été mis en évidence que le récepteur *Ca*Gpr1 était internalisé en présence de méthionine (Maidan *et al.,* 2005). Deuxièmement, Schrevens *et al.,* 2018 ont démontré que ce récepteur était requis pour induire la transition

hyphale en réponse à la méthionine. Enfin, Ballou *et al.,* (2016) ont mis en évidence que le lactate pourrait être un autre ligand de *Ca*Gpr1, car cette source de carbone est aussi capable d'induire l'internalisation du récepteur.

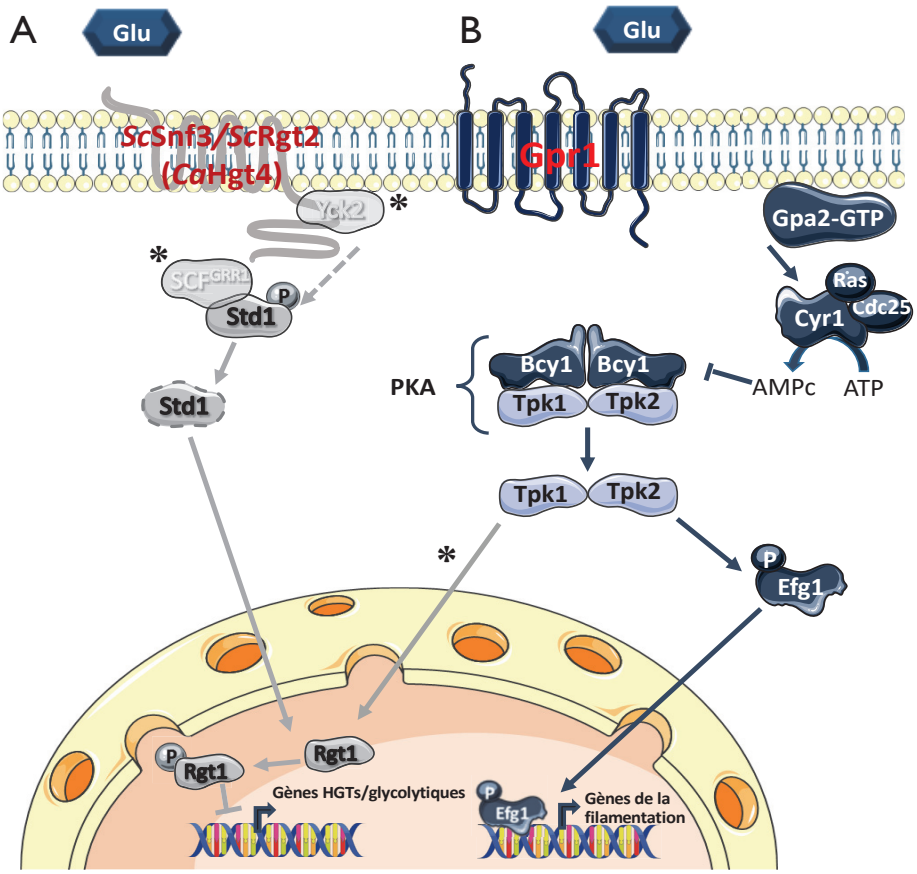


*Figure 12: Schéma général des voies de signalisation permettant la perception du glucose extracellulaire chez S. cerevisiae et C. albicans. Les éléments grisés portant un astérisque ont été déduits du modèle S. cerevisiae mais leur rôle n'a pas été démontré chez C. albicans. (**A**) Voie Sugar-Receptor-Repressor : la perception du glucose extracellulaire par les senseurs Snf3/Rgt2 (Hgt4 chez C. albicans) active une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation du répresseur transcriptionnel Rgt1, par les sous-unités catalytiques (Tpk1 et Tpk2) de la protéine Kinase A. Cette phosphorylation inhibe la liaison de Rgt1 à l'ADN, ce qui permet l'expression des gènes HGTs, des gènes impliqués dans le processus de respiration et de la fermentation. (**B**) Voie de l'adénylate cyclase : la perception du glucose par le récepteur couplé aux protéines G, Gpr1, active la protéine G Gpa2. Cette dernière active ensuite l'adénylate Cyr1, qui catalyse la formation d'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc produit se lie et inhibe les sous-unités régulatrices (Bcy1) de la protéine Kinase A. Cette inhibition permet l'activation des sous-unités catalytiques (Tpk1 et Tpk2) qui phosphorylent le facteur de transcription Efg1. Chez C. albicans, CaEfg1 est l'un des principaux régulateurs de la transition morphologique. Ce dernier entre alors dans le noyau et en se liant à l'ADN autorise l'expression des gènes déclenchant la transition morphologique.*

B. La métabolisation du glucose et son implication dans la virulence

1. La glycolyse

Dès son entrée dans la cellule, le glucose rejoint la glycolyse. Cette voie métabolique constituée de 10 étapes successives catalyse la conversion des hexoses en pyruvate, principal précurseur énergétique de la cellule (Fig. 13). Très conservée au cours de l'évolution, la glycolyse est présente dans tous les domaines du vivant, eucaryotes et procaryotes. Dans cette partie, nous allons présenter la glycolyse chez les champignons au sens large (levures et filamenteux) et analyser l'implication de cette voie métabolique sur la physiologie et la virulence de *C. albicans.*

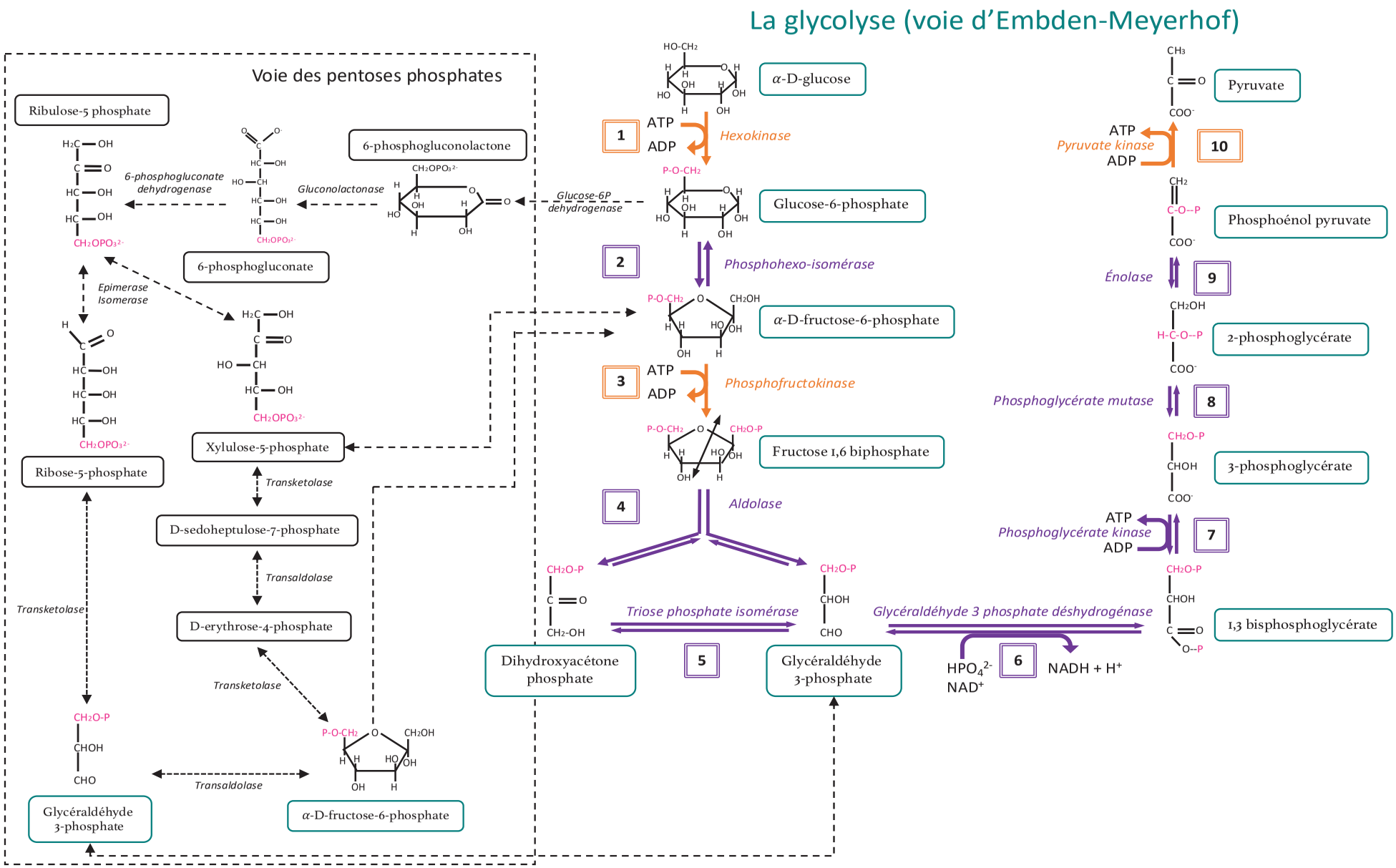


Figure 13 : Représentation schématique des différentes étapes de la glycolyse. Les éléments figurés en orange indiquent les réactions irréversibles, tandis que les éléments violets indiquent les réactions réversibles. Sur le côté gauche du schéma, figure une représentation schématique de la voie des pentoses phosphates et de ses connexions avec la voie glycolytique.

a) Première étape : la phosphorylation du glucose

La première étape irréversible de la glycolyse consiste à convertir le glucose en glucose-6-phosphate (Fig. 13). Cette étape de phosphorylation qui survient très rapidement après l'import du glucose dans la cellule, permet de maintenir dans le cytoplasme une concentration en glucose relativement faible ce qui facilite l'entrée de nouvelles molécules de glucose, par diffusion facilitée. Chez la plupart des organismes vivants, deux grandes familles d'enzymes sont capables de catalyser la phosphorylation des hexoses : les hexokinases qui sont impliquées dans la phosphorylation du glucose, du fructose et du mannose et les glucokinases qui sont spécifiquement dédiées à la phosphorylation du glucose et dans une moindre mesure à celle du mannose. Ces enzymes utilisent l'ATP comme donneur de phosphate et catalysent le transfert du 3ème phosphate sur le groupement hydroxyle du carbone 6 du glucose. La première étape de la glycolyse est donc consommatrice d'énergie.

Au niveau structural, les hexokinases et glucokinases présentent une organisation relativement similaire. Ces protéines sont constituées de deux sous-domaines caractéristiques, un petit et un grand, formant des lobes. Le site de fixation de l'ATP ainsi que le domaine consensus cœur (LGFTFSY/FP) de fixation des hexoses sont situés à l'interface de ces deux lobes. Le site de fixation des hexoses, a été très conservé au cours de l'évolution comme en témoigne le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Organism	Typical hexokinases		Atypical hexokinases	
	Protein	Sugar-binding domain[a]	Protein	Sugar-binding domain[a]
A. nidulans	Glucokinase (GlkA)	LGFTFSFP	HxkB	LAFTFSYP
	Hexokinase (HxkA)	LGFTFSYP	HxkC	MGLSWSFP
			HxkD	MGITFSFP
S. cerevisiae	Hexokinase PI	LGFTFSYP	EMI2	MGFTFSYP
	Hexokinase PII	LGFTFSFP	YLR446W	VSVTFSFP
	Glucokinase	LGFTFSYP		
A. thaliana	Hexokinase 1	LGFTFSFP	At4g37840	LGFTLTRS
	Hexokinase 2	LGFTFSFP	At3g20040	LAFTFSFP
	At1g47840	LGFTFSFP	At1g50460	LAFTFSFP
D. melanogaster	Hexokinase type 2	LGFTFSFP	Hexokinase type 1	LGIAFAFT
	Hexokinase C	LGFTFSFP		
	CG3001	LGFTFSFP		
H. sapiens	Hexokinase I (N)	VGFTFSFP		
	Hexokinase I (C)	LGFTFSFP		
	Hexokinase II (N)	LGFTFSFP		
	Hexokinase II (C)	LGFTFSFP		
	Hexokinase III (N)	LGFSFSFP		
	Hexokinase III (C)	LGFTFSFP		
	Glucokinase	LGFTFSFP		

Tableau 2 : Domaine consensus cœur de fixation des hexoses et illustration de sa conservation au cours de l'évolution (Bernardo et al., 2007).

Les variations de la séquence en acide aminé du site consensus, pourraient être à l'origine de la différence de spécificité de substrat de ces enzymes. Lors de la fixation du substrat, les deux sous domaines se rapprochent, faisant passer la protéine dans une conformation dite « fermée » (Anderson *et al.,* 1979). Cet état favorise le transfert du groupement phosphate sur le substrat (Kuser *et al.,* 2008).

Aucun schéma prédéfini n'a été trouvé concernant la distribution de ces enzymes, chaque espèce dispose donc d'une panoplie d'enzymes de phosphorylation des hexoses qui lui est propre.

i. Les enzymes de phosphorylation du glucose chez les levures

Chez *S. cerevisiae*, deux hexokinases *Sc*Hxk1 et *Sc*Hxk2 ainsi qu'une glucokinase *Sc*Glk1 ont été décrites (Lobo et Maitra, 1977 ; Walsh *et al.,* 1991). L'hexokinase 2 (*Sc*Hxk2) semble être l'enzyme la plus importante dans le processus de phosphorylation du glucose *in vivo* (Gancedo *et al.,* 1977), tandis que l'hexokinase 1 (*Sc*Hxk1) et la glucokinase (*Sc*Glk1) semblent contribuer de façon minoritaire à ce processus (Herrero *et al.,* 1995). L'hexokinase 2 contrôle donc l'entrée du glucose dans la voie glycolytique ainsi que dans les voies métaboliques afférentes. Il n'est donc pas surprenant que des analyses de fluxomique aient mis en évidence que la délétion de l'hexokinase 2 diminue drastiquement le flux glycolytique mais aussi la fermentation alcoolique, la biosynthèse de glycérol ainsi que la synthèse de certains acides aminés (Raghevendran *et al.,* 2004). L'analyse de la régulation transcriptionnelle des gènes *ScHXK1*, *ScHXK2* et *ScGLK1* a permis de démontrer que l'expression du gène *ScHXK2* est induite par le glucose et les hexoses d'une manière générale, tandis que la transcription des gènes *ScHXK1* et *ScGLK1* est uniquement activée en présence de sources carbonées non fermentescibles comme l'éthanol, le glycérol et le galactose (Herrero *et al.,* 1994). Enfin, chez *S. cerevisiae*, il a été démontré qu'en plus de son rôle dans la phosphorylation du glucose, l'hexokinase 2 joue un rôle central dans le mécanisme de répression glucose (Entian, 1980). Ce processus qui sera abordé plus en détail dans la suite de ce manuscrit est un système élaboré par les levures pour optimiser l'utilisation du glucose, en réprimant l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation de sources carbonées alternatives. Cette particularité, classe l'hexokinase 2 dans la famille des « moonlight proteins ». C'est-à-dire des protéines possédant deux fonctions cellulaires bien distinctes.

Chez *K. lactis*, seules une hexokinase et une glucokinase ont été recensées (Prior *et al.,* 1993 ; Kettner *et al.,* 2007). La délétion du gène *KlRAG5*, codant pour l'hexokinase de *K. lactis*, diminue drastiquement la capacité de la levure à croitre en présence de glucose comme seule source de carbone. Ce résultat suggère que la protéine *Kl*Rag5 est la principale enzyme impliquée dans la phosphorylation du glucose chez *K. lactis* (Prior *et al.,* 1993). Il a également été démontré que la délétion du gène *KlRAG5*, modifie l'expression de la perméase au glucose *KlRAG1*, mettant ainsi en évidence l'existence chez cette levure d'une connexion entre le métabolisme du glucose et son transport (Prior *et al.,* 1993). En 2014, Mates *et al.,* ont démontré que *Kl*Rag5 était impliquée dans le remodelage de la chromatine et la réponse générale au stress (Mates *et al.,* 2014).

Chez les levures du genre *Candida*, des études menées chez *C. tropicalis* ont mis en évidence la présence de deux hexokinases et d'une glucokinase, respectivement codées par les gènes *CtHXK1*, *CtHXK2* et *CtGLK1*. Une forte induction de la transcription des gènes codant pour les hexokinases a été démontrée en présence de glucose, tandis que le gène *CtGLK1* semble constitutivement exprimé quelle que soit la source de carbone. Ceci suggère que ces gènes sont régulés par des mécanismes différents (Hirai *et al.,* 1977). Une régulation similaire a été mise en évidence chez *S. cerevisiae* (Herrero *et al.,* 1995). Chez *C. lipolytica*, une hexokinase et une glucokinase ont également été identifiées mais toutes deux sont exprimées constitutivement (Hirai *et al.,* 1977). Chez *C. albicans*, au moins une hexokinase codée par le gène *CaHXK1* a été décrite (Singh *et al.,* 2001). Les travaux menés sur l'hexokinase I ont révélé que contrairement à *Sc*Hxk1, cette enzyme n'est pas impliquée dans la phosphorylation du glucose intracellulaire mais dans celle de la N-acétylglucosamine qui est un sucre présent dans la matrice extracellulaire des cellules animales (Singh *et al.,* 2001). Plus récemment il a été révélé que l'hexokinase 1 de *C. albicans* (*Ca*Hxk1), était impliquée dans la transition morphologique ainsi que dans la transition white-opaque (Rao *et al.,* 2013 ; 2014). De plus, un

blast de la séquence nucléotidique du gène *CaHXK1* dans le génome de *S. cerevisiae* a révélé un taux d'identité de 25% avec les hexokinases I et II de cette levure, suggérant que l'hexokinase I de *C. albicans* est très éloignée sur le plan évolutif des hexokinases de *S. cerevisiae*.

À ce jour, aucune étude à part celle actuellement en cours au laboratoire et faisant l'objet des travaux décrits dans ce manuscrit, n'a été effectuée sur les autres enzymes de phosphorylation des hexoses chez *C. albicans*.

ii. Les enzymes de phosphorylation du glucose chez les champignons filamenteux

Chez *Botrytis cinerea*, un champignon filamenteux pathogène des plantes, une hexokinase (*Bc*Hxk1) et une glucokinase (*Bc*Glk1) ont été identifiées. Le mutant *Bchxk1Δ* présente un phénotype pléiotrope, caractérisé notamment par un retard de croissance et de germination en milieu riche, un défaut de sporulation ainsi qu'une diminution drastique de la virulence *in planta* (Rui et Hahn, 2007). À l'inverse, le mutant *Bcglk1Δ,* présente un phénotype en tout point similaire à la souche sauvage. De façon analogue à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae*, l'hexokinase 1 de *B. cinerea* est la principale enzyme de phosphorylation des hexoses. En revanche ni l'hexokinase, ni la glucokinase ne sont impliquées dans la répression glucose chez cet organisme (Rui et Hahn, 2007).

Chez le champignon pathogène de l'Homme, *Aspergillus fumigatus*, deux gènes *AfHXKA* et *AfGLKA* codant respectivement pour une hexokinase et une glucokinase ont été identifiés (Fleck et Brock, 2010). Curieusement, chez ce champignon, l'activité de ces deux enzymes n'est pas uniforme dans les différentes structures fongiques. En effet, la glucokinase *Af*GlkA est principalement présente et active dans la forme unicellulaire du champignon, ainsi que dans les spores, tandis que l'hexokinase *AfHxkA* est essentiellement associée à la forme filamenteuse (Fleck et Brock, 2010). Ainsi, la délétion de la glucokinase *Af*GlkA affecte la germination des spores mais n'impacte pas la croissance du champignon, tandis que la mutation du gène *AfHXKA* n'affecte pas la germination mais entraine des retards importants dans le développement du champignon en présence d'hexoses (Fleck et Brock, 2010). La délétion simultanée des gènes *AfHXKA* et *AfGLKA* abolit la croissance du champignon en présence de sources carbonées fermentescibles ou non-fermentescibles et augmente la sensibilité du champignon aux stress pariétaux, suggérant que la présence d'au moins une hexose kinase active est nécessaire pour maintenir l'intégrité pariétale. Dans un modèle murin de colonisation du tissu pulmonaire, les deux gènes *AfHXKA* et *AfGLKA* sont fortement exprimés suggérant leur rôle au cours du processus infectieux. Enfin, l'analyse du processus de répression glucose chez ce champignon révèle un cas particulier puisque l'hexokinase et la glucokinase contribuent toutes deux à la mise en place de ce mécanisme avec un rôle prépondérant de la glucokinase (Fleck et Brock, 2010).

Chez certains champignons filamenteux des gènes codant pour des « hexokinases-like » n'ayant pas de fonction catalytique ont été détectés dans le génome (Katz *et al.,* 1996, 2000 ; Bernardo *et al.,* 2006 ; Flipphi *et al.,* 2009). Dans ces hexokinases « atypiques » le site consensus de fixation des hexoses apparait largement dégénéré (Tableau 2). Ce type d'enzyme a notamment été identifié chez *A. fumigatus* où le gène *AfHXKB* code pour une protéine n'ayant pas d'activité catalytique envers les hexoses (Fleck *et al.,* 2010), mais aussi chez *A. nidulans* (Bernardo *et al.,* 2006). Dans le génome de ce dernier, 4 gènes codant pour des hexokinases ont été recensés (*AnHXKA* à *AnHXKD*), parmi eux, un seul, *AnHXKA,* code pour

une enzyme phosphorylant les hexoses. Les autres encodent des protéines uniquement impliquées dans des processus régulateurs (Bernardo *et al.,* 2006).

b) Du glucose-6-phosphate au pyruvate chez les levures

- ***Étape de la phosphoglucose isomérase***

La seconde étape de la glycolyse fait intervenir une phosphoglucose isomérase (Pgi) qui catalyse la conversion du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate (Fig. 13). Cette enzyme, qui est située à la jonction entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates, participe à l'orientation du flux métabolique (Fig. 13). De nombreuses études ont mis en évidence que la délétion de la phosphoglucose isomérase conduit à une réorientation du flux métabolique en direction de la voie des pentoses phosphates. C'est notamment le cas chez *E. coli* et *K. lactis*, dont les mutants de la Pgi présentent un phénotype de croissance normal en présence de glucose (Goffrini *et al.,* 1991 ; Canonaco *et al.,* 2001). Ceci suggère que chez ces microorganismes, la voie des pentoses phosphates est capable de soutenir la croissance en absence d'une glycolyse fonctionnelle. Cependant, tous les champignons ne sont pas capables d'utiliser aussi efficacement la voie des pentoses phosphates, ainsi, chez *S. cerevisiae* la délétion du gène *ScPGI1* ne permet pas la croissance de la levure en présence de glucose (Maitra, 1971).

Chez *C. neoformans*, une étude a démontré que la diminution de l'expression de la *PGI*, par insertion d'un élément transposable dans le promoteur du gène, impacte drastiquement la capacité du champignon à produire une capsule correcte. L'intégrité pariétale ainsi que la résistance au stress sont également impactées (Zhang *et al.,* 2015). La capsule est un facteur de virulence de ce champignon et son défaut de synthèse suggère l'existence d'un lien direct entre le métabolisme carboné central et la virulence.

- ***Étape de la phosphofructokinase***

Au cours de cette étape, un nouveau groupement phosphate est ajouté sur le fructose-6-phosphate, pour former du fructose-1,6-biphosphate (Fig. 13). Cette réaction, consommatrice d'énergie (ATP), est catalysée par une enzyme appelée phosphofructokinase. Chez de nombreuses espèces de levures, dont *S. cerevisiae* et *K. lactis* deux gènes impliqués dans la synthèse d'une phosphofructokinase fonctionnelle ont été identifiés.

Chez *K. lactis*, l'enzyme est un octamère constitué de deux types de sous-unités différentes ayant respectivement une masse de 119 et 102 kDa (Bar *et al.,* 1997) codées par les gènes *KlPFK1* et *KlPFK2* (Heinisch *et al.,* 1993). Des mutants délétés des gènes *KlPFK1* ou *KlPFK2* conservent leur capacité à pousser en présence de glucose comme seule source de carbone alors qu'aucune activité phosphofructokinase n'est détectée *in vitro* dans ces cellules. Un phénotype similaire est observé chez les mutants *Scpkf1Δ* ou *Scpfk2Δ* de *S. cerevisiae* (Clifton et Fraenkel, 1982). En revanche, la délétion simultanée des gènes *ScPFK1* et *ScPFK2* chez *S. cerevisiae*, abolit la croissance de la levure en présence de glucose. Chez *K. lactis*, la présence d'une respiration fonctionnelle suffit à maintenir un phénotype de croissance normal en présence de glucose et ce même en absence des deux sous-unités de la phosphofructokinase. Ceci suggère, une fois encore que la voie des pentoses phosphates est, chez cette levure, suffisamment performante pour compenser la perte de la glycolyse (Jacobi *et al.,* 1993). Cette hypothèse est renforcée par le fait que la délétion du gène *KlTAL1*, qui code pour une enzyme

majeure de la voie des pentoses phosphates, abolit la croissance du double mutant *Klpfk1pfk2Δ* en présence de glucose.

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, la création d'un dominant négatif exprimant une forme tronquée de la phosphofructokinase bloque la transition G2/M du cycle cellulaire et induit un défaut de septation des cellules (Alvarez *et al.,* 1998).

Chez la levure pathogène *C. albicans*, deux gènes *CaPFK1* et *CaPFK2*, codant respectivement pour des sous-unités protéiques de 109 et 104 kDa, ont été identifiés (Lorberg *et al.,* 1999). L'expression hétérologue de ces gènes complémente le phénotype du mutant *Scpfk1pfk2Δ* de *S. cerevisiae*, confirmant que ces gènes codent pour la phosphofructokinase chez *C. albicans* (Lorberg *et al.,* 1999). Au niveau structural, la phosphofructokinase de *C. albicans*, se caractérise par une extension N-ter d'environ 180 acides aminés. À ce jour, les implications fonctionnelles de cette extension ne sont pas connues (Lorberg *et al.,* 1999).

- ***Étape de la fructose-1,6-biphosphate aldolase***

Durant la quatrième étape de la glycolyse, le fructose-1,6-biphosphate, molécule à 6 atomes de carbone, est clivé en 2 molécules à 3 atomes de carbone : la dihydroxyacétone phosphate (DAHP) et le glyceraldéhyde-3 phosphate (G3P) (Fig. 13). Cette réaction enzymatique réversible est catalysée par une fructose-1,6-biphosphate aldolase. Chez *S. cerevisiae*, la fructose-1,6-biphosphate aldolase est codée par le gène *ScFBA1* (Schwellberger *et al.,* 1989). Très peu de données sont disponibles sur les effets fonctionnels de la délétion de ce gène. Cependant, une analyse transcriptomique globale a révélé que *ScFBA1* est un gène essentiel de *S. cerevisiae*, requis à la fois pour la croissance en présence de sources carbonées fermentescibles et non-fermentescibles (Giaever *et al.,* 2002). Des orthologues fonctionnels ont été identifiés chez *C. albicans* (*CaFBA1*) (Prado *et al.,* 2004 ; Rodaki *et al.,* 2006). Chez des mutants conditionnels de *C. albicans*, exprimant à un très faible niveau le gène *CaFBA1*, une étude a mis en évidence que la croissance des cellules était temporairement arrêtée, mais que leur viabilité n'était pas affectée. L'analyse de la virulence de ces mutants en modèle murin a également révélé qu'un défaut d'expression de *CaFBA1* conduit à une perte partielle de virulence de la levure (Rodaki *et al.,* 2006).

- ***Étape de la triose phosphate isomérase***

La dihydroxyacétone phosphate est ensuite convertie en glycéraldéhyde-3 phosphate (Fig. 13). L'isomérisation de ces composés est catalysée par une triose phosphate isomérase. Bien que la réaction de conversion puisse avoir lieu dans les deux sens, le passage du DHAP vers G3P est favorisé car seul le G3P est la cible des étapes suivantes de la glycolyse. La DHAP quant à elle, sert de précurseur à la synthèse de glycérol. La triose phosphate isomérase est donc une enzyme clé de la glycolyse capable d'orienter le flux métabolique vers les étapes ultérieures de la glycolyse, ou vers la voie de biosynthèse du glycérol. Chez *S. cerevisiae*, cette enzyme est codée par le gène *ScTPI1* (Alber et Kawasaki, 1982). La délétion de ce gène conduit à un défaut de croissance de la levure en présence de glucose et à une accumulation anormale de DHAP intracellulaire (Ciriacy et Breitenbach, 1979). Compagno *et al.,* 1996, ont démontré que la délétion de *ScTPI1* s'accompagnait également d'une réorientation du flux métabolique vers le glycérol (Compagno *et al.,*1996). Chez *K. lactis*, la délétion de la triose phosphate isomérase, n'affecte pas la croissance en présence de glucose. Le blocage de la respiration par l'ajout d'antimycine A dans le milieu inhibe la croissance du mutant *KlTPI* dans un milieu

contenant du glucose (Compagno *et al.,* 1999). Ce phénotype, similaire à ceux décrits chez les mutants *Klrag2* et *Klpfk1pfk2* illustre une nouvelle fois la compensation métabolique via la voie des pentoses phosphates (Fig. 13).

Chez *C. albicans*, la triose phosphate isomérase est codée par le gène *CaTPI1*. Les conséquences fonctionnelles de la délétion de ce gène ne sont pas clairement connues, car *CaTPI1* semble être un gène essentiel pour la survie de la levure (Mitchell, unpublished data, 2009). Cependant, la dérégulation de l'expression de ce gène, par insertion d'un élément transposable dans son promoteur (en position -157 avant l'ATG) induit un phénotype d'hyperfilamentation, suggérant l'existence d'un lien entre le métabolisme et le dimorphisme et donc la virulence de *C. albicans* (Uhl Ma *et al.,* 2003). Dans un modèle murin de candidose systémique la protéine *Ca*Tpi1 a été détectée dans le sérum des souris infectées (Pitarch *et al.,* 2001 ; Fernandez-Arenas *et al.,* 2004). La même observation a été faite chez des patients atteints de candidémie (Pitarch *et al.,* 2004). La protéine *Ca*Tpi1 pourrait donc être sécrétée par la levure ou présenter une double localisation pariétale et cytosolique, suggérant son implication potentielle dans les mécanismes de virulence.

- ***Étape de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase***

La sixième étape de la glycolyse est catalysée par une glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui convertit le G3P en 1,3-biphosphoglycérate (Fig. 13). Il s'agit d'une étape importante dans la glycolyse, car l'oxydation de l'aldéhyde génère une liaison acyl-phosphate riche en énergie. Au cours de la réaction, une molécule de NADH est générée à partir de NAD^+. Ce cofacteur étant essentiel au bon fonctionnement de la glycolyse, le NADH doit être réoxydé via la chaine respiratoire pour que la glycolyse puisse se poursuivre. Chez *S. cerevisiae*, trois gènes *ScTDH1*, *ScTDH2* et *ScTDH3* codant pour des isoformes différentes de la protéine GAPDH ont été identifiés. L'expression de ces gènes n'est pas équivalente, *ScTDH1* code pour environ 10 à 15% des GAPDH totales, alors que *ScTDH2* code 25 à 30% du pool total de cette enzyme. Le gène *ScTDH3* est le plus exprimé, et il est estimé que 50 à 60% des glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases totales dans la cellule sont codées par ce gène (McAlister et Holland, 1985). Les mutants exprimant uniquement *ScTDH1* ne sont pas viables, tandis que ceux exprimant seulement *ScTDH2* ou *ScTDH3* présentent une croissance ralentie en présence de glucose. Chez *K. lactis*, un seul gène, *KlGAP1,* codant pour une G3PDH a été identifié. Chez *K. marxianus*, une famille de 3 gènes (*KmGAP1*, *KmGAP2* et *KmGAP3*) codant pour des GAPDH a été identifiée. Ces gènes sont différemment régulés et l'un d'entre eux, *KmGAP1*, serait impliqué dans les processus de floculation et de croissance (Fernandes *et al.,* 1995).

Chez *C. albicans*, la GAPDH est codée par un gène unique *CaTDH3.* La construction d'une banque de mutants dans une souche haploïde stable de *C. albicans*, par insertion aléatoire d'élément transposable et son analyse par un système d'intelligence artificielle, a permis d'identifier *CaTDH3* comme un gène essentiel requis pour la viabilité de la levure (Segal *et al.,* 2018). Chez *C. albicans*, la GAPDH est aussi retrouvée associée à la paroi (Gil-Navarro *et al.,* 1997). Cette enzyme a également été identifiée comme étant capable d'interagir avec la laminine et les fibronectines, suggérant qu'elle puisse jouer un rôle important dans la virulence en contribuant à l'adhésion aux tissus de l'hôte (Gozalbo *et al.,* 1998).

- ***Étape de la 3-phosphoglycérate kinase***

Au cours de cette étape, catalysée par la 3-phosphoglycérate kinase, l'énergie contenue dans le groupement acylphosphate du 1,3-biphosphoglycérate est utilisée pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (Fig. 13). Chez *S. cerevisiae*, le gène *ScPGK1*, codant pour la 3-phosphoglycérate kinase, est l'un des gènes glycolytiques les plus exprimés (Chambers, 1997). Chez *C. albicans* l'expression de *CaPGK1* est indépendante de la source carbonée et une fraction du pool de cette protéine est retrouvée à la surface de la paroi cellulaire. Cependant, le mode d'exportation n'est pas connu car aucun signal d'adressage n'a pu être identifié (Alloush *et al.,* 1997). Plus récemment, il a été démontré que la phosphoglycérate kinase pariétale était capable de lier une protéine de l'hôte appelée plasminogène. Cette pré-protéine abondamment présente dans le système circulatoire de l'hôte, catalyse suite à son activation (plasmine) le clivage de la fibrine et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Cette activité catalytique est notamment requise pour la coagulation sanguine et le remodelage des tissus (Lijnen et Collen, 1995). *C. albicans* ne produit pas de facteurs d'activation du plasminogène mais détourne ceux de l'hôte. La séquestration importante de plasminogène au niveau de la paroi et son activation subséquente pourrait favoriser l'invasion et la nécrose des tissus de l'hôte par la levure (Crowe *et al.,* 2003).

- ***Étape de la phosphoglycérate mutase***

La phosphoglycérate mutase (PGM) convertit le 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate (Fig. 13). Chez *S. cerevisiae*, la phosphoglycérate mutase est codée par le gène *ScGPM1*. Sous sa forme active, la protéine est un tétramère composée de 4 sous-unités identiques. Une importante fraction, enzymatiquement active de la protéine a été retrouvée au niveau de la paroi cellulaire (Motshwene *et al.,* 2003). Un mutant *Scgpm1Δ* présente un important défaut de croissance en présence de glucose, glycérol et éthanol (Papini *et al.,* 2010). Chez *C. albicans*, l'analyse de la localisation subcellulaire de la phosphoglycérate mutase, a permis de mettre en évidence sa présence, non seulement au niveau cytoplasmique, où elle participe au fonctionnement de la glycolyse, mais aussi à la surface de la cellule (Poltermann *et al.,* 2007). Plus récemment, une étude a démontré que cette protéine joue un rôle important dans l'adhésion de *C. albicans* à certains types cellulaires de l'hôte (kératinocytes, cellules endothéliales, monocytes). L'adhésion est favorisée par une interaction entre la phosphoglycérate mutase et la vitronectine présente à la surface de ces cellules (Lopez *et al.,* 2014). La délétion du gène *CaGPM1*, codant pour la phosphoglycérate mutase, diminue drastiquement l'adhésion de la levure aux cellules de l'hôte. Ceci suggère que *Ca*Gpm1 joue un rôle important dans la colonisation et l'invasion des tissus de l'hôte et par conséquent dans la virulence de *C. albicans* (Lopez *et al.,* 2014).

- ***Étape de l'énolase***

Au cours de la neuvième étape de la glycolyse, une réaction de déshydratation catalysée par l'énolase, convertit le 2-phosphoglycérate en phospho-énol-pyruvate (Fig. 13). Chez *S. cerevisiae*, 2 gènes codant pour des énolases ont été identifiés : *ScENO1* et *ScENO2* (Holland et Holland, 1978). L'expression du gène *ScENO1* est constitutive, tandis que celle du gène *ScENO2* est fortement induite (>20 fois) par la présence de glucose. Ceci suggère que ces deux isoenzymes contribuent différemment à la glycolyse et à la néoglucogenèse. Un mutant simple

Sceno1Δ ou *Sceno2Δ* est viable et capable de pousser en présence de glucose (McAlister et Holland, 1982) ce qui traduit la redondance fonctionnelle de ces deux enzymes. En revanche, un mutant *Sceno1eno2Δ* délété simultanément des deux énolases est incapable de pousser en présence de glucose (Niedenthal *et al.,* 1999). En 1999, Edwards *et al.,* ont mis en évidence la localisation pariétale de l'énolase (Edwards *et al.,* 1999). Cependant, sa fonction au niveau de la paroi n'est pas encore identifiée. En plus de son rôle dans la glycolyse, l'énolase de *S. cerevisiae*, est aussi une heat shock protéine impliquée dans la thermotolérance et le contrôle de la croissance (Iida et Yahara, 1985).

Chez *K. lactis*, l'énolase est codée par le gène *KlRAG17* (Lemaire et Wésolowki-Louvel, 2004). Dans les mutants de l'énolase *KlenoΔ*, aucune activité énolase n'est détectée. De plus, ces mutants présentent un sévère défaut de croissance en présence de glucose et de source carbonée néoglucogénique comme le glycérol. Ces données suggèrent que *K. lactis* ne possède qu'une seule et unique énolase. Enfin, il a été mis en évidence que la délétion de l'énolase chez *K. lactis* entraine une diminution de l'expression du gène *KlRAG1*, codant une perméase au glucose, ainsi que des gènes glycolytiques. Ceci suggère que l'énolase et une glycolyse fonctionnelle sont essentielles pour permettre l'expression correcte des perméases au glucose, créant ainsi un lien direct entre la détection du glucose et sa métabolisation via la glycolyse (Lemaire et Wésolowki-Louvel, 2004).

Chez *C. albicans*, l'énolase semble aussi être codée par un gène unique *CaENO1* (Mason *et al.,* 1993). Les mutants *Caeno1Δ/Δ* sont incapables de pousser en présence de glucose et présentent une sensibilité accrue aux antifongiques. La délétion du gène *CaENO1* se traduit aussi par un phénotype hypofilamenteux et hypovirulent des mutants en modèle murin (Ko *et al.,* 2013). En plus de sa localisation cytosolique, l'énolase de *C. albicans* est aussi présente au niveau de la paroi cellulaire, où de nombreuses études ont démontré qu'elle participe à l'adhésion, en interagissant avec des protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte comme les laminines ou la fibronectine (Carneiro *et al.,* 2004 ; Esgleas *et al.,* 2008 ; Castaldo *et al.,* 2009 ; Donofrio *et al.,* 2009). Dans le sérum des patients infectés, l'énolase est détectée en abondance (Walsh *et al.,* 1991 ; Angiolella *et al.,* 1996). Par quel mécanisme ces protéines dépourvues de signal de sécrétion classique se retrouvent dans le milieu extérieur ou à la surface des cellules, reste une question à élucider. La « sécrétion » de l'énolase est un mécanisme important, favorisant la colonisation de l'épithélium intestinal par la levure (Silva *et al.,* 2014). Enfin, il a récemment été révélé que l'énolase possède une fonction transglutaminase dans la paroi, totalement déconnectée de sa fonction glycolytique, ce qui la classe dans la catégorie des « moonlights » protéines. Cette fonction transglutaminase est notamment importante pour la croissance de la levure, la division cellulaire et la formation des hyphes (Reyna-Beltran *et al.,* 2018).

- ***Étape de la pyruvate kinase***

La dernière étape de la glycolyse catalyse la conversion du phospho-énol-pyruvate en pyruvate sous l'action d'une pyruvate kinase. Au cours de cette étape, une nouvelle molécule d'ATP est générée (Fig. 13). Chez *S. cerevisiae*, deux gènes *ScPYK1* et *ScPYK2* codant pour deux pyruvate kinases différentes ont été identifiés. L'expression du premier est fortement induite par le fructose-1,6-biphosphate, tandis que le second ne répond pas à ce composé. Le gène *ScPYK2*, est réprimé par le glucose et dans certaines conditions permet un fonctionnement ralenti de la glycolyse (Boles *et al.,* 1997). Chez la plupart des autres levures un gène unique assure la production de la pyruvate kinase (Flores *et al.,* 2000).

Chez *C. albicans*, la pyruvate kinase est codée par le gène *CaPYK1*. Chez un mutant *Capyk1Δ/Δ* la croissance en présence de glucose comme seule source de carbone est abolie. En revanche, le mutant présente un phénotype de croissance normal en présence de source carbonée non fermentescible (acétate et acides aminés) (Barelle *et al.,* 2006). Au cours de la même étude, il a été démontré qu'un mutant *Capyk1Δ/Δ* présente un sévère défaut de virulence dans un modèle murin de candidose disséminée. De plus, l'analyse de la charge fongique des souris infectées démontre très clairement que le mutant *Capyk1Δ/Δ* est incapable de coloniser correctement son hôte (Barelle *et al.,* 2006).

2. Devenir du pyruvate

Dans la cellule, le pyruvate formé au cours de la glycolyse, est un métabolite important situé à la croisée entre le métabolisme oxydatif et le métabolisme fermentatif. En présence d'oxygène le pyruvate est oxydé en CO_2, tandis qu'en absence d'oxygène, le pyruvate est principalement converti en éthanol (Fig. 14). Cette vision très dualiste est néanmoins à nuancer, en effet, chez *S. cerevisiae* une forte concentration de glucose inhibe le métabolisme oxydatif et ce, même en présence d'oxygène (levure Crabtree positive).

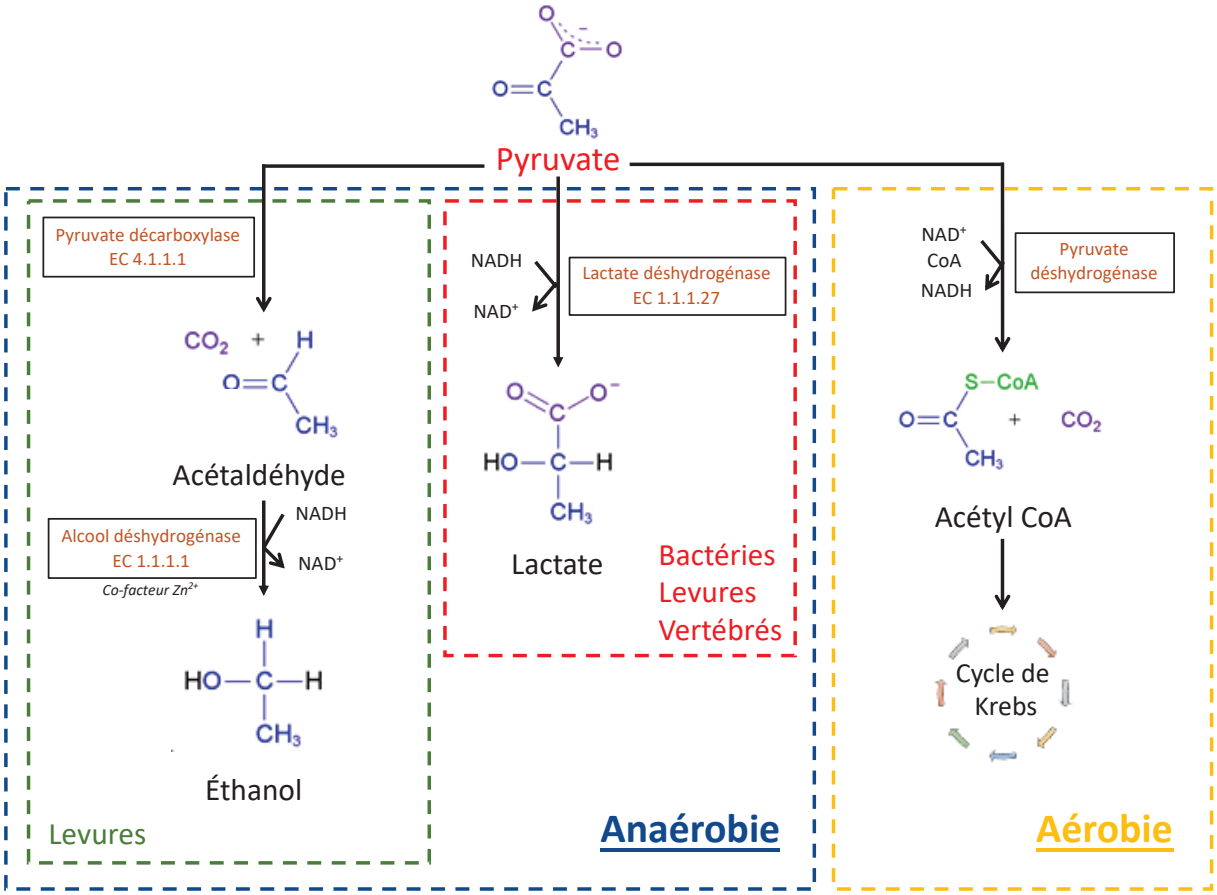


Figure 14 : Schéma représentant les devenirs possibles du pyruvate suite à sa synthèse par la voie glycolytique. En absence d'oxygène, le pyruvate sert de substrat à la fermentation alcoolique ou lactique. En présence d'oxygène, le pyruvate est transformé en Acétyl-CoA par une pyruvate déshydrogénase, puis est oxydé via le cycle de Krebs.

a) En anaérobie : la fermentation

En absence d'oxygène, la conversion du pyruvate en éthanol est catalysée par une pyruvate décarboxylase et une alcool déshydrogénase, au cours d'un processus appelé fermentation alcoolique (Fig. 14).

i. La pyruvate décarboxylase

Chez *S. cerevisiae*, au moins trois gènes (*ScPDC1*, *ScPDC2* et *ScPDC5*) codant pour des pyruvate décarboxylases ont été identifiés. Le produit du gène *ScPDC2*, ne semble pas être une enzyme active, mais est impliqué dans la régulation de l'expression des autres gènes *ScPDC.* À l'inverse, *ScPDC1* est responsable de 80% de l'activité pyruvate décarboxylase totale de la cellule. En présence de glucose la transcription des gènes *ScPDC1* et *ScPDC5* est fortement induite (Hohmann et Cederberg, 1990). Chez *K. lactis* la pyruvate décarboxylase est encodée par un gène unique : *KlRAG6* (Bianchi *et al.,* 1996). Contrairement à ce qui est observé chez les mutants de la pyruvate décarboxylase chez *S. cerevisiae*, les mutants *Klrag6Δ* présentent un phénotype de croissance similaire à celui de la souche sauvage en présence de glucose. Ceci illustre bien le mode de vie différent de ces deux levures, *K. lactis* étant une levure Crabtree négative, qui conserve un métabolisme oxydatif en présence de forte concentration en glucose.

Plus récemment, il a été mis en évidence que la levure *K. marxianus*, possède deux gènes codant des pyruvate décarboxylases *KmPDC1* et *KmPDC5* (Choo *et al.,* 2018). Le mutant *Kmpdc1Δ* ne possède quasiment plus d'activité pyruvate kinase, mais présente en condition aérobie un phénotype de croissance en présence de glucose similaire à la souche sauvage. En revanche, dans un environnement limité en oxygène, ce mutant est incapable de croitre en présence de glucose. La délétion de *KmPDC5* n'affecte ni l'activité pyruvate kinase ni la croissance de la levure, suggérant que KmPdc5 a perdu sa fonction catalytique. Tandis que la transcription du gène *KmPDC1* est activée par le glucose, le niveau d'expression du gène *KmPDC5* est faible et n'est pas dépendante de la source carbonée. Contrairement à la souche sauvage, les simples (*Kmpdc1Δ*) et doubles mutants (*Kmpdc1pdc5Δ*) produisent moins d'éthanol et accumulent davantage de pyruvate dans leur cytoplasme (Choo *et al.,* 2018).

ii. L'alcool déshydrogénase

Chez *S. cerevisiae*, trois gènes *ScADH1*, *ScADH2* et *ScADH3* codant pour des alcools déshydrogénases ont été identifiés. Un seul orthologue fonctionnel *CaADH1*, complémentant les mutations *adh* de *S. cerevisiae*, a été identifié dans le génome de *C. albicans* (Bertam *et al.,* 1996). Dans la même étude, les auteurs ont mis en évidence que l'Adh1 de *C. albicans* était un élément immunogène au cours de l'infection, suggérant que cette enzyme puisse avoir une double localisation cytosolique/pariétale. La localisation à la surface de la cellule a été confirmée par des analyses globales (Urban *et al.,* 2003). En 2001, Klotz *et al.,* ont suggéré que l'Adh1 de *C. albicans* pourrait, jouer un rôle important au cours du processus infectieux en favorisant l'adhésion de la levure aux tissus de l'hôte (Klotz *et al.,* 2001). Ce possible rôle dans la virulence est renforcé par le fait que *Ca*Adh1, est aussi capable de lier avec une forte affinité le plasminogène, ce qui pourrait localement favoriser l'invasion et la nécrose des tissus de l'hôte (Crowe *et al.,* 2003). Enfin, plus récemment, il a été mis en évidence que l'alcool déshydrogénase, de par son activité catalytique, régule la formation du biofilm chez *C. albicans* (Mukherjee *et al.,* 2006).

b) En aérobie : le cycle de Krebs

En présence d'oxygène, le pyruvate est oxydé pour former du CO_2. Ce processus d'oxydation est réalisé par le cycle de Krebs (ou cycle TCA), voie métabolique centrale, jouant un rôle majeur dans l'assimilation de nombreuses sources carbonées comme les hexoses, les lipides et les acides aminés. C'est également l'une des principales voies productrices d'énergie dans la cellule en condition aérobie. Le cycle TCA est aussi impliqué dans la régulation de nombreux processus biologiques (Fernie *et al.,* 2004). Chez l'Homme, il est connu que des mutations au niveau du cycle TCA sont associées à des troubles neurologiques sévères et favorisent l'apparition de certains cancers (Eng *et al.,* 2003). Les différentes étapes de cette voie métabolique prennent place dans la mitochondrie. Pour entrer dans le cycle de Krebs, le pyruvate doit dans un premier temps subir une décarboxylation oxydative. Cette première réaction, catalysée par une pyruvate déshydrogénase, convertit le pyruvate en acétyl-CoA (Fig. 14). Dans la cellule, l'acétyl-CoA fait le lien entre la glycolyse et le cycle de Krebs. L'une des premières étapes du cycle TCA consiste à conjuguer une molécule d'acétyl-CoA avec une molécule d'oxaloacétate pour former un composé à six carbones, le citrate (Fig. 15). Cette première réaction est catalysée par une citrate synthase. Chez *S. cerevisiae*, trois gènes codant pour des citrates synthases différentes ont été identifiés. *ScCIT1* et *ScCIT3* codent pour des enzymes mitochondriales, tandis que le gène *ScCIT2* code pour une enzyme impliquée dans le cycle glyoxylique (Velot *et al.,* 1999 ; Jia *et al.,* 1997). Une fois formé, le citrate est converti en isocitrate sous l'action d'une aconitase. Chez *S. cerevisiae*, cette enzyme est codée par le gène *ScACO1*. L'expression du gène *ScACO1* est réprimée par le glucose, mettant en évidence l'utilisation préférentielle d'un métabolisme fermentaire par *S. cerevisiae* (Gangloff *et al.,* 1990). Chez *C. albicans* un orthologue fonctionnel : *CaACO1* a été identifié (Rao *et al.,* 1962).

Très peu de données moléculaires sont disponibles sur les gènes codant les enzymes impliquées dans les étapes ultérieures du cycle de Krebs (Fig. 15). Ce manque d'information contraste avec l'importance que le cycle de Krebs revêt dans le métabolisme oxydatif des levures. Les étapes suivantes du cycle TCA feront donc l'objet d'une brève description.

Une fois formé, l'isocitrate est décarboxylé pour former de l'α-cétoglutarate (Fig. 15). Cette réaction est catalysée par une isocitrate déshydrogénase. Au cours de l'étape suivante, l'α-cétoglutarate subit lui-même une décarboxylation, sous l'impulsion d'une α-cétoglutarate déshydrogénase, afin de générer du succinyl-CoA. Les dernières étapes du cycle sont dédiées à la régénération de l'oxaloacétate. Brièvement, le succinyl-CoA est successivement converti en succinate, fumarate, malate et enfin oxaloacétate, grâce à l'action d'une succinyl thiokinase, d'une succinate déshydrogénase, d'une fumarase et d'une L-malate déshydrogénase respectivement (Fig. 15). Chez *S. cerevisiae*, 3 gènes codant pour des malates déshydrogénases ont été identifiés *ScMDH1*, *ScMDH2* et *ScMDH3*. Les produits de ces gènes ont des localisations différentes dans la cellule. *Sc*Mdh1 est localisée dans la mitochondrie et joue un rôle majeur dans le cycle de Krebs. La protéine *Sc*Mdh2 présente une localisation cytoplasmique tandis que *Sc*Mdh3 est située dans les peroxysomes et intervient dans le cycle du glyoxylate (Steffan et McAlister-Henn, 1992).

Plus récemment, une analyse globale du cycle de Krebs chez *C. albicans*, a permis de mettre en évidence les effets de la délétion des différents acteurs du cycle sur la physiologie de la levure (Tao *et al.,* 2017). Ainsi, il a été démontré que la délétion des gènes *CaCIT1*, *CaACO1* et *CaMDH1*, codant respectivement la citrate synthase, l'aconitase et la malate déshydrogénase, *(Fig. 15)*, inhibe totalement la croissance de la levure quelle que soit la source de carbone utilisée. Chez *C. albicans*, des paralogues de la malate déshydrogénase et de l'aconitase codés

respectivement par les gènes *CaACO2* et *CaMDH1-3* ont aussi été identifiés. Cependant, le produit de ces gènes n'est pas impliqué dans le cycle de Krebs mais joue un rôle important dans le fonctionnement du cycle glyoxylique (Tao *et al.,* 2017). La délétion des gènes *CaKDG1*, *CaKDG2* et *CaSDH2*, *CaSDH3,* codant respectivement l'α-cétoglutarate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase (Fig. 15), diminue drastiquement la croissance de la levure en présence de source carbonée fermentescible (glucose, fructose, mannose) et abolit totalement le processus de croissance en présence de sources carbonées non fermentescibles (éthanol, glycérol, acides aminés). Chez des mutants de l'isocitrate déshydrogénase (*Caidh1*, *Caidh2*), de la succinate déshydrogénase (*Casdh4*) et de la fumarase (*Cafum12*) le taux croissance en présence de source carbonée non fermentescible est réduit. Ces résultats révèlent que le cycle de Krebs joue un rôle critique dans l'assimilation des sources carbonées fermentescibles et non fermentescibles par la levure (Tao *et al.,* 2017). Le blocage du cycle TCA, suite à la mutation des enzymes clés, conduit à une réorientation du flux métabolique vers le shunt glyoxylique (Tao *et al.,* 2017). Les auteurs ont également pu mettre en évidence que l'inhibition du cycle TCA conduit à une diminution du taux d'ATP et d'AMPc intracellulaire, ce qui entraine un défaut d'activation du module Cdc25-Ras1, qui contrôle la morphogenèse via la voie de l'AMPc chez *C. albicans* (Fig. 7). Ainsi, la délétion de la plupart des gènes du cycle de Krebs conduit à des degrés divers à un défaut de formation des hyphes en milieu inducteur (Tao *et al.,* 2017). La production des hyphes étant un facteur de virulence critique de *C. albicans*, il n'est pas déraisonnable de penser que les mutants du cycle TCA puissent également être affectés sur le plan de la virulence.

Au cours du cycle, de l'énergie sous forme de GTP est produite, ainsi que des coenzymes $NADH^+$ et $FADH_2$ (Fig. 15). La régénération de ces molécules dans la chaine respiratoire permet la synthèse de molécules d'ATP supplémentaires. Ainsi, le bilan énergétique de l'oxydation complète d'une molécule de glucose via la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaine respiratoire et de 38 moles d'ATP.

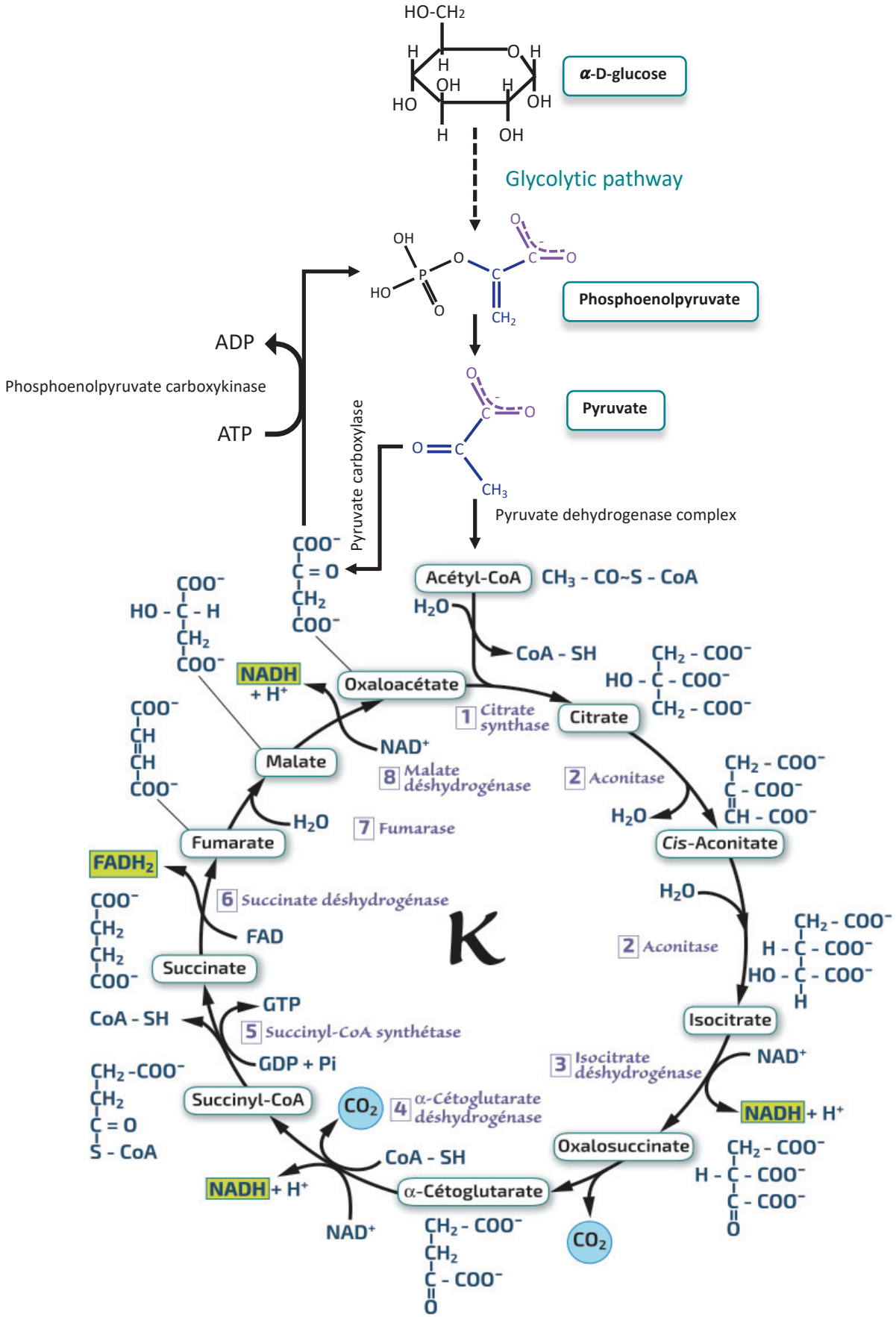


Figure 15 : Le cycle de Krebs. Les différentes étapes du cycle de Krebs sont représentées par des numéros. La partie supérieure du schéma représente l'interconnexion entre le cycle de Krebs et la voie glycolytique

C. Réseaux de régulation de la glycolyse

L'assimilation du carbone est un processus essentiel à la survie et à la croissance de tout organisme vivant. La glycolyse est une voie métabolique majeure impliquée dans ce processus d'assimilation, que ce soit via la respiration ou la fermentation. Une régulation transcriptionnelle fine des enzymes glycolytiques est donc nécessaire à la fois à la croissance, et à la virulence de *C. albicans*.

Notre compréhension de la régulation de la glycolyse repose principalement sur les découvertes faites chez *S. cerevisiae*. Chez cette levure, trois principaux régulateurs transcriptionnels des gènes glycolytiques ont été identifiés : *Sc*Gcr1p, *Sc*Gcr2p et *Sc*Tye7p (Uemura *et al.,* 1990). *Sc*Gcr1p est un activateur transcriptionnel potentiellement impliqué dans la régulation de tous les gènes glycolytiques. En effet, l'ensemble des gènes de la glycolyse présentent dans leurs promoteurs le motif consensus de fixation *Sc*Gcr1p (CTTCC). Le mutant *Scgcr1Δ*, révèle une croissance perturbée en présence de glucose. De plus, l'analyse du protéome de ce mutant révèle une importante diminution de la concentration en enzymes glycolytiques (Lopez et Baker, 2000). La protéine *Sc*Gcr2 n'interagit pas directement avec l'ADN, car elle est dépourvue de séquence de fixation aux acides nucléiques. Il a été démontré que *Sc*Gcr2 s'associe avec *Sc*Gcr1 pour contrôler l'expression des gènes glycolytiques (Chambers *et al.,* 1995). Chez *K. lactis*, des orthologues fonctionnels des gènes *ScGCR1* et *ScGCR2* ont été identifiés (Haw *et al.,* 2001 ; Neil *et al.,* 2004). Une étude menée chez des mutants *Klgcr1Δ* et *Klgcr2Δ* a révélé une diminution de l'expression des gènes glycolytiques chez ces mutants, confirmant que les protéines *Kl*Gcr1p et *Kl*Gcr2p sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de la glycolyse (Neil *et al.,* 2004). Bien que la régulation transcriptionnelle de la glycolyse soit bien définie chez *S. cerevisiae*, il n'en est pas de même chez tous les microorganismes.

Chez *C. albicans*, par exemple, aucun orthologue des régulateurs *Sc*Gcr1 et *Sc*Gcr2 n'a pu être identifié dans le génome. Cependant, des analyses par blast dans le génome ont permis de mettre en évidence l'existence d'un homologue de *Sc*Tye7p : *Ca*Tye7p, qui, pourrait être un bon candidat pour la régulation de la glycolyse (Askew *et al.,* 2009). Une autre étude menée chez *C. albicans* a démontré l'implication du régulateur transcriptionnel *Ca*Gal4 dans le contrôle des gènes glycolytiques (Martchenko *et al.,* 2007). Des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine ont mises en évidence que *Ca*Gal4 et *Ca*Tye7 interagissent respectivement avec 98 et 271 gènes (Askew *et al.,* 2009). L'analyse des cibles de *Ca*Gal4 et *Ca*Tye7 a permis de démontrer que ces régulateurs interagissent principalement avec les gènes du métabolisme carboné, et notamment avec ceux de la glycolyse (Fig. 16A). En effet, la délétion de *CaTYE7* entraine une diminution drastique de l'expression des gènes glycolytiques, de ceux impliqués dans le métabolisme du tréhalose, ainsi que de ceux impliqués dans la fermentation. *Ca*Tye7 apparaît donc comme un régulateur majeur du métabolisme des carbohydrates chez *C. albicans*. *Ca*Gal4 est aussi impliqué dans l'activation des gènes glycolytiques car, chez le double mutant *Cagal4tye7Δ/Δ*, l'expression de ces gènes est plus faible que chez le simple mutant *Catye7Δ/Δ* (Fig. 16B). En outre, bien que liant un certain nombre de cibles communes, ces régulateurs ont aussi des cibles spécifiques. Par exemple, *Ca*Gal4 interagit avec les promoteurs des gènes codant la pyruvate déshydrogénase (PHD), enzyme clé de la respiration. *Ca*Gal4, semble donc contrôler l'orientation du flux métabolique soit vers la fermentation, soit vers la respiration. *Ca*Tye7 quant à lui, interagit avec les gènes impliqués dans le métabolisme du tréhalose (Fig. 16A), du glycogène et du glycérol et semble donc réguler le stockage du carbone dans la cellule. *Ca*Tye7 est également

requis pour l'induction de l'expression des gènes glycolytiques en condition d'hypoxie. Le blocage de la glycolyse avec de l'oxalate, inhibiteur compétitif de la pyruvate kinase, mime le phénotype du mutant *Catye*7Δ/Δ. Ceci confirme que l'hyperfilamentation observée chez le mutant et induite par l'hypoxie était une conséquence de la dérégulation génétique de la glycolyse (Bonhomme *et al.,* 2011). En effet, la surexpression des gènes glycolytiques en hypoxie permet une augmentation du flux glycolytique afin de contourner le défaut de la chaine respiratoire quand l'oxygène est facteur limitant.

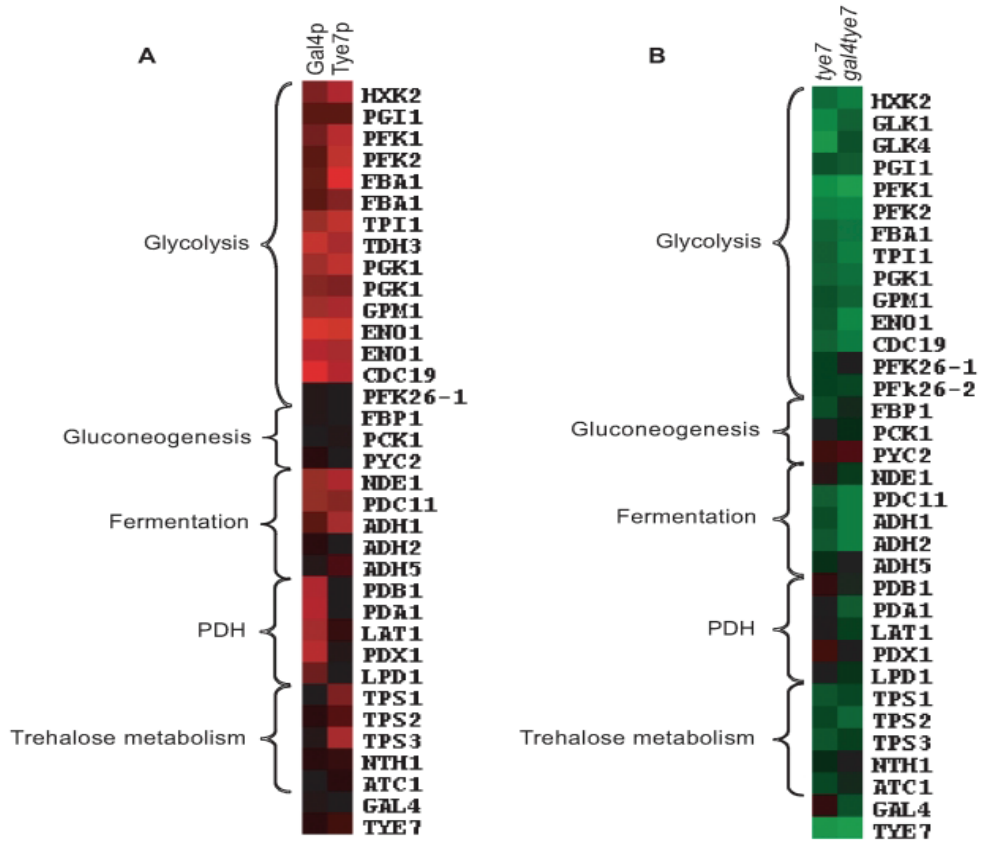


Figure 16 : (A) Analyse des gènes liés par les régulateurs Gal4 et Tye7. En rouge sont représentés les gènes interagissant avec les régulateurs, en noir les gènes qui ne sont pas liés par Gal4 ou Tye7. (B) Analyse du niveau d'expression des gènes du métabolisme carboné central chez les mutants tye7 ou gal4, par rapport au sauvage. En noir sont représentés les gènes dont l'expression ne varie pas, en rouge les gènes dont l'expression augmente et en vert les gènes dont l'expression diminue. L'intensité de la couleur est représentative du niveau de surexpression ou de sous-expression du gène considéré (Askew et al., 2009).

Les travaux de Askew *et al.,* 2009 ont également mis en évidence que la source carbonée est capable de moduler la liaison des régulateurs transcriptionnels à leurs cibles. Par exemple, en présence de glycérol, le régulateur *Ca*Gal4 n'interagit plus avec les gènes glycolytiques, et sa liaison aux gènes codant la pyruvate déshydrogénase est fortement réduite. Curieusement, cette influence de la source carbonée n'est pas retrouvée pour *Ca*Tye7. Ainsi, il apparait que *Ca*Tye7 est un régulateur central du métabolisme des carbohydrates, permettant une expression basale forte des gènes glycolytiques indépendamment de la source de carbone. Par contre, *Ca*Gal4, de par sa dépendance à la source carbonée, apparaît comme un régulateur plus fin, capable de moduler l'expression des gènes métaboliques en fonction des besoins et de l'environnement direct de la cellule. En agissant de concert, ces deux régulateurs contrôlent finement l'expression de la quasi-totalité des gènes du métabolisme carboné central (Fig. 17).

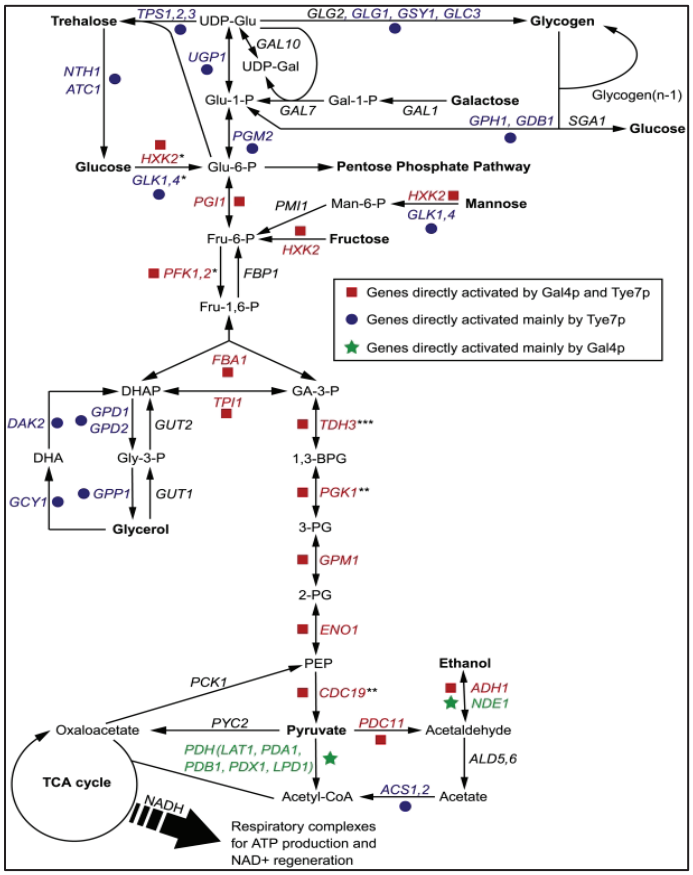


Figure 17 : Vue générale du métabolisme carboné central et de sa régulation par les régulateurs transcriptionnels Gal4 et Tye7 chez la levure pathogène C. albicans. Les carrés rouges représentent les gènes activés directement par Gal4 et Tye7. Les ronds bleus représentent les gènes activés principalement par Tye7 et les étoiles vertes ceux activés essentiellement par Gal4. Ces régulateurs, contrôlent le flux métabolique et jouent aussi un rôle majeur dans l'orientation de celui-ci. Le régulateur Tye7, par exemple, contrôle l'engagement de la cellule soit dans la voie glycolytique, soit vers la formation de molécules de stockage du carbone. Le régulateur Gal4 quant à lui régule les gènes codant la pyruvate déshydrogénase, enzyme clé permettant la formation de l'Acétyl-CoA, et contrôle donc l'engagement de la cellule vers le métabolisme oxydatif ou fermentaire (Askew et al., 2009).

Enfin, il a été mis en évidence que ces deux régulateurs sont essentiels à la virulence de *C. albicans.* En effet, la délétion indépendante ou simultanée de *TYE7* et de *GAL4* diminue significativement la virulence de la levure à la fois en modèle insecte *Galleria mellonella* et en modèle murin, mettant en évidence l'existence d'un lien direct entre le métabolisme carboné et virulence (Askew *et al.,* 2009).

In vivo, le pouvoir pathogène de la levure repose aussi sur sa capacité à se multiplier et à coloniser la muqueuse intestinale. Six régulateurs transcriptionnels sont requis pour une colonisation efficace du tractus digestif : *TYE7, RTG1, RTG3, LYS144, HMS1* et *ZCF21* (Perez *et al.,* 2012). La présence de *Ca*Tye7 dans cette liste démontre que le métabolisme carboné central joue un rôle majeur dans la capacité de *C. albicans* à coloniser son hôte. Ensemble, ces six régulateurs contrôlent l'expression d'un réseau de plus de 800 gènes, dont environ 1/5 sont surexprimés dans le tractus digestif, suggérant leur implication dans le processus de colonisation (Perez *et al.,* 2012).

D. Optimisation de l'utilisation du glucose : la répression glucose

Le glucose est le monosaccharide le plus abondant sur Terre et sert de source d'énergie à la plupart des microorganismes. Bien que ces derniers soient capables d'assimiler une large gamme de sources de carbone différentes, le glucose est préférentiellement assimilé par l'ensemble des êtres vivants et en particulier par les levures qui ont perfectionné une voie de signalisation permettant d'optimiser l'utilisation de ce sucre. Ce système, connu sous le nom de répression glucose permet de réprimer l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation des sources carbonées alternatives, tant que du glucose est présent dans l'environnement.
Un exemple incontournable de la répression glucose est l'effet Crabtree observé chez *S.*

cerevisiae. En présence de fortes concentrations de glucose, les levures Crabtree positive fermentent malgré la présence d'oxygène, car le mécanisme de répression glucose inhibe l'expression des gènes impliqués dans le processus de respiration cellulaire.

1. Les acteurs de la répression glucose chez *S. cerevisiae*

Les principaux acteurs sont la kinase *Sc*Snf1, qui, lorsqu'elle phosphoryle le facteur de transcription *Sc*Mig1 conditionne son entrée dans le noyau et autorise la répression de la transcription. L'hexokinase *Sc*Hxk2 s'associe au facteur de transcription *Sc*Mig1 afin de le protéger de la phosphorylation par Snf1 et ainsi maintenir le complexe répresseur *Sc*Mig1/Hxk2 dans le noyau (Fig. 18). Les éléments de cette voie, leurs interactions et leurs effecteurs sont particulièrement bien décrits chez *S. cerevisiae*.

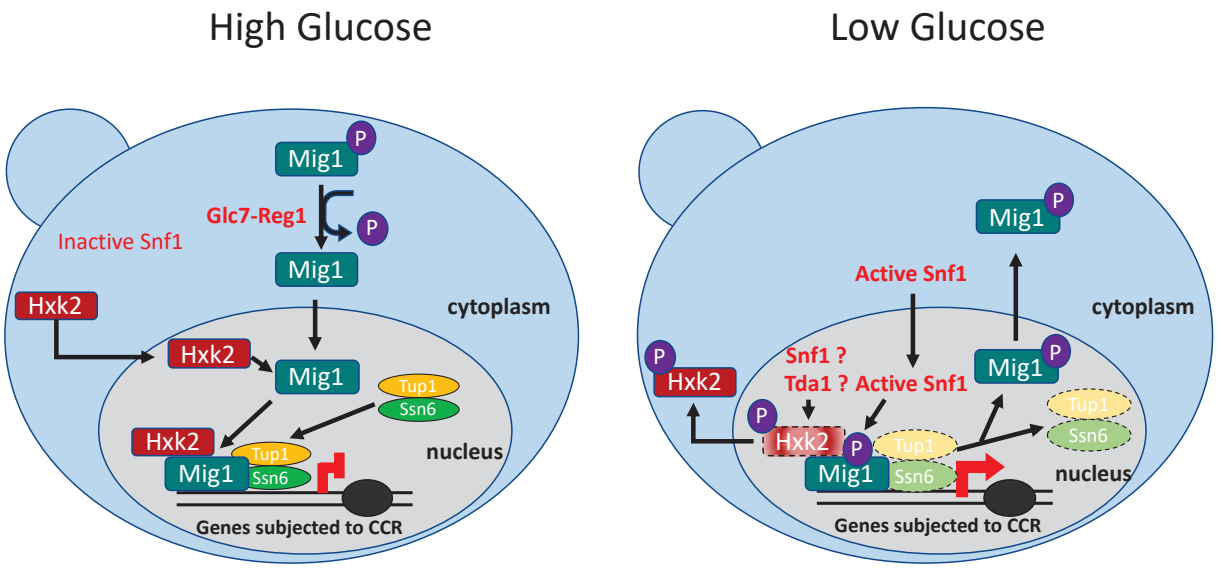


Figure 18 : Représentation schématique de la répression glucose et des principaux acteurs impliqués. En présence de forte concentration en glucose, ScSnf1 est inactif et localisé dans le cytoplasme. Dans ces conditions, le répresseur transcriptionnel ScMig1 est déphosphorylé, s'associe à l'hexokinase 2 et recrute les acteurs du complexe répresseur général de la transcription Tup1-Ssn6. Le complexe répresseur ainsi formé réprime l'expression des gènes soumis à la répression glucose (genes subjected to Carbon Catabolite Repression (CCR)). En absence de glucose, l'hexokinase 2 ScHxk2, est phosphorylée et se détache de ScMig1. La protéine kinase ScSnf1 est activée et relocalisée au niveau du noyau où elle phosphoryle le répresseur transcriptionnel ScMig1. Il en résulte une déstabilisation du complexe répresseur permettant l'expression des gènes réprimés par le glucose (d'après Conrad et al., 2014 ; Adnan et al., 2017).

Un effecteur important de cette voie est donc la sérine/thréonine kinase *Sc*Snf1. Cette protéine est un orthologue de l'AMPK présente chez les mammifères. La protéine *Sc*Snf1 constitue la sous-unité catalytique α d'un complexe hétérotrimérique, composé également de sous unités ß et γ. Ensemble, ces trois sous-unités forment le complexe SNF1 (Fig. 19). La sous-unité gamma codée par le gène *ScSNF4*, possède des fonctions régulatrices, tandis que la sous unité ß, codée par les gènes *ScSIP1*, *ScSIP2* et *ScGAL83*, joue un rôle important dans la localisation cellulaire et la stabilité du complexe SNF1 (Vincent *et al.,* 2001 ; Hedbacker *et al.,* 2004). La protéine *Sc*Snf1 est constituée de deux domaines différents. Un domaine régulateur situé en position C-ter et un domaine catalytique localisé dans la région N-ter de la protéine. En présence de glucose, ces deux domaines interagissent et la protéine se trouve dans une conformation inactive (Celenza et Carlson, 1989ab ; Jiang et Carlson, 1996 ; Ludin *et al.,* 1998 ; Leech *et al.,* 2003). En absence de glucose un changement de conformation au sein du complexe SNF1 permet l'interaction de la protéine régulatrice *Sc*Snf4, avec le domaine

régulateur de *Sc*Snf1. Cette interaction met fin à l'auto-inhibition de *Sc*Snf1. Le domaine catalytique de *Sc*Snf1 est donc libre et peut phosphoryler ses effecteurs. Il a également été démontré que la phosphorylation de *Sc*Snf1 sur un résidu thréonine 210 était essentielle pour son activation complète (McCartney et Schmidt, 2001). Cette réaction de phosphorylation est catalysée chez *S. cerevisiae,* par trois kinases différentes *Sc*Tos3, *Sc*Sak1 et *Sc*Elm1. Ces enzymes semblent avoir des fonctions partiellement redondantes car seule la délétion simultanée des trois kinases abolit l'activation de *Sc*Snf1 (Hong *et al.,* 2003 ; Nath *et al.,* 2003 ; Sutherland *et al.,* 2003). Bien que chacune de ces protéines soient activée dans des conditions différentes, *Sc*Sak1, semble être la principale kinase activatrice de *Sc*Snf1 (Hong *et al.,* 2003). Plus récemment, il a été mis en évidence que la phosphorylation de *Sc*Snf1 par les kinases activatrices n'était pas affectée par les variations de la concentration en glucose (Rubenstein *et al.,* 2008), ce qui suggère que le contrôle de l'activité de *Sc*Snf1 se fait à un autre niveau (Rubenstein *et al.,* 2008). La déphosphorylation de *Sc*Snf1 sur son résidu thréonine 210, par le complexe phosphatase Glc7/Reg1 pourrait être le principal mécanisme régulant l'activité de cette kinase. En effet, le taux de déphosphorylation de *Sc*Snf1 est directement corrélé à la disponibilité en glucose dans l'environnement (Sanz *et al.,* 2000). Cependant, des résultats contradictoires ont été soulevés par l'étude de Rubenstein *et al.,* 2008. D'après les auteurs, l'activité du complexe Glc7/Reg1 reste inchangée en réponse aux fluctuations du glucose extracellulaire. Les auteurs émettent donc l'hypothèse que le glucose n'affecterait pas directement l'activité des enzymes mais plutôt leur interaction avec la protéine *Sc*Snf1 (Rubenstein *et al.,* 2008). De plus, de récents travaux ont démontré que l'ajout de glucose dans le milieu entrainait bien une augmentation rapide de l'activité de Reg1, conduisant à l'inactivation de *Sc*Snf1 (Castermans *et al.,* 2012). Le complexe Glc7/Reg1 est composé de deux éléments (Fig. 19). La protéine *Sc*Glc7, codée par le gène *ScGLC7*, constitue la partie catalytique du complexe phosphatase tandis que *Sc*Reg1, est la sous-unité régulatrice jouant un rôle important dans l'adressage de la phosphatase *Sc*Glc7 à sa cible.

La nature du signal modulant l'activité du complexe SNF1n'est pas clairement définie. Chez les mammifères, les fluctuations du ratio AMP/ATP au cours de la métabolisation du glucose, sont impliquées dans l'activation de l'AMPK (Wilson *et al.,* 1998). En absence de glucose, la valeur de ce ratio augmente d'un facteur 200 puis diminue lorsque du glucose est ajouté dans le milieu. Cependant, chez *S. cerevisiae*, il a été mis en évidence que SNF1 n'était pas directement régulée par ce ratio (Hardie *et al.,* 1998). Par la suite, un faisceau d'indices a permis de supposer que le glucose-6-phosphate pouvait être l'effecteur impliqué dans l'activation de la répression glucose. Premièrement, chez un triple mutant *Schxk1hxk2glk1Δ* incapable de produire du glucose-6-phosphate, *Sc*Snf1 est constitutivement active, suggérant que ce métabolite module l'activité du complexe SNF1. Deuxièmement, l'utilisation de 2-déoxyglucose pouvant être phosphorylé mais pas métabolisé conduit à une diminution de l'activité de *Sc*Snf1. Troisièmement, l'utilisation de 6-déoxyglucose, ne pouvant pas être phosphorylé n'affecte pas l'activité de *Sc*Snf1 (Vincent *et al.,* 2001 ; Hedbacker *et al.,* 2006). Cependant, plusieurs études ont mis en évidence que l'initiation de la répression glucose pourrait être liée à la concentration en glucose plutôt qu'à sa métabolisation. En effet, des mutants présentant un défaut d'import ou de perception du glucose sont incapables d'activer la répression glucose (Meijer *et al.,* 1998 ; Ye *et al.,* 1999 ; Ozcan, 2002). Ceci suggère que le signal initiant la répression glucose se situerait en amont du glucose-6-phosphate (Ozcan, 2002). Finalement, Mayers *et al.* (2011) ont démontré que la concentration en glucose pourrait moduler la conformation du complexe SNF1 et donc l'activation de la répression glucose. En absence de glucose, SNF1 est activé, interagit avec des adénylates de faible

énergie (ADP) et adopte une conformation résistante aux phosphatases. Quand du glucose est perçu, le complexe SNF1 change de conformation, libère l'ADP et peut être désactivé par le complexe phosphatase Reg1/Glc7, conduisant à la mise en place de la répression glucose. L'ADP semble donc jouer un rôle majeur dans la mise en place et la levée de la répression glucose via *Sc*Snf1 (Mayers *et al.,* 2011).

Suite à son activation, la protéine kinase *Sc*Snf1 interagit avec de nombreux facteurs de transcription, en active certains et en réprime d'autres. L'une des principales cibles de *Sc*Snf1 est le répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1. Ce répresseur est notamment impliqué dans la répression du gène *ScSUC2* codant pour une invertase chez *S. cerevisiae* et de 350 autres gènes en présence de glucose (Treitel *et al.,* 1995 ; Gertz *et al.,* 2009).

En absence de glucose, *Sc*Snf1 est activée et phosphoryle *Sc*Mig1 au niveau de la sérine 311 (Fig. 19). Suite à cette phosphorylation, le changement de conformation de *Sc*Mig1 entraine la perte de l'interaction du répresseur avec l'ADN et sa translocation dans le cytoplasme. Il en résulte une levée de la répression glucose. Lorsque la concentration en glucose augmente, *Sc*Mig1 est déphosphorylé et migre dans le noyau. La déphosphorylation de *Sc*Mig1 est un processus encore assez mal compris. Il a notamment été suggéré que le complexe phosphatase Glc7/Reg1 pourrait participer à la déphosphorylation de la Sérine 311 de *Sc*Mig1 (Rubenstein *et al.,* 2008). Plus récemment, une étude a confirmé le rôle de ces phosphatases dans la déphosphorylation de *Sc*Mig1 mais a également mis en évidence qu'un second mécanisme indépendant de Glc7/Reg1 et du glucose était nécessaire pour la déphosphorylation complète de *Sc*Mig1 (Shashkova *et al.,* 2017). Dans le noyau, *Sc*Mig1 interagit, grâce à son domaine en doigt de zinc (C_2H_2), avec les promoteurs des gènes impliqués dans l'assimilation des sources carbonées alternatives, au niveau d'une région consensus riche en GC (Schüller, 2003). *Sc*Mig1 recrute ensuite le complexe répresseur général de la transcription : *Sc*Tup1-Ssn6, pour réprimer l'expression de ces gènes cibles (Treitel et Carlson, 1995 ; Lutfiyya *et al.,* 1998). Au sein du complexe répresseur, *Sc*Mig1 peut aussi interagir avec *Sc*Mig2, un autre répresseur transcriptionnel participant à la répression glucose (Lutfiyya *et al.,* 1998).

Un autre partenaire de *Sc*Mig1 est l'hexokinase 2 (*Sc*Hxk2) qui, en plus de sa capacité à phosphoryler les hexoses intracellulaires, exerce également une fonction de régulateur transcriptionnel (Herrero *et al.,* 1998) (Fig. 19). L'analyse transcriptomique du mutant *Schxk2Δ*, révèle un profil d'expression des gènes réprimés par le glucose, altéré, avec notamment une diminution de l'effet Crabtree et la conservation d'un métabolisme oxydatif en présence de forte concentration de glucose. Ce phénotype suggère un défaut de la répression glucose chez ce mutant (Rodriguez *et al.,* 2001 ; Schuurmans *et al.,* 2008a ; Schuurmans *et al.,* 2008b). Une analyse précise de la séquence de *Sc*Hxk2, ainsi que des expériences de délétions ciblées ont permis de mettre en évidence que les deux fonctions de l'hexokinase 2 sont portées par des domaines différents. Ainsi, l'activité catalytique de l'hexokinase 2 repose principalement sur les quatre résidus suivants : Ser^{158}, Asp^{211}, Gln^{269} et Gln^{302}. En effet, la délétion d'un seul de ces acides aminés suffit à diminuer de 90% l'activité de phosphorylation de l'hexokinase 2 (Bennett et Steitz, 1980). De plus, la délétion de la sérine 158 abolit la croissance de la levure en présence de glucose et de fructose (Pelaez *et al.,* 2010). La fonction de répression glucose de l'hexokinase 2 est portée par un décapeptide de 10 acides aminés situé en position N-terminale compris entre la Lysine 6 et la Méthionine 15 (K6M15). Chez un mutant *Schxk2ΔK6M15* le gène *ScSUC2* n'est plus réprimé en présence de glucose (Pelaez *et al.,* 2010). Les auteurs ont également démontré que ces deux fonctions sont découplées puisque la délétion de la fonction catalytique n'affecte pas la fonction de

répression et inversement (Pelaez *et al.,* 2010). Pour assurer sa fonction de régulateur transcriptionnel, l'hexokinase 2 doit être capable d'entrer et de sortir du noyau cellulaire. Cependant, la protéine est trop grosse pour diffuser passivement à travers les pores nucléaires. Ainsi, le transport de *Sc*Hxk2 à travers l'enveloppe nucléaire est un processus contrôlé et finement régulé. Récemment, les protéines impliquées dans le transport de *Sc*Hxk2 ont été identifiées. L'import dans le noyau nécessite les karyophérines (*Sc*Kap60 et *Sc*Kap95), tandis que l'export nucléaire fait intervenir la protéine *Sc*Xpo1 (Pelaez *et al.,* 2009 ; Pelaez *et al.,* 2012). Le transport de *Sc*Hxk2 fait aussi intervenir la protéine *Sc*Gsp1 qui contrôle la directionnalité du transport. Dans la cellule, la localisation de *Sc*Hxk2 est dépendante de la disponibilité en glucose et de l'état de phosphorylation de sa sérine 14. En effet, un mutant ponctuel *ScHXK2S14A*, présentant une forme non phosphorylable de la sérine 14 présente un défaut d'export nucléaire et reste principalement localisé au niveau du noyau. À l'inverse un mutant *ScHXK2S14D* mimant une phosphorylation constitutive de la sérine 14 présente un défaut d'import dans le noyau et conserve une localisation principalement cytosolique. Une régulation fine de la phosphorylation de ce résidu est donc requise pour permettre la localisation correcte de l'hexokinase 2 en réponse au glucose (Fernandez-Garcia *et al.,* 2012).

En présence de forte concentration de glucose, *Sc*Hxk2 est déphosphorylée et interagit avec *Sc*Kap60 qui favorise l'import nucléaire de l'hexokinase 2. Il a récemment été mis en évidence que le complexe phosphatase Glc7/Reg1 était impliqué dans la déphosphorylation de *Sc*Hxk2 en présence de glucose (Fernandez-Garcia *et al.,* 2012). Dans le noyau, *Sc*Hxk2 et *Sc*Mig1 interagissent par le biais du décapeptide (K6M15) de *Sc*Hxk2 et de la sérine 311 de *Sc*Mig1 (Ahuatzi *et al.,* 2007 ; Pelaez *et al.,* 2010). Cette interaction masque la sérine 311 de *Sc*Mig1 qui, de fait, n'est pas accessible à la phosphorylation par *Sc*Snf1. Cela permet de stabiliser le complexe répresseur et de maintenir la répression glucose. Plus récemment, il a été démontré que la concentration en glucose intracellulaire pourrait moduler la conformation tridimensensionnelle de l'hexokinase 2 et ainsi contrôler son interaction avec *Sc*Mig1 (Vega *et al.,* 2017).

Lorsque la concentration en glucose diminue, *Sc*Hxk2 est phosphorylée au niveau de la sérine 14. La kinase impliquée dans cette phosphorylation n'est pas clairement identifiée. En 2012, Fernandez-Garcia *et al.,* ont démontré que l'hexokinase 2 était un substrat de la protéine kinase *Sc*Snf1 à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cependant, il a également été mis en évidence que la sérine 14 de *Sc*Hxk2 pouvait être phosphorylée par la protéine kinase Tda1 (Kettner *et al.,* 2012). En 2009, Pelaez *et al.,* ont suggéré que la phosphorylation de ce résidu favoriserait l'export nucléaire de *Sc*Hxk2 (Pelaez *et al.,* 2009). Quelques années plus tard, des analyses bio-informatique, ont permis de démontrer que cette phosphorylation modifie les propriétés biochimiques de la région NLS adjacente, ce qui favorise l'interaction de *Sc*Hxk2 avec l'exportine Xpo1 (Fernandez-Garcia *et al.,* 2012). La phosphorylation de *Sc*Hxk2 déstabilise son interaction avec *Sc*Mig1 et donc le complexe répresseur. *Sc*Hxk2 se détache de *Sc*Mig1 et migre dans le cytoplasme (Fig. 18 et 19). Ainsi, la sérine 311 de *Sc*Mig1 n'est plus protégée par *Sc*Hxk2, et peut-être phosphorylée par *Sc*Snf1 ce qui conduit à la translocation de *Sc*Mig1 dans le cytoplasme et donc à la levée de la répression glucose.

Chez *S. cerevisiae*, une autre cible majeure de *Sc*Snf1 est le facteur de transcription *Sc*Adr1. En absence de glucose, ce facteur contrôle l'expression des gènes comme *ScADH2* et *ScFOX2* permettant respectivement l'utilisation de l'éthanol et des acides gras comme source de carbone (Ratnakumar and Young 2010 ; Turcotte *et al.,* 2010). Dans les environnements limités en glucose, *Sc*Snf1 contrôle l'activation de *Sc*Adr1 en modulant son interaction avec la chromatine (Young, Kacherovsky and Van Riper 2002 ; Schüller 2003 ; Ratnakumar *et al.,* 2009

; Turcotte *et al.,* 2010).

Chez *S. cerevisiae*, la répression glucose intervient à différents niveaux :
Au niveau transcriptionnel, l'expression des gènes de la néoglucogenèse, tels que *ScPCK1* et *ScFBP1*, et du cycle du glyoxylate comme *ScICL1*, est réprimée en présence de glucose via le répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1 (Turcotte *et al.,* 2010). Au niveau traductionnel, les enzymes, *Sc*Pck1, *Sc*Fbp1 et *Sc*Icl1, produits de ces gènes sont rapidement dégradées suite à leur ubiquitination.

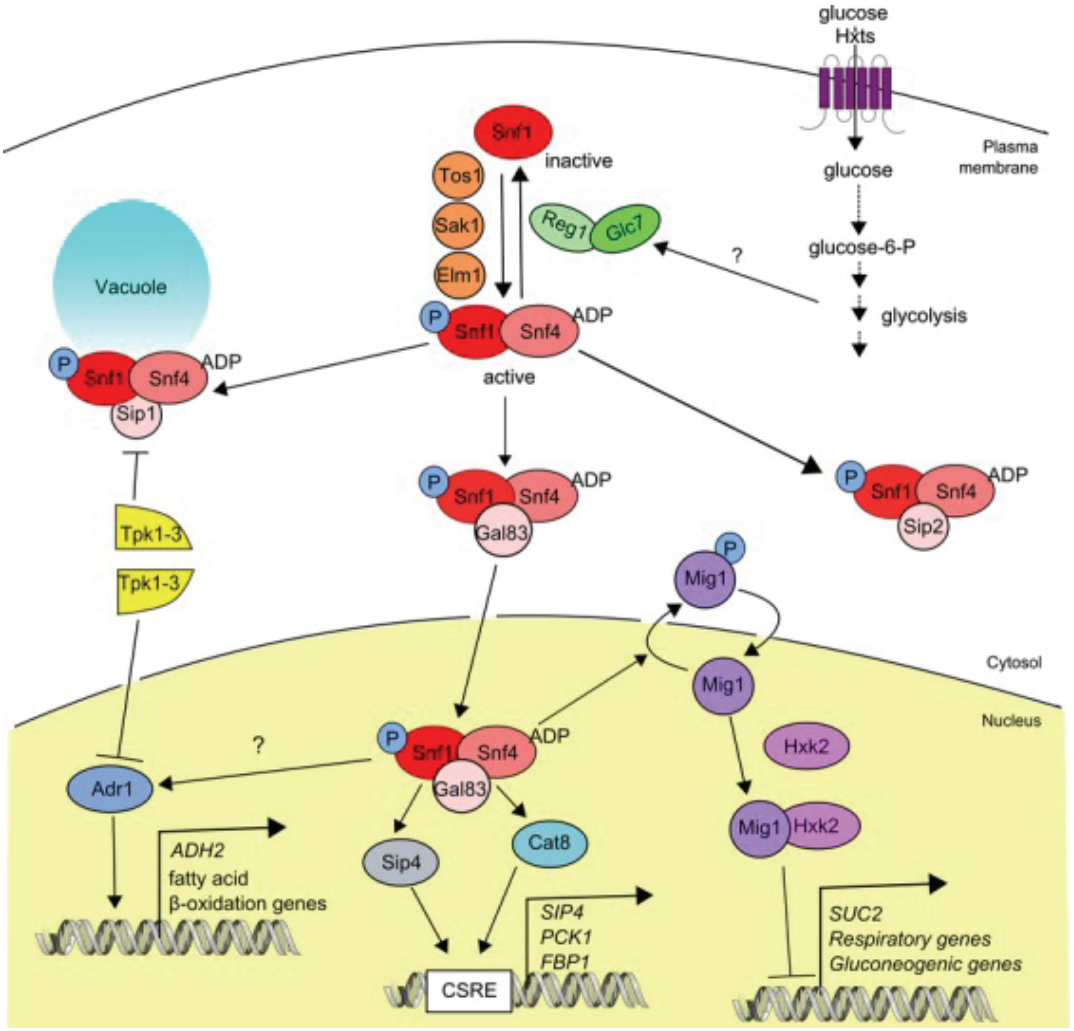


Figure 19 : La protéine kinase ScSnf1 : acteur majeur de la répression glucose. ScSnf1 orchestre la répression glucose des gènes impliqués dans l'assimilation des sources carbonées alternatives, la respiration et la néoglucogenèse. Snf1 est un complexe hétérotrimérique composé d'une sous unité catalytique (ScSnf1), d'une sous-unité régulatrice (ScSnf4) et d'une sous-unité ß (ScGal83, ScSip1 ou ScSip2), définissant la localisation de Snf1. Le complexe Snf1 est actif sous sa forme phosphorylée. La phosphorylation de Snf1 est catalysée par trois kinases (ScTos1, ScSak1, ScElm1), tandis que la déphosphorylation est médiée par le complexe phosphatase ScReg1/Glc7. En présence de forte concentration de glucose, le répresseur transcriptionnel ScMig1 est déphosphorylé, migre dans le noyau et s'associe avec l'hexokinase (ScHxk2) pour former un complexe répresseur stable. Lorsque le glucose est épuisé, Snf1 est activé, migre dans le noyau et phosphoryle ScMig1 et ScHxk2 déstabilisant le complexe répresseur et permettant l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation des sources carbonées alternatives (Conrad et al., 2014).

2. Les acteurs de la répression glucose chez *C. albicans*

Chez *C. albicans*, le mécanisme de répression glucose a été conservé et des orthologues de cette voie ont été identifiés dans le génome. C'est notamment le cas du gène *CaSNF1* codant pour la protéine kinase *Ca*Snf1. Contrairement à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae* et *C.*

glabrata, la protéine *Ca*Snf1 est essentielle pour la viabilité de *C. albicans* (Petter et Kwon-Chung, 1996 ; Petter *et al.,* 1997). La transcription de *CaSFN1* est fortement activée en réponse au stress et joue un rôle important dans la résistance aux drogues (Orlova *et al.,* 2008). De plus, l'analyse transcriptomique d'une souche clinique hypervirulente a révélé une surexpression de *CaSNF1,* suggérant le rôle de cette protéine dans la virulence (Xu *et al.,* 2005). Chez *S. cerevisiae*, 3 kinases *Sc*Tos3, *Sc*Elm1 et *Sc*Sak1 sont impliquées dans l'activation de *Sc*Sfn1. Chez *C. albicans*, aucun orthologue de *Sc*Tos3 n'a été recensé et la délétion de *CaELM1* n'affecte pas le niveau d'activation de *Ca*Snf1. En revanche, la délétion du gène *CaSAK1* abolit l'activation de *Ca*Sfn1. De plus, le mutant *Ca*sak1Δ/Δ présente un défaut de croissance en présence de sources carbonées alternatives. Ces données suggèrent que chez *C. albicans*, la kinase *Ca*Sak1 est la seule impliquée dans l'activation de *Ca*Snf1. *Ca*Sak1 joue également un rôle crucial dans l'adaptation métabolique et le fitness de la levure en modèle murin (Ramirez-Zavala *et al.,* 2017). Chez *C. albicans*, le complexe SNF1 est aussi une structure hétérotrimérique, composé d'une sous-unité catalytique *Ca*Snf1, d'une partie régulatrice *Ca*Snf4 et d'une sous-unité ß codée par les gènes *CaKIS1* et *CaKIS2* (Corvey *et al.,* 2005). Une autre différence majeure avec le modèle décrit chez *S. cerevisiae*, est que chez *C. albicans*, la protéine *Ca*Mig1 ne porte pas de site consensus de phosphorylation par *Ca*Snf1. Ce qui suggère que *Ca*Mig1 est régulée différemment de *Sc*Mig1 ou possède un rôle différent chez *C. albicans*. Cette idée est supportée par le fait que la transcription de *CaMIG1* n'est pas régulée par la source de carbone (Zaragoza *et al.,* 2000). Le rôle de *Ca*Mig1 dans la répression glucose chez *C. albicans* n'est donc pas clairement défini. En effet, en 2000, Zaragoza *et al,* ont démontré que la délétion de *CaMIG1* n'impacte pas l'expression du régulon *GAL* (qui est réprimé par le glucose). Cette observation a ensuite été réfutée par le groupe de Pavelka qui a mis en évidence une augmentation de l'expression de *CaGAL1* chez le mutant *Camig1Δ/Δ* (Cottier *et al.,* 2017). Le mutant *Camig1Δ/Δ* présente un phénotype de filamentation et de virulence similaire à la souche sauvage (Zaragoza *et al.,* 2000 ; Cottier *et al.,* 2017). Chez *S. cerevisiae*, *Sc*Mig1 recrute le complexe général de la transcription Tup1-Ssn6 pour réprimer l'expression des gènes impliquée dans l'assimilation de source carbonée alternative (Tzamarias et Struhl, 1995). Cependant, *Sc*Tup1 peut aussi fonctionner indépendamment de *Sc*Mig1. Une situation similaire semble exister chez *C. albicans* (Murad *et al.,* 2001). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les mutants *Catup1Δ/Δ* et *Camig1Δ/Δ* présentent un phénotype différent (Tzamarias et Struhl, 1995 ; Zaragoza *et al.,* 2000). Enfin, la présence de la séquence consensus KMPPK dans la séquence protéique de *Ca*Mig1, suggère que cette protéine puisse, de façon analogue à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae,* être relocalisée dans le noyau (Zaragoza *et al.,* 2000). En revanche, rien n'est décrit concernant le rôle potentiel de l'hexokinase 2 dans le mécanisme de répression glucose chez *C. albicans*.

IV. La flexibilité métabolique de *C. albicans* : support de la virulence

A. L'assimilation de sources carbonées alternatives est essentielle à la virulence de *C. albicans*

Le glucose est le sucre le plus abondant sur Terre et la source de carbone préférentiellement utilisée par la plupart des cellules vivantes. Cependant, dans les systèmes biologiques, le glucose est souvent l'élément limitant. Chez l'Homme, par exemple, sa concentration oscille

entre 4 mM, dans le flux sanguin, et 30 mM à la surface de certaines muqueuses (Brown *et al.,* 2014). Les microenvironnements que constituent le foie, les reins ou encore le tube digestif sont relativement riches en glucose, mais aussi en sources carbonées alternatives (Fig. 20) tels que les acides gras, les acides aminés ou encore l'acide lactique qui est essentiel pour permettre la colonisation du tube digestif par la levure (Ueno *et al.,* 2011 ; Sandai *et al.,* 2012). Les fluides présents au niveau des muqueuses orales et vaginales sont riches en protéines et dérivés protéiques (peptides et acides aminés). Une importante concentration en protéine est également retrouvée au niveau du flux sanguin. Une autre source de carbone abondamment présente dans l'hôte, est la N-acétyl-glucosamine. Ce sucre possédant un groupement amine est principalement retrouvé dans la matrice extracellulaire des cellules animales ainsi que dans le peptidoglycane constituant la paroi des bactéries. Enfin, les lipides et les phospholipides présents dans la membrane plasmique de toutes les cellules constituent aussi une source de nutriment potentiellement accessible.

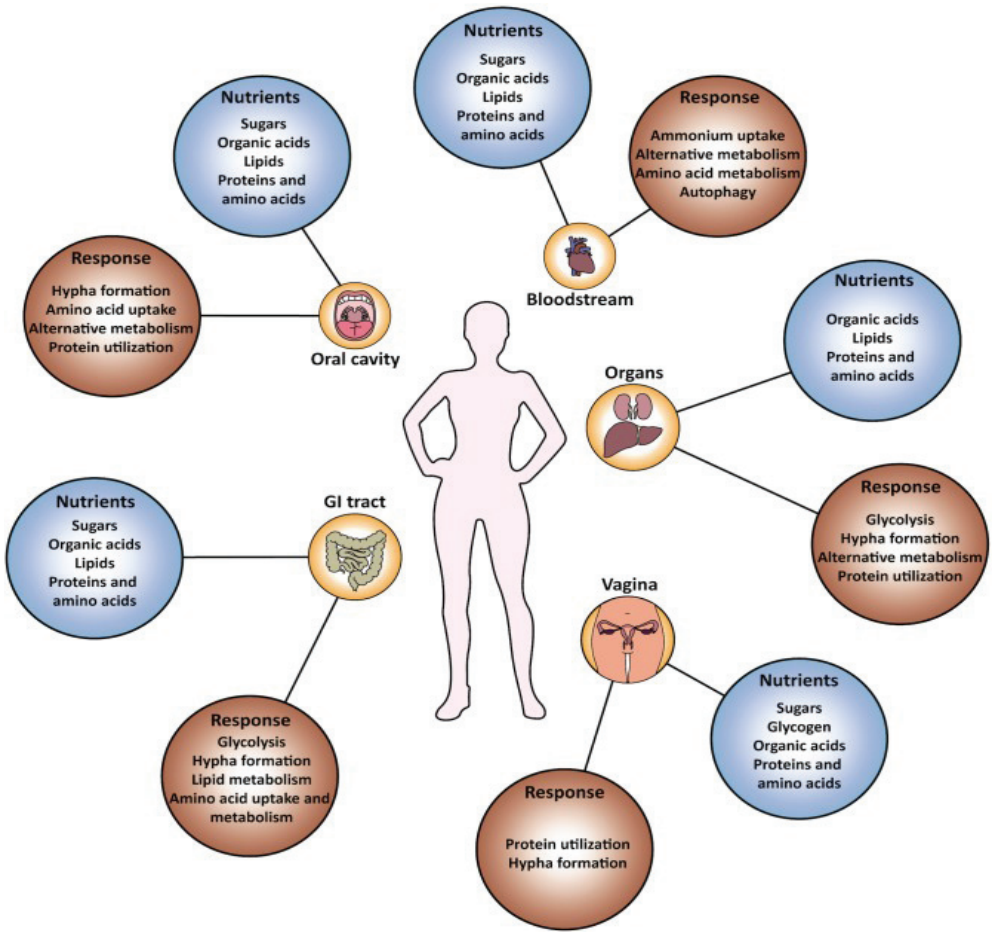


Figure 20 : Les nutriments disponibles et la réponse métabolique du pathogène dans les diverses niches du corps humain sont résumés dans ce schéma. La composition nutritive globale au sein de ces différentes niches reste globalement constante. Le terme " alternative metabolism " désigne les nutriments catabolisés par des voies autres que la glycolyse, comme le cycle glyoxylique, la ß-oxydation des acides gras et la dégradation des acides aminés (Miramon et Lorenz, 2017).

Au cours du processus infectieux, *C. albicans* transite d'un microenvironnement à l'autre. La complexité de ces environnements expose la levure à une multitude de sources carbonées différentes. Pour se développer et persister durablement au sein de ces niches biologiques particulières et répondre aux contraintes de son environnement direct, la levure doit être capable d'ajuster rapidement et efficacement son métabolisme.

Par exemple, lors de la phagocytose par les macrophages, *C. albicans* induit 3 reprogrammations successives de son métabolisme. Durant les premières heures de l'interaction avec les phagocytes, la levure réprime l'expression des gènes glycolytiques et active l'expression des gènes de la néoglucogenèse et du cycle glyoxylique, suggérant que cet environnement est pauvre en sources carbonées fermentescibles. Environ 6h post-infection, quand *C. albicans* s'évade du phagosome par le biais du développement hyphal, la levure réactive la transcription des gènes de la glycolyse pour consommer le glucose présent dans le liquide interstitiel. Enfin, 9h après la phagocytose, la levure active les gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du lactate et assimile le lactate produit par les macrophages. (Tucey *et al.,* 2018). Cet exemple illustre très bien la plasticité métabolique de *C. albicans*, et l'importance qu'elle revêt dans la survie de la levure et la mise en place de l'infection. L'existence de voies de signalisation perfectionnées dédiées à la détection précise et fine des ressources carbonées disponibles est donc primordiale pour permettre l'adaptation du pathogène aux fluctuations de son environnement. La flexibilité métabolique de *C. albicans* repose sur sa capacité à activer rapidement et efficacement les voies métaboliques permettant l'assimilation des sources carbonées alternatives (lactate, acides organiques, lipides, protéines …) rencontrées au sein de l'hôte. L'assimilation de ces nutriments passe principalement par trois voies métaboliques : la ß-oxydation des lipides, le cycle du glyoxylate et la néoglucogenèse. Par souci de clarté, ces trois voies seront abordées séparément. Cependant, *in vivo*, ces voies sont interconnectées et travaillent de concert pour permettre l'assimilation complète des sources carbonées alternatives (Fig. 21).

Ces voies métaboliques, de par leur implication dans la virulence sont particulièrement bien étudiées chez *C. albicans*. Dans cette partie, nous aborderons donc essentiellement les éléments connus chez *C. albicans*.

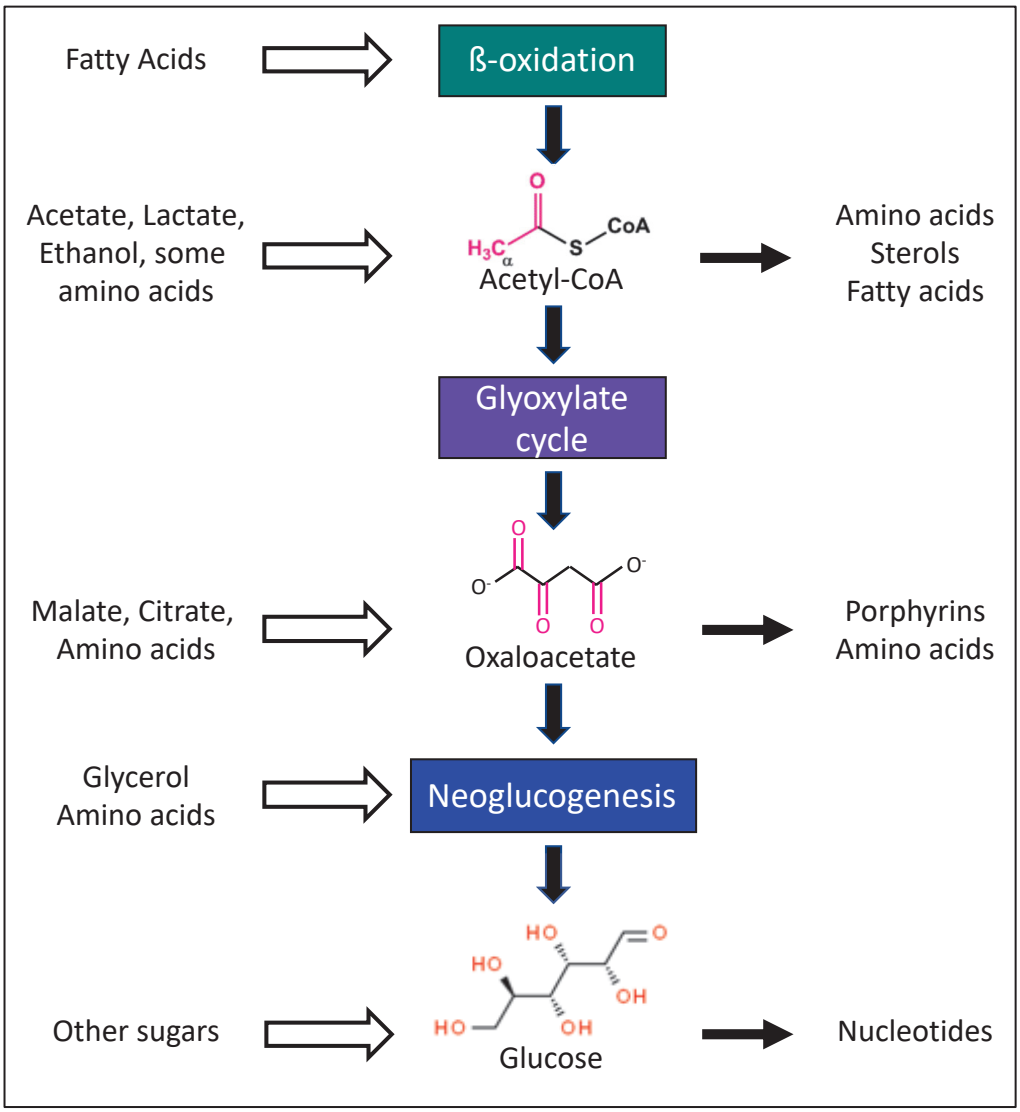


Figure 21 : Vue d'ensemble du métabolisme carboné alternatif mis en place en absence de glucose. L'interconnexion entre les voies de la ß-oxydation des lipides, le cycle glyoxylique et la néoglucogenèse est clairement figurée sur ce schéma (d'après Ramirez et Lorenz, 2006). Les flèches blanches indiquent les points d'entrées des sources carbonées dans les différentes voies métaboliques, tandis que les flèches noires indiquent les molécules pouvant être produites à partir des intermédiaires issus de ces voies.

1. La ß-oxydation des lipides

Cette voie métabolique, permet l'utilisation des lipides comme unique source de carbone. Chez *C. albicans* et chez les champignons d'une manière générale, le catabolisme des acides gras se déroule uniquement dans les peroxysomes (Hiltunen *et al.,* 2003).
Chez les levures deux sources principales, fournissant des acides gras à la cellule ont été identifiées : la dégradation des triglycérides stockés dans les corps gras et l'import de lipides environnementaux. Pour être métabolisés, les acides gras doivent être activés. L'activation des lipides est catalysée par une Acyl-CoA synthétase qui consomme une molécule d'ATP pour greffer un groupement Acyl-CoA sur la chaine carbonée d'une molécule d'acide gras (Fig. 22).

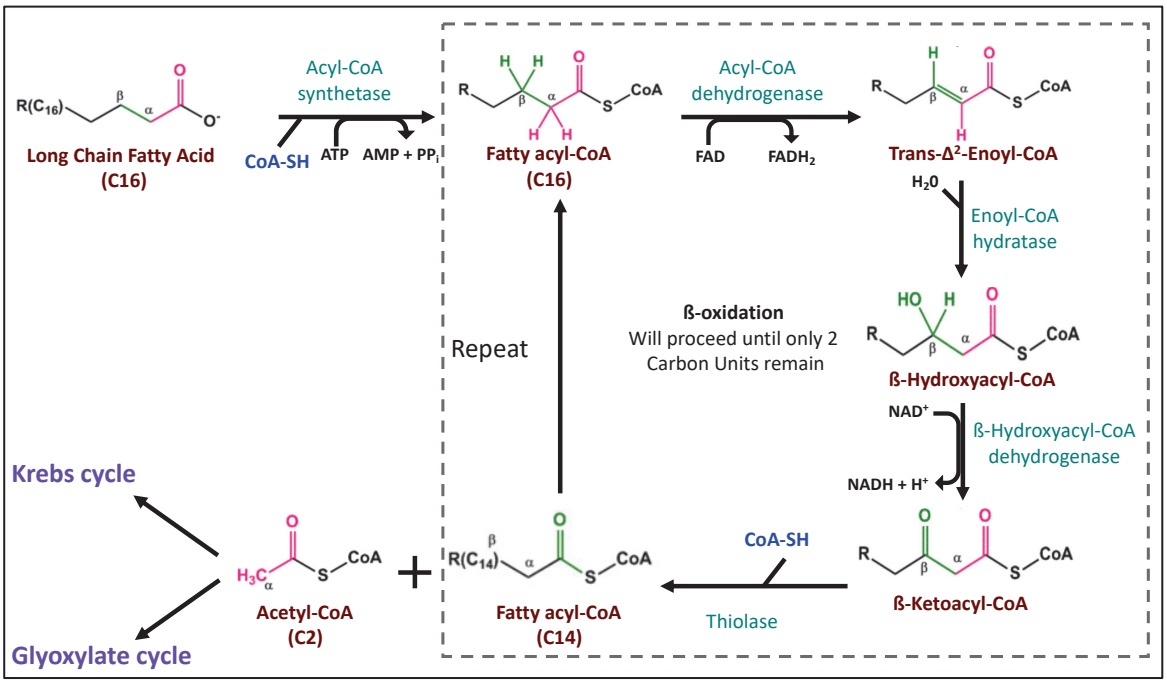


Figure 22 : La ß oxydation des lipides dans l'hélice de Linen. Avant d'entrer dans le cœur de la voie (encadré gris) les acides gras sont activés par le biais d'une Acyl-CoA synthétase qui va greffer un groupement Acyl-CoA sur la chaine carbonée des lipides. Les acides gras activés entrent ensuite dans l'hélice de Linen (encadré gris) où ils subissent différentes réactions de déshydrogénation et d'hydratation. À la fin de chaque tour d'hélice, une molécule d'acétyl-CoA est libérée, raccourcissant ainsi de 2 carbones la chaine d'acide gras initiale. La ß-oxydation se poursuit de façon cyclique tant que le nombre d'atomes de carbone constituant la chaine d'acide gras est supérieur à 3. Les molécules d'acétyl-CoA libérées au cours de la réaction peuvent rejoindre le cycle de Krebs ou le cycle glyoxylique.

Chez *S. cerevisiae*, cinq gènes (*ScFAA1* – *ScFAA4* et *ScFAT2*) codant pour des Acyl-CoA synthétases ont été identifiés dans le génome. La délétion simultanée des gènes *ScFAA1* et *ScFAA4* entraine un défaut d'activation des lipides et une incapacité de la levure à croitre sur un milieu contenant de l'oléate comme seule source de carbone (Knoll *et al.,* 1995).

Chez *C. albicans* le gène *CaFAA4* a récemment été identifié (Tejima *et al.,* 2018). L'expression hétérologue de *CaFAA4* dans une souche mutée *Scfaa1faa4Δ* de *S. cerevisiae*, restaure la croissance de la levure en présence de lipide. De plus, un mutant *Cafaa4Δ/Δ* est incapable d'utiliser les acides myristiques (C14) et palmitiques (C16) comme source de carbone. Ces données suggèrent que chez *C. albicans*, le gène *CaFAA4* code bien pour une Acyl-CoA synthétase, et que *Ca*Faa4p semble être la seule enzyme impliquée dans l'activation des lipides.

Une fois activés, les acides gras saturés subissent un processus cyclique, composé de 4 étapes successives : la ß-oxydation. Ces 4 réactions forment l'hélice de Linen (Fig. 22). À chaque tour d'hélice, la chaine carbonée de l'acide gras composée de *n* atome de carbone, subit une décarboxylation conduisant à la libération d'une molécule d'acétyl-CoA et au raccourcissement de la chaine carbonée à C_{n-2}.

La première étape de la réaction de ß-oxydation des lipides implique l'introduction d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 conduisant à la formation de trans-Δ^2-Enoyl-CoA. Cette réaction de déshydrogénation est catalysée par une enzyme appelée Acyl-CoA oxydase. Cette enzyme joue un rôle clé dans le catabolisme des lipides en contrôlant le flux entrant dans la voie. Chez *S. cerevisiae*, une seule enzyme *Sc*Fox1 codée par le gène *ScFOX1*, prend en charge tous les acyl-CoAs (Dmochowska *et al.,* 1990). Un mutant *Scfox1Δ* est incapable de croitre sur un milieu contenant de l'acide oléique comme seule source de carbone (Poirier *et al.,* 2006).

Chez *C. albicans*, aucune donnée moléculaire n'est disponible concernant la première étape de cette voie.

La deuxième réaction conduit à l'addition d'un groupement OH sur le carbone 3 de la chaine carbonée (Fig. 22). Il en résulte la formation d'un intermédiaire L-ß-hydroxyacyl-CoA.

La troisième étape est une réaction d'oxydation conduisant à la formation de 3-cétoacyl-CoA et à libération d'une molécule de $NADH,H^+$, ultérieurement réoxydée dans la chaine respiratoire avec libération d'énergie sous forme d'ATP. Ces deux réactions sont catalysées par une enzyme multifonctionnelle ayant à la fois une activité Enoyl-CoA hydratase et hydroxyacyl-CoA déshydrogénase.

Chez *C. albicans*, cette enzyme plurifonctionnelle est codée par le gène *CaFOX2* (Lorenz *et al.,* 2004). Le mutant *Cafox2Δ/Δ* est incapable de croitre en présence d'acide gras comme seule source de carbone, suggérant que chez ce mutant la ß-oxydation des lipides n'est pas fonctionnelle (Piekarska *et al.,* 2006). Dans un modèle murin de candidose systémique, le mutant *Cafox2Δ/Δ* présente une virulence drastiquement atténuée (Piekarska *et al.,* 2006 ; Ramirez et Lorenz, 2007). De façon inattendue, ce mutant est également incapable de pousser en présence d'éthanol et d'acétate, dont l'assimilation est indépendante de la ß-oxydation des lipides, mais requiert un cycle glyoxylique fonctionnel. L'analyse des peroxysomes du mutant *Cafox2Δ/Δ* révèle une morphologie anormale de ces organites (Piekarska *et al.,* 2006). Ainsi, la délétion du gène *CaFOX2* pourrait conduire à un défaut de fonctionnement global des peroxysomes et de l'ensemble des voies métaboliques siégeant dans cet organite dont la ß-oxydation des lipides et le cycle glyoxylique. Plus récemment, Piekarska *et al.,* ont pu mettre en évidence que le mutant *Cafox2Δ/Δ* est incapable de transporter correctement les intermédiaires du cycle glyoxylique et l'Acétyl-CoA à travers la membrane du peroxysome, suggérant qu'une ß-oxydation fonctionnelle est requise pour le fonctionnement du cycle glyoxylique dans le peroxysome (Piekarska *et al.,* 2008). Il a également été mis en évidence que le défaut de virulence du mutant *Cafox2Δ/Δ* était principalement lié au dysfonctionnement du cycle glyoxylique plutôt qu'à celui de la ß-oxydation (Piekarska *et al.,* 2006 ; 2008).

La réaction finale de la ß-oxydation des lipides est catalysée par une 3-cétoacyl-CoA thiolase, qui clive le 3-cétoacyl-CoA et libère une molécule d'Acyl-CoA à C_{n-2} atomes de carbone, qui sera dégradée par ß-oxydation selon un processus itératif (tant que n>3) (Fig. 22), et une molécule d'acétyl-CoA, qui rejoindra le cycle glyoxylique. Chez *C. albicans*, trois gènes codant pour des thiolases ont été identifiés *CaPOT1*, *CaFOX3* et *CaPOT13*. Seul le mutant *Capot1Δ/Δ* présente un défaut de croissance en présence de lipides suggérant que *Ca*Pot1 est la principale thiolase impliquée dans l'assimilation des lipides chez *C. albicans*. La délétion des thiolases, n'affecte pas la virulence de la levure dans un modèle *in vivo* d'embryon de poulet, ce qui semble indiquer que l'assimilation des lipides via la ß-oxydation n'est pas requise pour la virulence de *C. albicans* (Otzen *et al.,* 2013).

2. Le cycle glyoxylique

Pour proliférer dans des milieux totalement dépourvus de sucres, les microorganismes doivent donc être capables de synthétiser *de novo* des hexoses qui sont des molécules essentielles contrôlant de nombreux processus biologiques (résistance au stress, métabolisme, croissance et développement (Rolland *et al.,* 2001)). Chez les levures, les bactéries et les plantes, il existe une forme tronquée du cycle de Krebs, permettant de synthétiser à partir de composé à deux atomes de carbone (Acétyl-CoA), de l'oxaloacétate

(C4) qui est le principal précurseur de la néoglucogenèse (Fig. 23). Cette voie métabolique, utilise de l'oxaloacétate pour reformer des intermédiaires de la glycolyse et ultimement du glucose-6-phosphate. Ainsi, la forme raccourcie du cycle de Krebs, appelée cycle glyoxylique ou shunt du glyoxylate, permet l'assimilation et la croissance des levures et des bactéries sur des sources carbonées non fermentescibles comme l'éthanol, l'acétate ou encore les lipides, qui produisent lors de leur métabolisation de l'Acétyl-CoA. Chez les plantes, le cycle du glyoxylate joue un rôle très important pendant la germination, en catalysant la conversion des réserves lipidiques de la graine en glucides nécessaire à la croissance de l'embryon (Hyun-Jae Lee *et al.,* 1964). Le shunt du glyoxylate est composé de 5 réactions enzymatiques successives, deux d'entre elles, catalysées par l'isocitrate lyase (Icl) et la malate synthase (Ms) sont spécifiques du cycle glyoxylique tandis que les 3 autres sont communes au cycle de Krebs (Fig. 23). Bien qu'un certain nombre de réactions soient communes au cycle de Krebs et au cycle glyoxylique, elles sont souvent catalysées par des isoformes différentes de l'enzyme. Les réactions enzymatiques de cette voie métabolique se déroulent dans les peroxysomes.

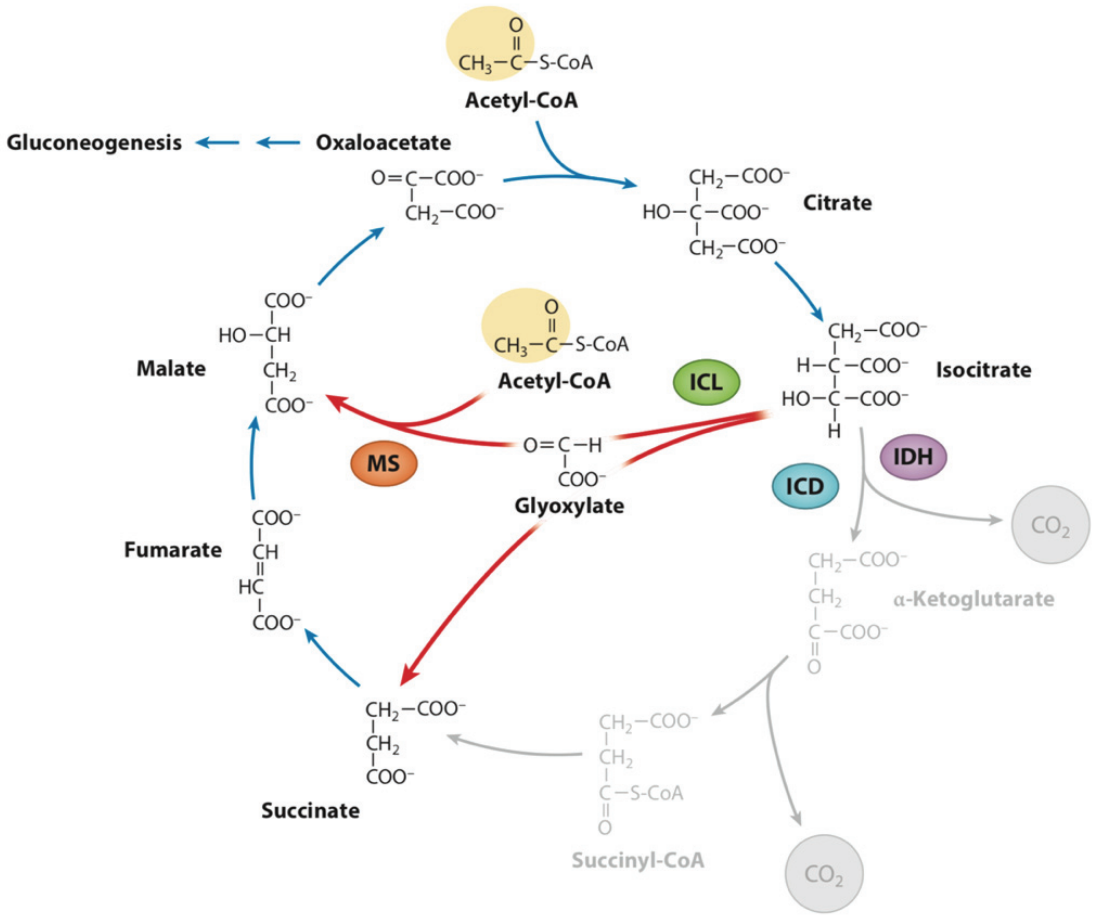


Figure 23 : Vue d'ensemble du shunt glyoxylate (flèches rouges) et de son interaction avec le cycle TCA (flèches bleues). Les étapes de décarboxylation oxydative du cycle TCA qui sont contournées par le shunt glyoxylate sont représentées en gris. Les molécules d'acétyl-CoA servant au fonctionnement du cycle glyoxylique sont figurées en beige. Les enzymes clés du shunt glyoxylique sont représentées en vert (ICL = Isocitrate Lyase) et en orange (MS = Malate synthase) (Dolan et Welch, 2018).

Le point de départ du cycle glyoxylique est commun avec le cycle de Krebs, décrit dans la section précédente. Brièvement, une molécule d'acétyl-CoA (C2) provenant par exemple de la ß-oxydation des lipides est conjuguée avec une molécule d'oxaloacétate (C4) sous l'action d'une citrate synthase pour former du citrate (C6). Une aconitase catalyse ensuite la conversion du citrate en isocitrate. Dans la cellule, deux enzymes sont capables de prendre en

charge l'isocitrate. La première, l'isocitrate déshydrogénase (IDH) oriente le flux métabolique en direction du cycle de Krebs, tandis que la seconde, l'isocitrate lyase (ICL), oriente le flux en direction du shunt glyoxylique (Fig. 23). L'isocitrate se trouve donc à la croisée de ces deux voies métaboliques. *In vivo*, l'IDH et l'ICL entrent en compétition pour leur substrat commun : l'isocitrate. Chez la plupart des microorganismes, l'IDH à une affinité plus forte pour l'isocitrate que l'ICL, le flux métabolique est donc naturellement dirigé vers le cycle de Krebs (Dunn *et al.,* 2009). Pour permettre la croissance sur des sources carbonées non fermentescibles, les bactéries comme *E. coli* ont développé un système élégant basé sur l'existence d'une IDH phosphatase/kinase qui contrôle l'activation / l'inactivation de l'IDH, permettant ainsi de réorienter le flux en direction du cycle glyoxylique (Cozzone, 1998). Chez les levures, ce système ne semble pas avoir été conservé ou n'a pas été décrit à ce jour. La répartition du flux métabolique dans l'une ou l'autre des voies pourraient simplement résulter de l'abondance plus importante de l'une des deux enzymes. Dans la cellule, il existe donc un équilibre dynamique dans le fonctionnement de ces deux voies, ce qui permet de contrôler la production d'énergie dans la cellule (via le cycle de Krebs) et la formation de précurseurs de la néoglucogenèse (via le cycle glyoxylique).

Pour entrer dans le cycle glyoxylique, l'isocitrate doit être transloqué dans les peroxysomes, où il est pris en charge par une isocitrate lyase qui catalyse son clivage en glyoxylate (C2) et en succinate (C4). Chez *C. albicans*, l'isocitrate lyase est codée par le gène *CaICL1*. Au cours de son interaction avec les macrophages, *C. albicans* reprogramme son métabolisme et active fortement (x22) la transcription du gène *CaICL1*. Ceci suggère que, cet environnement particulier est pauvre en glucose et que le cycle glyoxylique joue un rôle majeur dans la survie de *C. albicans* au sein du macrophage (Lorenz et Fink, 2001). La délétion du gène *CaICL1* entraine une incapacité de la levure à pousser en présence de source carbonée non fermentescible, comme l'éthanol, l'acétate et les lipides. De plus, un mutant *Caicl1Δ/Δ* présente un important défaut de virulence en modèle murin, confirmant que l'assimilation de source carbonée alternative via le cycle glyoxylique est essentielle pour la virulence de la levure (Lorenz et Fink, 2001 ; Ramirez et Lorenz, 2007). Le rôle crucial du cycle glyoxylique dans la virulence a également été mis en évidence chez d'autres espèces pathogènes (i)de l'Homme, comme *Mycobactérium tuberculosis*, et (ii) des plantes, comme *Leptosphaeria maculans*, *Magnaporthe grisae*, *Stagonospora nodorum* et *Colletrichum lagenarium* (McKinney *et al.,* 2000 ; Idnurm *et al.,* 2002 ; Wang *et al.,* 2003 ; Solomon *et al.,* 2004 ; Asakura *et al.,* 2006).

Au cours de l'étape suivante, le succinate regagne le cycle de Krebs, tandis que le glyoxylate est conjugué avec une nouvelle molécule d'acétyl-CoA pour former du malate (Fig. 23). Cette réaction de condensation est catalysée par une malate synthase. Chez *C. albicans*, la malate synthase est codée par le gène *CaMLS1*. De façon analogue à ce qui est décrit pour *CaICL1*, la transcription du gène *CaMLS1* est fortement activée suite à l'exposition de la levure aux macrophages et aux neutrophiles (Lorenz et Fink, 2001, 2004), confirmant le rôle du cycle glyoxylique au cours de l'interaction hôte-pathogène. Cependant, le rôle direct de *Ca*Mls1 dans la virulence n'a pas été confirmé car aucun mutant *Camls1Δ/Δ* n'a été construit à ce jour.

Le malate est ensuite converti en oxaloacétate sous l'impulsion d'une malate déshydrogénase (Fig. 23). Chez *C. albicans,* la malate déshydrogénase codée par le gène *CaMDH1-3,* est responsable de la conversion du malate en oxaloacétate au cours du cycle glyoxylique (Tao *et al.,* 2017). L'oxaloacétate est le principal précurseur pouvant rejoindre la néoglucogenèse pour reformer des biomolécules à 6 atomes de carbone.

3. La néoglucogenèse

La néoglucogenèse est une voie anabolique permettant la synthèse *de novo* d'hexoses à partir de précurseurs non glucidiques comme le lactate, le glycérol ou encore l'oxaloacétate. La plupart des réactions de la néoglucogenèse sont catalysées par les enzymes glycolytiques. Cependant, les réactions catalysées par la fructose-1-6-biphosphate et la pyruvate kinase sont irréversibles. La synthèse de fructose-6-phosphate et de phosphoénolpyruvate via la néoglucogenèse nécessite donc des enzymes spécifiques. Ces étapes clés de la néoglucogenèse constituent également les principaux points de contrôle de cette voie métabolique (Fig. 24).

La synthèse de fructose-6-phosphate à partir de fructose-1-6-biphosphate requiert une enzyme appelée fructose-1-6-bisphosphatase. Cette enzyme catalyse le clivage du groupement phosphate porté sur le carbone 1. Chez *S. cerevisiae*, le gène codant pour cette enzyme est *ScFBP1* (Sedivy et Fraenkel, 1985). En présence de glucose, la transcription du gène *ScFBP1* est réprimée, ce qui oriente le flux métabolique en faveur de la glycolyse. En revanche, quand la quantité de glucose extracellulaire s'épuise ou en présence de sources carbonées non fermentescibles, l'expression du gène *ScFBP1* est activée, orientant le flux en direction de la néoglucogenèse (Funayama *et al.,* 1980). En plus d'une régulation transcriptionnelle, la protéine *Sc*Fbp1 possède une régulation allostérique complexe. En effet, l'activité de la protéine est négativement régulée par l'AMP et le fructose 2,6-biphosphate (Sedivy et Fraenkel, 1985). Un mutant *Scfbp1Δ* présente une croissance normale en présence de glucose mais un important défaut de croissance en présence de sources carbonées néoglucogéniques (Sedivy et Fraenkel, 1985). Ainsi, la néoglucogenèse est une voie métabolique essentielle pour permettre l'assimilation des sources carbonées non fermentescibles. En 2006, Kitanovic et Wölfl ont mis en évidence que *Sc*Fbp1 était aussi impliqué dans la réponse aux stress génotoxiques et dans le vieillissement cellulaire (Kitanovic et Wölfl, 2006). Plus récemment, la même équipe a mis en évidence que la fonction catalytique de *Sc*Fbp1 et ses fonctions dans la réponse au stress étaient découplées, classant ainsi *Sc*Fbp1 dans la famille des moonlight protéines (Ghanem *et al.,* 2017).

Chez *C. albicans*, le gène *CaFBP1*, codant pour une fructose-1,6-phosphatase a été identifié. La régulation de ce gène par le glucose est conservée chez cette levure. En effet, l'expression du gène *CaFBP1* est fortement induite en présence d'éthanol, d'acétate et d'oléate, mais est réprimée par le glucose (De la Rosa, Ruiz et Rodriguez, 2000). Il a également été mis en évidence que ce gène était fortement induit en réponse à la phagocytose, indiquant une reprogrammation du métabolisme de la levure dans le macrophage (Lorenz, Bender et Fink, 2004). Un mutant *Cafbp1Δ/Δ* est incapable de croitre en présence de sources carbonées non fermentescibles et présente un sévère défaut de virulence dans un modèle murin de candidose systémique. Le profil de virulence du mutant *Cafbp1Δ/Δ* est similaire à celui du mutant *Caicl1Δ/Δ* précédemment décrit. Ceci indique qu'au cours du processus infectieux et de la colonisation de l'hôte, *C. albicans* détecte et utilise comme source de carbone les substrats de la néoglucogenèse et du cycle glyoxylique. Ces deux voies métaboliques sont donc requises pour la virulence de *C. albicans* (Ramirez et Lorenz, 2007).

L'étape finale de la glycolyse aboutit à la synthèse de pyruvate. Cependant, cette molécule ne peut pas directement être reconvertie en phosphoénolpyruvate (Fig. 24). Les cellules ont donc mis en place un artifice permettant de contourner cette restriction. Le phosphoénolpyruvate est synthétisé à partir d'un intermédiaire du cycle glyoxylique : l'oxaloacétate. Cette réaction, qui consomme une molécule d'ATP, est catalysée par une

phosphoénol carboxykinase. Chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*, cette enzyme est respectivement codée par les gènes *ScPCK1* et *CaPCK1* (Stucka *et al.,* 1988 ; Valdes-Hevia *et al.,* 1989 ; Leuker *et al.,* 1997). Au niveau transcriptionnel, la régulation de ces gènes est similaire. Leur expression est réprimée en présence de glucose et induite sur des substrats non fermentescibles (Gancedo et Schwerzmann, 1976 ; Leuker *et al.,* 1997). Chez *C. albicans*, il a été démontré que la mutation du gène *CaPCK1*, entraine un défaut de virulence de la levure en modèle murin (Barelle *et al.,* 2006).

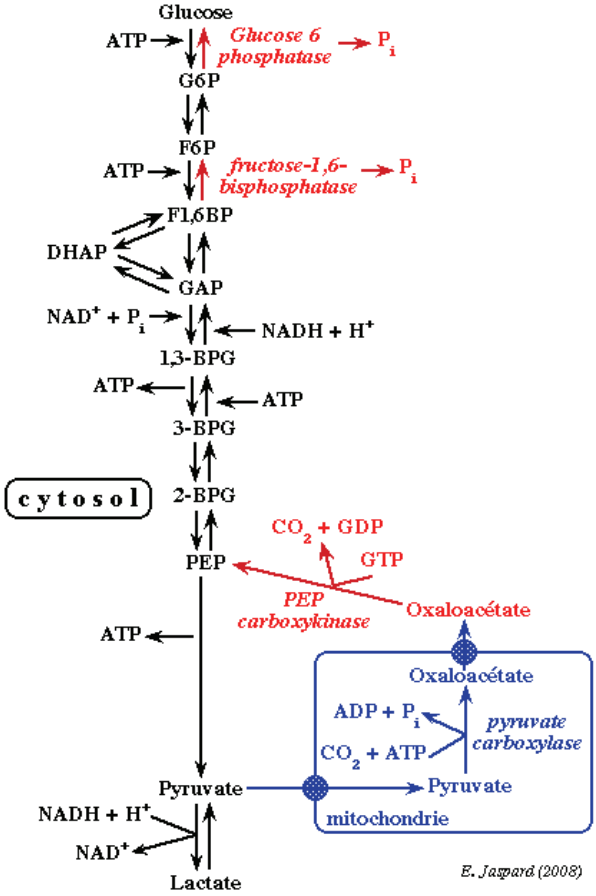


Figure 24 : La néoglucogenèse. La plupart des réactions de cette voie métabolique sont catalysées par les enzymes glycolytiques. Les étapes irréversibles nécessitant des enzymes spécifiques sont figurées en rouge. La synthèse de novo de phosphoénolpyruvate (PEP) nécessite la mise en place d'un contournement aboutissant à la synthèse d'oxaloacétate (encadré bleu). G6P, glucose-6-phosphate ; F6P, Fructose-6-phosphate ; F1,6BP, Fructose-1,6-biphosphate ; DHAP, Dihydroxyacétone phosphate ; GAP, Glycéraldéhyde phosphate ; 1,3BPG, 1,3 biphosphoglycérate ; 3BPG, 3-phosphoglycérale ; 2-BPG, 2-phosphoglycérate ; PEP, phosphoénolpyruvate.

La construction de mutants délétés des enzymes clés de la ß-oxydation des lipides, du cycle glyoxylate ou de la néoglucogenèse, diminue drastiquement la capacité de la levure à assimiler les sources carbonées alternatives (Lorenz et Fink, 2001 ; Piekarska *et al.,* 2006 ; Ramirez et Lorenz, 2007). Cette réduction de la flexibilité métabolique de *C. albicans* s'accompagne d'un sévère défaut de virulence *in vivo* à la fois en modèle macrophages et en modèle murin. Ceci démontre que la plasticité métabolique de la levure est de première importance dans le mécanisme de virulence et dans l'adaptation de la levure à son environnement.

B. La persistance des enzymes métaboliques permet l'adaptation rapide de la levure aux différents microenvironnements

Chez la levure modèle *S. cerevisiae*, la répression glucose agit à deux niveaux distincts.
Au niveau transcriptionnel, l'expression des gènes de la néoglucogenèse, tels que *ScPCK1* et *ScFBP1*, et du cycle du glyoxylique comme *ScICL1*, est réprimée en présence de glucose via le répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1 (Turcotte *et al.,* 2010). Au niveau traductionnel, les enzymes, *Sc*Pck1, *Sc*Fbp1 et *Sc*Icl1, produits de ces gènes sont rapidement dégradées suite à leur ubiquitination. La dégradation de ces protéines permet à la levure de n'utiliser que le glucose comme source de carbone.

Les travaux de Sandai *et al* (2012), ont examiné les effets du glucose sur la stabilité des protéines *Ca*Icl1 et *Ca*Pck1 de *C. albicans.* Les analyses effectuées par Western Blot ont montré que, contrairement à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae*, ces enzymes persistent dans la cellule suite à une exposition au glucose. Cependant, l'analyse de la stabilité des ARNm correspondants par RT-qPCR, a montré que les transcrit des gènes *CaICL1* et *CaPCK1,* étaient rapidement dégradés après ajout de glucose dans le milieu. L'expression des gènes *CaICL1* et *CaPCK1* est donc fortement réprimée en présence de glucose, mais cette régulation ne se reflète pas au niveau du protéome.

Chez *S. cerevisiae,* le processus d'ubiquitination contribue à la dégradation accélérée des protéines en réponse au glucose. En exprimant de façon hétérologue le gène de *S. cerevisiae ICL1 (ScICL1)* dans une souche sauvage de *C. albicans*, les auteurs ont remarqué que les transcrits et l'enzyme *Sc*Icl1 étaient rapidement dégradés après ajout de glucose. La même expérience avec une souche de *C. albicans,* délétée du gène de la polyubiquitine ligase a mis en évidence l'absence de dégradation de l'enzyme *Sc*Icl1 (Sandai *et al.,* 2012). Il semble donc que, le processus d'ubiquitination impliqué dans la dégradation accélérée des protéines en réponse au glucose soit conservé chez *C. albicans.* Cependant, en analysant, les séquences des enzymes *Ca*Icl1 et *Ca*Pck1, les auteurs ont pu mettre en évidence que, chez *C. albicans*, les sites consensus d'ubiquitination ont été perdus (Sandai *et al.,* 2012). Ceci permet à ces enzymes de persister dans la cellule, alors même que les gènes correspondants sont soumis à une répression transcriptionnelle forte, en réponse au glucose. *C. albicans* est donc capable de produire simultanément des enzymes de la glycolyse, de la néoglucogenèse et du cycle glyoxylique, permettant l'assimilation concomitante de plusieurs sources carbonées, et donc de répondre rapidement à un changement de la composition en nutriments de son environnement. Pour un pathogène transitant d'une niche à l'autre, exposé à un microbiote complexe, ce mécanisme pourrait permettre à *C. albicans* d'éviter les phases de latence associées à la reprogrammation du métabolisme dans un environnement en constant changement (Lorenz, 2013). En 2016, Childers *et al.,* ont démontré que la persistance de ces enzymes et l'assimilation simultanée de plusieurs sources carbonées était essentielle à la colonisation du tractus digestif par la levure et à la mise en place d'une infection systémique en modèle murin. Cette importante plasticité métabolique joue aussi un rôle dans la survie de la levure suite à sa phagocytose (Childers *et al.,* 2016).

Objectifs du projet de thèse

Dans les systèmes biologiques complexes comme l'hôte humain, les sources carbonées physiologiques principalement disponibles sont les acides gras, le lactate, l'acétate et les hexoses (glucose, galactose, fructose …). Ces molécules sont respectivement assimilées via les voies de la ß-oxydation, du cycle du glyoxylate, de la néoglucogenèse et de la glycolyse. Si de nombreuses études ont mis en évidence que des mutations affectant le métabolisme carboné alternatif ont de profondes conséquences sur la capacité de la levure à coloniser son hôte et à mettre en place une infection, peu de données sont disponibles concernant la glycolyse, alors même que le glucose est la source de carbone préférentiellement utilisée par les microorganismes. Nos travaux se sont donc focalisés sur l'étude de cette voie métabolique et plus précisément sur la première étape irréversible de cette voie, la conversion du glucose en glucose-6-phosphate, jamais été étudiée chez *C. albicans*.

La première partie de ce travail de thèse avait pour objectif d'identifier et de caractériser le système permettant la phosphorylation des hexoses chez *C. albicans*.

- Une hexokinase (*CaHXK2*) et deux glucokinases (*CaGLK1* et *CaGLK4*) ont été mises en évidence. La régulation transcriptionnelle de ces gènes en réponse à différents stimuli (source de carbone, concentration en glucose, …) a été explorée. L'expression des protéines associées a également été analysée.
- L'implication de chacune de ces enzymes dans le processus de phosphorylation des hexoses, ainsi que leur rôle dans le fitness (croissance, filamentation, résistance au stress) de *C. albicans* ont été explorés grâce à la construction de différentes combinaisons de mutants de délétion et l'utilisation d'approches variées de biochimie et de biologie moléculaire.
- Sur le plan de la virulence, le comportement des mutants a été évalué dans deux pathosystèmes : un modèle insecte *Galleria mellonella,* et un modèle macrophage murin.
- Les hexokinases fongiques pouvant être impliquées dans le mécanisme de la répression glucose, nous avons cherché à mettre en évidence le rôle régulateur de *Ca*Hxk2 chez *C. albicans*. Pour cela, la transcription de gènes soumis à la répression glucose ainsi que la migration de l'hexokinase dans le noyau en condition de répression ont été analysées chez la souche sauvage et les mutants hexose kinases.

L'objectif des travaux présentés dans la seconde partie de la thèse, était de dissocier les fonctions catalytiques et régulatrices de l'hexokinase afin de comprendre plus finement comment chacune de ces fonctions contribuent au fitness et à la virulence de la levure.

- En nous appuyant sur les données disponibles chez *S. cerevisiae*, une approche de mutagenèse dirigée a été utilisée pour construire différents mutants de délétion et de substitution.
- La capacité de ces mutants à phosphoryler le glucose et à réprimer l'expression des gènes du métabolisme carboné alternatif a ensuite été analysée par le biais de dosages enzymatiques et d'études transcriptionnelles.
- Enfin, la capacité des mutants à adopter un mode de développement filamenteux, ainsi que leur virulence *in vivo* et *in vitro* ont été analysées.

Les données de la littérature montrent que le macrophage est un environnement relativement pauvre en sucres simples (bien qu'il contienne 10 mM de glucose) et que pour survivre, la levure doit composer avec les sources carbonées alternatives présentes dans le phagocyte. La troisième partie de nos travaux a fait l'objet d'un projet technique impliquant une approche transcriptionnelle ciblée par digital droplet PCR. Notre objectif a consisté à analyser quelles étaient les reprogrammations métaboliques chez la levure durant les phases précoces de la phagocytose par les macrophages.

Résultats : Partie I

Les hexokinases et les glucokinases sont essentielles pour la physiologie et la virulence de la levure pathogène *Candida albicans*

Résumé :

Candida albicans est un pathogène opportuniste naturellement présent dans la flore commensale humaine. Dans certaines circonstances (immunosuppression, brûlure, dysbiose…), *C. albicans* adopte un comportement pathogène invasif et peut infecter un large éventail d'organes. Dans ces environnements particuliers, les nutriments disponibles varient en qualité et en quantité. La flexibilité métabolique de *C. albicans* est donc de première importance pour permettre l'infection et la colonisation des tissus de l'hôte. La survie de la levure repose sur sa capacité à assimiler efficacement les sources carbonées fermentescibles et non fermentescibles localement disponibles. Le glucose est la source de carbone préférentiellement utilisée par la plupart des microorganismes pour soutenir les réactions de leur métabolisme et produire de la biomasse. Cependant, dans les systèmes biologiques, le glucose est souvent un élément limitant présent à l'état de trace. Cela impose donc au pathogène de disposer d'outils de détection et d'assimilation précis et efficaces. Nous avons exploré et caractérisé le système permettant la phosphorylation des hexoses chez *C. albicans*. Trois enzymes, une hexokinase (*Ca*Hxk2) et deux glucokinases (*Ca*Glk1 et *Ca*Glk4) sont impliquées dans l'activation des hexoses intracellulaires. Gâace à la construction d'une série de mutants nous avons montré que la phosphorylation du glucose est principalement effectuée par *Ca*Hxk2. L'analyse de l'expression des gènes *CaHXK2*, *CaGLK1* et *CaGLK4* a révélé qu'ils étaient régulés par des voies de signalisation différentes et qu'il n'existe pas de phénomène de régulation croisée. En présence de glucose, *Ca*Hxk2 migre dans le noyau et contribue au mécanisme de la répression glucose. En outre, *Ca*Hxk2 participe à la résistance au stress oxydant, osmotique et de la paroi, tandis que les glucokinases sont surexprimées en condition d'hypoxie. Le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est incapable d'adopter un mode de croissance filamenteux, ce qui démontre que la phosphorylation des hexoses est une étape clé dans le dimorphisme de *C. albicans*. La délétion de l'hexokinase 2 diminue drastiquement la virulence de la levure en modèles *Galleria mellonella* et macrophages. En contribuant à la flexibilité métabolique, à la réponse aux stress et à la morphogenèse, les enzymes de phosphorylation du glucose jouent un rôle essentiel dans la virulence de *C. albicans*.

I. Introduction

C. albicans est une levure naturellement présente dans la flore commensale humaine chez plus de 70% de la population (Mathé *et al*., 2013). Elle est notamment retrouvée au niveau des microbiotes de la peau, du tube digestif ou encore des muqueuses orales ou génitales. Cette levure est parfaitement adaptée aux hôtes à sang chaud dans lesquels elle peut se multiplier et proliférer (Hiller *et al*., 2011 ; Gow *et al*., 2012). L'absence de réservoir écologique connu suggère que *C. albicans* a, au cours de l'évolution, sélectionné les traits lui permettant de persister de façon optimale au sein d'un hôte animal (Hofs *et al*., 2016).

Chez un individu sain et immunocompétent, la multiplication de la population fongique est strictement contrôlée. Les défenses du système immunitaire et l'effet de compétition entre les microorganismes de la flore microbienne endogène permettent de réguler la prolifération de *C. albicans* et contribuent à la maintenir dans un état commensal. Cependant, dans certaines circonstances, le fragile équilibre entre commensalisme et pathogénicité peut être remis en cause. Un affaiblissement local ou systémique des défenses immunitaires (VIH, neutropénie, lymphopénie), un déséquilibre de la flore bactérienne endogène (traitement antibiotique), ou encore la rupture de certaines barrières physiques de l'hôte (épithéliums, muqueuses), sont autant de facteurs susceptibles de rompre cet état d'équilibre et de modifier le rapport de force entre les deux partenaires (Mathé *et al*., 2013). L'introduction de surfaces artificielles dans l'organismes de type sondes, cathéters ou prothèses fournie également un terrain propice au développement d'infection fongique systémique. L'acquisition par *C. albicans* d'un comportement pathogène et invasif s'accompagne également d'une transition morphologique de la levure qui passe d'une forme levure (ovoïde) à une forme mycélienne (filamenteuse). Le dimorphisme, réel facteur de virulence chez les champignons pathogènes est déclenché par un faisceau de signaux environnementaux (CO2, température, pH, nutriments, sérum…) eux même intégrés par des voies de signalisation complexes (Biswas *et al*., 2007). Lors d'une candidose systémique, le pathogène gagne la circulation sanguine, après avoir induit le processus d'endocytose par les cellules épithéliales ou par des mécanismes actifs mettant en jeu le développement des hyphes (Polke *et al*., 2015). Ces mécanismes lui permettent de se disséminer par voie hématogène dans l'ensemble de l'organisme et de coloniser les organes profonds tels que le cœur, le foie, les reins ou encore le cerveau (Perlroth *et al*., 2007). Au sein de son hôte *C. albicans* est donc capable de coloniser de nombreuses niches au sein desquelles les conditions physico-chimiques et les nutriments disponibles varient (Sandai *et al*., 2012).

Le glucose est le sucre le plus abondant sur terre et la source de carbone préférentiellement utilisée par la plupart des cellules vivantes. Cependant, dans les systèmes biologiques, le glucose est souvent l'élément limitant. Chez l'Homme, par exemple, sa concentration oscille entre 4 mM, dans le flux sanguin, et 30 mM à la surface de certaines muqueuses (Brown *et al*., 2014). Les microenvironnements que constituent le foie, les reins ou encore le tube digestif sont relativement riches en glucose, mais aussi en sources carbonées alternatives telles que les acides gras, les acides aminés ou encore l'acide lactique qui est essentiel pour permettre la colonisation du tube digestif par la levure (Ueno *et al*., 2011 ; Sandai *et al*., 2012). Au cours du processus infectieux, *C. albicans* transite d'un microenvironnement à l'autre. La complexité de ces environnements expose la levure à une multitude de sources carbonées différentes. Pour se développer et persister durablement au sein de ces niches biologiques particulières et répondre aux contraintes de son

environnement direct, la levure doit être capable d'ajuster rapidement et efficacement son métabolisme. De nombreuses études ont démontré que des mutants des voies métaboliques de la glycolyse (Ko *et al*., 2013), de la ß-oxydation des lipides (Ramirez *et al*., 2007) et du cycle glyoxylique (Lorenz et Fink, 2001) était hypovirulents. La flexibilité métabolique de *C. albicans* est donc de première importance pour sa survie et la mise en place d'une infection par le pathogène. L'existence de voies de signalisation perfectionnées permettant une détection précise et fine des ressources carbonées disponibles est donc primordiale pour permettre l'adaptation du pathogène aux fluctuations de son environnement. Bien que les microorganismes soient capables d'assimiler une large gamme de source de carbone, le glucose est préférentiellement assimilé par l'ensemble des êtres vivants et en particulier par les levures qui ont perfectionné de nombreux réseaux de régulation permettant la détection, l'acquisition et l'utilisation de ce sucre (Santangelo *et al*., 2006 ; Zhao *et al*., 2007 ; Dashko *et al*., 2014).

La réponse de *Saccharomyces cerevisiae* au glucose est un exemple phare de réponse cellulaire aux changements environnementaux. Les mécanismes impliqués sont particulièrement complexes car en plus d'être la source carbonée préférentiellement utilisée, le glucose est aussi une molécule signal induisant une reprogrammation de l'expression de nombreux gènes (Gancedo *et al*., 2008). Chez *S. cerevisiae*, la détection du glucose extracellulaire met en jeux deux voies de signalisation, largement décrites et étudiées. Les travaux menés chez *S. cerevisiae* ainsi que la recherche d'orthologues dans le génome de *C. albicans* ont permis de reconstituer chez cette dernière, au moins de façon partielle ces deux voies de signalisation (Sabina *et al*., 2009 ; Brown *et al*., 2009). (I) La voie de l'AMPc qui met en jeu le récepteur couplé aux protéines G, *Sc*Gpr1, est essentielle pour une réponse rapide à un signal glucose. Cependant, contrairement à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae*, cette voie de signalisation ne participe pas à la perception du glucose chez *C. albicans* mais est impliquée dans le contrôle de la morphogenèse de la levure (Maidan *et al*., 2005) (Fig. 12B). (II) La voie *« Sugar Receptor Repressor »* (SRR), repose sur la présence d'un senseur membranaire de forte affinité *Ca*Hgt4. La liaison du glucose extracellulaire à ces senseurs permet d'initier un signal glucose aboutissant à l'expression des gènes *HXT* codant les perméases au glucose (Sabina *et al*., 2009) (Fig. 12A), dont une vingtaine ont été identifiés chez les levures *S. cerevisiae* et *C. albicans* (Wieczorke *et al*., 1999 ; Fan *et al*., 2002).

Une fois à l'intérieur de la cellule, le glucose est phosphorylé pour former du glucose-6-phosphate qui rejoint ensuite la glycolyse, principale voie de production d'énergie chez les organismes vivants. Chez *S. cerevisiae*, trois enzymes sont dédiées à la phosphorylation du glucose intracellulaire : les hexokinases I (*Sc*Hxk1) et II (*Sc*Hxk2), impliquées dans la phosphorylation du glucose, du fructose et du mannose et une glucokinase (*Sc*Glk1) spécifique du glucose (Herrero *et al*., 1995). Si chez *S. cerevisiae*, peu de données sont actuellement disponibles sur les fonctions physiologiques de la glucokinase, l'hexokinase II et ses fonctions dans la cellule ont été largement étudiées. Cette enzyme bi-fonctionnelle joue un rôle majeur dans la phosphorylation du glucose intracellulaire, car elle présente une activité kinase respectivement 2 et 4 fois supérieure à celle de l'hexokinase I et de la glucokinase. *Sc*Hxk2 joue aussi un rôle important de régulateur transcriptionnel. En effet, l'hexokinase II est un élément clé de la répression glucose (Gancedo *et al*., 2008). Lorsque ce sucre est détecté en abondance dans la cellule, l'hexokinase *Sc*Hxk2 migre dans le noyau et se lie au répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1. Une fois formé, le complexe *Sc*Mig1/*Sc*Hxk2 réprime l'expression de gènes cibles (Fig. 18). De récents travaux ont montré que *Sc*Hxk2 est un senseur intracellulaire du glucose qui opère en changeant de conformation en réponse au glucose et joue le rôle de

soutien architectural du complexe de répression transcriptionnelle (Vega *et al*., 2016). Environ 350 gènes sont régulés par ce complexe (Treitel *et al*., 1995 ; Rodriguez *et al*., 2001 ; Moreno *et al*., 2005 ; Gertz *et al*., 2009), et nombre d'entre eux sont impliqués dans l'assimilation de sources carbonées alternatives.

Une recherche par blast dans le génome de *C. albicans* à partir des séquences *ScHXK2* et *ScGLK1* de *S. cerevisiae* a permis de mettre en évidence des séquences homologues. Aucune donnée moléculaire n'est disponible sur ces gènes et les potentielles fonctions des protéines ne sont pas connues chez *C. albicans*. Si le phénomène de répression glucose et le rôle du répresseur *Ca*Mig1 et de la protéine kinase *Ca*Snf1 ont été mis en évidence (Zaragoza *et al*., 2000 ; Corvey *et al*., 2005), la participation de l'hexokinase II au phénomène de répression glucose chez *C. albicans* n'a pas été démontrée. De plus, la contribution de ces protéines à la phosphorylation des hexoses intracellulaires et leur éventuel rôle régulateur reste à explorer. Au cours de cette étude, nous avons évalué la contribution de *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1 et *Ca*Glk4 à la phosphorylation des hexoses et au mécanisme de répression glucose. Nous avons également exploré les conséquences de la délétion des hexokinases et glucokinases sur la croissance, la réponse aux stress, la transition morphologique et la virulence de *C. albicans.*

Une partie des résultats présentés ci-après ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Frontiers in Microbiology » (Laurian *et al*., 2019, voir p. 137).

II. Analyse bioinformatique de la région génomique codant les enzymes de phosphorylation des hexoses *Ca*Hxk2, *Ca*Gkl1 et *Ca*Glk4 chez *C. albicans*

Chez la plupart des organismes vivants, deux grandes catégories d'enzymes sont impliquées dans la phosphorylation des hexoses. Les hexokinases, qui sont impliquées dans la phosphorylation du glucose, du fructose et du mannose et les glucokinases qui sont spécifiquement dédiées à la phosphorylation du glucose (Cardenas *et al*., 1998). Aucun schéma prédéfini n'existe concernant la distribution de ces enzymes. Chaque espèce dispose donc d'une panoplie d'enzymes de phosphorylation des hexoses qui lui est propre. Chez *S. cerevisiae* par exemple, deux hexokinases *Sc*Hxk1 et *Sc*Hxk2 ainsi qu'une glucokinase *Sc*Glk1 (Herrero *et al*., 1995) ont été décrites, tandis que chez *K. lactis* une seule hexokinase et une glucokinase ont été recensées (Kettner *et al*., 2007). Chez *C. albicans*, deux hexokinases codées respectivement par les gènes *CaHXK1* (C6_04580W_A (orf19.2154)) et *CaHXK2* (CR_04510W_A (orf19.542)) ont été identifiées. Des travaux menés sur l'hexokinase 1 de *C. albicans* ont révélé que contrairement à *Sc*Hxk1, cette enzyme n'est pas impliquée dans la phosphorylation du glucose intracellulaire mais dans celle de la N-acétylglucosamine qui est un sucre présent dans la matrice extracellulaire des cellules animales (Singh *et al*., 2001). De plus, un blast de la séquence nucléotidique du gène *CaHXK1* dans le génome de *S. cerevisiae* a révélé un taux d'identité de 25% avec les hexokinases 1 et 2 de cette levure, suggérant que l'hexokinase 1 de *C. albicans* est très éloignée sur le plan évolutif des hexokinases de *S. cerevisiae*. L'alignement des séquences nucléotidiques des gènes *CaHXK1* et *CaHXK2* a révélé une homologie de 50 % ce qui suggère que ces enzymes pourraient avoir des fonctions différentes.

À ce jour, aucune étude, à part celle actuellement en cours au laboratoire, n'a été effectuée sur l'hexokinase *Ca*HxK2. Une analyse par BLAST dans le génome de *C. albicans* (http://candidagenome.org/) a permis de révéler que les gènes *ScHXK1* et *ScHXK2 de S. cerevisiae,* présentent 71% d'identité avec le gène *CaHXK2*, suggérant que ces gènes partagent potentiellement des fonctions similaires. Une analyse de la séquence protéique a révélé dans la séquence de *Ca*Hxk2 l'organisation classique des hexokinases des champignons, formées de deux sous domaines conservés : un petit et un grand. De plus, le motif consensus - LGFTFSF/YP, (Bernardo *et al*., 2007) situé dans le petit sous domaine et permettant la fixation des hexoses, a également été retrouvé dans la séquence de la protéine *Ca*Hxk2. Ceci suggère que le gène *CaHXK2* code pour une enzyme impliquée dans la phosphorylation des hexoses. À l'inverse, ce motif n'a pas été retrouvé dans la séquence protéique *Ca*Hxk1, confirmant que cette enzyme n'est pas impliquée dans la phosphorylation des hexoses. Enfin, une analyse bio-informatique de la séquence de la protéine *Ca*Hxk2 (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk) a permis de prédire les fonctions de cette protéine. *Ca*Hxk2 serait capable de lier et d'hydrolyser l'ATP et présenterait également une activité catalytique de nature transférase, impliquée dans le transfert de groupement particulier d'une molécule à l'autre. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence l'existence de deux séquences NLS (Nuclear Localization Signal) dans la séquence de la protéine, suggérant que cette dernière pourrait être amenée à transiter entre le cytoplasme et le noyau. Cette propriété serait cohérente avec une potentielle fonction de régulateur transcriptionnel dans le cadre du mécanisme de la répression glucose (Corvey *et al*., 2005).

Nous avons également utilisé la séquence du gène *ScGLK1* pour rechercher par blast des homologues dans le génome de *C. albicans*. Notre analyse a permis de mettre en évidence l'existence d'une glucokinase *Ca*Glk1, codée par le gène *CaGLK1* (CR_07150W_A (orf19.734)) situé sur le chromosome R de *C. albicans* (Fig. 25). En utilisant la séquence de *CaGLK1* et en effectuant une nouvelle recherche par blast dans le génome, un second gène, *CaGLK4* (CR_07490C_A (orf19.6116)), lui aussi situé sur le chromosome R a été identifié (Fig. 25). Les deux gènes espacés d'environ 70 kpb l'un de l'autre sont orientés de façon opposée (Fig. 25). L'alignement des séquences nucléotidiques des gènes *CaGLK1* et *CaGLK4* révèle un taux d'identité de plus de 98%. La présence du motif consensus -LGFTFSF/YP- dans la séquence protéique de *Ca*Glk1 et *Ca*Glk4 suggère que ces dernières sont elles aussi capables de lier les hexoses. Nous avons ensuite réalisé une analyse bio-informatique des séquences protéiques des enzymes *Ca*Glk1 et *Ca*Glk4 (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk) afin de prédire leur fonction potentielle. Les sites prédits pour l'activité transférase et la capacité à lier l'ATP, ainsi que l'organisation classique des hexokinases ont été retrouvés dans la séquence protéique des glucokinases. Ces données suggèrent donc que les enzymes codées par les gènes *CaGLK1* et *CaGLK4* ont un rôle dans l'assimilation des hexoses.

L'analyse de la région génomique encadrant les deux gènes *CaGLK1* et *CaGLK4*, a révélé que leurs régions promotrices et terminatrices s'étendant respectivement 1500 pb en amont l'ATG et 1500 pb en aval du codon STOP, sont-elles aussi parfaitement homologues (Fig. 25). L'importante conservation entre ces deux gènes ainsi que leur orientation antiparallèle suggèrent qu'ils pourraient être issus d'un événement de duplication. L'analyse de la région génomique encadrant *CaGLK1* et *CaGLK4* montre que ces gènes sont respectivement encadrés par deux gènes de fonctions inconnues (Fig. 25). Les gènes *CR_07140C_A* (orf19.11) et *CR_07160C_A* (orf19.733) bordent le gène *CaGLK1*, (Fig. 25) tandis que le gène codant pour la glucokinase 4 est encadré par les gènes *CR_07480W_A* (orf19.6117) et *CR_07500W_A* (orf19.26.20). La proximité physique entre ces gènes ainsi que le fort taux d'homologie (96%) entre les séquences bordant *CaGLK1* et *CaGLK4,* nous laisse supposer que tous auraient pu être affectés par l'évènement de duplication (Fig. 25).

Le très fort taux d'identité de ces deux régions suggère que ces gènes ont été hautement conservés au cours de l'évolution grâce à une forte pression de sélection positive ayant contribué au maintien de la copie surnuméraire. Cependant, il peut également s'agir d'une duplication très récente. Chez les levures modèle *S. cerevisiae* et *K. lactis* ainsi que chez d'autres espèces de *Candida* comme par exemple *C. glabrata*, proche de *S. cerevisiae* sur le plan évolutif, cette duplication génique n'est pas retrouvée, ceci suggère que la duplication de ces gènes pourrait conférer un avantage sélectif à la levure. Au sein du clade CTG, qui regroupe la plupart des *Candida* pathogènes, cette duplication n'est pas retrouvée chez toutes les espèces. Ceci indique que cette duplication ne confère probablement pas un avantage sur le plan de la virulence, et met en évidence que cet évènement de duplication a été acquis plusieurs fois indépendamment au cours de l'évolution. Par exemple *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* ne possèdent qu'une seule glucokinase. À l'inverse, chez *C. dubliniensis* deux glucokinases présentant une forte identité de séquence ont été identifiées. De plus, l'analyse de la région génomique encadrant ces gènes a révélé une organisation similaire à celle observée chez *C. albicans*.

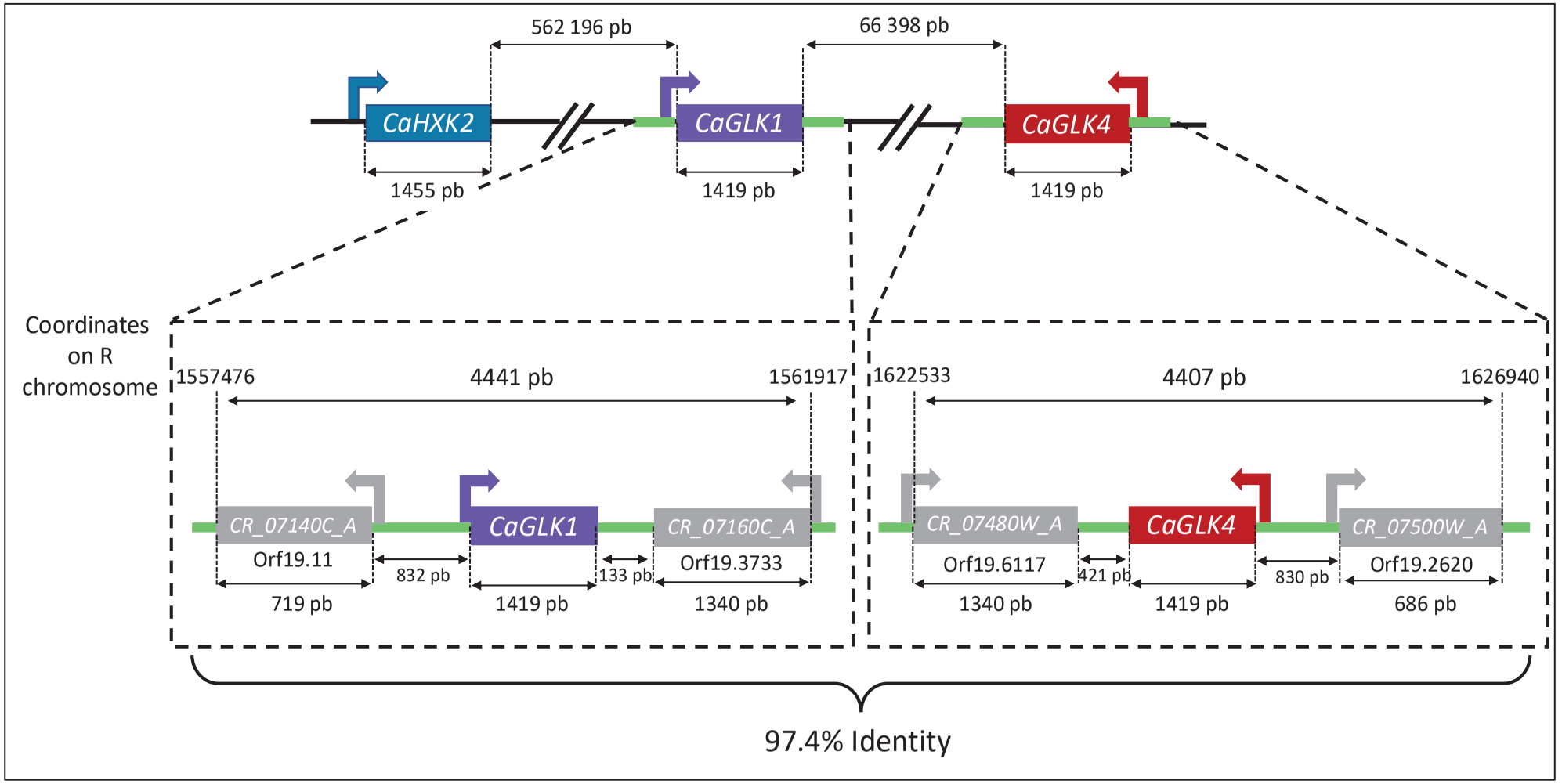


Figure 25 : Organisation de la région génomique du chromosome R portant les gènes CaHXK2, CaGLK1 et CaGLK4 codant respectivement pour l'hexokinase 2 et les glucokinases 1 et 4. Les régions homologues s'étendant en amont et en aval des gènes CaGLK1 et CaGLK4 sont figurés en vert fluo. Les encarts en pointillés représentent un zoom sur les régions génomiques encadrant les glucokinases. Dans ces deux régions, les gènes bordant les glucokinases présentent un fort taux d'identité de séquence, suggérant qu'ils sont issus d'un évènement de duplication. Ces gènes n'ont à ce jour pas été caractérisés et codent pour des protéines de fonction inconnues.

III. Construction des mutants de délétion des gènes codant les hexoses kinases chez *C. albicans*

Afin d'explorer le rôle physiologique des enzymes phosphorylant le glucose, nous avons entrepris la construction d'une série de mutants délétés d'un ou plusieurs gènes codant pour les enzymes de phosphorylation des hexoses. *C. albicans* étant diploïde, pour chaque mutant, la délétion a été réalisée par remplacement de gène pour les deux allèles.
Au total, 6 mutants différents ont été construits au cours de cette étude :

- Un mutant hexokinase 2 *Cahxk2Δ/Δ*
- Une souche complémentée dans laquelle les deux allèles du gène sauvage ont été réintroduits (*Cahxk2Δ/Δc/c*)
- Un mutant glucokinase 1 (*Caglk1Δ/Δ*)
- Un double mutant glucokinases 1 et 4 (*Caglk1glk4Δ/Δ*)
- Un double mutant hexokinase 2 glucokinase 1 (*Caglk1hxk2Δ/Δ*)
- Un triple mutant hexokinase 2 glucokinases 1 et 4 (*Caglk1glk4hxk2Δ/Δ*)

Pour construire ces différents mutants, nous nous sommes appuyés sur les propriétés de la cassette *SAT1-flipper* (Reuß *et al*., 2004), qui possède un marqueur de sélection (résistance à la nourséothricine) éliminable, permettant ainsi d'utiliser le même module pour déléter successivement les deux allèles d'un gène. Les cassettes de délétion ont soit été construites par « Long Flanking Homology » (LFH) soit par « Short Flanking Homology » (SFH) (Fig. 60). La technique LFH consiste à amplifier par PCR des régions homologues de 500 pb en amont et en aval de la séquence codante a déléter puis à assembler ces régions par PCR avec le module *SAT1-flipper*. Cette méthode est couramment utilisée chez *C. albicans* avec un excellent taux de transformation. En revanche, c'est une méthode chronophage nécessitant plusieurs étapes d'assemblage par PCR. Pour la plupart des mutants, nous avons adapté et utilisé la méthode SFH, beaucoup plus rapide. Cette technique consiste à amplifier directement le module *SAT1-flipper* avec de longues amorces possédant 85 pb homologues à la région à déléter. Pour la plupart des souches, la totalité de la séquence codante du gène cible a été éliminée. En revanche, pour construire le double mutant *Caglk1glk4Δ/Δ*, nous n'avons pas été en mesure de déléter la séquence codante du gène *CaGLK4* dans son intégralité. En effet, les séquences promotrices, codantes et terminatrices des deux gènes étant parfaitement homologues, nous pensions pouvoir déléter le gène *CaGLK4* en employant la même cassette que celle ayant servi à la délétion de *CaGLK1*. Cependant, toutes nos tentatives se sont révélées infructueuses et l'analyse par PCR des transformants obtenus ont révélé une réintégration de la cassette au locus initial du gène *CaGLK1*. Pour pallier ce problème, nous avons entrepris la construction d'une cassette permettant de déléter partiellement la séquence codante du gène *CaGLK4*. Afin de nous assurer que la protéine obtenue soit non fonctionnelle, nous avons ôté la partie du gène codant le site de fixation des hexoses. Les caractéristiques des souches sont regroupées dans le tableau 6.

IV. Contribution de l'hexokinase II et des glucokinases à l'alimentation du flux glycolytique

A. Dosage de l'activité hexokinase

Chez *C. albicans*, aucune étude n'a démontré le rôle de *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1 et *Ca*Glk4 dans le processus d'assimilation des hexoses. Pour analyser la contribution de chacune de ces enzymes dans le processus de phosphorylation des hexoses, nous avons déterminé les activités glucose kinase, fructose kinase et mannose kinase de nos différentes souches sauvages et mutantes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3. Chez la souche sauvage, nous avons détecté une activité glucose kinase de 55,4 nmol/min/mg (= 100%) (Fig. 8A). Chez un mutant *Cahxk2Δ/Δ*, cette activité n'est plus que de 19,22 nmol/min/mg, soit à peine 35% de l'activité détectée chez la souche sauvage. Ce résultat met en évidence (i) que l'hexokinase 2 n'est pas la seule enzyme impliquée dans la phosphorylation du glucose, comme en témoigne l'activité glucose kinase résiduelle, (ii) que dans les conditions du dosage, l'hexokinase 2 est la principale enzyme phosphorylant le glucose intracellulaire. En effet, chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ* une diminution de près de 70 % de l'activité glucose kinase est détectée (Tab. 3). La complémentation de la mutation *Cahxk2* restaure une activité et un taux de phosphorylation du glucose proche de ceux détectés dans la souche sauvage, confirmant que la perte d'activité détectée chez le mutant est bien due à la délétion de l'hexokinase 2 (Tab. 3).

Curieusement, la délétion de l'une (*Caglk1Δ/Δ)* ou des deux (*Caglk1glk4Δ/Δ)* glucokinases n'affecte pas la capacité de la cellule à phosphoryler le glucose. En effet, dans les extraits cellulaires de ces souches, nous avons respectivement mesuré une activité glucose kinase de 55,25 et 54,04 nmol/min/mg, soit des niveaux similaires à ceux de la souche sauvage (Tab. 3). En partant de ce constat, nous avons pu émettre plusieurs hypothèses : (i) les glucokinases ne participent pas à la phosphorylation du glucose intracellulaire, (ii) les glucokinases contribuent de façon minoritaire au processus de phosphorylation des hexoses, (iii) il existe un phénomène de compensation au niveau transcriptionnel ou traductionnel masquant la perte d'activité des glucokinases.

Pour mieux comprendre le rôle des glucokinases dans le processus de phosphorylation du glucose, nous avons déterminé la capacité d'un double mutant délété simultanément de l'hexokinase 2 et de la glucokinase 1 (*Caglk1hxk2Δ/Δ*), à phosphoryler le glucose. Chez ce mutant, nous avons mesuré une activité glucose kinase de 3,66 nmol/min/mg, ce qui correspond à une diminution de plus de 90% de l'activité de phosphorylation du glucose (Tab. 3). Ainsi, la capacité du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* à phosphoryler le glucose est largement inférieure à celle du simple mutant *Cahxk2Δ/Δ*. Ceci suggère que la glucokinase 1 est bien impliquée dans la phosphorylation du glucose intracellulaire. De plus, l'activité de phosphorylation du glucose mesurée chez le double mutant *Caglk1hkx2Δ/Δ* révèle qu'une autre enzyme est impliquée dans l'assimilation de ce sucre (Tab. 3). Cependant, la contribution de cette enzyme semble très minoritaire. Afin d'identifier l'enzyme responsable de la phosphorylation du glucose chez le double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ*, nous avons analysé l'activité glucose kinase d'un triple mutant (*Caglk1glk4hxk2Δ/Δ*) délété de l'hexokinase 2 et des deux glucokinases 1 et 4. Chez ce mutant, nous avons relevé une activité glucose kinase de 0,3 nmol/min/mg, soit une diminution de l'activité glucose kinase de plus de 99% par rapport à la souche sauvage (Tab. 3). Cette activité quasi-nulle ne peut être discernée du bruit

de fond de l'expérience. Ainsi, comme la délétion de la glucokinase 4 diminue encore la capacité de la levure à phosphoryler le glucose, nous pouvons en déduire que cette enzyme est fonctionnelle et participe à la phosphorylation du glucose.

Dans un second temps, nous avons analysé l'activité fructokinase de ces différentes enzymes. Chez la souche sauvage, nous avons mis en évidence une activité de phosphorylation du fructose de 59,4 nmol/min/mg (Tab. 3). La phosphorylation du fructose semble donc être plus rapide que celle du glucose. Chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ*, l'activité fructose kinase mesurée est de 0,28 nmol/min/mg, soit un taux de phosphorylation du fructose correspondant à 0,37% de la souche sauvage. Cette très faible valeur suggère que le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est incapable de phosphoryler le fructose (Tab. 3). La complémentation de la mutation *Cahxk2*, restaure un taux d'activité fructose kinase similaire à celui de la souche sauvage, confirmant que le défaut de phosphorylation du fructose observée chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est bien lié à la délétion de l'hexokinase 2 (Tab. 3). Les simples et doubles mutants (*Caglk1Δ/Δ*, *Caglk1glk4Δ/Δ*) présentent une activité fructose kinase identique celle de à la souche sauvage. À l'instar de ce que nous avons décrit pour le glucose, ceci peut être dû au fait que les glucokinases ne participent pas à la phosphorylation du fructose, ou y contribuent de façon minoritaire. Pour éclaircir ce point, nous avons mesuré l'activité fructose kinase chez le double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* et triple mutant *Caglk1glk4hxk2Δ/Δ*. La valeur obtenue (0,23 nmol/min/mg) est très similaire à celle mesurée chez le simple mutant *Cahxk2Δ/Δ* (Tab. 3). Ceci suggère que les glucokinases ne contribuent pas à la phosphorylation du fructose. L'hexokinase 2 apparait donc comme la seule enzyme capable de prendre en charge et de phosphoryler le fructose intracellulaire chez *C. albicans*.

Pour finir, nous avons analysé la capacité de ces différentes enzymes à phosphoryler le mannose. Nos résultats ont mis en évidence une activité mannose kinase de 43,91 nmol/min/mg dans la souche sauvage (Tab. 3) et de 12,48 nmol/min/mg chez le simple mutant (*Cahxk2Δ/Δ*), ce qui représente une diminution du taux de phosphorylation du mannose de 72 % (Tab. 3). Ceci suggère que l'hexokinase 2 est non seulement impliquée dans la phosphorylation du mannose mais aussi qu'elle est la principale enzyme de phosphorylation de ce sucre. Nous pouvons également conclure de ce résultat que les glucokinases sont capables de prendre en charge la phosphorylation du mannose. Chez la souche complémentée et les simples et doubles mutants glucokinase (*Caglk1Δ/Δ* et *Caglk1glk4Δ/Δ*), l'activité mannose kinase et le taux de phosphorylation du mannose sont identiques à ceux de la souche sauvage (Tab. 3). Ceci suggère que l'hexokinase 2 compense la perte d'activité de la glucokinase 1. La délétion simultanée des gènes Ca*HXK2* et Ca*GLK1* (*Caglk1hxk2Δ/Δ*) nous a permis d'enregistrer une activité mannose kinase de 1,52 nmol/min/mg, ce qui correspond à un taux de phosphorylation du mannose dans cette souche de 3,5 % (Tab. 3). Ceci démontre que la glucokinase 1 participe bien à la phosphorylation du mannose intracellulaire. L'activité résiduelle mesurée suggère que la glucokinase 4 est également capable de participer à la phosphorylation du mannose. Chez le triple mutant *Caglk1glk4hxk2Δ/Δ* nous avons mesuré une activité mannose kinase de 0,19 nmol/min/mg, ce qui correspond à une activité de phosphorylation du mannose environ à égale 0,4% de celle de la souche sauvage (Tab. 3). La glucokinase 4 est donc bien impliquée dans la phosphorylation du mannose intracellulaire mais de façon minoritaire par rapport à l'hexokinase 2 et à la glucokinase 1.

Souches	Activité glucose kinase (nmol/min/mg)	Activité fructose kinase (nmol/min/mg)	Activité mannose kinase (nmol/min/mg)
WT SC5314	55,4 (± 2,98)	59,3 (± 4,60)	43,91 (± 2,95)
Cahxk2Δ/Δ	19,22 (± 1,71)	0,2822 (± 0,15)	12,48 (± 0,12)
Cahxk2Δ/Δ::HXK2/HXK2	53,88 (± 0,42)	60,02 (± 1,31)	41,42 (± 3,48)
Caglk1Δ/Δ	55,25 (± 3,18)	60,016 (± 2,43)	45,54 (± 0,68)
Caglk1glk4Δ/Δ	54,04 (± 1,14)	59,96 (±4,00)	43,42 (±0,15)
Caglk1hxk2Δ/Δ	3,66 (± 0,70)	0,232 (± 0,07)	1,5235 (± 0,16)
Caglk1glk4hxk2Δ/Δ	0,3 (± 0,34)	0,229 (± 0,18)	0,19 (± 0,05)

Tableau 3 : Le tableau récapitule les activités hexose kinase mesurées dans les extraits cellulaires des différentes souches sauvages et mutantes de C. albicans. Le résultat est exprimé en nanomole d'hexose phosphorylée par minute et par milligramme de protéine (nmol/min/mg). Une activité kinase de 1 signifie qu'une nanomole de substrat est phosphorylée en une minute et par un milligramme de protéine. Pour chaque souche l'expérience a été effectuée au moins trois fois à partir d'échantillons biologiques différents. L'activité spécifiée dans le tableau représente la moyenne des expériences (+écart-type).

B. Mesure des constantes cinétiques de l'hexokinase 2 et des glucokinases 1 et 4

Pour mieux comprendre comment est orienté le flux glycolytique lorsque du glucose entre dans la cellule, nous avons entrepris de déterminer les constantes cinétiques (*Km*) de l'hexokinase et des glucokinases en présence de ce sucre (Fig. 26).

Les résultats que nous avons obtenus démontrent que le *Km* de l'hexokinase 2 en présence de glucose est de 112,1 (±7,09) µM. En présence du même sucre, le *Km* de la glucokinase 1 est de 88,19 (±7,08) µM et celui de la glucokinase 4 est de 3890 (±400) µM (Fig. 26). Les *Km* de l'hexokinase 2 et de la glucokinase 1 sont respectivement 34 et 44 fois inférieurs à celui de la glucokinase 4. Ainsi, nos résultats mettent en évidence que chez *C. albicans*, l'hexokinase 2 et la glucokinase 1 sont des enzymes de forte affinité pour le glucose, capables de phosphoryler le glucose présent à l'état de trace, tandis que la glucokinase 4 est une enzyme de faible affinité jouant probablement un rôle lorsque le glucose est abondant. Ceci signifie qu'en entrant dans la cellule, le glucose est principalement phosphorylé par l'hexokinase 2 et la glucokinase 1 et que la contribution de la glucokinase 4 à l'alimentation du flux glycolytique est négligeable.

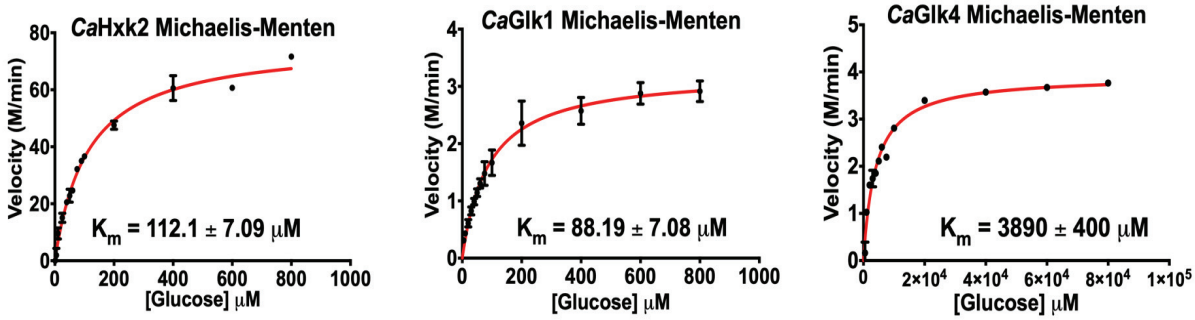


Figure 26 : Mesure des constantes cinétiques de l'hexokinase 2 et des glucokinases 1 et 4 de C. albicans. Le Km apparent des différentes enzymes a été déterminé à partir d'extraits protéiques bruts en présence de concentrations variables de glucose. L'expérience a été effectuée en triplicat et les données représentatives sont présentées.

V. Analyse transcriptionnelle des gènes *CaHXK2*, *CaGLK1* et *CaGLK4* et des enzymes correspondantes

Chez *S. cerevisiae*, le glucose a des effets drastiques sur le métabolisme et la physiologie grâce à des mécanismes de signalisation complexes et partiellement redondants (Rolland *et al*., 2002). Ces mécanismes permettent l'adaptation de la levure à des transitions entre l'abondance et la carence en glucose. *C. albicans* a évolué chez les animaux à sang chaud chez lesquels la concentration en glucose est globalement maintenue entre 3 et 5 mM, le glucose pouvant également être absent de certaines niches comme dans les cellules sanguines (Odds *et al*., 1988). Pour permettre l'adaptation du pathogène, les variations de concentration en glucose doivent avoir un impact sur la transcription des gènes de la glycolyse, et par conséquent sur celle des gènes impliqués dans la phosphorylation du glucose. Pour analyser le contexte d'expression de ces gènes, la régulation de la transcription du gène *CaHXK2* en fonction de la nature et de la concentration en source carbonée a été explorée. L'analyse bio-informatique a montré que les séquences des deux gènes *CaGLK1* et *CaGLK4* sont homologues à 98% au niveau de leur séquences codantes, mais aussi au niveau des régions promotrices et terminatrices, ce qui rend impossible de distinguer leurs transcrits par qRT-PCR, mais laisse supposer que ces profils puissent être identiques. Les profils d'expression présentés ci-après pour *CaGLK1/4* sont donc vraisemblablement le reflet de la transcription simultanée des deux gènes.

A. L'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* dépend de la source carbonée

Dans le corps humain, *C. albicans* transite entre différents microenvironnements au sein desquels les nutriments disponibles varient. La flexibilité métabolique de *C. albicans* lui permet de s'adapter rapidement et efficacement aux fluctuations de son environnement et notamment aux changements de source carbonée (Perlroth *et al*., 2007 ; Sandai *et al*., 2012). Pour mimer les effets d'un changement d'environnement et analyser la façon dont la levure modifie l'expression de gènes clés du métabolisme, nous avons cultivé les cellules en présence de lactate 2%, puis les avons transférées dans différents milieux contenant 2% de sources carbonées variées (glucose, fructose, mannose, glycérol ou lactate). Au bout d'une heure, les ARNs ont été extraits et l'impact du changement de la source carbonée sur l'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* a été analysé par q-RTPCR (Fig. 27A). En présence de glucose, de

fructose et de mannose qui sont des sucres phosphorylés par l'hexokinase 2, nous avons remarqué une augmentation de l'expression du gène *CaHXK2* d'environ 16 fois par rapport à la condition lactate 2% (Fig. 27A). Lorsque le glycérol, qui est assimilé indépendamment de l'hexokinase 2 est utilisé comme seule source de carbone, nous avons constaté un faible niveau de transcription du gène *CaHXK2*, correspondant vraisemblablement à son niveau basal d'expression (Fig. 27A). Une certaine cohérence est retrouvée dans ces résultats dans la mesure où le gène *CaHXK2* n'est induit que dans les conditions où la levure a été cultivée en présence de sources de carbone qui sont aussi les substrats de l'hexokinase 2.

Nous avons également analysé la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les glucokinases en présence de différentes sources de carbone. Les résultats mettent en évidence une induction de la transcription des gènes *CaGLK1/4* d'un facteur 5 en présence de glucose et de mannose, qui sont aussi des substrats pris en charge par les glucokinases (Fig. 27A). Curieusement, cette activation de la transcription est également observée lorsque les cellules sont cultivées en présence de fructose et de glycérol, qui sont des sources carbonées assimilées indépendamment des glucokinases (Fig. 27A). Nous avons également remarqué que le niveau d'expression du gène *CaHXK2* en présence d'hexoses est 3 à 4 fois supérieur à celui des gènes *CaGLK1/4*, suggérant un rôle plus important de l'hexokinase 2 dans l'assimilation des hexoses (Fig. 27A). Enfin, la transcription des glucokinases en présence de glycérol témoigne d'une régulation transcriptionnelle différentes de ces deux gènes (Fig. 27A).

Pour compléter notre étude de la régulation transcriptionnelle des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4*, nous avons analysé l'impact de la concentration en glucose sur le niveau d'expression de ces gènes (Fig. 27B). Pour cela, nous avons cultivé les cellules en présence de lactate 2%, puis les avons transférées dans un milieu contenant 0,1 ou 2% de glucose. La concentration 2% de glucose est utilisée en routine dans les milieux de culture chez *S. cerevisiae* pour optimiser la croissance des levures adaptées aux fortes concentrations en glucose, alors que la concentration de 0,1% est équivalente à la concentration en glucose du sang. En présence de glucose 0,1% nos résultats ont mis en évidence que le gène *CaHXK2* était en moyenne 17 fois plus exprimé qu'en présence de lactate 2% (Fig. 27B). La même analyse en présence de glucose 2% a révélé que la transcription du gène *CaHXK2* était en moyenne 27 fois plus importante par rapport à la condition lactate 2% (Fig. 27B). Ces résultats mettent en évidence que l'expression du gène *CaHXK2* est contrôlée par la disponibilité en glucose et que plus la concentration en glucose augmente plus le gène est transcrit. Le profil d'expression des gènes *CaGLK1/4* est similaire à celui du gène *CaHXK2*. En effet, en présence de glucose, nous avons mesuré une induction d'un facteur 4 de la transcription des gènes codant pour les glucokinases. Cependant, cette induction ne semble pas dose-dépendante, puisque le niveau d'expression des gènes *CaGLK1/4* est identique en présence de 0,1 et 2% de glucose (Fig. 27B). Ces résultats confirment que l'hexokinase 2 et les glucokinases sont régulées différemment au niveau transcriptionnel.

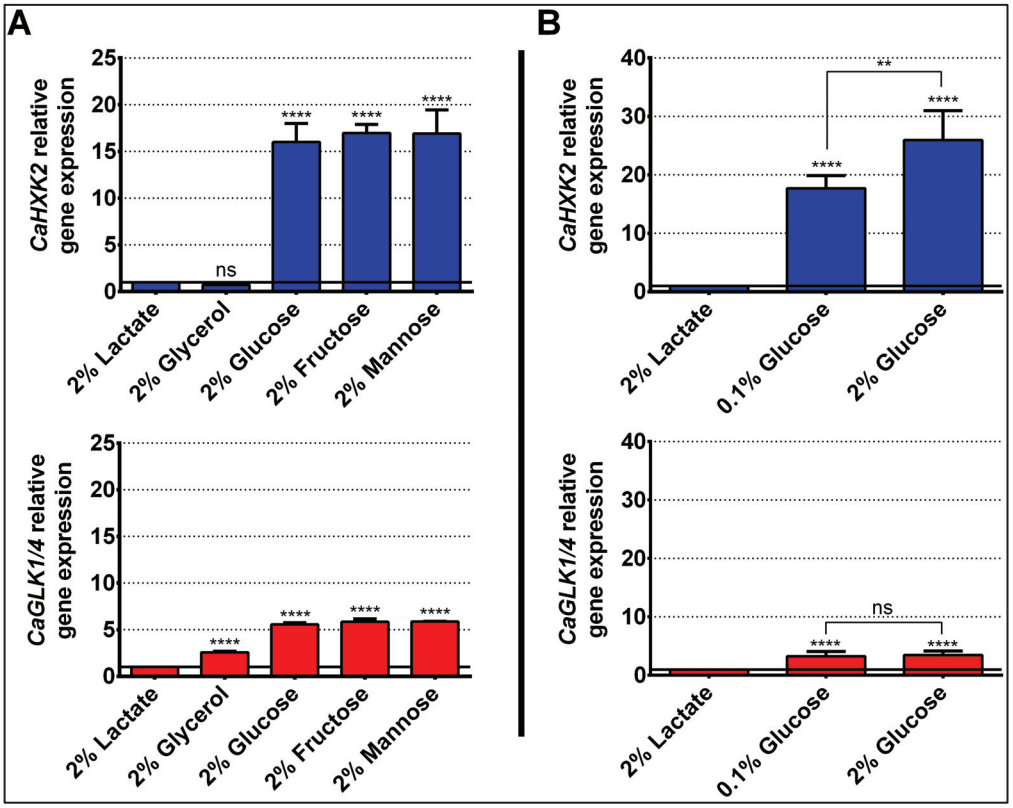


*Figure 27 : Analyse transcriptionnelle de l'expression des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4. (**A**) Expression relative des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4 en présence de différentes sources carbonées (2% lactate, glycérol, glucose, fructose, mannose). (**B**) Expression relative des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4 en présence de lactate 2% et de faible (0,1%) ou forte (2%) concentration en glucose. (**A et B**) Les cellules ont été cultivées dans un milieu contenant 2% de lactate jusqu'en début de phase exponentielle de croissance puis ont été transférées pendant 1h dans un milieu contenant la source de carbone appropriée. Les résultats sont normalisés par rapport au niveau d'expression du gène CaACT1. Le niveau d'expression des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4 est exprimé relativement à leur abondance dans la condition contrôle (lactate 2%), qui a été fixée à 1. Les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, effectuées en triplicat. ns, non significatif, *** P = 0.0002, **** P < 0.0001. Les valeurs des P_{values} ont été calculées par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.*

B. Existe-t-il un mécanisme de compensation au niveau transcriptionnel ?

Nous avons précédemment suggéré que l'absence de défaut d'activité glucose kinase des mutants *Caglk1Δ/Δ* et *Caglk1glk4Δ/Δ* pourrait être lié à un mécanisme de compensation s'opérant au niveau transcriptionnel ou traductionnel, qui masquerait les effets de la délétion de ces gènes. Afin de déterminer s'il existe un phénomène de compensation au niveau transcriptionnel, nous avons analysé l'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* dans les différents mutants que nous avons construits (Fig. 28). Dans un premier temps, nous avons pu constater que chez les mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ*, les transcrits du gène *CaHXK2* n'étaient pas détectables, confirmant que les deux allèles du gène ont bien été délétés (Fig. 28). La réintroduction des deux allèles sauvages, restaure un niveau d'expression du gène *CaHXK2* similaire à celui de la souche sauvage. La délétion de l'une ou des deux glucokinases n'affecte pas le niveau d'expression du gène *CaHXK2* (Fig. 28). De la même façon, nous avons pu constater que le niveau d'expression des gènes *CaGLK1/4* n'est pas affecté chez un mutant *Cahxk2Δ/Δ* (Fig. 28). Ainsi, nos résultats mettent en évidence, que contrairement à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae*, il n'existe pas chez *C. albicans* de mécanisme de compensation au niveau transcriptionnel entre les gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4*. Cependant, cela n'exclut pas l'hypothèse d'une compensation au niveau protéique.

De plus, l'absence d'effet de la délétion de *CaHXK2* sur l'expression des gènes *CaGLK1/4* révèle que ces derniers ne sont pas soumis à la répression glucose chez *C. albicans*.

Chez le double mutant *Caglk1glk4Δ/Δ*, la quantité de transcrits des gènes *CaGLK1/4* est nulle, ce qui là encore, confirme la délétion de ces gènes (Fig. 28). Curieusement, chez le simple mutant *Caglk1Δ/Δ* et le double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ*, nous avons détecté une très faible quantité de transcrits (Fig. 28). Comme les gènes *CaGLK1* et *CaGLK4* sont parfaitement homologues, nous supposons que les transcrits détectés sont ceux du gène *CaGLK4*. Nos données mettent donc en évidence que les gènes *CaGLK1* et *CaGLK4,* codants les glucokinases, ne sont pas exprimés de façon équivalente. En calculant le ratio d'expression de ces gènes, nous avons pu constater que le gène *CaGLK4* est 174 fois moins exprimé que le gène *CaGLK1*. Le très faible niveau d'expression de *CaGLK4*, semble cohérent avec le rôle mineur de la glucokinase 4 dans le processus de phosphorylation des hexoses. Au vu du très faible niveau d'expression de *CaGLK4*, nous assumons que les profils d'expression mesurés correspondent à ceux du gène *CaGLK1*.

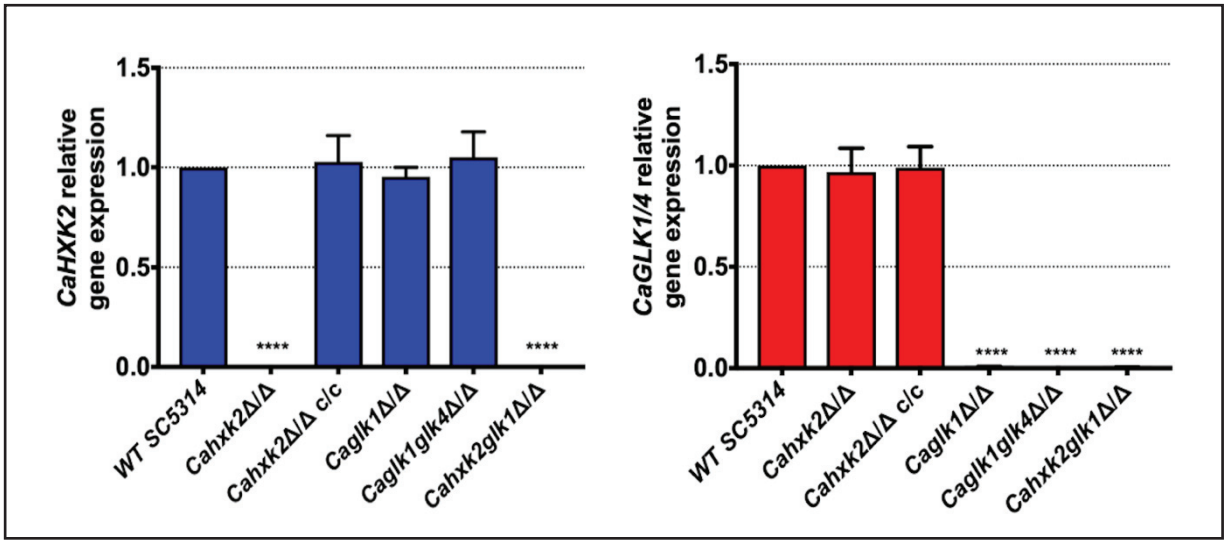


*Figure 28 : Analyse de l'expression relative des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4 dans les souches sauvages et mutantes de C. albicans. Les cellules ont été cultivées dans un milieu YPG contenant 2% de glucose jusqu'en début de phase exponentielle de croissance, puis les ARN totaux ont été extraits. Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène CaACT1, servant de calibreur interne. Le niveau d'expression des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4 est exprimé relativement à leur abondance dans la souche sauvage. Les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, effectuées en triplicat. ns, non significatif, *** P = 0.0002, **** P < 0.0001. Les valeurs des P_{values} ont été calculées par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.*

C. L'expression des protéines *Ca*Hxk2 et *Ca*Glk1 est constitutive

Afin de détecter les protéines *Ca*Hxk2 et *Ca*Glk1 et suivre leur expression, nous avons construit des souches portant un tag GFP en fusion (3') avec le gène Ca*HXK2* ou Ca*GLK1*. Ces souches ont ensuite été cultivées dans différentes conditions puis l'expression des enzymes *Ca*Hxk2 et *Ca*Glk1 a été analysée par Western blot. Dans un premier temps, nous avons analysé l'impact de la source carbonée sur l'expression de la glucokinase 1 et de l'hexokinase 2.

La glucokinase 1 est détectée de façon constitutive lorsque les cellules sont cultivées en présence de 2% glucose, mannose, tréhalose et glycérol (Fig. 29A). A l'inverse, en présence de lactate 2% la quantité de protéine détectée est plus faible (Fig. 29A). Le même travail mené

sur l'hexokinase 2 a révélé une présence constante de la protéine quelle que soit la source de carbone considérée (Fig. 29B).

Dans un second temps, nous avons analysé l'impact de la concentration en glucose sur l'expression des enzymes. Pour cela, les cellules ont été cultivées en présence de concentration croissante en glucose. Nos résultats ont mis en évidence d'une part que l'expression des protéines *Ca*Hxk2 et *Ca*Glk1 n'est pas contrôlée par la concentration en glucose, puisque le niveau de protéine détectée est constant quel que soit la concentration en glucose utilisée, et d'autre part que la protéine *Ca*Hxk2 est plus abondante dans la cellule que *Ca*Glk1. Ce résultat est cohérent avec le niveau d'expression plus élevé du gène *CaHXK2* (Fig. 29C).

Afin d'explorer la régulation de l'expression de la protéine *Ca*Glk4, nous avons construit une souche exprimant la protéine *Ca*Glk4 fusionnée en C-ter avec la GFP (*Ca*Glk4-GFP). Cependant, nous n'avons jamais pu détecter la protéine par Western Blot. Au vu du très faible niveau d'expression du gène *CaGLK4*, ce résultat ne nous a pas paru très surprenant et nous supposons que la quantité de protéine *Ca*Glk4 dans la cellule est infime.

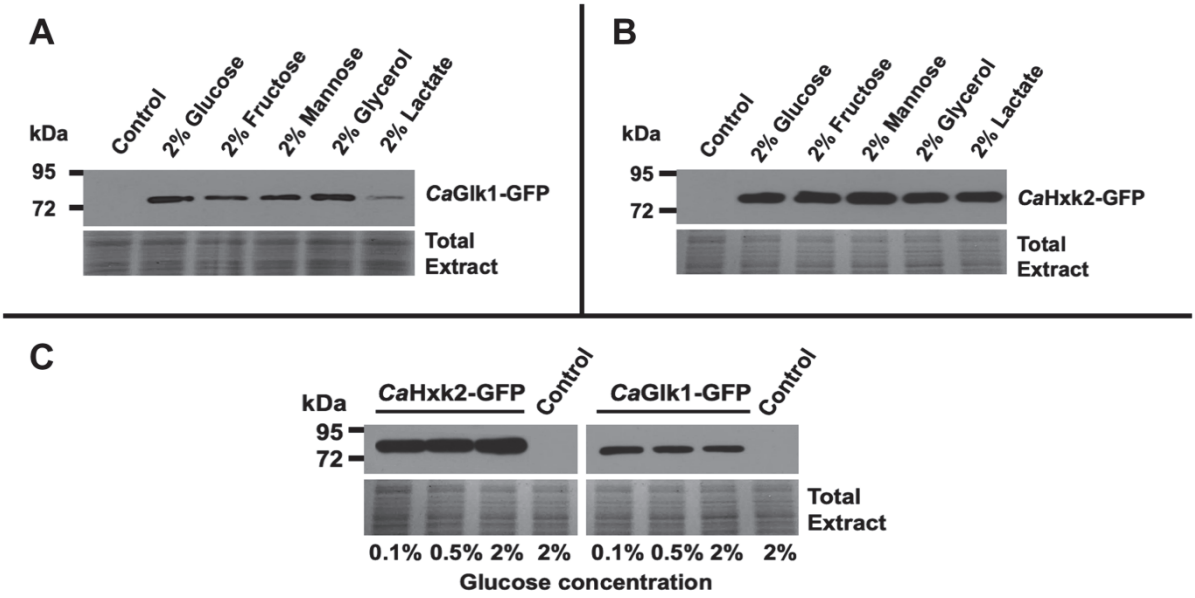


*Figure 29 : Analyse de l'expression des protéines CaGlk1 et CaHxk2. (**A et B**) Une souche de C. albicans exprimant CaGlk1 ou CaHxk2 fusionnée en C-terminal avec la GFP a été cultivée en présence de 2% de sources carbonées variées (glucose, fructose, mannose, glycérol ou lactate) jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance. Les cellules ont été collectées, puis broyées. Les protéines CaHxk2-GFP et CaGlk1-GFP ont été détectées par Western Blot en utilisant des anticorps anti-GFP. La coloration au bleu de Coomassie a été utilisée comme contrôle de charge (extrait total). Les Western Blot ont été effectués en triplicat et les données représentatives sont présentées ici. (**C**) Des souches de C. albicans exprimant les protéines CaHxk2 ou CaGlk1 portant une étiquette GFP en C-Terminal, ont été cultivées en présence de 0,1%, 0,5% et 2% de glucose jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance. Les lysats de cellules ont été analysés par Western Blot à l'aide d'anticorps anti-GFP pour détecter CaHxk2-GFP ou CaGlk1-GFP. Des extraits protéiques issus de la souche sauvage non étiquetée ont été inclus dans l'étude comme témoins négatifs. Les protéines totales ont été détectées grâce à une coloration au bleu de Coomassie, qui sert de témoin de charge. L'expérience a été réalisée en triplicat et un résultat représentatif est ici présenté.*

VI. Implication de l'hexokinase II dans le mécanisme de répression glucose chez *C. albicans*

Chez la levure modèle *S. cerevisiae*, les fonctions de l'hexokinase 2 ont été largement étudiées. Au-delà de son implication dans la phosphorylation des hexoses, l'hexokinase intervient également dans le processus de la répression glucose en se liant au régulateur transcriptionnel

*Sc*Mig1 (Santangelo *et al.*, 2006). Chez *C. albicans* l'implication de l'hexokinase dans la répression glucose n'a jamais été montrée. Pour analyser le rôle de l'hexokinase dans la répression glucose, nous avons suivi la localisation cellulaire de la protéine *Ca*Hxk2 marquée à la GFP. Nos résultats ont mis en évidence qu'en présence de forte (2%) et faible (0,1%) concentration de glucose, l'hexokinase *Ca*Hxk2, est non seulement détectée dans le cytoplasme, mais aussi dans le noyau des cellules (Fig. 30A). En revanche, en absence de glucose (lactate), l'hexokinase 2 n'est pas détectée dans le noyau (Fig. 30A). Ceci suggère qu'un mécanisme similaire à ce qui est décrit chez le modèle *S. cerevisiae* existe chez *C. albicans*. Chez *S. cerevisiae*, en condition de répression glucose, la majeure partie de l'hexokinase reste dans le cytoplasme et seulement 15% de la quantité totale de la protéine transite dans le noyau (Fernandez-Garcia *et al.*, 2012). Nos résultats tendent à montrer qu'un phénomène similaire se produit chez *C. albicans*, ce qui a pour effet de rendre difficile la mise en évidence de la localisation dans le noyau en raison du fort niveau de fluorescence du cytoplasme. Nous avons également analysé la capacité de la protéine *Ca*Glk1 à transiter entre le cytoplasme et le noyau. Nos données révèlent qu'en présence ou en absence de glucose, *Ca*Glk1 conserve une localisation cytosolique et est exclue du noyau (Fig. 30B).

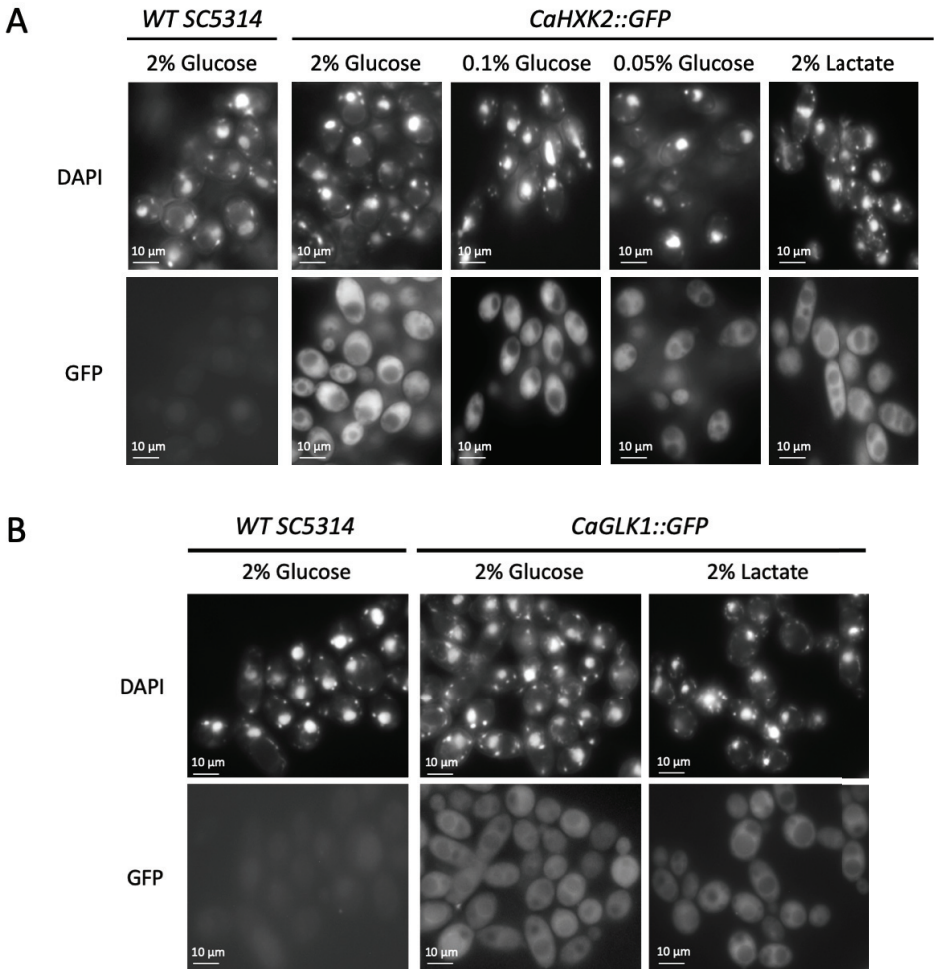


*Figure 30 : Analyse de la localisation cellulaire de l'hexokinase 2 (**A**) et de la glucokinase 1 (**B**) chez C. albicans. Des transformants exprimant la protéine CaHxk2 ou CaGlk1, fusionnée en C-terminal avec la GFP, ont été cultivés en présence de 0,05%, 0,1% ou 2% de glucose jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance. Pour mimer l'absence de glucose les cellules ont aussi été cultivées en présence de lactate 2%. Les noyaux ont été localisés à l'aide d'un marquage au DAPI. La localisation cellulaire de l'hexokinase 2 et de la glucokinase 1 a été déterminée par microscopie à fluorescence (Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescence microscope), dans des cellules vivantes de C. albicans. Les images ont été capturées à l'aide la caméra Zeiss AxiocamMR en utilisant le logiciel AxioVision.*

Chez *S. cerevisiae*, en présence de glucose, le mécanisme de répression glucose, réprime l'expression des gènes du cycle glyoxylique (*ScICL1*) et de la néoglucogenèse (*ScPCK1*) impliqués dans l'assimilation de sources carbonées alternatives. Ce mécanisme permet d'optimiser l'utilisation du glucose tant que celui-ci est disponible dans l'environnement. La répression de ces gènes est médiée par le complexe *Sc*Mig1-*Sc*Hxk2 (Fig. 18 et 19) (Mercado et Gancedo, 1992 ; Han et Emr, 2013). Afin d'analyser le rôle de l'hexokinase 2 dans le processus de répression glucose chez *C. albicans*, nous avons mesuré l'évolution du niveau d'expression des gènes *CaICL1* et *CaPCK1,* (connus pour être soumis à la répression glucose, Lorenz, Bender et Fink, 2004 ; Sandai *et al.,* 2012) en réponse au glucose (Fig. 31). Pour cela, nous avons cultivé les cellules en présence de lactate 2%, puis avons ajouté dans le milieu une solution concentrée de glucose. Chez la souche sauvage, 45 minutes après l'ajout de glucose dans le milieu, nos résultats mettent en évidence une diminution drastique de la quantité de transcrits des gènes *CaICL1* et *CaPCK1* de 99% et 90% respectivement (Fig. 31). Ces résultats confirment que ces gènes sont bien soumis à la répression glucose chez *C. albicans*. En revanche, chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ*, nous avons remarqué que la répression transcriptionnelle s'exerçant sur les gènes *CaICL1* et *CaPCK1* est moins forte que dans la souche sauvage (Fig. 31). Ceci suggère que, de façon analogue à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae*, l'hexokinase 2 participe au mécanisme de la répression glucose chez *C. albicans*.

Afin de déterminer si les glucokinases contribuent à la répression glucose, nous avons mesuré les variations du niveau d'expression des gènes *CaICL1* et *CaPCK1*, en présence de glucose, chez le double mutant *Caglk1glk4Δ/Δ*. Chez ce mutant, le profil d'expression des gènes *CaICL1* et *CaPCK1* en réponse au glucose est similaire à celui de la souche sauvage (Fig. 31). Nos données démontrent donc que les glucokinases n'interviennent pas dans le mécanisme de la répression glucose.

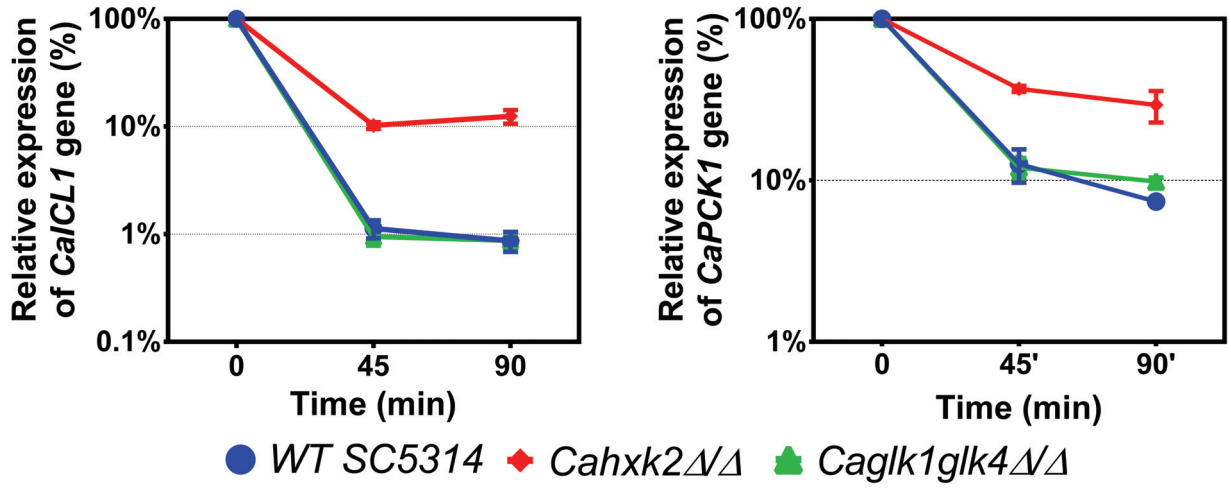


Figure 31 : Analyse du rôle de l'hexokinase 2 et des glucokinases dans le processus de répression glucose. Les cellules des souches sauvages (SC5314) et mutantes (Cahxk2Δ/Δ et Caglk1glk4Δ/Δ) ont été cultivés en présence de lactate 2% jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (DO =1.8). Après l'ajout de glucose dans le milieu (t0) le niveau d'expression des gènes CaICL1 et CaPCK1 a été mesuré par qPCR. Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène CaACT1, servant de calibreur interne. Le niveau d'expression des gènes CaICL1 et CaPCK1 est exprimé relativement à leur abondance au temps 0, qui a été fixée à 100%. Les courbes représentent la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes, effectuées en triplicat. La significativité des résultats a été vérifiée par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.

Afin de confirmer l'implication de l'hexokinase 2 dans le mécanisme de répression glucose, nous avons également analysé les variations du niveau d'expression des perméases de forte affinité (Fan *et al*., 2002) en réponse au glucose. Chez *C. albicans*, ces perméases impliquées

dans la captation des traces de glucose, sont connues pour être réprimées par le répresseur central de la répression glucose *Ca*Mig1, lorsque le glucose est abondant (Zaragoza *et al*., 2000 ; Sexton *et al*., 2007). L'expression des perméases (*CaHGT7*, *CaHXT10* et *CaHGT12*) est aussi contrôlée par la voie SRR (Fig. 12A), en revanche l'expression de *CaHGT8* est indépendante de cette voie de signalisation (Brown *et al*., 2006).

Chez le mutant hexokinase 2, en présence de forte concentration en glucose (2%) l'expression des perméases de forte affinité est drastiquement augmentée (Fig. 32). Ces résultats confirment le rôle de co-répresseur transcriptionnel de *Ca*Hxk2 en présence de forte concentration en glucose.

Curieusement, chez le double mutant glucokinase (*Caglk1glk4Δ/Δ*) la transcription des perméases *CaHGT7*, *CaHXT10* et *CaHGT12* est significativement réduite (Fig. 32), tandis que celle du gène *CaHGT8* n'est pas affectée. Ces résultats indiquent que les glucokinases ne sont pas impliquées dans la répression glucose de ces transporteurs. Chez le mutant *Caglk1glk4Δ/Δ,* seule la transcription des perméases contrôlées par la voie SRR est affectée (Fig. 32) ce qui met en évidence que les glucokinases pourraient être des acteurs moléculaires importants de cette voie de signalisation participant au contrôle de l'expression des perméases.

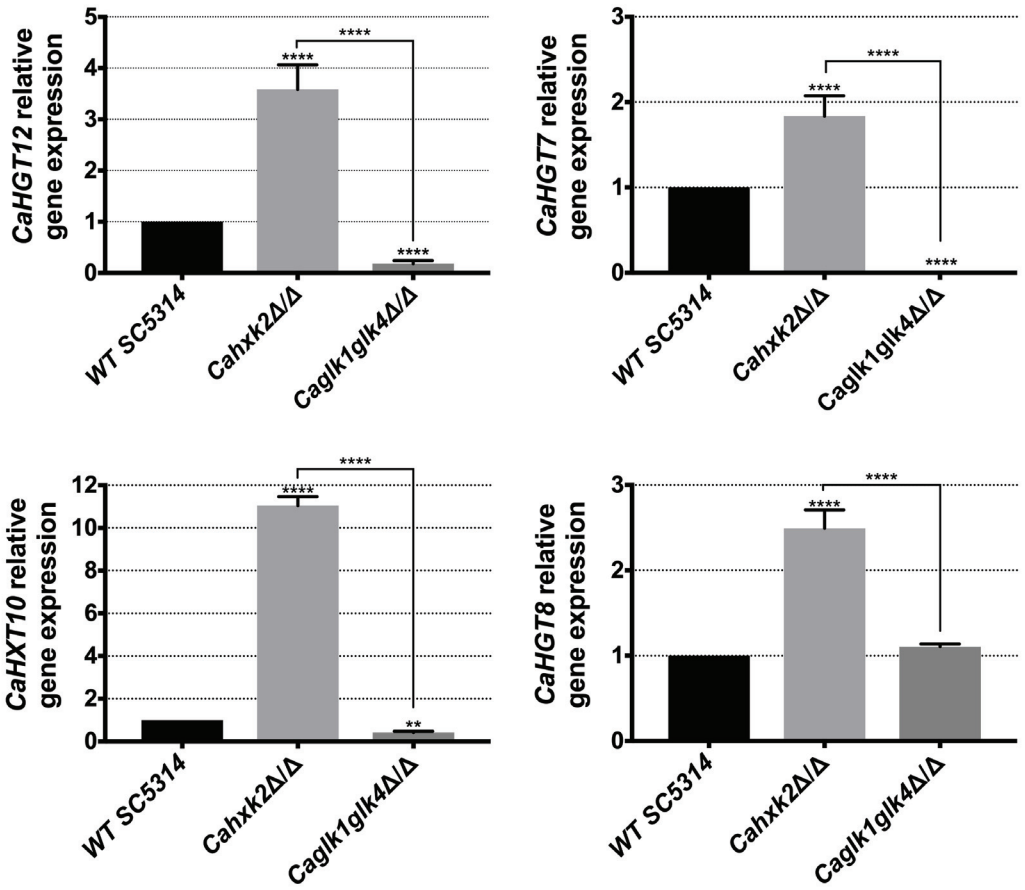


*Figure 32 : Analyse de l'expression des perméases de forte affinité. Les cellules ont été cultivées dans un milieu riche contenant 2% de lactate jusqu'en début de phase exponentielle (DO_{600nm} = 1,8), puis ont été transférées pendant 1h dans un milieu riche composé de 2% de glucose. Les ARNs totaux ont été extraits et le niveau d'expression des perméases a été analysé par qPCR. Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène CaACT1. Le niveau d'expression des gènes CaHGT7, CaHGT8, CaHXT10 et CaHGT12 est exprimé relativement à leur abondance dans la souche sauvage, qui a été fixée à 1. Les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, effectuées en triplicat. ns, non significatif, *** P = 0.0002, **** P < 0.0001. Les valeurs des P_{values} ont été calculées par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.*

VII. Analyse phénotypique des mutants

A. L'hexokinase II est requise pour la croissance en présence d'hexose

Pour évaluer l'impact de la délétion de l'hexokinase 2 et des glucokinases sur la croissance, nous avons établi, grâce à un système de TECAN les cinétiques de croissance des souches sauvages et mutantes, en mesurant à intervalle de temps régulier la densité optique à 600_{nm} des cultures cellulaires, en présence de fortes concentrations de diverses sources carbonées : glucose, fructose, mannose, galactose, glycérol et lactate (2%) (Fig. 33).

L'analyse des courbes de croissance (Fig. 33) a révélé que le mutant *Cahxk2Δ/Δ*, présente un défaut de croissance significatif en présence de fructose (Fig. 33). En effet, chez la souche sauvage, la phase stationnaire de croissance est globalement atteinte après 10 heures de culture, alors que chez le mutant elle ne l'est toujours pas au bout de 48 heures. Le défaut de croissance du mutant *Cahxk2Δ/Δ* observé en présence de fructose est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle, chez *C. albicans*, le fructose intracellulaire est assimilé uniquement via l'hexokinase 2. En présence de 2% de glucose et de mannose (Fig. 33), c'est un retard plus qu'un défaut de croissance qui a été observé pour la souche mutante. En effet, nous avons pu constater que le mutant *Cahxk2Δ/Δ* et la souche sauvage atteignent, en phase stationnaire, une DO statistiquement similaire. En revanche, alors que la souche sauvage atteint la phase stationnaire après 10 h de culture, le mutant *Cahxk2Δ/Δ* la rejoint au bout de 28 h. Nos données mettent en évidence qu'en présence de 2% de mannose, le retard de croissance du mutant *Cahxk2Δ/Δ* est plus important, puisque la phase stationnaire de croissance est atteinte après 35 h de culture. La croissance ralentie du mutant *Cahxk2Δ/Δ* en présence de glucose et de mannose corrobore le fait qu'il existe, chez *C. albicans*, plusieurs enzymes impliquées dans la phosphorylation de ces hexoses, et suggère que ces enzymes assimilent ces sucres moins efficacement que l'hexokinase 2.

En présence de 2% de galactose, de glycérol ou de lactate, qui sont des sources carbonées assimilées indépendamment de l'hexokinase 2, le mutant *Cahxk2Δ/Δ* présente un profil de croissance similaire à la souche sauvage, comme en témoigne la superposition des courbes (Fig. 33).

Afin de vérifier que le défaut de croissance observé chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ* en présence de glucose, fructose et mannose est bien dû à la délétion du gène *CaHXK2*, nous avons analysé le profil de croissance d'une souche complémentée dans laquelle les deux allèles sauvages du gène *CaHXK2* ont été réintroduits (Fig. 33). Les données obtenues ont mis en évidence que la souche complémentée présente un phénotype de croissance statistiquement identique à celui de la souche sauvage (Fig. 33). Ces résultats démontrent que le défaut de croissance du mutant hexokinase est bien dû à la délétion du gène *CaHXK2* et que chez *C. albicans*, l'hexokinase *Ca*Hxk2 est requise pour la croissance optimale de la levure.

Nous avons ensuite analysé les conséquences de la délétion de l'une (*Caglk1Δ/Δ*) ou des deux (*Caglk1glk4Δ/Δ*) glucokinases sur la croissance de la levure en présence de 2% de différentes sources carbonées. Quelle que soit la source de carbone considérée, nous avons pu remarquer que la délétion des gènes *CaGLK1* et *CaGLK4* n'a aucun impact sur la croissance de la levure (Fig. 33). En effet, la souche sauvage et les mutants présentent une cinétique croissance statistiquement identique. Ces résultats tendent à démontrer que le rôle des

glucokinases dans le processus de croissance est anecdotique et que ces enzymes ne sont pas essentielles pour permettre la croissance optimale de la levure.

Nous avons également étudié l'impact de la double délétion des gènes *CaGLK1* et *CaHXK2* sur la croissance de la levure. En présence de glucose, de fructose ou de mannose, qui sont des sucres assimilés par la glycolyse après avoir été phosphorylés par l'hexokinase et/ou les glucokinases, nous avons remarqué que le double mutant présente un défaut de croissance considérable par rapport à la souche sauvage (Fig. 33). En effet, en présence de glucose la souche sauvage atteint la phase stationnaire de croissance approximativement après 10 h de culture avec une DO égale à 1,2. Chez le double mutant en revanche la DO atteinte au bout du même laps de temps est de 0,23 ce qui représente un défaut de croissance de 83% par rapport à la souche sauvage (Fig. 33). De plus, une comparaison des cinétiques de croissance des mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ* révèle que le défaut de croissance observé chez le double mutant est plus important que celui détecté chez le simple mutant *Cahxk2Δ/Δ*. En effet, en présence de 2% de glucose, le simple mutant *Cahxk2Δ/Δ* atteint une DO de 1,3 après 24 h de culture alors que la DO du double mutant est de 0,4 (Fig. 33). Une réponse similaire est observée en présence de fructose et de mannose. Ces données suggèrent que la glucokinase 4 seule n'est pas capable de soutenir la croissance de la levure en présence d'hexoses. Plus étonnant, cet important défaut de croissance est également retrouvé lorsque la levure est cultivée en présence de source de carbone non phosphorylée par l'hexokinase et les glucokinases (Fig. 33). En présence de lactate, par exemple, la croissance du double mutant correspond à une DO de 0,35 au bout de 24 h alors qu'elle est de 0,65 chez le sauvage et les simples mutants *Caglk1Δ/Δ* et *Cahxk2Δ/Δ* (Fig. 33). En présence de galactose et de glycérol, un phénotype similaire est observé. Ceci suggère que les gènes *CaHXK2* et *CaGLK1* pourraient être impliqués dans d'autres phénomènes que la phosphorylation des hexoses comme par exemple la régulation de l'expression de gènes permettant l'assimilation de sources carbonées alternatives. Il se peut également que la combinaison de ces deux mutations ait des conséquences sur l'ensemble du métabolisme comme l'accumulation de certains métabolites intermédiaires ou la sur/sous expression de protéines, ce qui pourrait conduire à un défaut de croissance indépendant de la capacité à phosphoryler les hexoses.

Pour finir, nous avons analysé le profil de croissance du triple mutant *Caglk1glk4hxk2Δ/Δ.* Curieusement, nous avons pu mettre en évidence que le défaut de croissance du triple mutant n'était pas plus important que celui du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* (Fig. 33). Ceci démontre bien le rôle mineur de *Ca*Glk4 dans le processus de croissance de la levure. Le triple mutant *Caglk1glk4hxk2Δ/Δ* est totalement dépourvu d'enzymes capables de phosphoryler les hexoses, nous supposons que le faible taux de croissance observé est lié à la métabolisation des nutriments présents dans l'extrait de levure et la peptone qui composent le milieu de culture. De façon analogue à ce qui a été décrit précédemment, le défaut de croissance du triple mutant en présence de galactose, de glycérol et de lactate, est similaire à celui du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* (Fig. 33), suggérant que *Ca*Glk4 ne contribue pas à l'assimilation des sources carbonées alternatives.

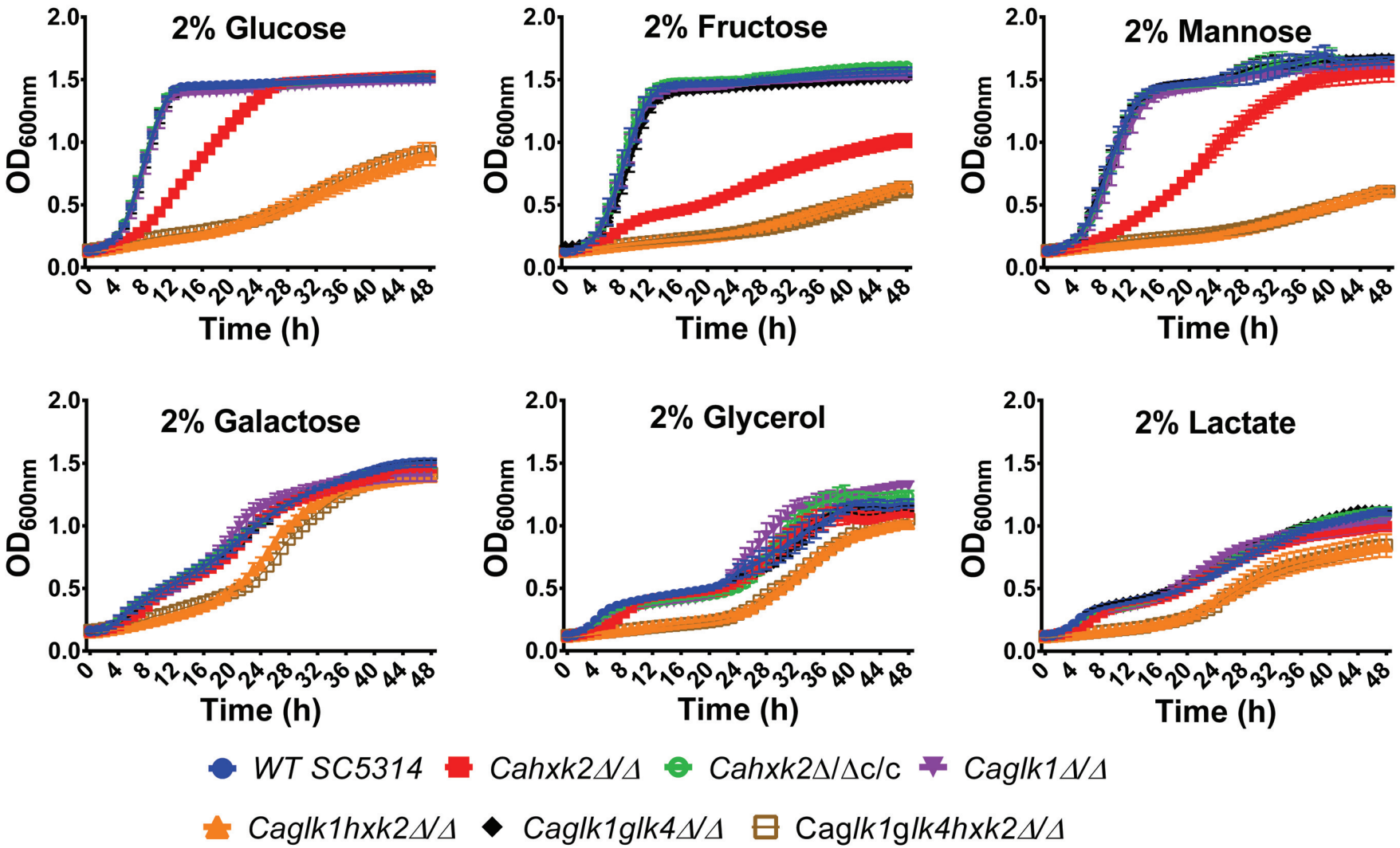


Figure 33 : Analyse de la croissance des souches sauvages (WT SC5413), mutantes (Cahxk2Δ/Δ, Caglk1Δ/Δ, Caglk1glk4Δ/Δ, Caglk1hxk2Δ/Δ et Caglk1glk4hxk2Δ/Δ) et complémentées (Cahxk2Δ/Δ$_{c/c}$) en présence de différentes sources de carbone à 2%. Les cellules ont été cultivées jusqu'en début de phase exponentielle de croissance, puis 10 µl de cellules ont été utilisés pour ensemencer 180 µl d'un nouveau milieu contenant 2% de glucose, fructose, mannose, galactose, glycérol ou lactate. La croissance a été suivie pendant une période de 48 h grâce à un lecteur de microplaque (TECAN infinite Pro 200). Les courbes représentent la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes, au cours desquelles les souches ont été testées en triplicat.

B. L'hexokinase II est requise pour le dimorphisme de *C. albicans*

C. albicans est une levure polymorphe capable d'adopter différentes morphologies. La forme levure est particulièrement bien adaptée à la dissémination du pathogène par voie sanguine, tandis que la forme filamenteuse permet l'adhésion et une invasion efficace des tissus de l'hôte. Dans le but de poursuivre l'analyse phénotypique des différents mutants glycolytiques, nous avons examiné les conséquences de la délétion des gènes *CaHXK2, CaGLK1* et *CaGLK4* sur la capacité de la levure à passer d'une forme à l'autre. Chez *C. albicans*, le dimorphisme joue un rôle prédominant dans les mécanismes de virulence (Baillie *et al*., 1998). En effet, certains facteurs de virulence comme les protéases, les adhésines ou la toxine *Ca*Ece1 ne sont exprimés que par la forme hyphale (Noble *et al*., 2016).

Nous avons induit la transition morphologique de *C. albicans* en cultivant les levures pendant 3 jours à 37°C sur différents milieux inducteurs de la filamentation. Les milieux sérum et spider contiennent respectivement du glucose et du mannitol comme source de carbone principale, tandis que dans le milieu YPNAG, la N-acétylglucosamine est la source de carbone majoritaire. Le glucose et le mannitol sont métabolisés par la glycolyse en étant phosphorylés par l'hexokinase ou les glucokinases, alors que la N-acétylglucosamine est métabolisée via une voie spécifique et rejoint la glycolyse sans intervention des enzymes de phosphorylation des hexoses (Yamada-Okabe *et al*., 2001 ; Rao *et al*., 2013). L'utilisation de ces différents milieux nous a permis de déterminer si l'impact au niveau de la filamentation est lié ou non à la métabolisation de la source carbonée contenue dans le milieu.

L'aspect macroscopique des colonies a été observé à la loupe binoculaire (Fig. 34) puis les cellules ont été observées au microscope. Les résultats obtenus montrent que les colonies formées par la souche sauvage sont pourvues sur leur pourtour de nombreux filaments, tandis que celles formées par le mutant *Cahxk2Δ/Δ* présentent un aspect totalement lisse sur milieu spider et sérum. En revanche, sur un milieu YPNAG, nous avons constaté que le simple mutant *Cahxk2Δ/Δ* présente un phénotype de filamentation similaire à celui de la souche sauvage (Fig. 34). Ceci suggère que le signal induisant la filamentation dans ce milieu n'est pas impacté par la délétion de l'hexokinase. Cela démontre également que les mutants *Cahxk2Δ/Δ* conservent la possibilité d'adopter un mode de développement filamenteux et que le défaut de filamentation observé sur les milieux sérum et spider est intrinsèquement lié au défaut de métabolisation de la source carbonée. La complémentation de la mutation *Cahxk2* (un ou deux allèles) restaure la capacité de filamentation (Fig. 34), suggérant que le défaut de filamentation observé chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ* résulte bien de la délétion du gène *CaHXK2.*

Les mutants *Caglk1Δ/Δ* et *Caglk1glk4Δ/Δ* délétés de l'une ou des deux glucokinases présentent un phénotype de filamentation similaire à la souche sauvage (Fig. 34). En effet, nous avons pu constater que les colonies formées par ces mutants sont pourvues de nombreux filaments en périphérie, et ce sur tous les milieux inducteurs testés (Fig. 34). Ces résultats suggèrent que les glucokinases ne sont pas requises pour le dimorphisme de *C. albicans*.

Nous avons ensuite analysé la capacité du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* à initier un processus de transition morphologique. Nous avons pu mettre en évidence que sur les milieux spider et sérum, le double mutant présente un phénotype identique à celui du simple mutant *Cahxk2Δ/Δ*, et est incapable de former des filaments (Fig. 34). De façon surprenante, sur un milieu contenant de la N-acétylglucosamine, qui est assimilée indépendamment de l'hexokinase 2 et des glucokinases, le double mutant (*Caglk1hxk2Δ/Δ*) présente aussi un

phénotype hypofilamenteux (Fig. 34). Ce défaut de filamentation pourrait être lié à une perturbation globale de la physiologie de ce mutant.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence que le triple mutant *Caglk1glk4hxk2Δ/Δ* présente, sur tous les milieux inducteurs testés, un phénotype similaire à celui du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ*.

Les observations microscopiques que nous avons menées ont confirmé les résultats obtenus au niveau macroscopique. En effet, nous avons démontré que les cellules des mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ* conservent un mode de développement blastique en milieux inducteurs (sérum et spider) tandis que la souche sauvage et les mutants *Caglk1Δ/Δ* et *Caglk1glk4Δ/Δ* adoptent, sur ces mêmes milieux, un mode de développement filamenteux (Fig. 34). Ensemble, nos données suggèrent que l'hexokinase *Ca*Hxk2 est essentielle au dimorphisme de *C. albicans.*

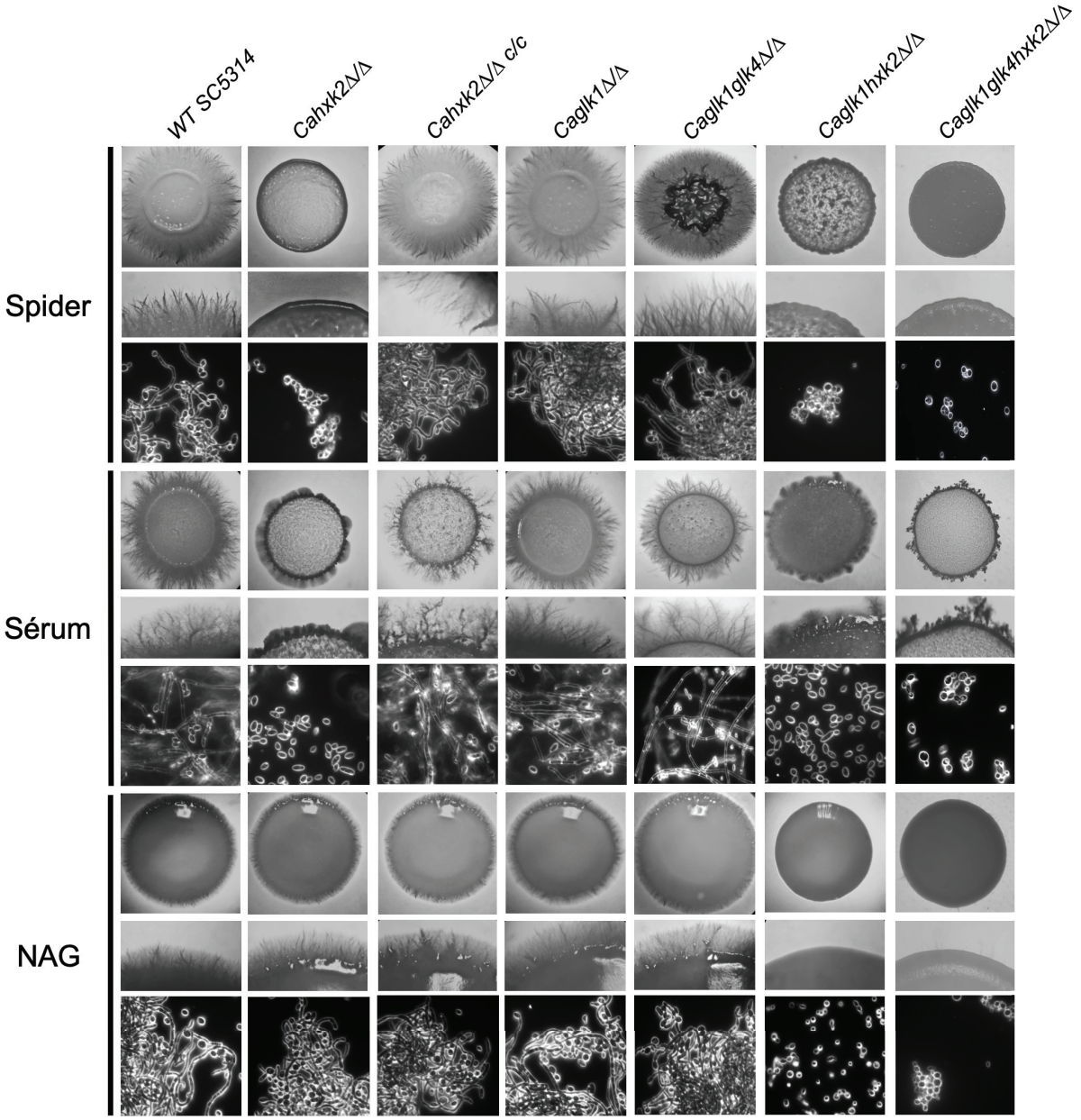


Figure 34 : Analyse macroscopique de la filamentation des différentes souches de C. albicans. Les souches sauvages et mutantes de C. albicans ont été cultivées pendant 3 jours à 37°C sur différents milieux (sérum, spider et NAG) inducteurs du dimorphisme. Pour chaque milieu, les panels supérieurs et médians, présentent l'aspect macroscopique de la colonie. Les photos ont été prise à la loupe binoculaire. Les photos présentées dans le panel inférieur, ont été obtenues en utilisant le microscope Zeiss Axioskop 2 et représentent l'aspect microscopique des colonies.

Pour mieux comprendre le rôle de l'hexokinase 2 et des glucokinases au cours du processus de filamentation, nous avons comparé le niveau d'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* durant les phases précoces de la transition morphologique (Fig. 35). Nos données mettent en évidence que 30 min après le transfert des cellules dans un milieu inducteur (sérum), la transcription du gène *CaHXK2* est multipliée par 3 (Fig. 35). Nous pouvons également remarquer que cette induction est éphémère puisque 60 min après le transfert, l'expression du gène diminue et tend à revenir à un niveau basal (Fig. 35). Nos données révèlent également une faible activation de la transcription des gènes codant pour les glucokinases 30 min après le transfert des cellules en milieu inducteur. Cependant, contrairement à ce que nous avons décrit pour l'hexokinase 2, cette induction semble persistante puisqu'elle est retrouvée 60 min après le transfert (Fig. 35). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'hexokinase 2 semble jouer un rôle important durant les phases précoces de la transition morphologique, tandis que les glucokinases contribueraient plus tardivement et dans une moindre mesure à ce processus.

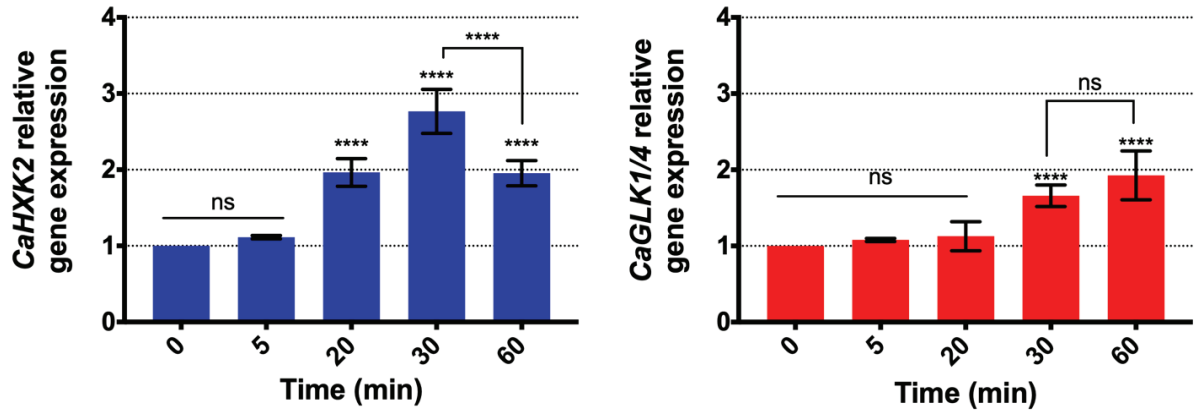


*Figure 35 : Expression relative des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4 dans la souche sauvage de C. albicans au cours des étapes précoces de la transition morphologique. Les cellules ont été cultivées dans un milieu YPG contenant 0,5% de glucose puis ont été transférées dans un milieu contenant 5% de sérum. Le niveau d'expression des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4 a été mesuré par qPCR, à différents temps (0, 5, 20, 30 et 60 min), et a été normalisé par rapport au niveau de l'ARNm de CaACT1, qui sert de calibreur interne. Le niveau des ARNm a été exprimé relativement à leur abondance au temps zéro, qui était fixée à 1. Les résultats représentent la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes réalisées sur trois échantillons biologiques différents, en duplicat technique (n = 6). ns, non significatif ; **** P < 0,0001. Les P-values ont été calculées par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.*

C. L'hexokinase II, mais pas les glucokinases, est essentielle pour permettre l'adaptation de la levure au stress de son environnement

Au sein de son hôte, *C. albicans* est capable de coloniser de nombreuses niches dans lesquelles les conditions physico-chimiques varient (Perlroth *et al.*, 2007). Les variations de pH, de température, ou de pression osmotique sont quelques exemples de stress auxquels sont fréquemment confrontées les levures pathogènes. La détection et la mise en place d'une réponse appropriée rapide aux changements environnementaux est donc de première importance pour permettre la survie et la multiplication de la levure (Smith *et al.*, 2004). La voie de signalisation HOG très conservée chez les levures est l'une des principales voies activées en réponse à la perception d'un stress extracellulaire (Smith *et al.*, 2004). Chez les levures et les champignons filamenteux, le facteur de transcription Hog1, activé en réponse à la perception d'un stress, induit l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des polyols (arabitol, glycérol) et des sucres de réserve (tréhalose), jouant un rôle important dans la résistance aux stress osmotique, oxydant et thermique (Smith *et al.*, 2004). La glycolyse,

principale voie d'assimilation des sucres dans la cellule fournit les précurseurs nécessaires à la synthèse de ces sucres de réserve. Dès lors, nous nous sommes demandé si une souche de *C. albicans* ayant un flux glycolytique appauvri du fait de la délétion des gènes codant les enzymes de phosphorylation des hexoses présenterait une sensibilité accrue aux stress générés par son environnement.

Pour répondre à cette question, nous avons comparé pour chaque souche, le taux de croissance des levures cultivées en présence d'un stress à celui des levures ayant poussées en absence de stress (ligne de référence (Fig. 36)). Le chlorure de potassium (KCl) a été utilisé pour mimer les effets d'un stress osmotique. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a permis de simuler les effets d'un stress oxydant, tandis que le SDS et la caféine ont été utilisés pour mimer les effets d'un stress de paroi. Les résultats que nous avons obtenus mettent en évidence que le mutant délété du gène codant pour l'hexokinase 2 présente une sensibilité accrue à tous les types de stress auquel il est confronté (Fig. 36). Par exemple, en présence de KCl 1.2 M, la souche *Cahxk2Δ/Δ* présente un défaut de croissance de 33,3% par rapport à la même souche cultivée en absence de KCl (Fig. 36). Un comportement similaire est observé lorsque la souche est cultivée en présence de NaCl 1 M ou de Sorbitol 1.5 M (données non présentées). En présence H_2O_2, le mutant *Cahxk2Δ/Δ* montre un défaut de croissance de plus de 45 % par rapport à la condition contrôle (Fig. 36). L'application d'un stress au niveau de la paroi (SDS) affecte drastiquement la croissance du mutant *Cahxk2Δ/Δ* puisqu'un défaut de croissance de près de 55% est détecté (Fig. 36). En revanche, la caféine à un effet plus modéré puisqu'un défaut de seulement 20% a été mesuré. Ce différentiel s'explique par le fait que la caféine et le SDS ont des cibles et mode d'action différents. En effet, la caféine est un inhibiteur des phosphodiestérases, tandis que le SDS agit en dénaturant les protéines de la paroi et de la membrane.

La perte de l'hexokinase 2 augmente donc significativement la sensibilité de la levure aux stress osmotique, oxydant et de paroi (Fig. 36). Ceci suggère qu'un flux glycolytique fonctionnel est nécessaire pour permettre à la levure de résister aux stress de son environnement. La complémentation de la mutation restaure un taux de croissance similaire à la souche sauvage ce qui confirme que le défaut de croissance observé est bien dû à la délétion du gène *CaHXK2* (Fig. 36).

Quel que soit le milieu considéré, les souches *Caglk1Δ/Δ* et *Caglk1glk4Δ/Δ* délétées de l'une ou des deux glucokinases présentent un phénotype de croissance similaire à celui observé pour la souche sauvage (Fig. 36). Ceci suggère que la contribution des glucokinases dans l'adaptation aux stress environnementaux est négligeable. Le double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* présente une sensibilité plus importante au stress osmotique que le simple mutant *Cahxk2Δ/Δ* (Fig. 36). En effet, en présence de KCl 1.2 M nous avons constaté que le double mutant présente un défaut de croissance de plus de 45 % alors que le simple mutant ne présentait un défaut que de 33 % (Fig. 36). Ce résultat renforce l'hypothèse qu'un flux glycolytique fonctionnel est requis pour permettre l'adaptation de la levure aux stress générés par son environnement.

Enfin, nous avons analysé la capacité du triple mutant *Caglk1glk4hxk2Δ/Δ* à faire face à différents stress (Fig. 36). Nous avons constaté que le taux de croissance de ce mutant en présence d'un stress osmotique, oxydant ou pariétal est similaire à celui du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ*. Ceci suggère que la glucokinase 4 n'est probablement pas impliquée dans le mécanisme d'adaptation aux stress (Fig. 36).

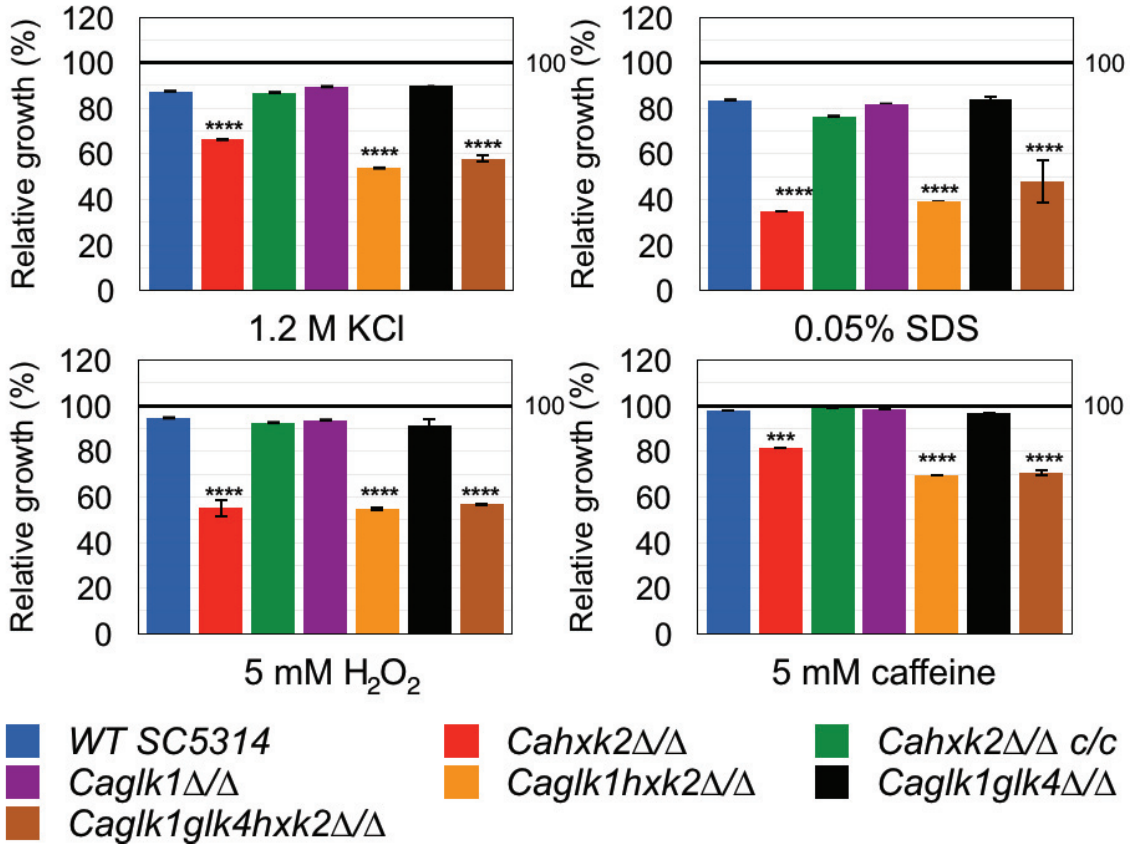


*Figure 36 : L'hexokinase 2 est requise pour faire face aux stress environnementaux. La croissance des souches sauvages et mutantes de C. albicans en présence de stress a été comparée à la croissance des mêmes souches en absence de stress (barre noire 100%). ns, non significatif, *** P = 0.0002, **** P < 0.0001. Les valeurs des P_{values} ont été calculées par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.*

Un autre stress auquel est fréquemment confronté *C. albicans* au cours du processus infectieux est la fluctuation de la concentration en O_2. En effet, au sein des différentes niches colonisées par la levure, la quantité d'O_2 varie grandement. La cavité orale, par exemple est relativement riche en dioxygène, tandis que celui-ci se raréfie dans le tube digestif. Cela impose donc au pathogène de disposer d'outils d'adaptation aux environnements hypoxiques.

Nous avons donc analysé les conséquences de la délétion du gène *CaHXK2* sur la capacité de la levure à croitre dans des environnements pauvres en dioxygène (Fig. 37). Pour cela, nous avons établi les cinétiques de croissance de *C. albicans* en présence et en absence d'O_2.

En absence d'O_2, nos données révèlent que la souche sauvage présente un taux de croissance légèrement inférieur, par rapport à la condition contrôle (Fig. 37). En effet, en présence de dioxygène, nous avons mesuré une DO en phase stationnaire de 1,3 contre 1,1 en absence d'O_2. Ce léger défaut de croissance démontre que *C. albicans* est bien adapté aux environnements pauvres en dioxygène.

Chez un mutant *Cahxk2Δ/Δ* nous avons noté que l'absence de dioxygène entraine un important défaut de croissance. En effet, la DO mesurée après 24h de culture est de 0,5 contre 1,4 en présence d'O_2 (Fig. 37). Ceci suggère que l'hexokinase 2 et donc un flux glycolytique fonctionnel sont requis pour permettre l'adaptation de la levure aux environnements hypoxiques. La complémentation de la mutation *Cahxk2* restaure un phénotype de croissance similaire à celui de la souche sauvage, confirmant que le défaut observé chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est bien lié à la délétion de l'hexokinase 2 (Fig. 37).

Le profil de croissance des mutants *Caglk1Δ/Δ* et *Caglk1glk4Δ/Δ* en hypoxie est similaire à celui de la souche sauvage (Fig. 37), suggérant que les glucokinases ne contribuent pas ou de façon minoritaire à l'adaptation de la levure aux environnements pauvres en dioxygène. En condition hypoxique, la croissance du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* est quasiment nulle, puisque nous avons mesuré une DO initiale et finale (après 24h de culture) de 0,13 et 0,24 respectivement (Fig. 37). En présence d'O_2, la croissance de ce mutant est légèrement meilleure, la DO relevée après 24 h de culture étant de 0,45 (Fig. 37). Cependant, nos résultats mettent en évidence que le défaut de croissance du simple *Cahxk2Δ/Δ* et du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* en absence de dioxygène est statistiquement similaire. En effet, dans un environnement hypoxique, ces deux mutants présentent un défaut de croissance d'environ 50% par rapport à la condition contrôle (avec O_2) (Fig. 37). Cela renforce l'hypothèse selon laquelle les glucokinases ne sont pas requises pour l'adaptation aux environnements hypoxiques.

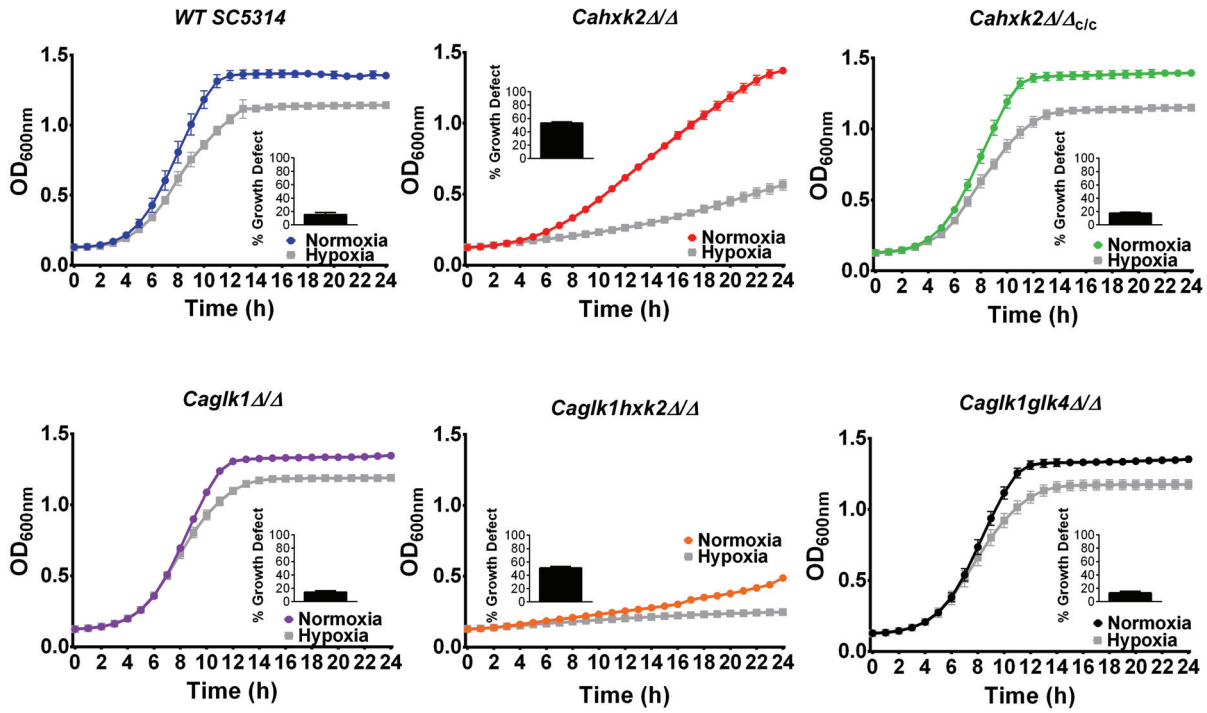


Figure 37 : Analyse de la croissance des souches sauvages et mutantes en condition normoxique (courbes colorées) et hypoxique (courbes grises). Les cinétiques ont été mesurées en microplaque grâce à un système de TECAN. L'environnement anoxique a été créé en scellant les puits avec 100 µl d'huile minérale de paraffine. Pour chaque souche, nous avons calculé le pourcentage de défaut de croissance en anoxie par rapport à la condition contrôle en présence d'O_2 (histogramme). Les données représentent la moyenne (+SD) de trois expériences indépendantes effectuées en triplicat.

Chez *C. albicans*, des analyses transcriptomiques globales ont révélé une surexpression des gènes glycolytiques en réponse à l'hypoxie (Setiadi *et al.*, 2006 ; Sellam *et al.*, 2014). Nous avons donc analysé les variations du niveau d'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* en réponse à l'hypoxie (Fig. 38A). Après 30 min de culture dans un environnement hypoxique, nous avons constaté une légère activation de la transcription du gène *CaHXK2* (x 1,4). Cette induction est retrouvée et est légèrement plus importante (x 1,7), après 60 min. Curieusement, alors que les glucokinases ne semblaient pas avoir de rôle fondamental pour la croissance en condition hypoxique (Fig. 37), nous avons mis en évidence une forte activation de la transcription des gènes *CaGLK1/4* en absence d'O_2 (Fig. 38A). En effet, l'expression de ces gènes est respectivement multipliée par 8 et 25 après 30 et 60 min de culture en condition

hypoxique. Nos données démontrent donc que l'hexokinase 2 et les glucokinases sont différemment régulées en réponse à l'hypoxie (Fig. 38A). Au niveau protéique, une régulation similaire a été mise en évidence. Un niveau constant d'hexokinase 2 marquée à la GFP a été détectée en normoxie et en hypoxie. En revanche, nous avons remarqué que la quantité de protéine *Ca*Glk1-GFP détectée reste constante en condition hypoxique alors qu'elle diminue en présence de dioxygène (Fig. 38B).

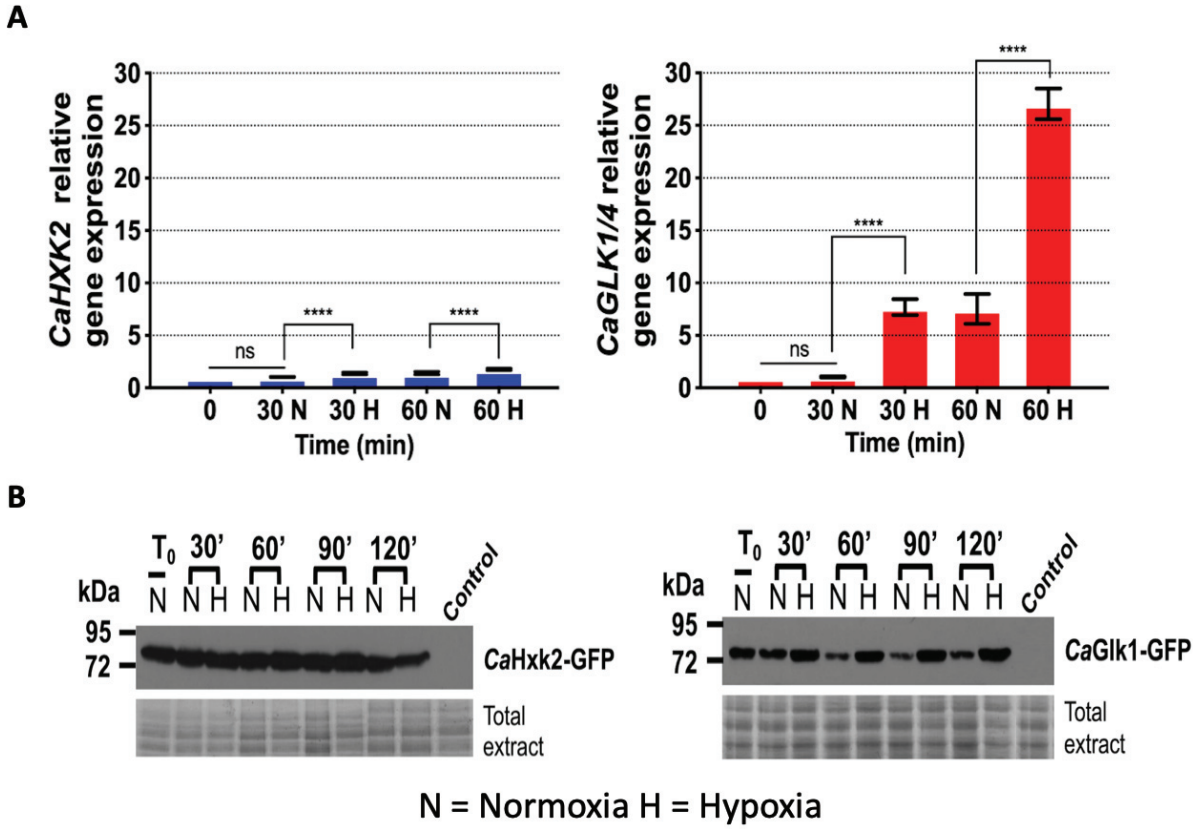


*Figure 38 : Rôle de l'hexokinase 2 et des glucokinases dans la réponse à la limitation en dioxygène. (**A**) Expression relative des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4 en condition normoxique (N) ou hypoxique (H). Le niveau des transcrits a été analysé par qPCR à 0, 30 et 60 min après le transfert des cellules dans un environnement pauvre en O_2. Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau de transcription du gène CaACT1. Le niveau des ARNm CaHXK2 et CaGLK1/4 a été exprimé par rapport à leur abondance à T0, qui a été fixée à 1. Les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, effectuées en triplicat. ns, non significatif, *** P = 0.0002, **** P < 0.0001. Les P_{values} ont été calculées par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey. (**B**) Analyse des variations du niveau d'expression des protéines CaHxk2 et Caglk1 au cours du temps en présence ou en absence de dioxygène. Des souches de C. albicans exprimant les protéines CaHxk2 et CaGlk1 portant une étiquette GFP en C-terminal, ont été cultivées jusqu'en milieu de phase exponentielle dans un milieu contenant 2% de glucose. Les cellules ont ensuite été transférées dans un nouveau milieu YPG, puis exposées (N =normoxie) ou non (H =hypoxie) à l'oxygène. Suite au transfert, les cellules ont été collectées à 0, 30, 60, 90 et 120 minutes. Les protéines CaHxk2-GFP et CaGlk1-GFP ont été détectées par Western-Blot en utilisant des anticorps anti-GFP. Des extraits protéiques issus de la souche sauvage ont également été ajoutés à l'étude et servent de témoin négatif. Une coloration au bleu de Coomassie a permis de vérifier que la quantité de protéine déposée dans chaque puits était identique. Les Western-Blot ont été effectués en triplicat et un résultat représentatif est présenté ici.*

D. L'hexokinase II est impliquée dans l'adhésion de la levure aux surfaces abiotiques

La sensibilité accrue des mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ* aux stress pariétaux, ainsi que la morphologie irrégulière des cellules (cf. Fig. 34) suggère que ces mutants pourraient

présenter une paroi altérée. La biosynthèse de la paroi, fait appel à des précurseurs dont beaucoup sont issus de la glycolyse. Par exemple, les ß-glucanes qui sont l'un des éléments majeur composant la paroi, sont synthétisés à partir du glucose-6-phosphate. Chez *C. albicans* la paroi joue un rôle clé dans l'interaction avec l'hôte et notamment dans l'adhésion de la levure aux surfaces biotiques et abiotiques.

Nous avons donc entrepris de déterminer si la délétion de l'hexokinase 2 pouvait affecter la capacité de la levure à adhérer aux surfaces abiotiques. Pour cela, les cellules ont été placées en condition d'adhésion en présence de glucose (2%). Le pourcentage de cellules ayant adhéré a ensuite été déterminé par le biais d'un test au Crystal Violet (Fig. 39A). Dans cette expérience, la souche sauvage a servi de référence et présente un taux d'adhésion fixé à 100%. Nos résultats mettent en avant une diminution drastique de la capacité d'adhésion du mutant *Cahxk2Δ/Δ* à une surface plastique (Fig. 39). En effet, nous avons noté une diminution de près de 40% de la quantité de cellules ayant adhéré au fond de la plaque. Chez le double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ*, nous pouvons remarquer que le défaut d'adhésion est encore plus prononcé, puisque l'adhésion relative des cellules est diminuée de près de 60% (Fig. 39). Un défaut d'adhésion similaire de ces mutants a pu être mis en évidence en présence de fructose (données non présentées). La délétion d'une (*Caglk1Δ/Δ*) ou des deux (*Caglk1glk4Δ/Δ*) glucokinases n'affecte pas les capacités d'adhésion de *C. albicans* (Fig. 39A&B).

Lorsque les cellules ont été placées en condition d'adhésion dans un milieu contenant du glycérol, qui est une source de carbone assimilée indépendamment de l'hexokinase 2, nous avons mis en évidence que le défaut d'adhésion des mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ* est moins prononcé, puisque nous avons respectivement noté un taux d'adhésion de 78 et 63% (Fig. 39B). Un résultat similaire a été obtenu lorsque les cellules ont été cultivées en présence de galactose (données non présentées). Ceci suggère que le défaut d'adhésion du mutant *Cahxk2Δ/Δ* en présence de glucose et de fructose est lié au défaut de métabolisation de ces sources carbonées.

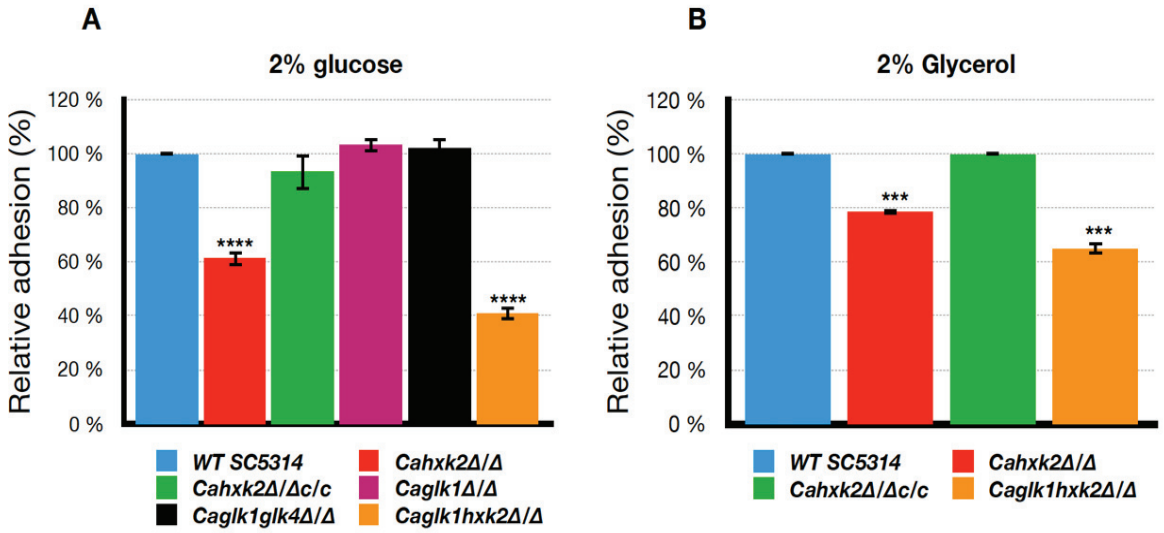


*Figure 39 : Mesure relative de l'adhésion des mutants glycolytiques. Les cellules ont été mises à adhérer en microplaques dans un milieu contenant 2% de glucose (**A**) ou de glycérol (**B**), pendant 1 h 30. L'adhésion relative des différentes souches a ensuite été mesurée par le biais d'un test au Crystal violet. Les valeurs obtenues ont été comparées à l'adhésion de la souche sauvage de C. albicans qui est fixée à 100%. Les histogrammes représentent la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes.*

L'adhésion des cellules aux surfaces abiotiques (plastique, métal…) est la première étape pouvant conduire à la formation d'un biofilm. Au vu de nos résultats, nous nous sommes demandé si la capacité d'adhésion réduite du mutant *Cahxk2Δ/Δ* pouvait conduire à un défaut de formation du biofilm. Pour répondre à cette question, les cellules ont été mises à adhérer en microplaque dans un milieu YPG. Nous avons ensuite mesuré l'évolution de la biomasse du biofilm par le biais d'un test au cristal Violet (Fig. 40). Les résultats sont exprimés en pourcentage et sont comparés à la biomasse du biofilm de la souche sauvage après 24 h de culture. Nos données révèlent qu'à 24 h, la biomasse du biofilm du mutant *Cahxk2Δ/Δ* est très légèrement inférieure (20%) à celle de la souche sauvage (Fig. 40). Cependant, cette différence s'estompe complètement à 48 et 72 h (Fig. 40). Le défaut de biomasse observé à 24 h peut s'expliquer d'une part, par le défaut d'adhésion du mutant *Cahxk2Δ/Δ* et d'autre part en raison d'une croissance plus lente pour le mutant hexokinase en présence de glucose, en comparaison avec la souche sauvage. L'absence de différence entre la biomasse du biofilm de la souche sauvage et du mutant hexokinase 2 à 48 et 72 h, montre que le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est capable de former un biofilm mature. Ainsi le gène *CaHXK2*, n'est pas essentiel à la formation du biofilm.

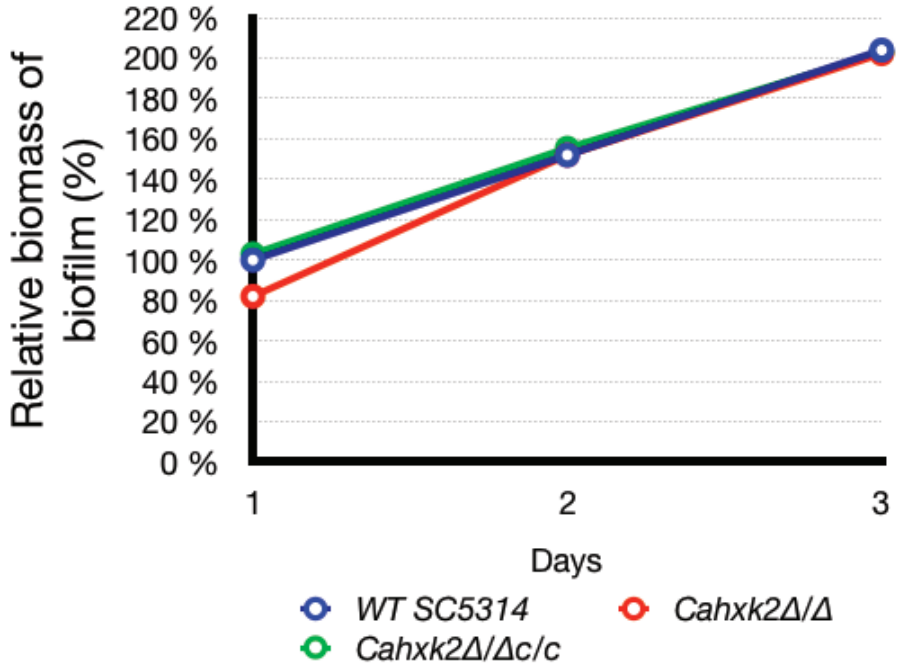


Figure 40 : Mesure relative de l'évolution de la biomasse du biofilm formé par les souches sauvages (WT SC5314), mutantes (Cahxk2Δ/Δ) et complémentées (Cahxk2Δ/$\Delta_{c/c}$) de C. albicans. Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport à la biomasse du biofilm formé par la souche sauvage en 24h. L'expérience a été réalisée en triplicat et un exemple représentatif des données obtenues est présenté ici.

E. L'hexokinase 2 est nécessaire à la virulence de *C. albicans* en modèle insecte et macrophage

L'assimilation des nutriments est un prérequis fondamental pour la croissance, la protection contre le stress et par conséquent la survie dans l'hôte. De plus, sachant que le dimorphisme de la levure est corrélé à son pouvoir pathogène et que les mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ* présentent un sévère défaut de filamentation, nous avions en notre possession deux indices forts nous incitant à considérer le comportement des mutants sur le plan de la virulence.

Le modèle insecte *Galleria mellonella* présente de nombreux avantages, notamment concernant les problèmes d'éthique et de coût. De plus, de nombreux facteurs de virulence nécessaires à la pathogénicité chez les mammifères le sont aussi chez les non vertébrés comme les insectes. Les hémocytes de l'insecte peuvent phagocyter les levures et un processus de mélanisation facilement observable indique une réponse immunitaire forte (Perdoni *et al*., 2014).

Afin de déterminer si la délétion du gène *CaHXK2* impacte la virulence de *C. albicans*, nous avons infecté des larves de *G. mellonella* avec la souche sauvage, la souche mutante délétée du gène *CaHXK2* et la souche complémentée dans laquelle les deux allèles sauvages du gène ont été réintroduits. La virulence des mutants délétés de l'une ou des deux glucokinases (*Caglk1Δ/Δ, Caglk1glk4Δ/Δ*), ainsi que celle du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* a également été évaluée. La survie des larves a ensuite été analysée pendant 8 jours (Fig. 41). Les courbes de Kaplan-Meyer montrent que les chenilles infectées avec la souche sauvage présentent un taux de mortalité de 100% au bout de 7 jours, alors qu'après la même période d'incubation, 70% des larves infectées avec le mutant *Cahxk2Δ/Δ* sont toujours vivantes et le restent à l'issue des 8 jours de l'expérience (Fig. 41). Le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est donc significativement hypovirulent dans un pathosystème *Galleria* par rapport à la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que l'hexokinase 2 est requise pour la virulence optimale de *C. albicans*. Ce résultat est soutenu par le fait que la complémentation de la mutation sur les deux allèles restaure, de façon partielle mais statistiquement significative la virulence du champignon, puisque seul 40 % des larves infectées avec la souche complémentée survivent à l'issue de l'expérience (Fig. 41).

Le mutant *Caglk1Δ/Δ* présente un phénotype de virulence statistiquement similaire à celui de la souche sauvage. En revanche, la délétion simultanée des deux glucokinases entraine une légère hypovirulence de la levure. En effet, un peu plus de 50% des larves infectées avec le double mutant *Caglk1glk4Δ/Δ* survivent à l'issue de l'expérience (Fig. 41). Huit jours post-infection, le taux de survie des larves infectées avec le double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* est de 85%, démontrant que la délétion simultanée de l'hexokinase 2 et de la glucokinase 1 altère drastiquement la virulence de *C. albicans* en modèle insecte (Fig. 41).

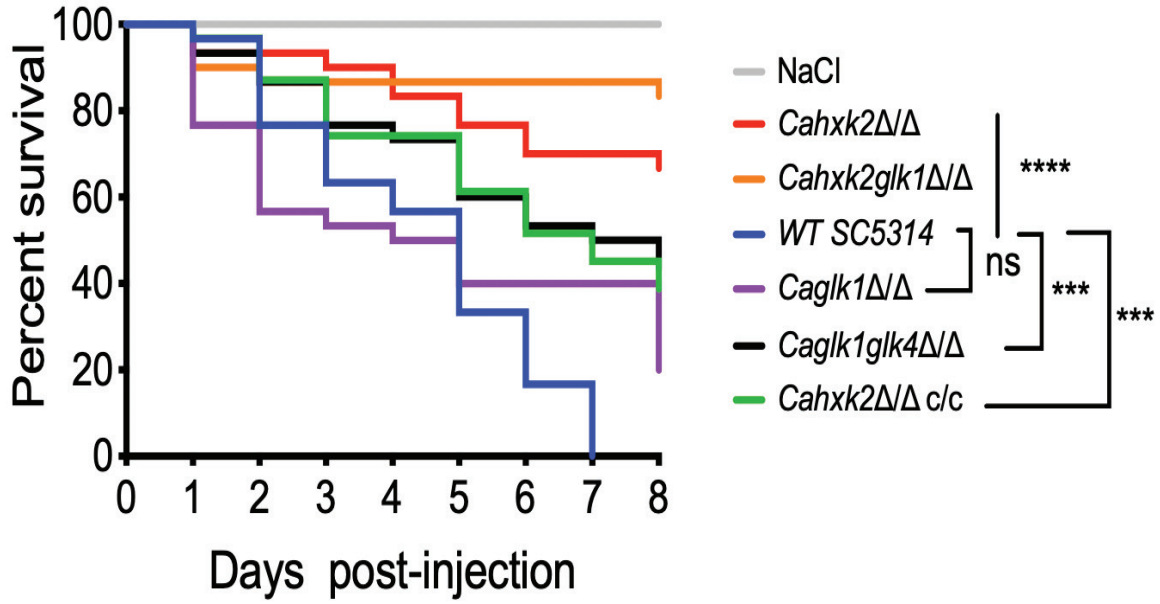


*Figure 41 : Analyse de la virulence des souches sauvages et mutantes de C. albicans en modèle insecte Galleria mellonella. Pour chaque souche, 30 chenilles choisies au hasard ont été infectées avec 2.5x10^5 cellules. Les cellules ont été injectées dans l'hémolymphe des insectes au niveau de la troisième paire de fausses pattes. Un groupe de chenilles contrôle, ayant reçu une injection de NaCl 0,9% a aussi été ajouté à l'étude. Après l'injection, les chenilles ont été placées dans le noir à 37°C et leur survie a été suivie sur une période de 8 jours. Les données sont représentées sous la forme d'une courbe de survie de Kaplan-Meyer. Des tests Log-Rank ont été effectués pour analyser statistiquement les résultats obtenus. ns, non significatif, *** P = 0.0002, **** P < 0.0001. Les souches Cahxk2Δ/Δ, Caglk1hxk2Δ/Δ et Caglk1glk4Δ/Δ sont significativement hypovirulentes par rapport à la souche sauvage (P_{value} <0.0001). La différence observée entre la souche Caglk1Δ/Δ et la souche sauvage n'est pas significative (P_{value} >0.05). La souche complémentée Cahxk2Δ/Δc/c présente une virulence supérieure au mutant Cahxk2Δ/Δ mais inférieure à la souche sauvage (P_{value} = 0.002).*

Afin de nous placer dans un contexte physiologique plus proche de celui que *C. albicans* pourrait rencontrer dans un hôte animal, la virulence de la levure a également été testée dans un modèle macrophage de souris (*J774*). Une collaboration établie avec une équipe de recherche de l'Université de Bordeaux (Pathogénicité des *Candida,* LMFP, UMR 5234) et spécialisée dans l'interaction des levures du genre *Candida* avec les macrophages nous a permis de réaliser ces expériences d'infection. L'internalisation des levures et la viabilité des macrophages ont été analysées par cytométrie en flux (Fig. 42). L'interaction entre les levures et les macrophages a été analysée après 30 min, 4 et 24 h de co-culture. Au bout de 30 min d'incubation, les résultats ont mis en évidence un taux d'internalisation de la souche sauvage et des différents mutants de l'ordre de 80% (Fig. 42). Après 4 h de co-culture, le taux d'internalisation des différentes souches est d'environ 83%. Ces résultats démontrent que les différents mutants que nous avons construits ne présentent pas de défaut d'internalisation dans le macrophage, ce qui suggère que leur capacité à être phagocytés n'est pas altérée.

Après 4 h d'infection, nous avons effectué une première mesure de la viabilité des macrophages infectés. Les macrophages co-cultivés avec la souche sauvage de *C. albicans* présentent un taux de survie de 34%, tandis qu'avec le mutant *Cahxk2Δ/Δ* un taux de survie près de 2 fois supérieur à 58% a été observé (Fig. 42). L'hexokinase 2 est donc requise pour la virulence optimale de la levure en modèle macrophage. La complémentation de la mutation *Cahxk2* restaure un phénotype de virulence similaire à celui observé pour la souche sauvage, confirmant que le défaut de virulence observé précédemment est bien lié à la perte de l'hexokinase 2 (Fig. 42).

La délétion de l'une ou des deux glucokinases n'impacte pas la capacité de *C. albicans* à tuer les macrophages. En effet, le taux de survie des macrophages infectés avec le simple

Caglk1Δ/Δ ou double *Caglk1glk4Δ/Δ* mutant est similaire à celui des macrophages infectés avec la souche sauvage (Fig. 42). Enfin, la survie des macrophages infectés avec le double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* est 3 fois supérieure à celle des macrophages infectés avec la souche sauvage et presque 2 fois supérieure à celle de ceux infectés avec le simple mutant *Cahxk2Δ/Δ*. Vingt-quatre heures post-infection, le taux de survie des macrophages infectés avec les souches sauvages et mutantes est statistiquement identique et est d'environ 3%. En revanche, les macrophages infectés avec la souche *Caglk1hxk2Δ/Δ* présentent un taux de survie de 40%, confirmant le phénotype fortement hypovirulent du double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* (Fig. 42).

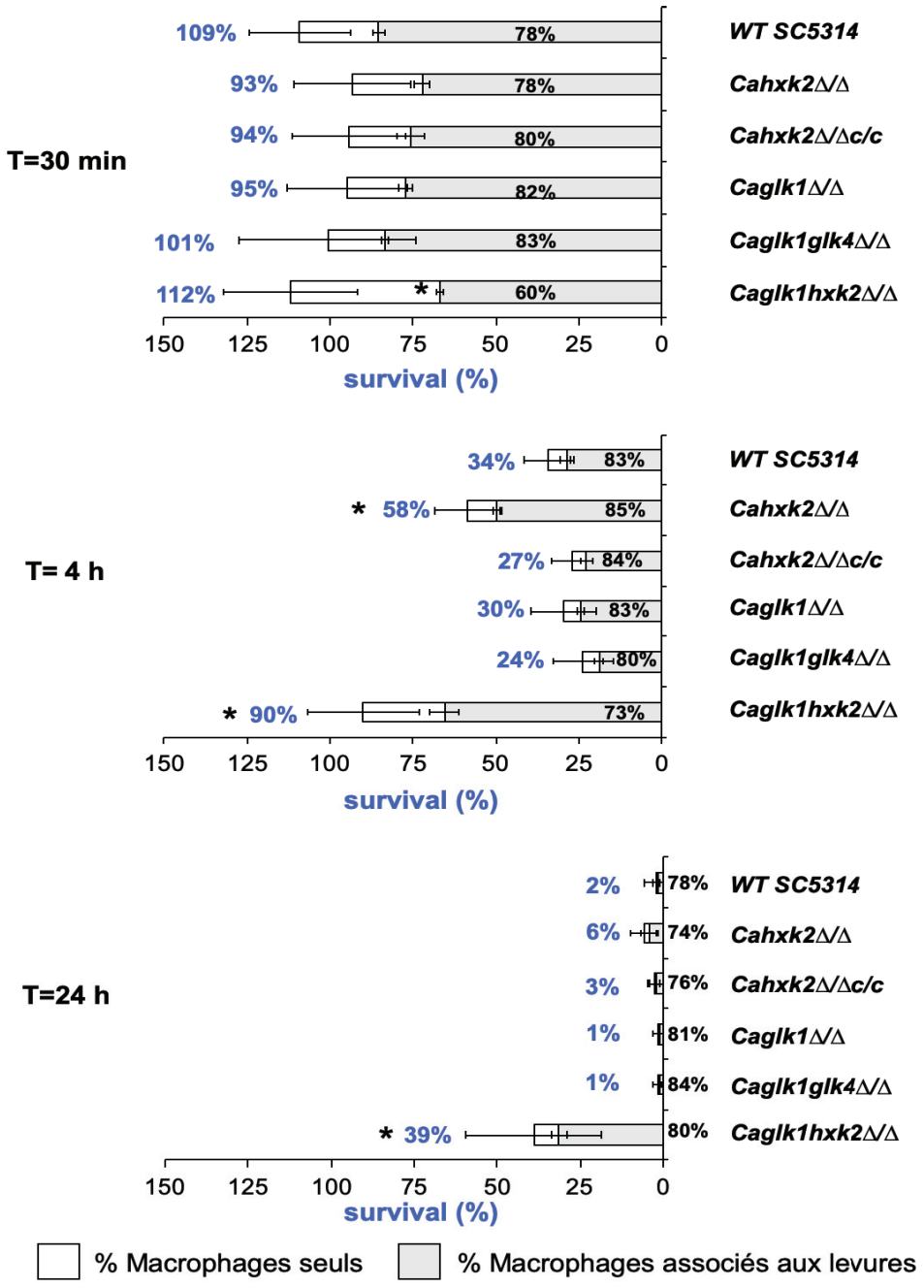


Figure 42 : Analyse de la virulence des souches sauvages et mutantes de C. albicans en modèle macrophage de souris (J774). L'interaction entre les macrophages et les levures à un ratio de 1 macrophage pour 5 levures (MOI 1 :5), a été analysée par cytométrie en flux au cours d'une cinétique de 24h. Les barres horizontales représentent le taux de survie des macrophages, indiqué en pourcentage (en bleu) sur le côté gauche de la barre. La partie blanche de la barre représente le pourcentage de levures non phagocytées, tandis que la partie grise représente le pourcentage de levures internalisées par les macrophages (% indiqué en noir). Les histogrammes représentent la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes.

La destruction des macrophages par *C. albicans*, repose en grande partie sur sa capacité à adopter un mode de développement filamenteux à l'intérieur du phagosome. Les hyphes formés par la levure exercent une pression mécanique et percent la membrane du phagosome. La rupture de l'intégrité membranaire du phagosome et subséquemment du macrophage conduit à la mort du phagocyte. Afin de déterminer si le défaut de virulence des mutants hexokinase (*Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ*) est lié à un défaut de filamentation, nous avons analysé la morphologie des différentes souches au cours de l'interaction avec les macrophages à 4 et 24 h post-infection (Fig. 43). Après quatre heures de co-culture, nous pouvons constater que les macrophages infectés avec la souche sauvage sont percés par de nombreux filaments. Ce qui confirme que suite à sa phagocytose, *C. albicans* adopte une croissance hyphale lui permettant de sortir du phagocyte. La formation des hyphes se poursuit 24 h post infection. Après 24 h de co-culture, nos données mettent en relief l'aspect très irrégulier et granuleux des macrophages (Fig. 43), témoignant de la mort des phagocytes. L'aspect morphologique observé est cohérent avec les résultats de virulence obtenus. Les mutants glucokinases (*Caglk1Δ/Δ* et *Caglk1glk4Δ/Δ*) ne sont pas affectés dans leur capacité à développer des hyphes. Ce qui démontre que dans un contexte physiologique, les glucokinases ne sont pas requises pour le dimorphisme de la levure. En revanche, nos résultats révèlent très clairement que les mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ* sont incapables de mettre en place un développement hyphal à l'intérieur des macrophages (Fig. 43). Ces résultats démontrent que l'hexokinase *Ca*Hxk2 est requise pour la formation des hyphes dans cet environnement particulier et confirment le rôle crucial du dimorphisme dans le processus infectieux.

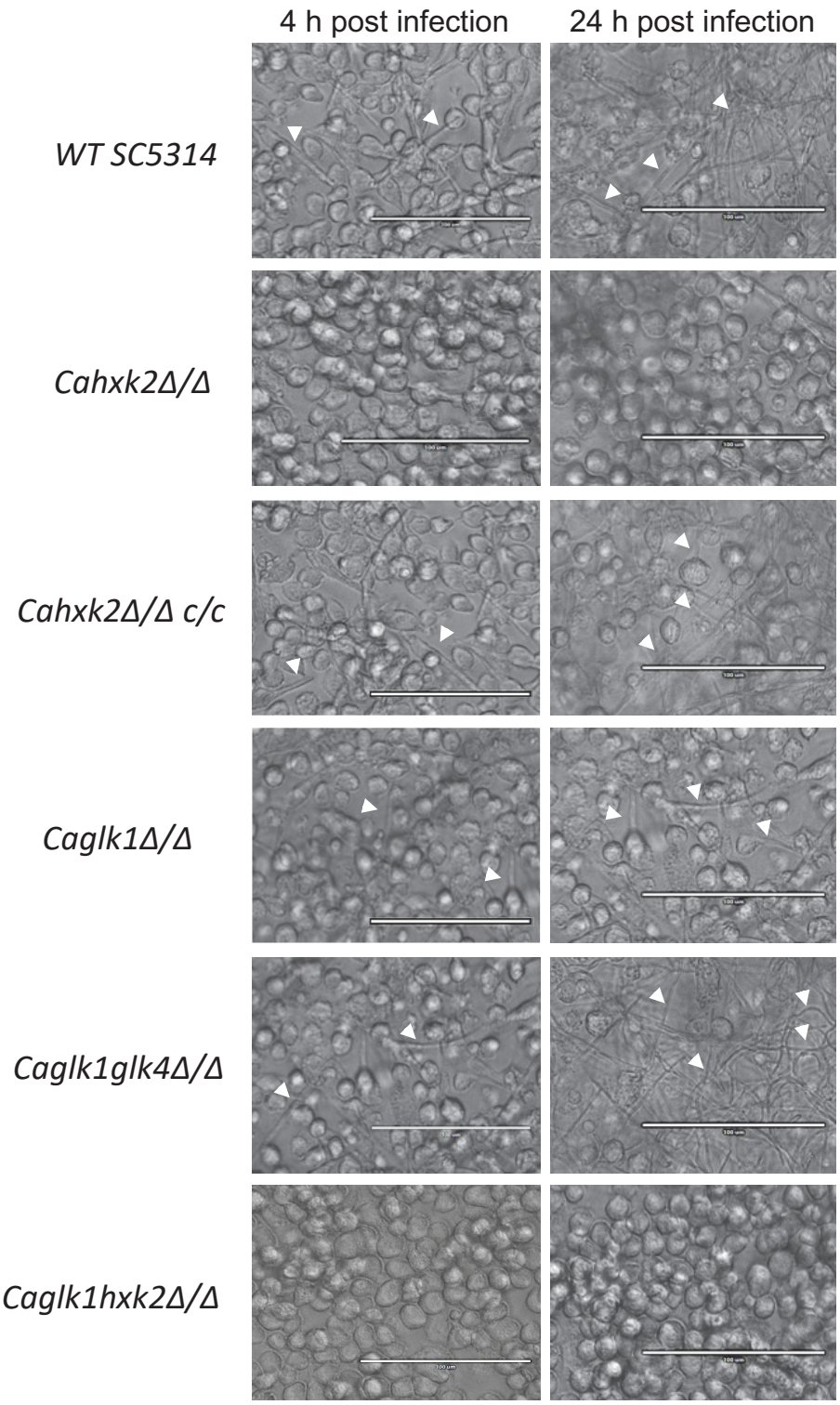


Figure 43 : L'hexokinase 2 est requise pour le dimorphisme de C. albicans à l'intérieur des macrophages. Photographies en microscopie optique des macrophages de souris après 4 et 24 de co-culture avec les levures (MOI 1 :5). Les flèches blanches indiquent les hyphes formés par C. albicans. Sauf mention contraire la barre d'échelle correspond à une longueur de 100 µm.

VIII. Discussion et perspectives

Chez *C. albicans*, de nombreuses études ont mis en évidence le lien entre le métabolisme carboné alternatif (néoglucogenèse, cycle glyoxylique …) et la virulence (Lorenz et Fink, 2001 ; Ramirez et Lorenz, 2007). Cependant, la connexion entre le métabolisme carboné central (glycolyse) et la pathogénicité a rarement été étudiée. Quelques données éparses ont notamment révélé le rôle important de l'énolase dans le processus de virulence de la levure, mais les autres étapes de la glycolyse n'ont à ce jour pas été explorées (Ko *et al*., 2013). Ce manque d'information contraste avec l'importance que revêt cette voie métabolique dans de nombreux processus physiologiques. En effet, au-delà de fournir les précurseurs énergétiques, la glycolyse est un pilier central dans le fonctionnement de la cellule permettant notamment la synthèse des nucléotides, des sucres de réserve, des acides aminés, des composés de la paroi … (Rolland et al., 2002).

Au cours de ce travail, nous avons étudié les conséquences fonctionnelles de la délétion des hexoses kinases (*Ca*Hxk2, *Ca*Glk1 et *Ca*Glk4) catalysant la première étape de la glycolyse. Nous avons ainsi, pu assigner des fonctions à ces différentes enzymes et mieux comprendre leur rôle dans la physiologie et la virulence de *C. albicans*.

- *Les glucokinases jouent un rôle mineur dans la phosphorylation des hexoses*

Les résultats des dosages enzymatiques que nous avons effectués démontrent que l'hexokinase 2 est, chez *C. albicans,* impliquée dans la phosphorylation du glucose, du fructose et du mannose. L'activité fructose kinase mesurée est supérieure à celle de l'activité glucose kinase suggérant qu'à proportion égale, le fructose est assimilé plus rapidement que le glucose. En revanche, l'activité mannose kinase est plus faible ce qui suggère que l'assimilation de ce sucre est plus lente. Chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ*, l'activité glucose et mannose kinase correspond à environ ¼ de l'activité observée chez la souche sauvage. Ces résultats mettent en évidence le rôle des glucokinases dans la phosphorylation du glucose et du mannose intracellulaire. En revanche, l'absence d'activité fructose kinase chez le mutant hexokinase démontre que les glucokinases sont incapables de prendre en charge le fructose. Des études menées chez *S. cerevisiae* ont démontré que les glucokinases ne participent pas à la phosphorylation du fructose (Lobo et Maitra, 1977 ; Gancedo *et al*., 1977). En analysant plus en détail les sites catalytiques de l'hexokinase et des glucokinases, nous avons pu constater que ceux-ci sont légèrement différents (Bernardo *et al*., 2007). Le site de fixation des sucres de l'hexokinase 2 comporte le motif –LGFTFS**Y**P-, tandis que celui des glucokinases porte le motif –LGFTFS**F**P-. Cette variation d'acide aminé dans le site catalytique pourrait être responsable d'un encombrement stérique empêchant la fixation du fructose au niveau du site catalytique des glucokinases.

La délétion du gène *CaHXK2* entraine une diminution drastique de la phosphorylation des hexoses intracellulaires. En revanche dans une souche délétée de l'une (*Caglk1Δ/Δ*) ou des deux (*Caglk1glk4Δ/Δ*) glucokinases, le taux de phosphorylation des sucres demeure similaire à celui observé dans la souche sauvage. Ceci suggère que dans les conditions où l'hexokinase 2 est fonctionnelle, les glucokinases ne jouent qu'un rôle mineur dans la phosphorylation des hexoses intracellulaires.

Nos données ont également révélé que les glucokinases ne contribuent pas de façon équivalente à la phosphorylation du glucose et du mannose. En effet, l'activité glucose kinase mesurée chez un double mutant *Caglk1hxk2Δ/Δ* a mis en évidence que la glucokinase 4 est

responsable de la phosphorylation d'environ 6,6% du glucose intracellulaire alors que la glucokinase 1 prend en charge 28,8% du glucose. Le rôle mineur de la glucokinase 4 est confirmé par la faible affinité de cette enzyme pour le glucose. En effet, les mesures des Km apparents des différentes hexoses kinases révèlent que l'affinité de *Ca*Glk4 pour le glucose est 20 fois inférieure à celle de l'hexokinase 2. Curieusement, l'affinité de *Ca*Hxk2 et de *Ca*Glk1 pour le glucose est relativement similaire, pourtant la proportion de glucose prise en charge par la glucokinase 1 est largement inférieure à celle de l'hexokinase 2. Cette différence pourrait être expliquée par une vitesse de fonctionnement différente de ces enzymes. Des études menées chez *S. cerevisiae*, ont mis en évidence que la constante catalytique de l'hexokinase 2 (*Sc*Hxk2), c'est-à-dire le nombre de moles de glucose phosphorylée par cette enzyme par seconde, était de 63,1 mM/s, contre 0,0721 mM/s pour la glucokinase 1 (*Sc*Glk1) (Smallbone *et al*., 2013). Cette analyse révèle que la vitesse de fonctionnement de *Sc*Glk1 est beaucoup plus lente que celle de *Sc*Hxk2. Ainsi, le glucose intracellulaire est, chez cette levure, principalement phosphorylé via l'hexokinase *Sc*Hxk2. De façon analogue, nos résultats de dosages enzymatiques démontrent clairement que la phosphorylation du glucose chez *C. albicans* repose principalement sur l'activité de l'hexokinase 2. Il se pourrait donc que la vitesse de fonctionnement de l'hexokinase soit supérieure à celles des glucokinases.

- *Les mutants hexokinase présentent une croissance ralentie*

La croissance ralentie des mutants hexokinase 2 (*Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ*) en présence de glucose pourrait s'expliquer par une diminution de l'import du glucose. En effet, chez *S. cerevisiae* et *K. lactis,* l'expression des perméases au glucose est sous le contrôle de la voie SRR (FIF X), qui module leur expression en fonction de la concentration en glucose extracellulaire. Chez ces levures, il a été récemment mis en évidence que l'expression correcte des perméases au glucose requérait une glycolyse fonctionnelle (Cairey-Remonnay *et al*., 2015). Cette connexion entre la glycolyse et la voie SRR, joue un rôle de « garde-fou » en empêchant l'import du glucose dans une cellule incapable de l'assimiler. Ce mécanisme de régulation ne semble pas avoir été conservé chez *C. albicans*. En effet, nos données révèlent, que l'expression de certaines perméases au glucose, contrôlées par la voie SRR (*CaHGT12*, *CaHGT10* et *CaHGT7* ; Sexton, Brown et Johnston, 2007), est fortement induite chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ*, excluant ainsi l'hypothèse d'un défaut d'import du glucose extracellulaire.

Curieusement, la délétion simultanée des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1* entraine un important défaut de croissance de la levure en présence de sources carbonées non fermentescibles (glycérol, lactate, galactose) assimilées indépendamment de l'hexokinase 2 ou des glucokinases. L'une des hypothèses qui pourrait expliquer ce défaut de croissance serait une perturbation globale de l'homéostasie du glucose dans la cellule. Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré qu'en présence de sources carbonées alternatives (galactose, lactate), un mutant totalement dépourvu d'activité hexose kinase (*Schxk1hxk2glk1Δ*) accumule une quantité intracellulaire de glucose anormalement élevée (x 225) par rapport à la souche sauvage (Miseta *et al*., 2003). Les hexoses sont des molécules essentielles au développement des microorganismes. D'une part car ils fournissent aux cellules l'énergie nécessaire pour soutenir les réactions de leur métabolisme, mais aussi servent de précurseurs pour la synthèse de nombreuses molécules (nucléotides, acides aminés, composants pariétaux …). Dans des environnements dépourvus d'hexoses, le glucose est généré via la néoglucogenèse ou est libéré à partir de forme de stockage comme le glycogène ou le tréhalose (Miseta *et al*., 2003). Chez le triple mutant *Schxk1hxk2glk1Δ*, le glucose libéré ne peut pas être phosphorylé et s'accumule dans le cytosol et le réticulum endoplasmique. Chez le double mutant

Caglk1hxk2Δ/Δ, le très faible niveau d'activité de la protéine *Ca*Glk4 pourrait, de la même façon conduire à une accumulation anormale de glucose. L'augmentation de la concentration en glucose intracellulaire pourrait conduire à l'instabilité osmotique de la levure et à sa lyse. En 2003, Miseta *et al*, ont également démontré que les fortes concentrations en glucose intracellulaire retrouvées chez le mutant *Schxk1hxk2glk1Δ* entrainent la glycation massive des protéines cytosoliques et sécrétées, avec pour principale conséquence une dérégulation globale des mécanismes d'import et d'export des composés ioniques. La capture du calcium (Ca^{2+}) est la plus affectée avec une diminution de près de 40% par rapport à la souche sauvage. Chez les eucaryotes, le calcium est impliqué dans de nombreux processus cellulaires : l'activation de certaines enzymes (Alblova *et al*., 2019), la progression du cycle cellulaire (Zhang *et al*., 2008) ou encore l'assemblage du cytosquelette (Moseley et Goode, 2006). La rupture de l'homéostasie ionique pourrait donc avoir des conséquences globales sur la physiologie et la biologie de la levure.

Enfin, la croissance ralentie ou altérée des mutants hexokinase 2 (*Cahxk2Δ/Δ, Caglk1hxk2Δ/Δ et Caglk1glk4hxk2Δ/Δ*) pourrait résulter d'un défaut global de la transcription des gènes. En effet, l'Acétyl-CoA, produit par l'oxydation du pyruvate, joue un rôle central dans la régulation de l'expression génique. En plus de son entrée possible dans le cycle de Krebs pour produire de l'énergie, l'Acétyl-CoA est directement impliqué dans l'acétylation des histones. En fonction de leur état d'acétylation, les histones modifient la conformation de la chromatine et autorisent ou non l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. En 2009, Friis *et al*. ont mis en évidence que l'augmentation de la disponibilité en glucose, augmente le taux d'Acétyl-CoA intracellulaire. Il en résulte une acétylation globale des histones s'accompagnant de l'activation de la transcription de centaines de gènes impliqués dans la prolifération et la croissance cellulaire (Friis *et al*., 2009). La réduction du flux glycolytique chez les mutants hexokinases, pourrait s'accompagner d'une réduction du taux d'Acétyl-CoA intracellulaire et conduire à des défauts de transcription et une croissance ralentie.

- *CaHxk2 participe à la répression glucose*

Chez *S. cerevisiae*, l'hexokinase 2 est une enzyme bi-fonctionnelle impliquée à la fois dans la phosphorylation des hexoses et jouant un rôle de régulateur transcriptionnel (Herrero *et al*., 1995 ; Gancedo *et al*., 2008). En présence de forte concentration en glucose, l'hexokinase *Sc*Hxk2 migre dans le noyau et s'associe au régulateur transcriptionnel *Sc*Mig1 pour réprimer l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation des sources carbonées alternatives (Gancedo *et al*., 2008). Chez *C. albicans*, l'implication de l'hexokinase 2 dans la répression glucose n'avait jamais été étudiée.

Nos résultats démontrent l'implication de l'hexokinase 2 dans le processus de répression glucose chez *C. albicans*. Cependant, les différents acteurs moléculaires et leur organisation au sein de la voie ne sont pas encore clairement élucidés chez cette levure. De façon analogue à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae* (Ahuatzi *et al*., 2007), *Ca*Hxk2 pourrait interagir avec le régulateur transcriptionnel *Ca*Mig1 et recruter le complexe répresseur général de la transcription *Ca*Tup1-Ssn6. Si des analyses transcriptomiques du mutant *Camig1Δ/Δ* ont révélé l'implication de *Ca*Mig1 dans la répression de l'expression de certains gènes en réponse au glucose (Murad *et al*., 2001), son interaction avec l'hexokinase 2, sa régulation par la protéine kinase *Ca*Snf1 et sa relocalisation nucléaire restaient des questions en suspens. Des éléments de réponse ont été apportés grâce à l'analyse de la séquence protéique de *Ca*Mig1. En effet, Zaragoza *et al*. (2000) ont mis en évidence que les sites de phosphorylation permettant la régulation de *Sc*Mig1 par la kinase *Sc*Snf1, n'ont pas été conservés chez *Ca*Mig1.

Ce qui suggère que *Ca*Mig1 est régulée différemment de son orthologue chez *S. cerevisiae*. Chez certains champignons filamenteux comme *A. nidulans* et *A. fumigatus*, les glucokinases contribuent également au mécanisme de répression glucose (Fleck et Brock, 2010 ; Flipphi *et al*., 2003). Chez *C. albicans*, nos données révèlent que les glucokinases ne sont pas impliquées dans la répression glucose. En revanche, ces enzymes semblent impliquées dans le contrôle de l'expression des perméases dépendantes de la voie SRR.

- *Les glucokinases ont elles un rôle régulateur ?*

Nous avons montré que chez *C. albicans*, le lien entre la glycolyse et la voie SRR (qui contrôle entre autres l'expression des perméases au glucose) ne semble pas avoir été conservé, en effet, la délétion du gène *CaHXK2* entraine une augmentation significative (x 3 à x 10) de l'expression des perméases de forte affinité. Cependant, nous avons démontré que l'expression des perméases de forte affinité est drastiquement réduite chez un mutant *Caglk1glk4Δ/Δ,* suggérant que le lien entre la glycolyse et la voie SRR se ferait non pas via *Ca*Hxk2 mais via les glucokinases. Cette implication des glucokinases dans la voie SRR est un élément totalement nouveau n'ayant jamais été décrit. Notre compréhension du rôle des glucokinases dans la voie SRR est donc assez limitée. Nos résultats démontrent que contrairement à l'hexokinase 2, la glucokinase 1 n'est pas relocalisée dans le noyau, même en présence de forte concentration en glucose (2%). Nous pouvons donc vraisemblablement exclure l'hypothèse selon laquelle la glucokinase 1 aurait un rôle de régulateur transcriptionnel. De plus, la délétion de *CaGLK1* n'a pas d'effet sur le flux glycolytique, éliminant de fait l'hypothèse selon laquelle l'appauvrissement du flux glycolytique pourrait affecter l'expression des perméases.

Les fonctions régulatrices pourraient en revanche être portées par la glucokinase 4. Le très faible niveau d'expression de cette protéine, ne nous a pas permis de la détecter en Western-Blot ni de suivre sa localisation cellulaire. Chez certains champignons filamenteux, des « hexokinase-like » n'ayant pas de fonction catalytique mais uniquement des fonctions régulatrices ont été identifiées (Katz *et al*., 2000 ; Bernardo *et al*., 2007). La présence de telles séquences « hexokinase-like » dans le génome des levures n'a, à ce jour, jamais été décrite. Cependant, la très faible activité catalytique de *Ca*Glk4 (≈ 3% de l'activité hexose kinase totale), pourrait être cohérente avec le fait que cette enzyme porte plutôt des fonctions régulatrices.

- *Rôle de l'hexokinase 2 dans le dimorphisme*

Chez les mutants de l'hexokinase 2, la filamentation, est affectée, ce qui suggère que l'activité de l'enzyme et/ou la protéine elle-même, sont impliquées dans ce processus. Le dimorphisme, facteur de virulence chez *C. albicans* est induit par de nombreux facteurs environnementaux (Biswas *et al*., 2007). Cette transition morphologique représente un coût énergétique important. Dans les cellules, la glycolyse fournit les principaux précurseurs énergétiques. Chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ*, le gène codant pour l'hexokinase 2 catalysant la première étape irréversible de la glycolyse, a été délété. La capacité de la levure à produire de l'énergie via cette voie est altérée, ce qui pourrait affecter le processus de transition morphologique. Un argument en faveur de cette hypothèse est l'existence chez les champignons d'une classe particulière de facteurs de transcription de type bHLH appelée APSES (Doedt *et al*., 2004).

Chez *C. albicans*, deux protéines APSES ont été identifiées : *Ca*Efg1 et *Ca*Efh1. La délétion des gènes codant ces protéines diminue de façon drastique la filamentation de *C. albicans*

(Doedt *et al*., 2004). *Ca*Efg1 est impliquée dans la transition de la forme levure à la forme mycélienne (Lo *et al*., 1997 ; Stoldt *et al*., 1997). L'analyse du transcriptome d'une souche mutante délétée du gène *CaEFG1* révèle la dérégulation de l'expression de plus de 280 gènes, mettant en lumière le rôle majeur de ce facteur de transcription. Parmi ces gènes, la plupart des gènes glycolytiques dont *CaFBA1P*, *CaPFK1*, *CaENO1* ainsi que de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des sucres de réserve tels que le tréhalose ou le glycogène ont été identifiés (Doedt *et al*., 2004). Ces résultats mettent en évidence le besoin énergétique important généré par la filamentation, qui implique l'activation transcriptionnelle des gènes glycolytiques par les facteurs de transcription APSES et argumente le fait que la délétion d'un gène majeur de la glycolyse, *CaHXK2*, puisse entrainer un défaut de filamentation. L'activation de la transcription des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* en réponse au sérum, renforce l'hypothèse qu'un flux glycolytique élevé est requis pour le changement morphologique de *C. albicans*. La délétion des gènes *CaGLK1* et *CaGLK4* n'entraine pas de défaut de filamentation. Ces enzymes ne sont sans doute pas impliquées dans le processus de filamentation, ou bien l'absence d'effet des glucokinases sur le flux énergétique n'entraine pas l'incapacité à filamenter.

Chez les bactéries *E. coli* et *Brevibacterium liquefaciens*, certains intermédiaires de la glycolyse comme le pyruvate et le phosphoénolpyruvate agissent comme des cofacteurs et améliorent l'activité de l'adénylate cyclase, conduisant à une augmentation de la quantité d'AMPc intracellulaire (Umezawa *et al*., 1974 ; Peterkofsky et Gazdar, 1978). Chez *C. albicans* l'AMPc est impliqué dans l'activation de la PKA, qui active ensuite certains de ces effecteurs dont *Ca*Efg1, le principal régulateur transcriptionnel contrôlant le dimorphisme. Chez *S. cerevisiae*, une étude de fluxomique a démontré que l'altération du flux glycolytique résultant de délétion du gène *ScHXK2* conduit à une diminution drastique de la production de phosphoénolpyruvate et de pyruvate (Raghevendran *et al*., 2004). Si le lien entre l'adénylate cyclase et les intermédiaires de la glycolyse a été conservé chez *C. albicans*, alors le défaut de filamentation des mutants hexokinase 2 pourrait être la résultante d'une diminution de la concentration en AMPc et donc d'un défaut d'activation du facteur *Ca*Efg1.

- *Rôle des hexoses kinases dans la réponse au stress*

En tant que commensale et pathogène, *C. albicans* colonise de nombreuses niches au sein de son hôte (tube digestif, flux sanguin, macrophages, foie, reins …). Dans ces différents environnements, les conditions physico-chimiques fluctuent grandement. Par exemple, dans les macrophages, *C. albicans* est exposée à un fort stress oxydant et cationique tandis que dans les reins les fortes concentrations en NaCl (600 mmol/L) exercent une forte pression osmotique sur la levure (Ohno *et al*., 1997 ; Zhang *et al*., 2004). Pour survivre, *C. albicans* doit donc être capable de faire face aux stress environnementaux imposés par ces microenvironnements.

L'une des réponses mise en place suite à un stress est l'activation de la voie HOG qui aboutit à l'accumulation d'osmolytes dans la cellule (Brown *et al*., 1990 ; Maeda *et al*., 1994 ; Alvarez-Peral *et al*., 2002 ; Kayingo *et al*., 2005 ; Li *et al*., 2009). Ces osmolytes, appartiennent essentiellement à la famille des polyols (arabitol, mannitol et glycérol) et jouent le rôle d'osmoprotectant en compensant les pertes d'eau de la cellule et en restaurant la pression de turgescence. (Brown *et al*., 1990). La MAPKinase *Ca*Hog1 active aussi la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse du tréhalose (Brown *et al*., 2014b), qui jouent un rôle important dans l'adaptation de la levure aux stress oxydants et thermiques. Les précurseurs nécessaires à la synthèse des polyols et du tréhalose sont fournis par la voie glycolytique. Nos résultats ont mis en évidence que les mutants de l'hexokinase 2 présentent une sensibilité accrue au

stress osmotique, oxydant et pariétal, suggérant le rôle central de l'hexokinase 2 dans le processus d'adaptation aux stress environnementaux. Notre hypothèse est que chez des mutants (*Cahxk2Δ/Δ*, *Caglk1hxk2Δ/Δ* et *Caglk1glk4hxk2Δ/Δ*) présentant un flux glycolytique appauvri du fait de la délétion du gène *CaHXK2*, la production des osmolytes « protecteurs » doit être significativement réduite, diminuant ainsi les capacités d'adaptation de la levure aux stress environnementaux. Une étude de fluxomique menée chez *S. cerevisiae* a confirmé notre hypothèse en démontrant que la délétion de l'hexokinase 2 diminue drastiquement la quantité de glycérol produite par la cellule (Raghevendran *et al*., 2004).

Dans un contexte infectieux, les levures phagocytées par les macrophages et les granulocytes sont exposées à un fort stress oxydant. En réponse à ce stress, *C. albicans* active une voie de signalisation non caractérisée qui aboutit à l'accumulation de la protéine *Ca*Cap1 dans le noyau. Cette dernière active alors l'expression des gènes impliqués dans la détoxification cellulaire comme *CaCAT1* et *CaSOD1* codant respectivement la catalase et la super oxyde dismutase (Znaidi *et al*., 2009). Cependant, l'inactivation de la voie HOG entraine une augmentation de la sensibilité au stress oxydant ce qui implique que cette voie participe aussi à la résistance à ce type de stress notamment en permettant l'accumulation de tréhalose par la cellule (Brown *et al*., 2014). Nos résultats ont démontré que la survie de la souche délétée de l'hexokinase 2 en présence d'un stress oxydant est réduite de près de 50 %. Cette diminution de la survie en présence de stress oxydant pourrait conduire à une atténuation de la virulence de la levure. Afin de déterminer si l'accroissement de la sensibilité aux stress osmotique et oxydant est bien lié à un défaut de synthèse des sucres de réserve, une étude comparative, par HPLC de la quantité et de la nature des polyols présents dans les extraits cellulaires des différents mutants permettrait d'argumenter cette hypothèse. De façon intéressante, Rodaki *et al*. (2009) ont démontré que l'exposition de *C. albicans* à des concentrations en glucose proches de celles retrouvées dans le flux sanguin (5mM), active le facteur de transcription *Ca*Hog1 et initie l'expression d'un programme génétique permettant de faire face aux stress oxydant et osmotique. Plus récemment, Brown *et al*., (2019) ont comparé cette réponse aux réflexes de Pavlov décrit chez les animaux. Il existerait chez *C. albicans,* une « mémoire du glucose » qui préparerait la levure à résister aux stress rencontrés dans les phagocytes. Cette réponse anticipée, illustre bien l'adaptation de *C. albicans* à la survie dans un hôte animal.

Nos résultats mettent également en avant la plus grande sensibilité des mutants hexokinase 2 aux stress pariétaux. Chez les levures, la paroi est une structure largement composée de polymères oligosaccharidiques (mannanes, glucanes, chitine). Les ß-glucanes qui entrent pour une part importante dans la composition de la paroi, sont produits à partir du glucose-6-phosphate (G6P) (Free, 2013). Il n'est donc pas déraisonnable de penser que la réduction du taux de G6P intracellulaire, résultant de la délétion du gène *CaHXK2*, conduise à une altération de la composition de la paroi. L'analyse des différents constituants de la paroi pourrait permettre de mieux comprendre les effets de la délétion de *CaHXK2* sur son architecture et sa structure.

La délétion des gènes *CaGLK1* et *CaGLK4,* qui n'impacte pas la qualité du flux glycolytique, ne conduit pas à une augmentation de la sensibilité aux différents stress. Ce résultat confirme que l'appauvrissement du flux glycolytique chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est responsable de cette sensibilité.

Un autre stress fréquemment rencontré par la levure au sein de son hôte est la limitation de la disponibilité en O_2. Des analyses transcriptomiques globales ont révélé une surexpression des gènes glycolytiques en réponse à l'hypoxie (Synnott *et al*., 2010). En

absence d'oxygène, l'induction des gènes de la glycolyse permet d'augmenter le flux glycolytique et ainsi de compenser la perte d'énergie liée au défaut de fonctionnement de la chaine respiratoire (Webster, 2003). En analysant le niveau d'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* dans des environnements pauvres en dioxygène, nous avons pu mettre en évidence une légère induction de l'expression de *CaHXK2* et une forte activation de la transcription des gènes *CaGLK1/4*. Au niveau protéique, la quantité de protéine *Ca*Glk1 détectée en condition hypoxique est plus importante qu'en condition normoxique. Les glucokinases semblent donc impliquées dans l'adaptation de la levure à l'hypoxie. Cependant, la délétion de l'une ou des deux glucokinases n'affecte pas la croissance de la levure en absence d'O_2. Nous supposons donc que les glucokinases pourraient jouer un rôle de « roue de secours » et permettre de maintenir un flux glycolytique élevé en absence d'O_2. Cette, absence de phénotype pourrait être lié à l'existence de phénomène de compensation. En effet, l'hexokinase 2 étant la principale enzyme permettant l'assimilation du glucose, l'effet de la délétion des glucokinases pourrait être masqué par le fonctionnement de l'hexokinase 2.

- *Le mutant hexokinase est hypovirulent*

La virulence des mutants *Cahxk2Δ/Δ et Caglk1hxk2Δ/Δ*, testée dans le pathosystème *G. mellonella* est respectivement diminuée d'environ 70% et 90% par rapport à la souche sauvage. Le métabolisme carboné joue un rôle central dans la mise en place des mécanismes de pathogénicité chez *C. albicans*. En effet, une délétion ciblée de certains gènes du cycle glyoxylique, de la néoglucogenèse ou encore de la glycolyse a mis en évidence une atténuation de la virulence de la levure en modèle murin, suggérant que les produits de ces gènes sont essentiels à la virulence de *C. albicans* (Lorenz et Fink, 2001 ; Barelle *et al*., 2006). Peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la voie glycolytique chez *C. albicans*, cependant il a été démontré que des mutations des gènes *CaENO1* codant l'énolase et *CaFBA1* codant la fructose-1-6 biphosphate sont hypovirulents, ce qui révèle le rôle des enzymes glycolytiques dans la mise en place d'un comportement invasif et pathogène (Rodaki *et al*., 2006). Le défaut de filamentation pourrait également expliquer ce phénotype. La majorité des mutants de filamentation présentent un défaut de virulence (Lo *et al*., 1997 ; Whiteway et Oberholzer, 2004 ; Carlisle *et al*., 2009). La filamentation est nécessaire pour la pénétration et la colonisation des tissus de l'hôte. Des analyses histologiques réalisées chez *G. mellonella* infectée par *C. albicans* ont montré le tropisme de la levure pour le tractus intestinal de la larve, qui est colonisé par de très nombreux filaments, organisés en biofilms, dès les premières 24 h (Perdoni *et al*., 2014). Un défaut de croissance pourrait également expliquer l'hypovirulence du mutant *Cahxk2Δ/Δ*. Cependant, si l'on s'appuie sur les données disponibles chez les animaux à sang chaud, l'environnement colonisé au cours de l'infection de *G. mellonella* est vraisemblablement pauvre en hexoses (Barelle *et al*., 2006 ; Brown *et al*., 2014), et ne devrait pas générer de défaut de croissance. La flexibilité métabolique de *C. albicans*, lui permet en effet d'assimiler de nombreuses sources carbonées, via les voies du cycle glyoxylique, de la néoglucogenèse ou encore de la ß-oxydation des lipides (Lorenz et Fink, 2001 ; Barelle *et al*., 2006 ; Ramirez *et al*., 2007). L'analyse de la charge microbienne de larves infectées par la souche sauvage et la souche mutante permettrait d'argumenter cette question.

Plus récemment, l'importance des hexokinases dans les mécanismes de pathogénicité a été élucidée chez la levure pathogène *C. neoformans*. Chez cette levure possédant deux hexokinases, le double mutant présente une virulence très atténuée en modèle murin et

macrophage par rapport à la souche sauvage et au simple mutant (Price *et al*., 2011). Le dosage de l'ATP dans la souche sauvage et le double mutant n'a pas révélé de différences significatives, ce qui exclut que le défaut de production d'énergie soit à l'origine de l'hypovirulence du mutant. Les auteurs supposent que la flexibilité métabolique de *C. neoformans* pourrait permettre au double mutant hexokinase de produire de l'énergie en utilisant des sources carbonées alternatives rencontrées au sein de l'hôte (Price *et al*., 2011). Enfin, les auteurs ont également pu mettre en évidence que la persistance de la levure au sein de son hôte était drastiquement diminuée chez le double mutant, suggérant que la glycolyse joue un rôle important dans la colonisation de l'hôte. Une sensibilité accrue au stress oxydant généré par l'hôte pourrait expliquer cette atténuation de la virulence.

En modèle macrophage de souris (J774), l'hypovirulence des mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *Caglk1hxk2Δ/Δ* a été confirmée. L'interaction de la levure avec les macrophages peut être décomposée en 3 phases principales. Une heure post-infection, les macrophages commencent à phagocyter les levures. Entre 3 et 6 h post-infection, *C. albicans*, répond à la phagocytose en adoptant un mode de développement filamenteux, lui permettant de percer et de s'échapper du macrophage. Enfin, environ 9 h post-infection, les levures se multiplient dans le milieu extracellulaire et induisent la mort massive des macrophages (Tucey *et al*., 2018). L'hypovirulence des mutants hexokinases, peut être liée (i) au défaut de formation des hyphes ce qui diminue drastiquement la capacité de la levure à sortir du phagosome et subséquemment du macrophage, (ii) à leur plus grande sensibilité au stress oxydant. L'impossibilité de la levure à sortir du phagosome et sa plus grande sensibilité au stress oxydant, pourrait faciliter son élimination par les macrophages et diminuer sa virulence. Plus récemment, Tucey *et al*. (2018) ont mis en évidence que la mort des macrophages suite à la formation des hyphes est un phénomène mineur. Les auteurs proposent que l'élimination massive des macrophages par *C. albicans* fasse intervenir un autre mécanisme. Pour élucider cette question, les variations du métabolisme carboné de la levure et du macrophage au cours du processus infectieux ont été analysées. Les auteurs ont mis en évidence une activation concomitante des gènes de la glycolyse des macrophages et de *C. albicans*. Ceci suggère qu'au cours du processus infectieux, les deux protagonistes entrent en compétition pour le glucose. Au cours de l'interaction hôte-pathogène, le glucose est un élément central, requis pour la viabilité du macrophage. En effet, suite à leur activation, les macrophages répriment fortement leur métabolisme oxydatif, le glucose est donc la seule source de carbone utilisable par ces cellules pour produire l'énergie nécessaire à l'élimination du pathogène et la mise en place de la réaction inflammatoire. Au cours de l'infection, Tucey *et al*. (2018) ont démontré que *C. albicans*, qui possède des outils performants de détection et d'assimilation du glucose, assimile beaucoup plus efficacement ce sucre que le macrophage. La déplétion en glucose générée par la présence de la levure, bloque le fonctionnement métabolique du macrophage ce qui conduit à l'hyperpolarisation de ses membranes mitochondriales. Le défaut de polarisation de la mitochondrie active les cascades apoptotiques conduisant à la mort massive des phagocytes. En modèle macrophage, la virulence de la levure repose donc principalement sur sa capacité à assimiler efficacement et rapidement le glucose. L'hypovirulence des mutants hexokinase 2 pourrait donc être liée à leur défaut d'assimilation de ce sucre.

Publication

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 25 February 2019
doi: 10.3389/fmicb.2019.00327

Hexokinase and Glucokinases Are Essential for Fitness and Virulence in the Pathogenic Yeast *Candida albicans*

Romain Laurian[1], Karine Dementhon[2], Bastien Doumèche[3], Alexandre Soulard[1], Thierry Noel[2], Marc Lemaire[1] and Pascale Cotton[1]*

[1] Génétique Moléculaire des Levures, UMR-CNRS 5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénie, Université de Lyon – Université Lyon 1, Lyon, France, [2] Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR-CNRS 5234, Université de Bordeaux, Bordeaux, France, [3] Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université de Lyon – Université Lyon 1, Lyon, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Ana Traven,
Monash University, Australia

Reviewed by:
Elizabeth R. Ballou,
University of Birmingham,
United Kingdom
Megan Lenardon,
University of New South Wales,
Australia

*Correspondence:
Pascale Cotton
pascale.cotton@univ-lyon1.fr

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

Received: 29 October 2018
Accepted: 08 February 2019
Published: 25 February 2019

Citation:
Laurian R, Dementhon K, Doumèche B, Soulard A, Noel T, Lemaire M and Cotton P (2019) Hexokinase and Glucokinases Are Essential for Fitness and Virulence in the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. Front. Microbiol. 10:327. doi: 10.3389/fmicb.2019.00327

The pathogenic yeast *Candida albicans* is both a powerful commensal and a pathogen of humans that can infect wide range of organs and body sites. Metabolic flexibility promotes infection and commensal colonization by this opportunistic pathogen. Yeast cell survival depends upon assimilation of fermentable and non-fermentable locally available carbon sources. Physiologically relevant sugars like glucose and fructose are present at low levels in host niches. However, because glucose is the preferred substrate for energy and biosynthesis of structural components, its efficient detection and metabolism are fundamental for the metabolic adaptation of the pathogen. We explored and characterized the *C. albicans* hexose kinase system composed of one hexokinase (*Ca*Hxk2) and two glucokinases (*Ca*Glk1 and *Ca*Glk4). Using a set of mutant strains, we found that hexose phosphorylation is mostly performed by *Ca*Hxk2, which sustains growth on hexoses. Our data on hexokinase and glucokinase expression point out an absence of cross regulation mechanisms at the transcription level and different regulatory pathways. In the presence of glucose, *Ca*Hxk2 migrates in the nucleus and contributes to the glucose repression signaling pathway. In addition, *Ca*Hxk2 participates in oxidative, osmotic and cell wall stress responses, while glucokinases are overexpressed under hypoxia. Hexose phosphorylation is a key step necessary for filamentation that is affected in the hexokinase mutant. Virulence of this mutant is clearly impacted in the *Galleria mellonella* and macrophage models. Filamentation, glucose phosphorylation and stress response defects of the hexokinase mutant prevent host killing by *C. albicans*. By contributing to metabolic flexibility, stress response and morphogenesis, hexose kinase enzymes play an essential role in the virulence of *C. albicans*.

Keywords: *Candida albicans*, hexokinase, glucokinase, glycolysis, glucose repression, hyphal transition, virulence

INTRODUCTION

C. albicans is an opportunistic pathogen which exists in a relatively harmless state in the microbiota of healthy individuals. It is notably present on the mucosal surfaces composing the digestive tract (Odds, 1988; Calderone and Clancy, 2012). Perturbations of the normal microbiota, use of medical implants, or predisposing factors like diabetes can trigger *C. albicans* infection. *C. albicans* is the most common cause of fungal nosocomial infections associated with high mortality rates in immunocompromised patients (Jarvis and Martone, 1992; Perlroth *et al.,* 2007; Armstrong-James *et al.,* 2014).

C. albicans colonizes diverse host microenvironments such as skin, mucosa, blood, and organs, (Odds, 1988). Among the wide range of virulence traits, survival at 37°C, pH and osmolarity adaptation, secretion of lytic enzymes, alteration of the immune response, morphological changes, such as a transition between yeast and hyphae, occur during infection and promote host invasion (Noble *et al.,* 2017). Another crucial factor is the metabolic capacity to assimilate host nutrients. The importance of metabolic flexibility to promote systemic infection and commensal colonization has been clearly emphasized during the past years (Wilson *et al.,* 2009; Sandai *et al.,* 2012; Brown *et al.,* 2014; Childers *et al.,* 2016). Genomic tools revealed that rapid transcriptional responses take place to set up a niche-specific carbon metabolism (Lorenz *et al.,* 2004; Barelle *et al.,* 2006; Bonhomme *et al.,* 2011; Ene *et al.,* 2012, 2013; Brown *et al.,* 2014). Utilization of alternative non-fermentable sources through the glyoxylate and gluconeogenesis pathways is essential to support *C. albicans* proliferation in vivo (Lorenz and Fink, 2001; Miramón and Lorenz, 2017). However, physiologically relevant hexose sugars like glucose, galactose, and fructose are transiently available at low level in the gastrointestinal tract and only glucose (0.05–0.1%) is present in the bloodstream (Barelle *et al.,* 2006; Pérez *et al.,* 2013; Miramón and Lorenz, 2017). During survival in blood, invasion of kidneys and liver, expression of *C. albicans* infection-associated genes involved in glycolysis has been reported (Brown *et al.,* 2007; Wilson *et al.,* 2009; Pérez *et al.,* 2013). Complete glycolytic activation by the two key transcriptional regulators Gal4p and Tye7p is required for full virulence in *Galleria mellonella* and mice (Askew *et al.,*2009). Glucose is the preferred substrate for ATP generation, metabolic precursors synthesis and maintenance of a reductive potential in eukaryotes (Flores *et al.,* 2000; Rolland *et al.,*2001). Hence, accurate and efficient glucose detection and metabolization pathways constitute a fundamental basis for metabolic adaptation of the pathogen. In *C. albicans*, there are 20 predicted glucose transporters; one of them, *Ca*Hgt4, a high affinity sensor of the SRR pathway (Sugar Receptor Repressor), is essential for low glucose level induction of six of the *C. albicans* transporters. In addition, *Ca*Hgt4 is also required for filamentation and contributes to virulence in mice (Brown *et al.,* 2006; Sabina and Brown, 2009).

Once detected, the initial step in glucose utilization is its transport and following transformation into a sugar phosphate. Most fungi contain at least two active hexose kinases: glucokinase and hexokinase. In *S. cerevisiae*, the hexokinase Hxk2 is the predominant glucose kinase in cells growing in high glucose conditions (Herrero *et al.,* 1995). Both enzymes can support growth on glucose but hexokinases and glucokinases can also phosphorylate other hexoses like fructose and mannose (Cárdenas *et al.,* 1998). The enzymatic equipment for hexose phosphorylation varies among different yeasts, although no physiological explanation for the differences has been found. A search in the genome of *C. albicans* revealed the presence of two hexokinases (*CaHXK1* and *CaHXK2*) and two glucokinase genes (*CaGLK1* and *CaGLK4*). The hexokinase *Ca*Hxk1 does not phosphorylate glucose but N-acetylglucosamine (GlcNAc), an extracellular carbon source present in the mucous membranes, triggering the transition between yeast and hyphal form (Yamada-Okabe *et al.,* 2001; Rao *et al.,* 2013). However, the hexokinase *Ca*Hxk2 and the glucokinases *Ca*Glk1 and *Ca*Glk4 have not been characterized so far and their respective role in *C. albicans* fitness and virulence has not been investigated yet. Moreover, nothing is known about the enzymatic functions of *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1 and *Ca*Glk4 and their putative dual regulatory role in glucose repression. The preferential use of glucose by yeasts results from glucose-induced transcriptional repression via the *Ca*Snf1, essential AMP-kinase, which phosphorylates the transcription factor *Ca*Mig1 (Zaragoza *et al.,* 2000; Corvey *et al.,* 2005). Based on the *S. cerevisiae* model, *Ca*Mig1 should form a necessary complex with the hexokinase *Ca*Hxk2 to shuttle in the nucleus and generate the glucose repression signal (Moreno *et al.,* 2005), but this particular step has not been described yet in *C. albicans*.

In this study, we evaluated the contribution of *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1 and *Ca*Glk4 to the phosphorylation of hexoses and to the glucose repression process. Substantial insights in the functional consequences of hexokinase and/or glucokinases deficiency for *C. albicans* growth, various stress responses, morphological transition and virulence are also proposed.

MATERIALS AND METHODS

Strains and Growth Conditions

C. albicans strains used in this study are listed in **Supplementary Table S1**. Strains were grown at 30°C or 37°C on YPG medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose). When necessary glucose was added at various concentrations (from 0.01 to 2%) or replaced by other carbon sources like 2% glycerol or 2% lactate. To analyze the influence of the carbon source on *CaHXK2* and *CaGLK1/4* transcript level, early log phase cells grown in lactate 2% (OD = 1.8) were transferred to the different media containing 2% lactate, 0.1% or 2% glucose, 2% glycerol, 2% fructose, and 2% mannose. Cells were then grown for 1 h at 30°C. To check compensation mechanisms between *CaHXK2* and *CaGLK1/4* at the transcriptional level, cells were grown to early log phase on 2% glucose (YPG). To analyze the influence of the carbon source on *Ca*Hxk2- GFP and *Ca*Glk1-GFP expression, cells were grown to mid log phase in the different media containing various carbon sources.

To analyze hexose transporter gene expression, cells were grown to early log phase in lactate 2% (OD = 1.8) and then transferred to 2% glucose (YPG). To analyze *CaHXK2* and *CaGLK1/4* transcript level during filamentation assays in liquid medium, cells were grown to OD = 1.8 in 0.5% glucose medium (YP) and then transferred for 30 and 60 min to 5% serum. For filamentation assays on solid medium, *C. albicans* cells were grown for 48 h at 37°C on Spider medium (1% Nutrient Broth, 1% mannitol, 0.2% KH_2PO_4, 2% agar) or 96 h on YP medium (1% yeast extract, 2% peptone) supplemented with 2.5 mM GlcNAc. Five percent calf serum was also used to induce the morphological switch at 37°C after a 2–5 days incubation period. The utilization of different carbon sources and sensitivity to different compounds (5 mM H_2O_2, 1.2 M KCl, 0.05% SDS, 5 mM caffeine) was monitored in liquid YPG at 30°C by spectrophotometry (Tecan Infinity 200 Pro Serie). Five ml of YPG inoculated with stationary phase cells were cultivated to an optical density at 600 (OD_{600}) = 0.6. Ten µl of culture were used to inoculate 180 µl of YP medium containing different carbon sources or the required additives distributed in the wells of a plate. Controls lacking carbon source or specific compounds were performed. Plates were sealed with gas-permeable plastic film. OD_{600} was measured every 30 min during 48 h, with shaking at 380 rpm. Growth data were based on three independent experiments, each of which consisted of assays performed in triplicate. For growth under hypoxic conditions, aerated flasks were inoculated with an overnight culture of *C. albicans*, to OD_{600} of 0.2. Cells were grown until the beginning of the exponential phase $OD_{600} \approx 1.8$. Hypoxic conditions were created by collecting and transferring cells suspension in hermetic and filled tubes. Different time points following the shift from normoxic to hypoxic growth conditions were considered (30, 60, 90, and 120 min). After appropriate time, cells were collected by centrifugation at 3,000 rpm for 5 min, washed twice with sterile water and rapidly frozen at −80°C. For each time point, three biological replicates were performed. For growth in 96-well plates, anoxic conditions were generated by adding 50 µl of mineral oil in each well. Growth values in the presence of stress and hypoxia correspond to the OD values reached after 24 h of growth for each strain.

Construction of Mutant Strains

Mutants of the wild type strain SC5314 (Gillum *et al.,* 1984) used in this study are listed in **Supplementary Table S1**. Mutant strains were constructed using the SAT1 flipper selection cassette kindly provided by J. Morschhäuser (Reuss *et al.,* 2004). *CaHXK2* homozygous mutant strain and the complemented strain *Cahxk2*Δ/Δ*c/c* were generated according to methods described by Reuss *et al.* (2004). The *Caglk1*Δ/Δ and *Caglk1glk4*Δ/Δ homozygous null mutant strains were constructed by one step cloning-free fusion PCR-based strategy. The *Cahxk2glk1*Δ/Δ mutant strain was constructed by deleting successively both *CaHXK2* alleles of the *Caglk1*Δ/Δ mutant using the *CaHXK2* deletion cassette (**Supplementary Data S1**). *Ca*Hxk2 and *Ca*Glk1 GFP epitope tagging was performed using a PCR-based strategy using pGFP-NAT1 as a template (kindly provided by S. Bates), (Milne *et al.,* 2011). The appropriate mutants were identified by PCR analysis using a combination of primers outside the sites of cassette integration and internal primers.

Yeast Transformation

C. albicans transformation was performed using the PEG Lithium technique (Walther and Wendland, 2003). After transformation, mixtures were incubated in YPG for 4 h at 30°C and then plated on YPG + nourseothricin 250 µg ml^{-1} (Werner BioAgent, Jena, Germany). Nourseothricin-sensitive cells were obtained according to Reuss *et al.* (2004). Transformants were grown overnight in YPG medium without selective pressure. Cells were plated on YPG containing nourseothricin (25 µg/ml). Small colonies containing nourseothricin-sensitive cells were selected after 2 days of growth at 30°C. Both alleles were disrupted or complemented in a similar manner after elimination of the SAT1 flipper cassette. In the case of in vivo epitope tagging using pGFP-NAT1 (**Supplementary Table S2**) it was not possible to eliminate the NAT1 marker, one allele was modified by transformation, only.

Yeast Cell Extract and Immunoblotting

To prepare proteins extracts, cells were suspended in 500 µl of 0.1 M Tris-HCl buffer supplemented with 10% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and then broken in the presence of 1.5 ml of glass beads using a FastPrep® -24 (MP Biomedicals) machine (five bursts 6.5 m/s for 30 s). Following this lysis step, cell extracts were centrifuged at 1,500 rpm for 10 min at 4°C. Proteins from the supernatant were quantified using NanoDrop 2000®.

Immunodetection conditions were as described by Rolland *et al.* (2006). The α-GFP antibody (monoclonal anti-mouse, Roche) and secondary antibody (mouse antibody, HRP conjugated, Bethyl Laboratories) mouse HRP were used at $1/5000^e$ and $\Delta/\Delta 0000^e$ final concentration, respectively.

Determination of Hexose Kinase Activity

Either glucose, fructose, or mannose were used as substrates. The hexokinase II activity was measured spectrophotometrically through $NADP^+$ reduction in a glucose-6-phosphate dehydrogenase-coupled reaction. Each reaction was performed in 1 ml spectrophotometer cuvette at room temperature. The final assay mixture consisted of 100 µl of 25 mM HEPES buffer pH 7.5, 100 µl of 10 mM $MgCl_2$, 100 µl of 1 mM β-NADP, 500 µg of crude proteins extract, two units of glucose-6-phosphate dehydrogenase and (i) 100 µl of 10 mM D-glucose for glucose kinase activity, (ii) two units of phosphoglucose isomerase and 100 µl of 10 mM D-fructose for fructokinase activity, (iii) two units phosphomannose isomerase, two units of phosphoglucose isomerase, and 100 µl of 10 mM D-mannose for mannokinase activity. Reactions were started with the addition of 100 µl of 5 mM ATP. Absorbance was continuously recorded at 340 nm, for 10- or 15-min. Activities were obtained from the mean of three independent experiments and expressed as a percentage of the activity obtained with wild type crude protein extract. The apparent Km of crude extracts of the glucose kinases were determined with a final ATP concentration of 5 mM, a final concentration of glucose ranging from 1 µM to 100 mM. The NADPH apparition at 340 nm was measured using a Tecan

Infinite M200 (Salzburg, Austria) microtiter plate reader at 30°C. A single well is composed of 10 µl glucose-6-P dehydrogenase (0.2 U/ml), 10 µl of 1 mM $NADP^+$, 10 µl of 10 mM $MgCl_2$, 10 µl of HEPES buffer (25 mM, pH 7.6) and 50 µg of crude extracts. The reaction was initiated by the addition of 10 µl of ATP (5 mM in potassium HEPES buffer). The activity was determined using a calibration curve of NADH in the range of 0–500 µM to consider the variability of the optical pathway. The parameters were obtained using Dynafit software and the rapid equilibrium approximation of the Michaelis–Menten equation (Kuzmic, 1996).

GFP Detection by Microscopy

Yeast strain expressing the *Ca*Hxk2::GFP and *Ca*Glk1::GFP fusion proteins were grown to exponential phase ($OD_{600} \approx 0.8$) in YP containing 0.05, 0.1, or 2% glucose or 2% lactate. Nuclei were stained by addition of DAPI to 10 µg/ml to the cultures and incubated at 28°C, 180 rpm for 60 min. Cells were washed twice with phosphate buffer saline (PBS) (10 mM Na_2HPO_4, 1.76 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl), collected by centrifugation and resuspended in 20 µl of PBS. GFP and DAPI localization were monitored in live cells cultures using a Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescence microscope. Images were taken with a Zeiss Axio*Ca*m MR camera using AxioVision software and processed using LiveQuartz Images Editor.

RNA Extraction and RT-q-PCR Analysis

Total RNA was extracted from cells grown to $OD_{600} \approx 1.5$, by the acid phenol method (Collart and Oliviero, 2001). For reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) experiments, 10 µg of total RNA extract were treated with DNase I (Ambion). Then, ReVertAid H Minus reverse transcriptase (Thermo Scientific), was used as described by the manufacturer, to generate cDNAs. RT-qPCR experiments were performed with the CFX 96 Bio-Rad light cycler using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Relative quantification was based on the 2^{-}CT method using *Ca*ACT1 (actin) as calibrator. The amplification reaction conditions were as follows: 95°C for 1 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and the final step 95°C for 10 s. A melting curve was generated at 95° for 10 s, 65°C for 5 s with an increment of 0.5°C until 95°C at the end of each PCR cycle, to verify that a specific product was amplified. Primers used in this study are presented in **Supplementary Table S4**.

Infection of *G. mellonella* Larvae

For *G. mellonella* infection, overnight cultures of WT (SC5314), mutant or complemented strains of *C. albicans* were grown to stationary phase ($OD_{600} = 5$) in 2% YPG medium. Cells were centrifuged and washed three times with 0.9% NaCl. Larvae were infected with 10 µl of suspension (2.5×10^5 cells) injected using a Hamilton syringe, between the third pair of prothoracic legs. Three replicates, each consisting of 10 insects, were carried out with survival rates measured daily for a period of 8 days. Infected larvae were incubated at 37°C in the dark. A control group injected with 10 µl of 0.9% NaCl was included. Death was determined based on the lack of motility and melanisation. Survival curves were plotted and their statistical significance were determined using the GraphPad Prism 7.0 program. P-values were estimated using Log rank tests. Surviving larvae were killed at −20°C after experiments following ice-anesthesia.

Infection of Phagocytes With Yeasts

Macrophages from the J774A.1 (ATCC TIB-67) murine cell line were infected as previously described (Dementhon *et al.,* 2012) in cRPMI medium (RPMI-1640 without phenol red and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate and 2 g/l sodium bicarbonate) at 37°C under 5% CO_2. Briefly, 2×10^5 macrophages per well were adhered overnight in 96-well plates, and infected with 1×10^6 *Ca*lcofluor White (CFW)-labeled yeast cells in stationary phase in cRPMI medium supplemented with 5 µg/ml CFW. Interaction was followed over a 24-h time course experiment. To count yeasts after phagocytosis, macrophages were infected with *C. albicans* strains as described in "Materials and Methods" section, using 10 macrophages to 1 yeast multiplicity of infection (MOI). After 4 h of interaction, the infected macrophages were collected after trypsin treatment, centrifuged for 10 min at 10,000 × g, and lysed in 1 ml of 0.2% ice-cold Triton X-100. Released yeast cells were resuspended in YPD and counted using Kova slides (Kova International). Triplicates were done for each experiment. The results are shown as the average of five independent experiments ±standard errors.

Flow Cytometry Analysis

Flow cytometry assays were conducted as previously described (Dementhon *et al.,* 2012) using a FACSCantoII (Becton Dickinson). Macrophage viability and the ratio of macrophages engaged in phagocytosis were determined after 30 min, 4 h and 24 h of infection with CFW-labeled yeasts. Quintuplets of each condition were done for each experiment. After trypsin treatment, macrophages were labeled with 0.2 µg/ml anti-mouse CD16-APC (a membrane stain) and 0.2 µM calcein-AM (Sigma) (a marker of active metabolism). The percentage of macrophage viability was calculated using the number of macrophages positive for both fluorescence (anti-CD16-APC and calcein-AM) when infected with yeasts compared to the control uninfected macrophages. Phagocytozing macrophages were quantified as the percentage of the double-stained macrophages also positive for CFW fluorescence. T-test was used to establish statistical significance with a significance level set at $P < 0.05$. Gating strategy was based on the specificity of each marker for a cell type. CFW stained yeast cells, calcein and anti-CD16-APC stained macrophages. The threshold for each fluorescence was determined based on positive and negative controls. Yeast without macrophages, in the presence of CFW, were used as positive control for CFW fluorescence. Macrophages alone in the presence of CFW were used as negative control. Cells in absence of CFW also served as negative controls. Yeast and hyphae were identified as positive for CFW fluorescence. Alive macrophages were first identified based on their double fluorescence for calcein (marker for an active metabolism) and anti-CD16- APC (membrane marker) (P5 population, **Supplementary Figure S3**). Then, this P5 population was analyzed for the CFW fluorescence: the triple fluorescent cells (Q2 quadrant,

positive for calcein, anti-CD16-APC and CFW) are macrophages associated to yeast cells, called "phagocytozing macrophages." Non-phagocytozing macrophages are the macrophages negative for CFW fluorescence (Q4 quadrant).

Statistical Analysis

All experiments were performed at least three times independently. All statistical data were calculated with GraphPad Prism 7.0 software. For comparisons of multiple groups one-way ANOVA method was used. Significance of mean comparison is annotated as follow: ns, not significant; $^{*}P = 0.033$; $^{**}P = 0.002$; $^{***}P = 0.0002$; $^{****}P < 0.0001$.

Ethics Statement

Our study was exempt from ethical approval. The *C. albicans* SC5314 strain used in this study is referenced in the ATCC collection as ATCCMYA-2876. Murine macrophages used for virulence tests were obtained from the J774A.1 cell line, referenced as ATCC TIB-67 in the ATCC collection. Insect larvae of *Galleria mellonella* were purchased from Sud-Est Appats[1] (Quiege, France). There are no legal or ethical restrictions associated with use of *Galleria* larvae[2].

RESULTS

Deciphering the Hexose Kinase Activity in *C. albicans*

One hypothetical hexokinase (*CaHXK2*, GenBank XM_712312) and two hypothetical glucokinase genes (*Ca*GlK1, GenBank XM_705084 and *CaGLK4*, GenBank XM_707231) were found in the genomic sequence of *C. albicans*[3]. Analysis of the *C. albicans HXK2*, *GLK1* and *GLK4* sequences revealed the presence of a classical hexose kinase conserved domain organized in two regions[4]: a small and a large subdomain. The small subdomain contains the sugar-binding site of typical hexose kinases: -LGFTFSF/YP- (Bernardo *et al.,* 2007). Protein function prediction[5] revealed that *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1 and *Ca*Glk4 may be involved in phosphate-containing compound metabolic processes, transferase activity and ATP-binding. The localization of these conserved domains is provided in **Supplementary Table S3** (Bork *et al.,* 1992; Kuser *et al.,*2000). Two nuclear localization sequences were identified in the hexokinase sequence: -PAQKRKGTFT- (8–17) and-QKRGYKTAH- (405–413). These sequences were not found in the glucokinase sequences. Both glucokinase and hexokinase genes are located on chromosome R (**Figure 1A**), spaced by70 Kbp and oriented in opposite directions. The *CaGLK1* and *CaGLK4* sequences share 98.6% and 99.2% identity at the nucleotide and amino acid level, respectively. Alignment of the *CaGLK1* and *CaGLK4* genomic regions showed that a high level of identity (98%) spanned from 1,500 bp before and after the coding sequences. Within these conserved regions, separated by a few hundred of base pairs, both glucokinase genes are framed by two uncharacterized coding sequences. Alignment of these sequences, spanning the 5′ and 3′ regions of both glucokinases, revealed a level of 95.1% and 98.8% identity, respectively. This strongly indicates that the whole conserved region containing the *CaGLK1* and *CaGLK4* genes has been duplicated and conserved.

To identify the function of *CaHXK2*, *CaGLK1*, and *CaGLK4*, a set of gene disruption strains was constructed in the *C. albicans* wild type strain SC5314. Single homozygous null *Ca*hxk2 (*Cahxk2*Δ/Δ) and *Ca*glk1 (*Caglk1*Δ/Δ) mutants and double homozygous null *CaHXK2 CaGLK1* (*Ca*hxk2glk1Δ/Δ) and *CaGLK1 CaGLK4* (*Ca*glk1glk4Δ/Δ) mutants were constructed by replacing both wild type alleles using the excisable *Ca*SAT1 flipper cassette (Reuss *et al.,* 2004). A *CaHXK2* complemented strain (*Cahxk2*Δ/Δ c/c) was also constructed by reintegrating the wild type coding sequence at the *HXK2* locus, using the same strategy (**Supplementary Data S1**).

To investigate the contribution of *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1, and *Ca*Glk4 to the phosphorylation of hexoses in *C. albicans*, we measured the hexose kinase activity displayed by the wild type strain (SC5314) and the generated mutant strains (**Figure 1B**). Data obtained with *Cahxk2*Δ/Δ cell extracts revealed that glucose kinase and mannose kinase activities decreased by 65% and 75%, respectively, while the phosphorylation of fructose was totally abolished. This suggests that other enzymes, like glucokinases, could phosphorylate glucose and mannose, while fructose is phosphorylated by *Ca*Hxk2 only. Values obtained with the complemented strain *Cahxk2*Δ/Δc/c, statistically comparable to the data from the wild type strain, indicated that the lack of fructose phosphorylation was due to the deletion of the gene. Deletion of one or both glucokinase genes (*CaGLK1*, *CaGLK4*) had no apparent consequence on the level of hexose phosphorylation, suggesting that glucokinase activity could be compensated by the hexokinase activity. Hexose kinase activity measured in the *Cahxk2*Δ/Δ strain corresponds to the sum of the activities of *Ca*Glk1 and *Ca*Glk4 (33% of the total activity). Glucose kinase activity, measured in the double mutant strain *Cahxk2glk1*Δ/Δ, which corresponds to the activity of *Ca*Glk4, was drastically reduced compared to the *Cahxk2*Δ/Δ mutant. This activity corresponds to 6% of the total glucose kinase activity. Taken together these results suggest that glucokinases enzymes contribute unevenly and seem to play a minor role in glucose phosphorylation in the wild type strain.

To further investigate the specificity of *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1, and *Ca*Glk4, we determined their apparent Michaelis constant for glucose (**Figure 1C**). Apparent K_m of *Ca*Hxk2 was measured in the *Caglk1glk4*Δ/Δ strain, while the K_m of Glk4 was determined in *Cahxk2glk1*Δ/Δ strain. The apparent K_m of Glk1 was estimated in the *Cahxk2*Δ/Δ by subtracting the effect of *Ca*Glk4. Data revealed that hexokinase 2 and glucokinase 1 have much lower K_m values (K_m 104.87 ± 7.05 μM and K_m 84.86 ± 6.23 μM, respectively) than glucokinase 4 (K_m 3900 ± 400 μM), using glucose as a substrate. The low glucose affinity of *Ca*Glk4 could partially explain the poor contribution of this protein to glucose and mannose phosphorylation.

[1] http://www.sudestappats.fr/
[2] https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2013/2/1/AGRG1231951D/jo/texte
[3] http://www.candidagenome.org/
[4] http://prosite.expasy.org/
[5] http://bioinf.cs.ucl.ac.uk

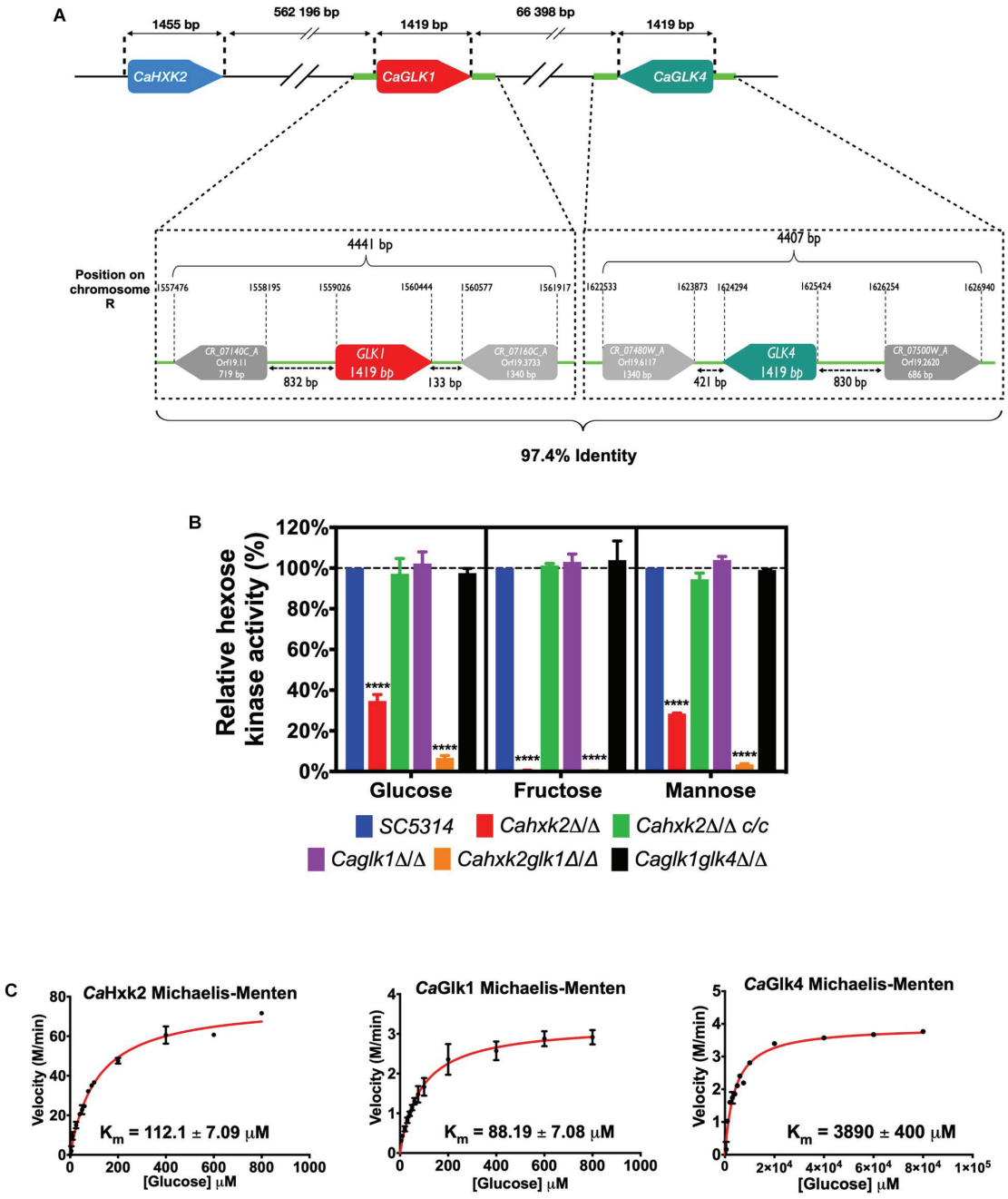


FIGURE 1 | The hexose kinase system in *C. albicans*. (A) The hexose kinase genes are located on *C. albicans* chromosome RA (*Ca*22chrRA_C_*albicans*_SC5314:994,376. . . 997,830). Glucokinase genes are oriented in opposite directions and bordered by highly homologous regions (light green). (B) Hexose phosphorylation rates in *C. albicans* wild type and hexose kinase mutant cell extracts. For each strain, the amount of glucose-6-phosphate produced was measured and expressed as a percentage of the wild type strain. Data are presented as a mean (+ standard deviation) of three independent experiments performed on three different biological samples, in triplicates (n = 9); $^{****}P < 0.0001$; one-way ANOVA using Dunnett's method. (C) Kinetic constant of hexose kinases (apparent K_m determined with crude extracts) in *C. albicans* in the presence of glucose. The experiment was performed in triplicate. Representative data are presented here.

Hxk2 Mostly Sustains Growth in the Presence of Hexoses

Impact of hexokinase and glucokinase gene deletion on growth in the presence of hexoses was evaluated (**Figure 2**). Delayed growth of the hexokinase mutant *Cahxk2*Δ/Δ on glucose and mannose and severely impaired growth on fructose, confirmed the absence of a functional hexokinase. Slow growth on glucose and mannose was consistent with the presence of an additional glucokinase

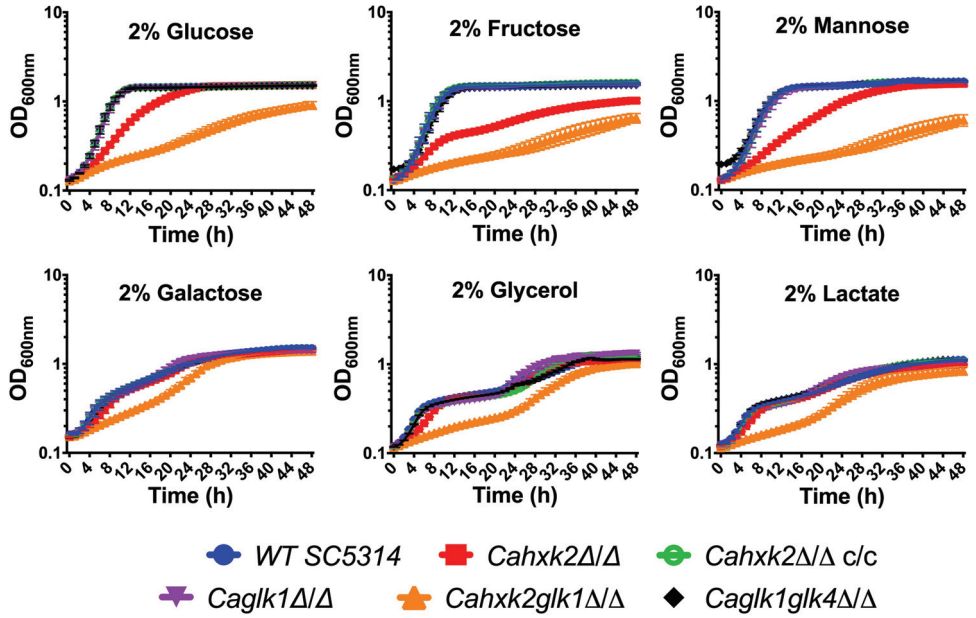


FIGURE 2 | Hexokinase 2 is necessary to sustain *C. albicans* growth. Five ml of YPG inoculated with stationary phase cells were cultivated to OD_{600} = 0.6. Ten µl of culture were used to inoculate 180 µl of YP medium containing different carbon sources. A 96-well plate containing appropriate medium was inoculated with each strain at starting OD_{600} = 0.2. Cells growth was performed at 30°C and recorded during 48 h using microplates reader (TECAN infinite pro200). Data are presented as a mean (± standard deviation) of three independent experiments performed on three different biological samples, in triplicates (n = 9).

activity. The strong growth defect observed on fructose for this mutant confirmed the fact that fructose is phosphorylated by *Ca*Hxk2 only. The residual growth observed on fructose could be due to the metabolism of the alternative carbon sources present in YPG. Growth of the mutant *Cahxk2*Δ/Δ was not affected in the presence of glycerol or galactose, substrates that are not phosphorylated by *Ca*Hxk2. This indicates that growth defects are linked to an impaired phosphorylation of hexoses. Moreover, growth of the complemented strain was comparable to the wild type. Altogether, these data clearly show that the hexokinase *Ca*Hxk2 is necessary for proper growth in *C. albicans* in the presence of glucose, fructose and mannose.

Deletion of *CaGLK1* or both *CaGLK1* and *CaGLK4* did not affect growth. Growth of the double mutant *Cahxk2glk1*Δ/Δ was drastically affected in the presence of glucose, fructose and mannose. Growth failure was also observed, but less pronounced, in the presence of carbon sources that are not phosphorylated by hexokinase or glucokinase (galactose, lactate, glycerol). This strongly suggests that the presence of *Ca*Glk4 alone is not sufficient to sustain growth in the presence of hexoses and that the lack of both *Ca*Hxk2 and *Ca*Glk1 could affect general physiological properties, beyond hexose phosphorylation in *C. albicans*.

Glucokinases and Hexokinase Do Not Compensate at the Transcriptional Level and Are Differentially Regulated

To highlight the respective role of hexokinase and glucokinases, *CaHXK2*, *CaGLK1*, and *CaGLK4* expression was analyzed. To check the influence of the carbon source, cells were grown on 2% lactate and transferred to different media (**Figures 3A,B**). Due to the high level of homology of their coding sequences (98.6% identity) it was not possible to amplify *CaGLK1* transcripts alone. Therefore, the transcription level corresponded to the sum of *CaGLK1* and *CaGLK4* transcripts (indicated as *CaGLK1/4*). In the presence of glucose, *CaHXK2* was three times more expressed than *CaGLK1/4* (**Figure 3A**). Transcription of hexokinase and glucokinase genes was strongly induced by glucose (0.1% and 2%). In the presence of glucose, *CaHXK2* was three to five times more expressed that *CaGLK1/4* (**Figures 3A,B**). Contrary to glucokinase genes, the level of *CaHXK2* transcripts was dependent on the glucose concentration. Transcription of hexose kinase genes was also strongly induced by mannose and fructose. Surprisingly, the transcription of glucokinase genes was induced by fructose and glycerol which are not substrates for glucokinases (**Figure 3B**).

To better elucidate hexose kinase gene regulation, we examined their transcription after growth on 2% glucose in the different mutant strains (**Figure 3C**). Expression data confirmed an absence of transcripts in the corresponding gene- deleted strains and revealed a complete restoration of the hexokinase transcription level after re-introduction of both wild type alleles. *CaHXK2* expression was not increased in the glucokinase mutants (*Caglk1*Δ/Δ, *Caglk1glk4*Δ/Δ). Likewise, *CaGLK1/4* gene expression was not increased in *Cahxk2*Δ/Δ. This suggests that unlike what happens in *S. cerevisiae* (Moreno and Herrero, 2002), no compensation mechanisms interfere to regulate glucokinases and hexokinase at the transcriptional level in the absence of one or the other gene. This points out different

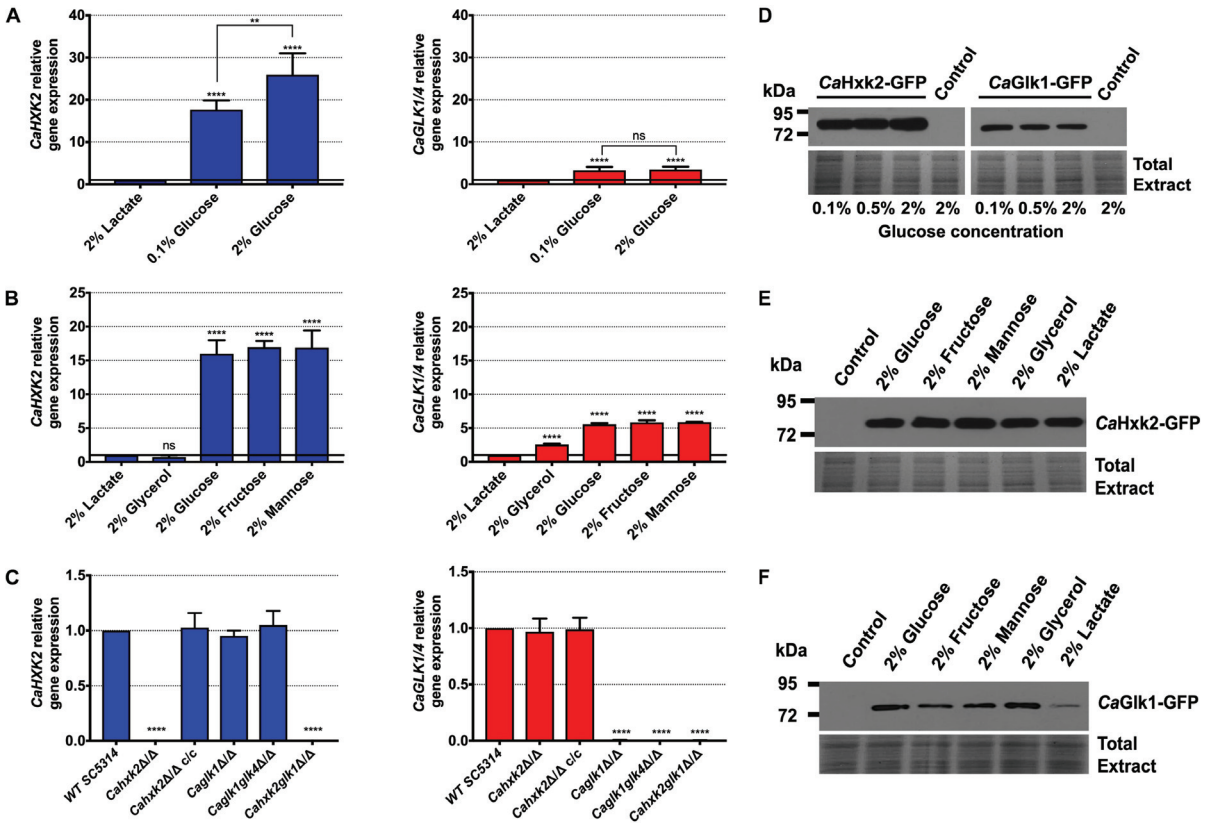


FIGURE 3 | Hexokinase and glucokinases expression. (A) Relative expression of *CaHXK2* and *CaGLK1/4* in wild type strain in presence of 2% lactate, 0.1% and 2% glucose. Lactate-grown cells (OD = 1.8) were transferred for 1 h to different media containing 2% carbon sources (B) Relative expression of *CaHXK2* and *CaGLK1/4* in wild type strain in presence of various carbon sources (2% lactate, glycerol, glucose, fructose or mannose). For the panels (A,B) the results were normalized to the expression of *Ca*ACT1. The level of *CaHXK2* and *CaGLK1/4* mRNAs was expressed relatively to their abundance in 2% lactate, which was set to 1. Lactate-grown cells (OD = 1.8) were transferred for 1 h to different media containing 2% carbon sources (C) Relative expression of *CaHXK2* and *CaGLK1/4* in wild type and hexose kinase mutant strains after growth in 2% YPG (OD = 1.8). The expression was normalized to the level of the *Ca*ACT1 mRNA internal control. mRNA levels were expressed relatively to their abundance in the wild type strain, which was set to 1. Results represent a mean (+ standard deviation) of three independent experiments performed on three different biological samples, in duplicate (n = 6); ns, non-significant; $^{**}P = 0.002$; $^{****}P < 0.0001$. P-values were calculated by one-way ANOVA using Tukey's method. (D) Strains of *C. albicans* expressing C-terminally GFP-tagged *Ca*Hxk2 or *Ca*Glk1 were cultivated in presence of 0.1, 0.5, or 2% glucose to mid log phase. Whole cell lysates were analyzed for *Ca*Hxk2-GFP and *Ca*Glk1-GFP by western blotting, using α-GFP antibody. Detection of total proteins by in-gel Coomassie staining was used as a loading control (total extract). Western blots were performed three times. Representative data are presented here. (E,F) *C. albicans* expressing C-terminally GFP-tagged *Ca*Hxk2 or *Ca*Glk1 were cultivated in presence of various carbon sources (2%) to mid log phase. Whole cell lysates were analyzed for *Ca*Hxk2-GFP and *Ca*Glk1-GFP by western blotting, using α-GFP antibody. Wild type strain protein extracts were loaded as control. Detection of total proteins by in-gel Coomassie staining was used as a loading control (total extract). Western blots were performed three times. Representative data are presented here.

regulation pathways. However, this compensation could occur at the protein level since the double glucokinase mutant shows no hexose phosphorylation deficiency. Moreover, the fact that the level of *CaGLK1/4* transcripts was unchanged in the absence of the hexokinase (*Cahxk2*Δ/Δ) revealed that glucokinases genes are not subjected to glucose repression (**Figure 3C**). Interestingly, the level of *CaGLK4* expression detected in *Caglk1*Δ/Δ and *Cahxk2glk1*Δ/Δ was very low, just above the detection threshold. Considering that the glucokinase gene expression level detected in the mutant *Cahxk2*Δ/Δ is the sum of *GLK1* and *GLK4* transcripts, we can again assume that *CaGLK1* and *CaGLK4* are not equally expressed.

To investigate the expression of the enzymes, we constructed *HXK2::GFP* and *GLK1::GFP* strains (*CaHXK2*-GFP and *CaGLK1*-GFP) expressing *CaHXK2*-GFP and *CaGLK1*-GFP from their own promoters. GFP-tagged *Ca*Hxk2 and *Ca*Glk1 were detected in cell extracts by immunoblotting, after growth in the presence of glucose. *Ca*Hxk2-GFP and *Ca*Glk1-GFP were detected whatever the glucose concentration. However, *Ca*Hxk2-GFP was much more abundant than *Ca*Glk1-GFP (**Figures 3D–F**). This is consistent with the higher transcription level observed for *CaHXK2* but could also reflect a faster turnover for glucokinases. *Ca*Hxk2-GFP was equally detected in the presence of various carbon sources that are inducers of its transcription and substrates of the enzyme, but also in the presence of glycerol and lactate that do not induce *CaHXK2* transcription (**Figure 3B**). This could be explained by the long half-life of *Ca*Hxk2. In addition to the lowest abundance

of *Ca*Glk1-GFP, the main difference between *Ca*Hxk2-GFP and *Ca*Glk1-GFP protein content was that *Ca*Glk1 was barely detectable in cell extracts after growth on lactate. This may again reflect different regulation processes for *Ca*Hxk2 and *Ca*Glk1/4.

Hexokinase Mediates Glucose Repression but Not Glucokinases

To highlight the regulatory functions of *Ca*Hxk2, we examined the localization of *Ca*Hxk2-GFP in living cells exposed to glucose (**Figure 4A**). Upon growth in glucose (2%) the GFP signal was distributed in all the cell (except in the vacuole) with a strong accumulation into a structure that colocalize with the nucleus. This nuclear GFP signal was less apparent in cells grown in 0.1% glucose and nearly absent in cells grown without glucose (2% lactate) or at very low glucose concentration (0.05%). This indicates that, in *C. albicans*, *Ca*Hxk2 is able to shuttle from the cytoplasm to the nucleus in presence of high glucose (0.1% and more). This observation is similar to what observed in *S. cerevisiae* grown in 2% glucose where Hxk2 is known to accumulate into the nucleus where it exerts a transcriptional regulatory function necessary for glucose repression independent of its hexokinase activity (Randez-Gil *et al.,* 1998; Fernández-García *et al.,* 2012). The cellular localization of the glucokinases was also investigated. Upon growth of *Ca*Glk1-GFP on 2% glucose, the GFP signal was not detected in the nucleus (**Supplementary Figure S1**).

To ascertain the impact of *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1, and *Ca*Glk4 on glucose repression, we analyzed the expression of high affinity hexose transporter genes (Fan *et al.,* 2002) that are known to be controlled by the central repressor of the glucose repression pathway, *Ca*Mig1, in response to glucose (Zaragoza *et al.,* 2000; Sexton *et al.,* 2007) (**Figure 4B**). These transporter genes (*CaHGT7, CaHGT12, CaHXT10*) are also regulated by another main glucose sensing pathway, the SRR pathway, except *CaHGT8* which is not (Brown *et al.,* 2006). Hexose transporter gene expression was drastically enhanced (up to 10 times for *CaHXT10*) in the hexokinase mutant after transfer on 2% glucose medium. On the contrary, in the double glucokinase mutant expression level was either lowered in the case of *CaHGT7*, *CaHGT12*, and *CaHXT10* or unaffected in the case of *CaHGT8*. These data suggest that *Ca*Hxk2 but not glucokinases, could have a repressor function on hexose transporter gene expression. Moreover, SRR-dependent *CaHGT7*, *CaHGT12*, *CaHXT10* under-expression in the glucokinase mutant may suggest an unexpected regulatory role for glucokinase in transporter gene expression.

Hexose Kinase Enzymes Mediate Protection During Harmful Environmental Challenges: Glucokinase Contributes to the Hypoxic Response

In *C. albicans* and number of yeasts, one strategy to counteract oxidative and osmotic stresses is the rapid endogenous synthesis of compatible solutes or, under exposure to cell wall stresses, cell wall biogenesis (Eisman *et al.,* 2006; Sánchez-Fresneda *et al.,* 2013). These stress responses which are directly or indirectly linked to glucose metabolism, could have been affected in the hexose kinase mutants. For that purpose, wild type and mutant strains were grown in the presence of 2% glucose (YPG) supplemented with 1.2 M KCl (osmotic stress), 5 mM H_2O_2 (oxidative stress), 0.05% SDS and 5 mM caffeine (cell wall stresses). Data presented **Figure 5A** that compare OD values of each strain in the presence and absence of stress after 24 h of growth in microplates, revealed that all stresses had an impact by decreasing growth of the hexokinase mutants (*Cahxk2*Δ/Δ, *Cahxk2glk1*Δ/Δ). Conversely, single and double glucokinase mutant strains were not significantly susceptible to the applied stresses. This suggests that *Ca*hxk2 is involved in stress responses through its central metabolic position.

During host infection, *C. albicans* colonizes multiple niches that greatly differ in oxygen content, meaning that it is adapted to hypoxic environments. Growth of the wild type and mutant strains under hypoxic conditions revealed the impact of *CaHXK2* deletion (**Figure 5B**). Growth of *Cahxk2*Δ/Δ and *Cahxk2glk1*Δ/Δ was affected by 50% after 24 h, as compared to normoxia while the deletion of one or two glucokinases had minor or no effects. The transcriptional response to hypoxia, elucidated in *C. albicans*, revealed a global upregulation of glycolytic genes (Setiadi *et al.,* 2006; Sellam *et al.,* 2014). This prompted us to investigate the expression of hexokinase and glucokinase in response to hypoxia (**Figure 5C**). After 1 h of exposure, *CaGLK1/4* transcript level increased by a factor of 25, while *CaHXK2* upregulation was much less detectable. This shows that glucokinases and hexokinase transcription is differently regulated by hypoxic conditions. This was confirmed at the protein level. GFP-tagged hexokinase was equivalently detected in normoxia and hypoxia. In contrast, immunoblot of *Ca*Glk1-GFP revealed a constant amount of protein in response to hypoxia that persisted along the growth, while in normoxia, the amount of *Ca*Glk1-GFP detected clearly decreased (**Figure 5D**).

Hexose Phosphorylation by *Ca*Hxk2 Is Necessary to Filamentation

As glucose is one of the several stimuli that can trigger yeast-to-hypha development in *C. albicans* (Biswas *et al.,* 2007), we checked the ability of hexokinase and glucokinase mutants to undergo a yeast-to-hyphae morphological transition. To evaluate the impact of the hexose phosphorylation step on filamentation, hyphal formation was induced by growth on different media containing known inducing carbon sources, requiring or not hexose kinase enzymes for further metabolization. Spider and serum media, contain, respectively, mannitol and glucose that depends upon the hexose kinase step to be metabolized. The third medium contains N-acetylglucosamine, that does not require *Ca*hxk2, *Ca*Glk1, or *Ca*Glk4 to be metabolized, but require *Ca*Hxk1 (Yamada-Okabe *et al.,* 2001; Rao *et al.,* 2013). After 2 days of growth at 37°C on serum and spider media, the wild type, *CaHXK2* complemented strain and glucokinase mutants showed abundant filaments at the periphery of the colony, while the hexokinase mutants (*Cahxk2*Δ/Δ, *Cahxk2glk1*Δ/Δ) produced hyphae-deficient colonies (**Figure 6A**). Morphological changes were also observed at the cell level. Microscopic

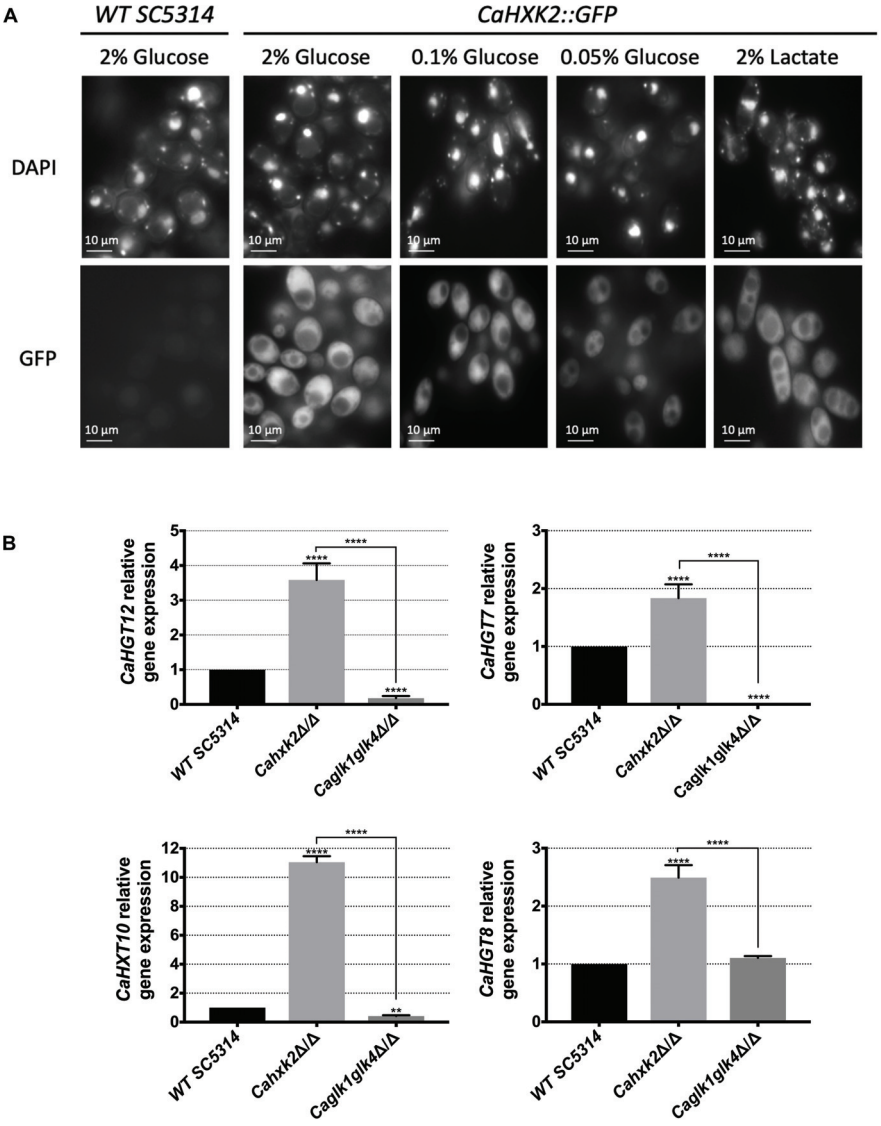


FIGURE 4 | Hexokinase 2, but not glucokinases, participates to glucose repression. (A) Subcellular localization of *Ca*Hxk2-GFP was followed using fluorescence microscopy. Direct visualization of *Ca*Hxk2-GFP in live cells of *C. albicans* was performed as described in the "Materials and Methods" section. Nuclei were identified using DAPI staining. Transformants expressing *Ca*Hxk2-GFP were grown on medium containing 2%, 0.1%, or 0.05% glucose or 2% lactate as carbon source. GFP and DAPI localization was monitored in live cell cultures using a Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescence microscope. Images were taken with a Zeiss Axio*Ca*m MR camera using AxioVision software. (B) Expression of glucose permeases, controlled by the Sugar Receptor Repressor pathway (*CaHGT12*, *CaHXT10*, and *CaHGT7*) or not (*CaHGT8*) was measured by qPCR in each strain. Cells were cultivated in the presence of 2% lactate and then transferred for 1 h in 2% glucose before RNA was extracted. Expression levels were normalized to the expression of *Ca*ACT1. For each permease, the mRNA levels were expressed relatively to their abundance in the wild type strain, which was set at 1. Results represent a mean (+ standard deviation) of three independent experiments performed on three different biological samples, in duplicate; (n = 6), $^{**}P = 0.002$; $^{****}P < 0.0001$. P-values were calculated by one-way ANOVA using Tukey's method.

observations revealed a drastically decreased proportion of filamentous structures for the hexose kinase mutant cells, suggesting that the hexokinase *CaHXK2* is necessary to the yeast-to-hyphae transition. By contrast, filamentation of the *Cahxk2*Δ/Δ hexokinase mutant was not affected during growth in the presence of N-acetylglucosamine. This suggests that hexose phosphorylation by *Ca*Hxk2 is an essential step for filamentation. The double mutant *Cahxk2glk1*Δ/Δ behave in a similar way to the *Cahxk2*Δ/Δ hexokinase mutant on spider and serum media but not in the presence of GlcNAc, where it appeared hypofilamentous. This filamentation defect of the double mutant *Cahxk2glk1*Δ/Δ grown on the particular carbon source GlcNAc, may be the consequence of severe physiological disturbances.

To eventually highlight a specific role in pathogenic behavior for *C. albicans* hexose kinases, we compared hexokinase and glucokinase gene expression levels during the early steps of the morphological switch. Our data did not reveal any particular transcriptional response of one gene or another (**Figure 6B**). Both

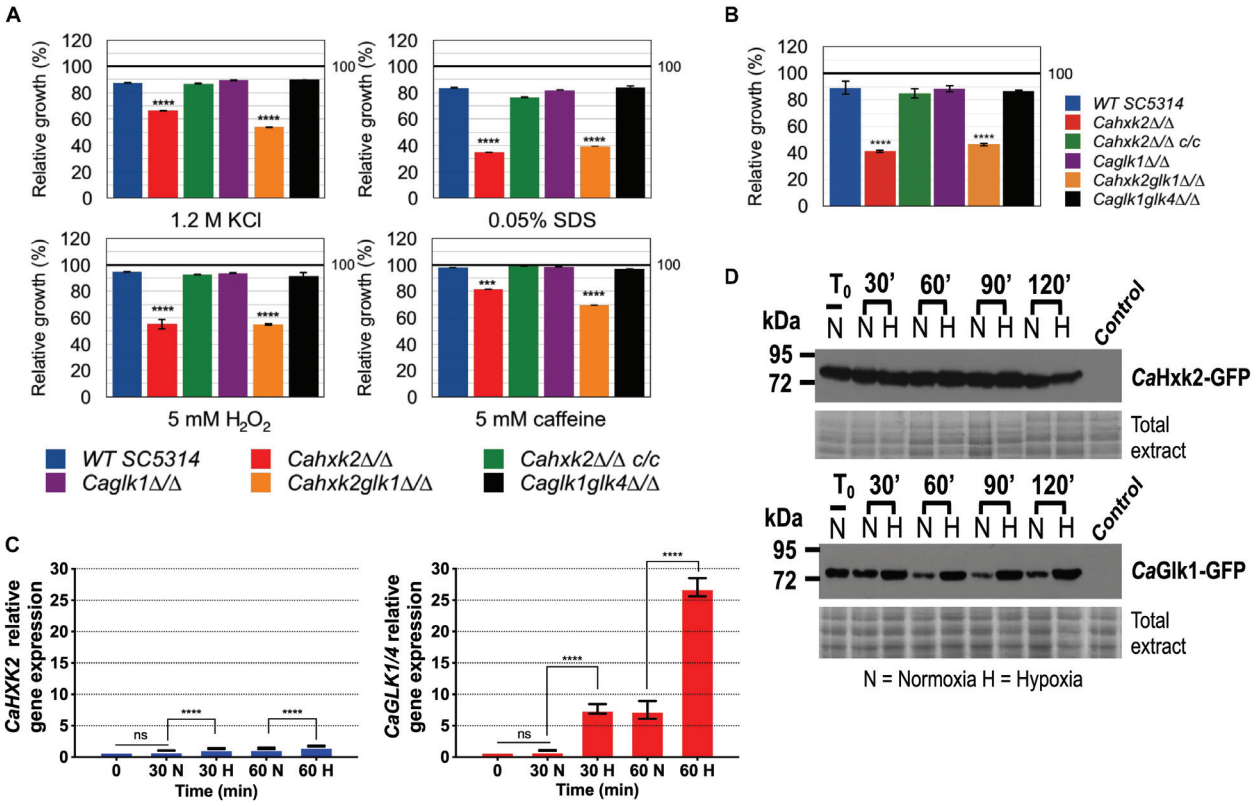


FIGURE 5 | Hexose kinase enzymes mediate protection during harmful environmental challenges. (A) Growth of the wild type and hexose kinase mutant strains exposed to various stresses in YPG was expressed as a percentage of the growth of each strain in absence of stress which was set to 100% (black line). Data correspond to the OD values reached after 24 h of growth in microplates. (B) Growth of the wild type and hexose kinase mutant strains under hypoxic conditions in 2% glucose YPG was expressed as a percentage of growth in normoxia which was set to 100% (black line). (C) Relative expression of *CaHXK2* or *CaGLK1/4* measured in normoxia (N) or hypoxia (H) during growth in YPG 2% glucose. Transcript level was analyzed by qPCR at 0, 30 and 60 min. Results were normalized to the *Ca*ACT1 transcript level. The level of *CaHXK2* and *CaGLK1/4* mRNAs was expressed relatively to their abundance at time zero, which was set to 1. Histograms represents a mean of three independent experiments performed on three different biological samples, in triplicate (n = 9); ns, non-significant; ***P = 0.0002; ****P < 0.0001. P-values were calculated by one-way ANOVA using Tukey's method. (D) Strains of *C. albicans* expressing *Ca*Hxk2-GFP or *Ca*Glk1-GFP were grown in 2% glucose YPG to the mid log phase. Cells were transferred into the new medium containing 2% glucose and exposed (N = Normoxia) or not (H = Hypoxia) to oxygen. Following this shift, cells were collected at 0, 20, 60, 90, and 120 min and the detection of *Ca*Hxk2-GFP or *Ca*Glk1-GFP was performed by western blot using α-GFP antibody. Wild type strain protein extracts were loaded as control. Detection of total proteins by in-gel Coomassie staining was used as a loading control (total extract). Western blots were performed three times. Representative data are presented here.

profiles revealed a two-time increase of transcripts 30 or 60 min after the initiation of the filamentation by serum and a shift at 37°C. However, after 1 h of growth, glucokinases expression continues to increase while *CaHXK2* transcription level decreases after 30 min.

*Ca*hxk2 Mutant Is Hypovirulent in *Galleria mellonella* and Macrophage Models

To explore the impact of altering hexokinase and glucokinases on *C. albicans* virulence, we examined first the survival rate of the host model *G. mellonella* following infection with the wild type, mutant and complemented strains (**Figure 7A**). *G. mellonella* survival data indicated that there was a statistically significant difference between the survival rate of larvae infected by the mutant and the wild type strains, except for the *Caglk1*Δ/Δ single mutant. Seven days post infection, 100% of the larvae were killed by the wild type strain while the survival of the larvae infected by *Cahxk2*Δ/Δ and *Cahxk2glk1*Δ/Δ was still 70% and 85%, respectively. The double glucokinase mutant was also significantly less virulent than the wild type strain, with an intermediary survival rate of 50%. The *Cahxk2*Δ/Δc/c complemented strain revealed a partially restored virulence. These data suggest that strains lacking the hexokinase or both glucokinases show an affected virulence in the *G. mellonella* model.

Secondly, we analyzed the ability of the mutant to kill macrophages at different interaction times using an in vitro model assay (**Figure 7B**). Flow cytometer analysis showed that hexokinase and glucokinase gene deletions did not modify macrophages association with yeast for any strains, except for the *Cahxk2glk1*Δ/Δ double mutant which shows a slightly decreased number of recruited macrophages at the early time of infection

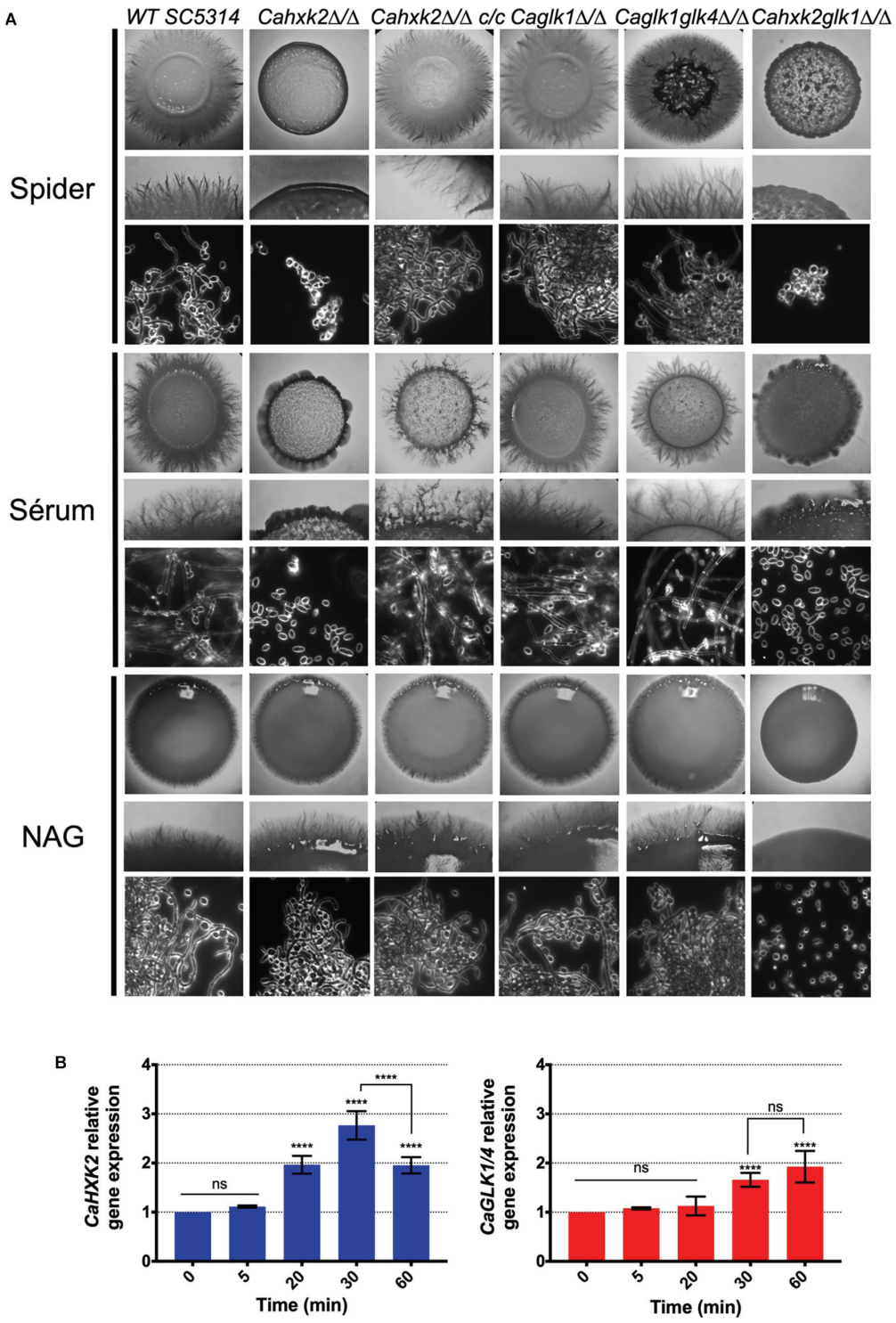


FIGURE 6 | Hexose phosphorylation is required to sustain filamentation. (A) *C. albicans* wild type and mutant strains were grown during 3 days at 37°C on spider, serum or N-acetyl-glucosamine medium. For each medium, the upper and middle panels show photographs of macroscopic appearance of the colonies. Photographs present in the lower panel were obtained using Zeiss Axioskop 2 Plus microscope with dark field and show the microscopic aspect. (B) Relative expression of *CaHXK2* and *CaGLK1/4* in the wild type strain during filamentation after transfer from 0.5% YPG to 5% serum liquid medium. Expression level of *CaHXK2* and *CaGLK1/4* was measured by qPCR, at different time points (0, 5, 20, 30, and 60 min), and normalized to the level of the *Ca*ACT1 mRNA internal control. mRNAs level was expressed relatively to their abundance at time zero, which was set to 1. Results represent a mean (+ standard deviation) of three independent experiments performed on three different biological samples, in duplicate (n = 6); ns, non-significant; ****$P < 0.0001$. P-values were calculated by one-way ANOVA using Tukey's method.

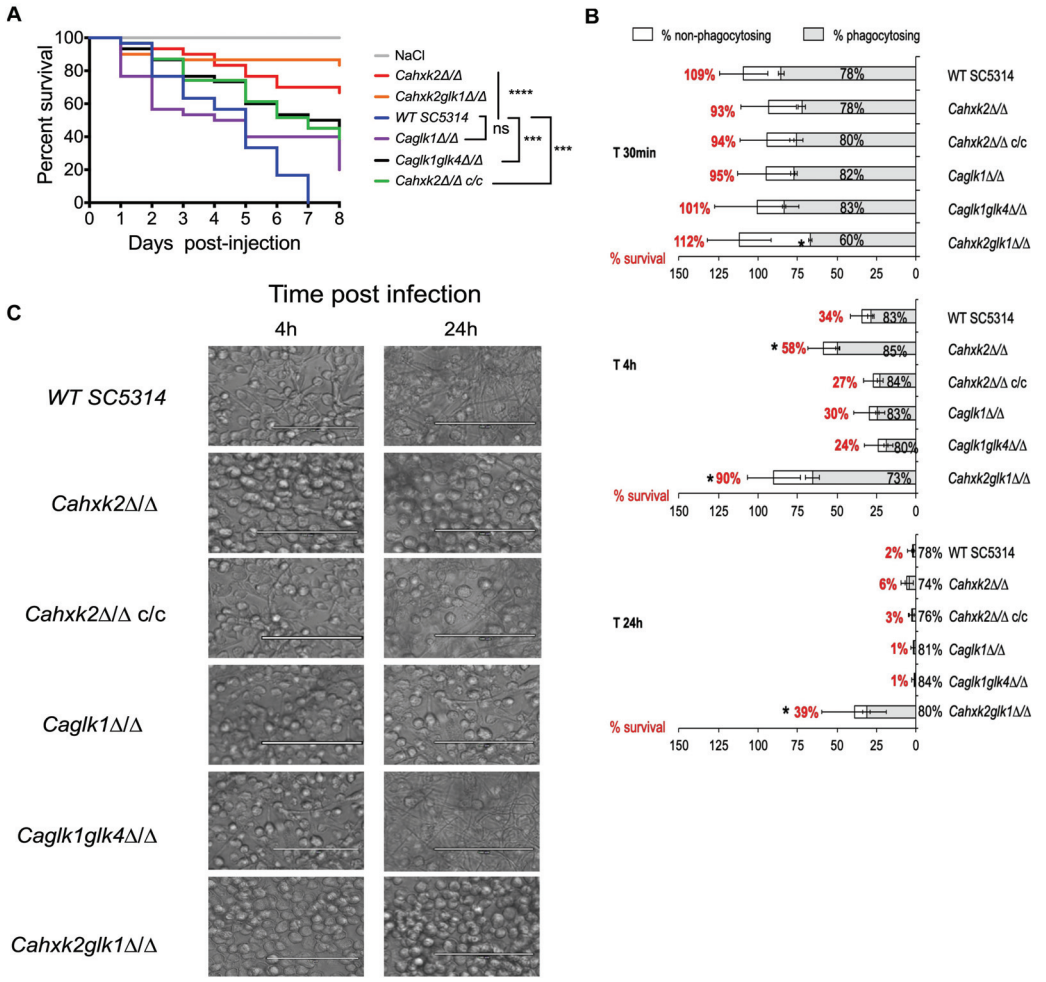


FIGURE 7 | Hexokinase 2 is required for full virulence of *C. albicans*. (A) *Galleria mellonella* model of systemic infection. 2.5 × 10^5 cells of wild type (SC5314), complemented (*Cahxk2*Δ/Δc/c) or hexose kinase mutant strains were injected into the hemocoel at the last left-pro leg of 30 *Galleria* larvae. Sterile NaCl (0.9%) was injected into control larvae. Survival was monitored for 8 days at 37°C and presented in a Kaplan-Meier plot. Statistical analysis was performed using log rank tests; ns, non-significant; ***P = 0.0002; ****P < 0.0001. *Cahxk2*Δ/Δ, *Ca*hxk2glk1Δ/Δ, and *Ca*glk1glk4Δ/Δ mutant strains are significantly less virulent compared to the wild type strain ($P_{value} \leq 0.0001$). The difference observed between *Caglk1*Δ/Δ mutant and the wild type strain is not significant ($P_{value} > 0.05$). The complemented strain exhibits higher virulence than hexokinase mutants but lesser than the wild type ($P_{value} = 0.002$). (B) Flow cytometer analysis of mouse macrophage interaction with live *C. albicans* cells in stationary phase at MOI 1:5 (1 macrophage for 5 yeasts) over a 24-h time course experiment. The horizontal bars represent the macrophage survival, indicated as a percentage on the left side of the bar. The white part of the bars represents the percentage of non-phagocytozing macrophages. The shades tones part represents the percentage of phagocytozing macrophages. Histograms represent a mean of three independent experiments performed on three different biological samples, repeated five times (+ standard deviation). (C) Representative pictures of the J774 macrophages after 4 and 24 h of infection with wild type and hexose kinase mutant strains in culture flasks at MOI 1:5. The scale bars represent 100 μm.

(60% compared to approximately 80% for the other strains). This suggests that the absence of hexokinase or glucokinase has no impact on the recognition step. Survival of macrophages was severely higher when *Cahxk2*Δ/Δ and *Cahxk2glk1*Δ/Δ were tested. After 4 h in the presence of the hexokinase mutant (*Cahxk2*Δ/Δ) the number of alive macrophages was nearly twice as high as in the presence of the wild type strain. Moreover, 90% of the macrophages infected by *Cahxk2glk1*Δ/Δ were still alive after 4 h, while 34% remained alive with the wild type strain. After 24 h, 39% of the macrophages infected with *Cahxk2glk1*Δ/Δ survived, compared to only 2% with the wild type strain and 1% for the other strains. This underlines again the very affected virulence capacities of this double mutant and highlights a role for Glk1 in the absence of Hxk2. Reintegration of the wild type *CaHXK2* gene restored the killing capacities, suggesting that the virulence defect was linked to the absence of *CaHXK2*. As compared to the wild type strain, interactions performed with glucokinase mutants (*Caglk1*Δ/Δ, *Caglk1glk4*Δ/Δ) and macrophages did not reveal significant differences. Because the process of macrophage killing relies on the formation that pierce the phagocytic membrane, the morphogenesis of the strains was analyzed after 4 and 24 h of infection (**Figure 7C**). Our data clearly reveal that *Cahxk2*Δ/Δ and *Cahxk2glk1*Δ/Δ did not develop hyphae during macrophage infection. In order to make sure that

the growth defect of the hexokinase mutant strains was not the main cause for avirulence, *C. albicans* cells were released from macrophage after 4 h of phagocytosis by cell lysis and counted (**Supplementary Figure S2**). As compared to the wild type, there was no significant differences in the capacity of the mutant strains to divide inside the macrophage.

Altogether, these data suggest that the virulence defect associated to the deletion of *Ca*hxk2 could concern the fungal escape phase rather than the recognition and initial phagocytosis step.

DISCUSSION

In this study, we sought to assign functions to the hexokinase and glucokinases that could potentially contribute to the fitness and virulence of *C. albicans*. We showed that hexose phosphorylation is mostly assured by *Ca*Hxk2, which mainly sustains in vitro growth in the presence of hexoses. Hexokinase expression is induced by glucose and higher than glucokinase expression. But proteins are both detectable even in the absence of any phosphorylable hexose. As shown for *S. cerevisiae* glycolytic enzymes, regulation is the result of a complex mixture of gene expression and metabolic effects, in order to optimize simultaneously fluxes, protein and metabolite concentrations (Daran-Lapujade *et al.,* 2007). *C. albicans* inhabits niches containing contrasting carbon sources. Metabolic flexibility implies that alternative carbon sources and glucose are assimilated simultaneously (Barelle *et al.,* 2006; Childers *et al.,* 2016). The discrepancy between *C. albicans* transcriptome and proteome has been already clearly highlighted (Sandai *et al.,* 2012). Upon glucose exposure, *Ca*Icl1 and *Ca*Pck1, enzymes involved in the assimilation of alternative carbon sources are not degraded, while their transcripts are subjected to glucose repression. We can assume that a persistent level of *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1 and *Ca*Glk4 could promote metabolic flexibility and stress response to cope with changing microenvironments reached by the pathogen in the various host niches.

The affected growth profiles of *Cahxk2*Δ/Δ and *Cahxk2glk1*Δ/Δ indicate the limited ability of *Ca*Glk1 and *Ca*Glk4 to allow glucose utilization in the absence of *Ca*Hxk2, while normal growth was observed in the absence of *Ca*Glk1 and/*Ca*Glk4. One possible hypothesis would be a limited glucose uptake caused by the absence of hexokinase. Hence, in *S. cerevisiae* and *K. lactis* glycolytic mutants, glycolysis controls glucose signaling via the SRR pathway. The expression of several glucose-regulated genes, like hexose transporter genes, depends on a functional glycolysis, limiting therefore glucose import (*Ca*irey-Remonnay *et al.,* 2015). However, this control does not seem to exist in *C. albicans*. On the contrary, expression of transporter genes controlled by the SRR pathway (*HGH12*, *HGT7*, *HXT10*) was enhanced in the hexokinase mutant *Cahxk2*Δ/Δ. Therefore, the poor expression of glucokinase genes, the low intracellular concentration of *Ca*Glk1 and *Ca*Glk4 and their low participation in hexose kinase activity, could mainly explain the growth defect in the absence of hexokinase.

Moreover, glycolysis constitutes an interface between metabolism and gene transcription. For instance, glycolysis yields pyruvate which can be oxidized into acetyl-CoA, directly implicated in histone acetylation and gene expression. In stationary yeast cells, increase glucose availability leads to higher levels of acetyl-CoA synthesis, global histone acetylation, accompanied by the induction of a thousand of growth-related genes (Friis *et al.,* 2009). The reduced glycolytic flux of the hexokinase mutant could therefore lead to transcription defects and slower growth. In all the tested conditions, the double mutant *Cahxk2glk1*Δ/Δ presented an altered phenotype. In this context, *Ca*Glk4 is the only hexose kinase enzyme present. Because of the low affinity of *Ca*Glk4 for glucose and its very low expression, growth of *Cahxk2glk1*Δ/Δ is drastically affected in the presence of hexoses. This could be explained by the lack of efficient hexose kinase enzymes. Moreover, hexokinase and glucokinase gene deletions could lead to several drastic intracellular changes. In *S. cerevisiae*, the hxk2 mutant has a higher H^+-ATPase activity and a lower pyruvate decarboxylase activity which coincided with an intracellular accumulation of pyruvate (Diderich *et al.,* 2001). Absence of glucose repression could also contribute to redirect carbon flux. In *K. lactis*, the identification of hexokinase-dependent proteins related to chromatin remodeling, amino acids and protein metabolism, redox maintenance and stress response reinforces the idea that glucose kinase enzymes exert broader functions than hexose phosphorylation and glucose repression (Mates *et al.,* 2014).

Our findings reveal that the well-established bifunctional functions of Hxk2 in *S. cerevisiae* (Herrero *et al.,* 1995; Vega *et al.,* 2016) also exists in *C. albicans*, while glucokinases do not seem to play a role in glucose repression. We detected *Ca*Hxk2-GFP in the nuclei in 0.1% glucose-grown cells (5 mM), which corresponds to the glucose level maintained in the bloodstream and in vaginal secretions (Barelle *et al.,* 2006; Brown *et al.,* 2014). Glucose repression pathway via *Ca*Hxk2, could thereby promote metabolic adaptation to favor the fitness of the pathogen, even in glucose-limited host niches. In response to glucose and according to the *S. cerevisiae* model, *Ca*Hxk2 should act as a transcriptional carbon catabolite corepressor binding to *Ca*Mig1 (Ahuatzi *et al.,* 2007). *C. albicans* has two orthologs of ScMig1, *Ca*Mig1 and *Ca*Mig2 but, to our knowledge, no functions have been assigned yet to *Ca*Mig2. Transcriptional studies realized on *Ca*Mig1 revealed that it regulates a unique set of genes, annotated as carbohydrate uptake and catabolism factors (Murad *et al.,* 2001). However, works conducted on *Ca*Mig1 revealed that it has no phosphorylation sequence for the kinase *Ca*Snf1, essential for the removal of glucose repression (Petter *et al.,* 1997; Zaragoza *et al.,* 2000). Deletion of *Ca*Mig1 has no effect on the expression of *Ca*GAL1, a glucose repressed gene (Zaragoza *et al.,* 2000) but impacts the transcription of hexose transporter genes (Broxton *et al.,* 2018). Moreover, *Ca*Mig1 has been recently implicated in the resistance to weak organic acids, a novel function (Cottier *et al.,* 2015). All these evidences show that some of the molecular mechanisms involved in glucose repression in *C. albicans* remain to be elucidated, in particular concerning the direct partners of *Ca*Hxk2. Moreover, contrary to *S. cerevisiae* (Moreno and Herrero, 2002), *C. albicans* glucokinases are not subjected to glucose repression.

This suggests that glucokinases are not involved into the control of glucose phosphorylation in *C. albicans* and underline their minor role in glucose metabolism.

Contrary to glucokinases, hexokinase gene deletion had an impact on various in vitro stress responses. Glucose has been shown to promote stress resistance and to induce some stress genes in *C. albicans* (Rodaki *et al.,* 2009). Our data support this finding, but furthermore indicate a role for glucose phosphorylation in stress resistance. Osmotic and oxidative stresses induce storage of trehalose, glycerol, and arabitol (Sánchez-Fresneda *et al.,* 2013). Biosynthesis of such osmolyte sugars and polyols, directly connected to the upper part of the glycolytic pathway, depends on glucose-6-phosphate availability. This was confirmed in *S. cerevisiae* where the analysis of metabolic fluxes in a Δhxk2 mutant revealed a synthesis of glycerol reduced by a factor of 4.5 (Raghevendran *et al.,* 2004). Moreover, the carbon source modulates cell wall architecture and strongly influences the resistance of *C. albicans* to osmotic and cell wall stresses. Glucose and lactate-grown cells display significant differences in cell wall elasticity and ultrastructure (Ene *et al.,* 2012). β-Glucans are major constituents of *C. albicans* cell wall. Glucan synthases assemble UDP-glucose residues produced from phosphorylated glucose (Free, 2013). Thus, any hexose phosphorylation defect would affect the cell wall and render it more sensitive to stress.

Glycolytic gene expression has been associated to the global response of *C. albicans* to hypoxia (Synnott *et al.,* 2010). Several transcription factors are involved in hypoxia-responsive expression of glycolytic genes. Among them, the key filamentation regulator Efg1 and the transcription factors Tye7 and Gal4 contribute to the early hypoxic response (Setiadi *et al.,* 2006; Askew *et al.,* 2009; Bonhomme *et al.,* 2011; Sellam *et al.,* 2014). Contrary to *S. cerevisiae* which ferments sugars even under aerobic conditions, *C. albicans*, a crabtree-negative yeast, ferments carbohydrates under hypoxic conditions (Johnston, 1999). Our findings specify a clear and drastic effect of hypoxia on glucokinase expression at the mRNA and protein levels. Glucokinase enzymes could be part of the global early hypoxic response, as a spare wheel, to maintain a necessary glycolytic flux during fermentation conditions in oxygen-poor niches. Moreover, this data confirms the fact that hexokinase and glucokinases are not targeted by the same regulatory pathways.

Our results show that the hexokinase mutant retains the filamentation capacity when the carbon source does not require *Ca*Hxk2 to be assimilated. Thus, the filamentation-defective phenotype of the hexokinase mutant could be linked to a phosphorylation defect. The absence of one or both glucokinases has no impact on filamentation. This could be related to their low contribution to hexose phosphorylation and, concerning the spider medium, because glucokinases do not phosphorylate fructose. The activities of several major glycolytic enzymes are known to differ in yeast and hyphal forms (Schwartz and Larsh, 1982). We have shown that induction of filamentation requires upregulation of hexose kinase genes. The morphological switch to filamentous growth requires energy and carbon source, notably to build membranes and cell walls. Thereby, several links between morphogenesis and expression of metabolic genes are established in *C. albicans*.

The transcription factor Efg1, part of a Ras-cAMP-PKA signaling network and involved in morphogenesis in *C. albicans*, strongly induces glycolytic and fermentation genes (Doedt *et al.,* 2004). Moreover, mutants of the *Ca*Hgt4/*Ca*Rgt1 pathway (SRR pathway) involved in the control of gene expression in the absence of glucose display affected filamentation phenotypes (Brown *et al.,* 2006; Sexton *et al.,* 2007). Thus, nested pathways control simultaneously morphogenesis, glucose signaling and metabolism and by this way *Ca*Hxk2, which directly impacts on filamentation through its kinase activity.

The hypovirulence of the hexokinase mutant suggests a central function for *Ca*Hxk2. We have shown that the glucose phosphorylation step controls filamentation. Morphological switch is a determining factor of virulence in both *Galleria* and macrophage models. Hyphae are observed in the *G. mellonella* infected tissues (Fuchs *et al.,* 2010). Histological investigations of infected larvae revealed that the SC5314 wild type strain shows a high propensity to filament, leading to gut invasion (Perdoni *et al.,* 2014). Time-lapse microscopy studies have shown a strong correlation between intra-phagocytic hyphal growth and macrophage lysis (Bain *et al.,* 2015). Numerous experimental data support a model by which *C. albicans* hyphae enable escape from phagocytes by growing and consequently lysing the cell (Erwig and Gow, 2016). *Ca*Hxk2 could then be required to sustain filamentation within the host cell. Moreover, the impact could be situated at the metabolic level. *C. albicans* hexokinase and double glucokinase mutants could degrade trehalose, major hemolymph sugar in *G. mellonella* larvae (Shukla *et al.,* 2015) to recover glucose, but remain unable or less efficient to phosphorylate it, respectively. Recently, Tucey *et al.* (2018) revealed concomitant up-regulation of host and pathogen glycolysis, setting up glucose competition by depleting glucose. *C. albicans*-activated macrophages shift to Warburg metabolism and become dependent on glucose for survival. During macrophage infection, both *C. albicans* free cells and escaped from macrophage could trigger rapid death to the phagocytes by depleting glucose levels. The hexokinase mutant could not compete efficiently for glucose and then turn out to be hypovirulent. Affected metabolic capacities of the hexokinase mutant, along with a less effective stress resistance and adaptation to hypoxic environments could impact colonization of host environments. When hexoses are naturally available like in the gastrointestinal tract, in the bloodstream or on epithelial cell surfaces, budding growth may depend on the optimal functioning of the hexokinase. Infection and invasion of cells, tissues and organs is associated to morphological plasticity of *C. albicans*. Infection hyphae actively adhere and penetrate into epithelial cells or induce their endocytic uptake (Dalle *et al.,* 2010; Martin *et al.,* 2011). Thus, filamentation defects of the mutant strain *Ca*hxk2 could also impact on its invasion capacities. Barelle *et al.* (2006) showed, using GFP fusions, that glyoxylate cycle and gluconeogenic genes are repressed by physiologically relevant concentrations of glucose during kidney infection. Thus, *C. albicans* cells growing in the mouse kidney model are supposed

to assimilate carbon via glycolytic metabolism. Consequently, a decreased glycolytic activity could also directly impact on the invasion and infection capacities of the pathogen.

Our data decipher the role of glucose kinase enzymes, not only as a central point of metabolism, but also as actors in regulation, stress response and morphogenesis. Altogether, those different interconnected functions influence the virulence of the yeast. Surprisingly, while the lack of glucokinases did not impact on the phenotype of the mutants, *Ca*Glk1 clearly appeared implicated in the hypoxic response. Moreover, the fact that hexose transporter gene expression level is affected in *Caglk1glk4Δ/Δ* suggests that glucokinases could be implicated in regulation processes that remain to be elucidated. Future research might provide further insights in this challenging area.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RL and PC designed and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. KD and BD performed the experiments, contributed to the manuscript writing and data analysis. AS, TN, and ML contributed to manuscript writing and data analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Jade Ravent for technical assistance. We thank J. Morschhäuser and S. Bates for providing the pSFS2A and pGFP-NAT1 plasmids, respectively. The RT-qPCR experiments were performed thanks to the DTAMB (Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité, Université Lyon 1). RL was the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche of France. This work was released as a preprint at BioRxiv, https://doi.org/10.1101/448373, (Laurian *et al.,* 2018).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00327/full#supplementary-material

REFERENCES

Ahuatzi, D., Riera, A., Peláez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2007). Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. J. Biol. Chem. 282, 4485–4493. doi: 10.1074/jbc.M606854200

Armstrong-James, D., Meintjes, G., and Brown, G. D. (2014). A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. Trends Microbiol. 22, 120–127. doi: 10.1016/j.tim.2014.01.001

Askew, C., Sellam, A., Epp, E., Hogues, H., Mullick, A., Nantel, A., *et al*. (2009). Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. PLoS Pathog. 5:e1000612. doi: 10.1371/journal.ppat.1000612

Bain, J., Gow, N. A. R., and Erwig, L.-P. (2015). Novel insights into host-fungal pathogen interactions derived from live-cell imaging. Semin. Immunopathol. 37, 131–139. doi: 10.1007/s00281-014-0463-3

Barelle, C. J., Priest, C. L., Maccallum, D. M., Gow, N. A. R., Odds, F. C., and Brown, A. J. P. (2006). Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. Cell. Microbiol. 8, 961–971. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00676.x

Bernardo, S. M. H., Gray, K.-A., Todd, R. B., Cheetham, B. F., and Katz, M. E. (2007). Characterization of regulatory non-catalytic hexokinases in *Aspergillus nidulans*. Mol. Genet. Genom. 277, 519–532. doi: 10.1007/s00438-006-0203-z

Biswas, S., Van Dijck, P., and Datta, A. (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71, 348–376. doi: 10.1128/MMBR.00009-06

Bonhomme, J., Chauvel, M., Goyard, S., Roux, P., Rossignol, T., and d'Enfert, C. (2011). Contribution of the glycolytic flux and hypoxia adaptation to efficient biofilm formation by *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 80, 995–1013. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07626.x

Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 7290–7294. doi: 10.1073/pnas.89.16.7290

Brown, A. J. P., Brown, G. D., Netea, M. G., and Gow, N. A. R. (2014). Metabolism impacts upon *Ca*ndida immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. Trends Microbiol. 22, 614–622. doi: 10.1016/j.tim.2014.07.001

Brown, A. J. P., Odds, F. C., and Gow, N. A. R. (2007). Infection-related gene expression in *Candida albicans*. Curr. Opin. Microbiol. 10, 307–313. doi: 10.1016/j.mib.2007.04.001

Brown, V., Sexton, J. A., and Johnston, M. (2006). A glucose sensor in *Candida albicans*. Eukaryot. Cell 5, 1726–1737. doi: 10.1128/EC.00186-06

Broxton, C. N., He, B., Bruno, V. M., and Culotta, V. C. (2018). A role for *Ca*ndida *albicans* superoxide dismutase enzymes in glucose signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. 495, 814–820. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.084

*Ca*irey-Remonnay, A., Deffaud, J., Wésolowski-Louvel, M., Lemaire, M., and Soulard, A. (2015). Glycolysis controls plasma membrane glucose sensors to promote glucose signaling in yeasts. Mol. Cell. Biol. 35, 747–757. doi: 10.1128/MCB.00515-14

*Ca*lderone, R. A., and Clancy, C. J. (2012). *Ca*ndida and *Ca*ndidiasis. Washington, DC: ASM Press.

Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., and Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. Biochim. Biophys. Acta 1401, 242–264. doi: 10.1016/S0167-4889(97)00150-X

Childers, D. S., Raziunaite, I., Mol Avelar, G., Mackie, J., Budge, S., Stead, D., *et al*. (2016). The rewiring of ubiquitination targets in a pathogenic yeast promotes metabolic flexibility, host colonization, and virulence. PLoS Pathog. 12:e1005566. doi: 10.1371/journal.ppat.1005566

Collart, M. A., and Oliviero, S. (2001). Preparation of yeast RNA. Curr. Protoc. Mol. Biol. 23, 13.12.1–13.12.5. doi: 10.1002/0471142727.mb1312s23

Corvey, C., Koetter, P., Beckhaus, T., Hack, J., Hofmann, S., Hampel, M., *et al*. (2005). *Ca*rbon Source-dependent assembly of the Snf1p kinase complex in *Ca*ndida *albicans*. J. Biol. Chem. 280, 25323–25330. doi: 10.1074/jbc.M503719200

Cottier, F., Tan, A. S. M., Xu, X., Wang, Y., and Pavelka, N. (2015). *MIG1* regulates resistance of *Candida albicans* against the fungistatic effect of weak organic acids. Eukaryot. Cell 14, 1054–1061. doi: 10.1128/EC.00129-15

Dalle, F., Wächtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., *et al*. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. Cell. Microbiol. 12, 248–271. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01394.x

Daran-Lapujade, P., Rossell, S., van Gulik, W. M., Luttik, M. A. H., de Groot, M. J. L., Slijper, M., *et al*. (2007). The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 15753–15758. doi: 10.1073/pnas.0707476104

Dementhon, K., El-Kirat-Chatel, S., and Noël, T. (2012). Development of an in vitro model for the multi-parametric quantification of the cellular interactions between *Ca*ndida yeasts and phagocytes. PLoS One 7:e32621. doi: 10.1371/journal.pone.0032621

Diderich, J. A., Raamsdonk, L. M., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A., and Van Dam, K. (2001). Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from

which hexokinase II has been deleted. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1587–1593. doi: 10.1128/AEM.67.4.1587-1593.2001

Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmühl, D. P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C. L., *et al*. (2004). APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. Mol. Biol. Cell 15, 3167–3180. doi: 10.1091/mbc.e03-11-0782

Eisman, B., Alonso-Monge, R., Román, E., Arana, D., Nombela, C., and Pla, J. (2006). The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. Eukaryot. Cell 5, 347–358. doi: 10.1128/EC.5.2.347-358.2006

Ene, I. V., Adya, A. K., Wehmeier, S., Brand, A. C., Mac*Ca*llum, D. M., Gow, N. A. R., *et al*. (2012). Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. Cell. Microbiol. 14, 1319–1335. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01813.x

Ene, I. V., Cheng, S.-C., Netea, M. G., and Brown, A. J. P. (2013). Growth of *Ca*ndida *albicans* cells on the physiologically relevant carbon source lactate affects their recognition and phagocytosis by immune cells. Infect. Immun. 81, 238–248. doi: 10.1128/IAI.01092-12

Erwig, L. P., and Gow, N. A. R. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. Nat. Rev. Microbiol. 14, 163–176. doi: 10.1038/nrmicro.2015.21

Fan, J., Chaturvedi, V., and Shen, S.-H. (2002). Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Ca*ndida *albicans*. J. Mol. Evol. 55, 336–346. doi: 10.1007/s00239-002-2330-4

Fernández-García, P., Peláez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2012). Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling. J. Biol. Chem. 287, 42151–42164. doi: 10.1074/jbc.M112.401679

Flores, C. L., Rodríguez, C., Petit, T., and Gancedo, C. (2000). *Ca*rbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. FEMS Microbiol. Rev. 24, 507–529. doi: 10.1016/S0168-6445(00)00037-1

Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. Adv. Genet. 81, 33–82. doi: 10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6

Friis, R. M. N., Wu, B. P., Reinke, S. N., Hockman, D. J., Sykes, B. D., and Schultz, M. C. (2009). A glycolytic burst drives glucose induction of global histone acetylation by picNuA4 and SAGA. Nucleic Acids Res. 37, 3969–3980. doi: 10.1093/nar/gkp270

Fuchs, B. B., Eby, J., Nobile, C. J., El Khoury, J. B., Mitchell, A. P., and Mylonakis, E. (2010). Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. Microbes Infect. 12, 488–496. doi: 10.1016/j.micinf.2010.03.001

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. doi: 10.1007/BF00328721

Herrero, P., Galíndez, J., Ruiz, N., Martínez-*Ca*mpa, C., and Moreno, F. (1995). Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae HXK1*, *HXK2* and *GLK1* genes. Yeast 11, 137–144. doi: 10.1002/yea.320110205

Jarvis, W. R., and Martone, W. J. (1992). Predominant pathogens in hospital infections. J. Antimicrob. Chemother. 29(Suppl. A), 19–24. doi: 10.1093/jac/29.suppl_A.19

Johnston, M. (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. Trends Genet. 15, 29–33. doi: 10.1016/S0168-9525(98)01637-0

Kuser, P. R., Krauchenco, S., Antunes, O. A., and Polikarpov, I. (2000). The high-resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. J. Biol. Chem. 275, 20814–20821. doi: 10.1074/jbc.M910412199

Kuzmic, P. (1996). Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. Anal. Biochem. 237, 260–273. doi: 10.1006/abio.1996.0238

Laurian, R., Dementhon, K., Doumèche, B., Soulard, A., Noel, T., Lemaire, M., *et al*. (2018). Hexokinase and glucokinases are essential for fitness and virulence in the pathogenic yeast *Candida albicans*. bioRXiv [Preprint]. doi: 10.1101/448373

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. doi: 10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004

Lorenz, M. C., and Fink, G. R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. Nature 412, 83–86. doi: 10.1038/35083594

Martin, R., Wächtler, B., Schaller, M., Wilson, D., and Hube, B. (2011). Host–pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. Int. J. Med. Microbiol. 301, 417–422. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.04.009

Mates, N., Kettner, K., Heidenreich, F., Pursche, T., Migotti, R., Kahlert, G., *et al*. (2014). Proteomic and functional consequences of hexokinase deficiency in glucose repressible *Kluyveromyces lactis*. Mol. Cell. Proteom. 13, 860–875. doi: 10.1074/mcp.M113.032714

Milne, S. W., Cheetham, J., Lloyd, D., Aves, S., and Bates, S. (2011). *Ca*ssettes for PCR-mediated gene tagging in *Candida albicans* utilizing nourseothricin resistance. Yeast 28, 833–841. doi: 10.1002/yea.1910

Miramón, P., and Lorenz, M. C. (2017). A feast for *Ca*ndida: metabolic plasticity confers an edge for virulence. PLoS Pathog. 13:e1006144. doi: 10.1371/journal.ppat.1006144

Moreno, F., Ahuatzi, D., Riera, A., Palomino, C. A., and Herrero, P. (2005). Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. Biochem. Soc. Trans. 33, 265–268. doi: 10.1042/BST0330265

Moreno, F., and Herrero, P. (2002). The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 26, 83–90. doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00600.x

Murad, A. M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., *et al*. (2001). Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors *Ca*Tup1, *Ca*Mig1 and *Ca*Nrg1. Mol. Microbiol. 42, 981–993. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02713.x

Noble, S. M., Gianetti, B. A., and Witchley, J. N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. Nat. Rev. Microbiol. 15, 96–108. doi: 10.1038/nrmicro.2016.157

Odds, F. C. (1988). *Ca*ndida and *Ca*ndidosis. London: Bailliere Tindall Press.

Perdoni, F., Falleni, M., Tosi, D., Cirasola, D., Romagnoli, S., Braidotti, P., *et al*. (2014). A histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. Eur. J. Histochem. 58:2428. doi: 10.4081/ejh.2014.2428

Pérez, J. C., Kumamoto, C. A., and Johnson, A. D. (2013). *Ca*ndida *albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. PLoS Biol. 11:e1001510. doi: 10.1371/journal.pbio.1001510

Perlroth, J., Choi, B., and Spellberg, B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. Med. Mycol. 45, 321–346. doi: 10.1080/13693780701218689

Petter, R., Chang, Y. C., and Kwon-Chung, K. J. (1997). A gene homologous to *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 appears to be essential for the viability of *Candida albicans*. Infect. Immun. 65, 4909–4917.

Raghevendran, V., Gombert, A. K., Christensen, B., Kötter, P., and Nielsen, J. (2004). Phenotypic characterization of glucose repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae* using experiments with 13C-labelled glucose. Yeast 21, 769–779. doi: 10.1002/yea.1136

Randez-Gil, F., Herrero, P., Sanz, P., Prieto, J. A., and Moreno, F. (1998). Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 425, 475–478. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00289-0

Rao, K. H., Ghosh, S., Natarajan, K., and Datta, A. (2013). N-acetylglucosamine kinase, *HXK1* is involved in morphogenetic transition and metabolic gene expression in *Candida albicans*. PLoS One 8:e53638. doi: 10.1371/journal.pone.0053638

Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., and Morschhäuser, J. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. Gene 341, 119–127. doi: 10.1016/j.gene.2004.06.021

Rodaki, A., Bohovych, I. M., Enjalbert, B., Young, T., Odds, F. C., Gow, N. A. R., *et al*. (2009). Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. Mol. Biol. Cell 20, 4845–4855. doi: 10.1091/mbc.e09-01-0002

Rolland, F., Wanke, V., *Ca*uwenberg, L., Ma, P., Boles, E., Vanoni, M., *et al*. (2001). The role of hexose transport and phosphorylation in cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 1, 33–45.

Rolland, S., Hnatova, M., Lemaire, M., Leal-Sanchez, J., and Wésolowski- Louvel, M. (2006). Connection between the Rag4 glucose sensor and the KlRgt1 repressor in *Kluyveromyces lactis*. Genetics 174, 617–626. doi: 10.1534/genetics.106.059766

Sabina, J., and Brown, V. (2009). Glucose sensing network in *Candida albicans*: a sweet spot for fungal morphogenesis. Eukaryot. Cell 8, 1314–1320. doi: 10.1128/EC.00138-09

Sánchez-Fresneda, R., Guirao-Abad, J. P., Argüelles, A., González-Párraga, P., Valentín, E., and Argüelles, J.-C. (2013). Specific stress-induced storage of

trehalose, glycerol and D-arabitol in response to oxidative and osmotic stress in *Candida albicans*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 430, 1334–1339. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.118

Sandai, D., Yin, Z., Selway, L., Stead, D., Walker, J., Leach, M. D., *et al*. (2012). The evolutionary rewiring of ubiquitination targets has reprogrammed the regulation of carbon assimilation in the pathogenic yeast *Ca*ndida *albicans*. MBio 6:e2489-14. doi: 10.1128/mBio.00495-12

Schwartz, D. S., and Larsh, H. W. (1982). Comparative activities of glycolytic enzymes in yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. Mycopathologia 78, 93–98. doi: 10.1007/BF00442632

Sellam, A., van het Hoog, M., Tebbji, F., Beaurepaire, C., Whiteway, M., and Nantel, A. (2014). Modeling the transcriptional regulatory network that controls the early hypoxic response in *Ca*ndida *albicans*. Eukaryot. Cell 13, 675–690. doi: 10.1128/EC.00292-13

Setiadi, E. R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C., and Ernst, J. F. (2006). Transcriptional response of *Ca*ndida *albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. J. Mol. Biol. 361, 399–411. doi: 10.1016/j.jmb.2006.06.040

Sexton, J. A., Brown, V., and Johnston, M. (2007). Regulation of sugar transport and metabolism by the *Candida albicans* Rgt1 transcriptional repressor. Yeast 24, 847–860. doi: 10.1002/yea.1514

Shukla, E., Thorat, L. J., Nath, B. B., and Gaikwad, S. M. (2015). Insect trehalase: physiological significance and potential applications. Glycobiology 25, 357–367. doi: 10.1093/glycob/cwu125

Synnott, J. M., Guida, A., Mulhern-Haughey, S., Higgins, D. G., and Butler, G. (2010). Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. Eukaryot. Cell 9, 1734–1746. doi: 10.1128/EC.00159-10

Tucey, T. M., Verma, J., Harrison, P. F., Snelgrove, S. L., Lo, T. L., Scherer, A. K., *et al*. (2018). Glucose homeostasis is important for immune cell viability during *Ca*ndida challenge and host survival of systemic fungal infection. Cell Metab. 27, 988–1006.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.019

Vega, M., Riera, A., Fernández-Cid, A., Herrero, P., and Moreno, F. (2016). Hexokinase 2 is an intracellular glucose sensor of yeast cells that maintains the structure and activity of Mig1 protein repressor complex. J. Biol. Chem. 291, 7267–7285. doi: 10.1074/jbc.M115.711408

Walther, A., and Wendland, J. (2003). An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. Curr. Genet. 42, 339–343. doi: 10.1007/s00294-002-0349-0

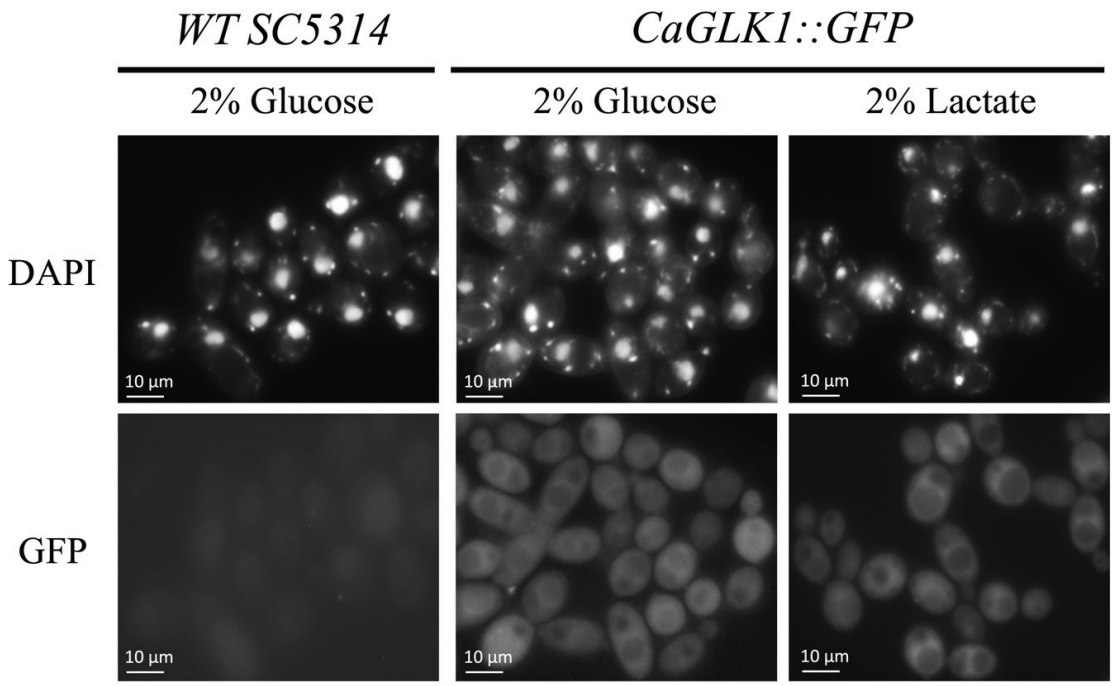
Wilson, D., Thewes, S., Zakikhany, K., Fradin, C., Albrecht, A., Almeida, R., *et al*. (2009). Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. FEMS Yeast Res. 9, 688–700. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00524.x

Yamada-Okabe, T., Sakamori, Y., Mio, T., and Yamada-Okabe, H. (2001). Identification and characterization of the genes for N-acetylglucosamine kinase and N-acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Eur. J. Biochem. 268, 2498–2505. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02135.x

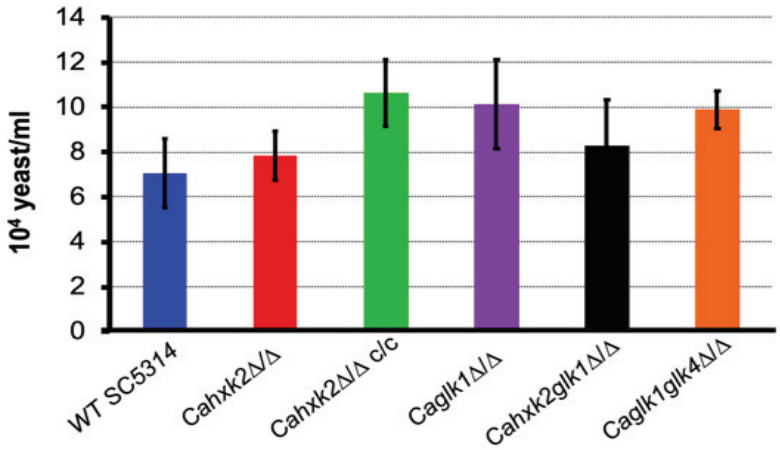
Zaragoza, O., Rodríguez, C., and Gancedo, C. (2000). Isolation of the *MIG1* gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. J. Bacteriol. 182, 320–326. doi: 10.1128/JB.182.2.320-326.2000

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

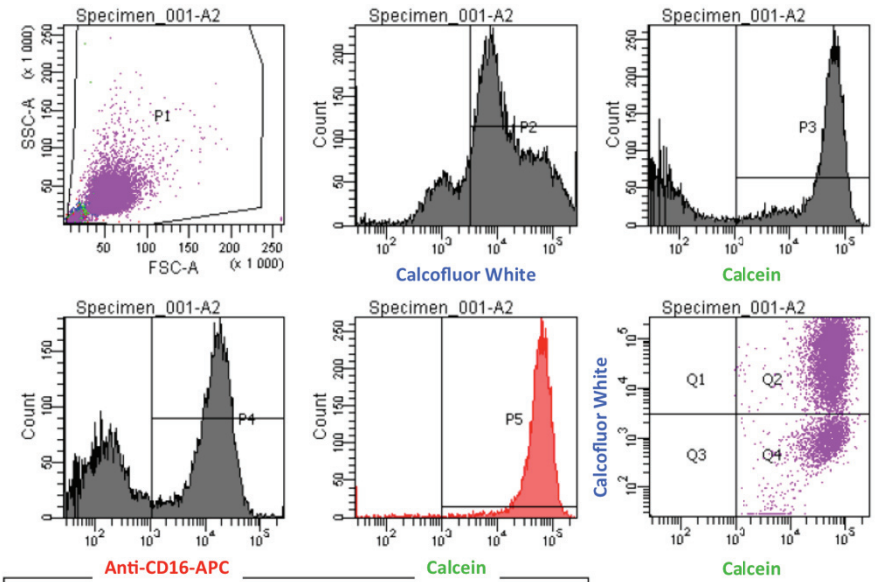
Copyright © 2019 Laurian, Dementhon, Doumèche, Soulard, Noel, Lemaire and Cotton. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Supplementary Figure S1. Localization of CaGlk1-GFP. Subcellular localization of CaGlk1-GFP was followed using fluorescence microscopy. Direct visualization of CaGlk1-GFP in live cells of *C. albicans* was performed as described in the methods section. Nuclei were identified using DAPI staining. Transformants expressing CaGlk1-GFP were grown on medium containing 2% glucose or lactate as carbon source. GFP and DAPI localization was monitored in live cell cultures using a Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescence microscope. Images were taken with a Zeiss AxioCam MR camera using AxioVision software.



Supplementary Figure S2. *C. albicans* wild type and mutant strains divide equally during macrophage phagocytosis.



Well: A2

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	16 131	####	100,0
P1	15 800	97,9	97,9
P2	12 924	80,1	80,1
P3	8 128	50,4	50,4
P4	7 294	45,2	45,2
P5	7 153	98,1	44,3
Q1	0	0,0	0,0
Q2	5 309	74,2	32,9
Q3	0	0,0	0,0
Q4	1 844	25,8	11,4

Supplementary Figure S3 . Flow cytometry gating strategy. The P5 cells, positive for both anti-CD16-APC and calcein fluorescence, are alive macrophages. Among P5 cells, those positive for Calcofluor White fluorescence (Q2 population) are engaged in phagocytosis with yeast.

Supplementary data S1. Construction of deletion and complementation cassettes.

For the disruption of the *CaHXK2* gene, a deletion cassette containing the *SAT1* flipper (Reuβ *et al*., 2004) flanked by 458 bp of the 5' region and 484 bp of the 3' region was assembled by short fragment homology (SFH) and cloned in pUC18 by SLIC (one step sequence and ligation independent cloning) to construct plasmid pCaPC1 (Supplementary Table S4). Primers p1 and p2 (Supplementary Table S4) were used to amplify a 458 bp upstream region (position -5 to -463). Primer p1 was flanked by 20 bp homologous to the pUC18 polylinker region, including the *SmaI* restriction site for further cloning by SLIC in pUC18. Primer p2 contained a 16 bp region complementary to the 5' end of the *SAT1* flipper cassette. Primers p3 and p4 (Supplementary Table S4) were used to amplify the *SAT1* flipper cassette from plasmid pSFS2A (kindly provided by J. Morschhäuser). A 484 bp downstream region starting immediately after the stop codon was amplified using p5 and p6 (S4 Table). p6 was flanked by 20 pb including the *Sma*I site, situated on the opposite part of the polylinker. The upstream and downstream fragments were then assembled to the *SAT1* cassette by SFH homology using the PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara) and then integrated in the *Sma*I linearized pUC18 by SLIC to generate the pCaPC1 plasmid (Supplementary Table S4). For *CaHXK2* deletion experiments pCaPC1 was digested by *Sma*I and the whole digestion mix was used for transformation experiments.

For the complementation of the *CaHXK2* gene, a *CaHXK2* genomic region spanning from -473 bp before the start codon to +363 bp after the stop codon, was amplified using primers p42 and p43 (S4 Table) containing respectively *Sph*I and *Sal*I restriction sites, to be inserted in the pUC18 vector by the SLIC technique to generate the pUC*HXK2* plasmid (Supplementary Table S4). The *SAT1* flipper cassette flanked by 488 bp of the downstream *HXK2* region was amplified with primers p44 and p45 (containing respectively *Sal1* and *Xma1* restriction sites) using pCaPC1 plasmid DNA as template. This fragment was then cloned by SLIC in pUC*HXK2* linearized by *Sal1* and *Xma1* to form pCa*HXK2*c (S3 Table). For *CaHXK2* complementation experiments pCa*HXK2*c was digested by *Sph*1 and *Sal*1 and the whole digestion mix was used for transformation experiments.

To construct the *Caglk1*Δ/Δ strain, the *SAT1* flipper cassette was amplified from pSFS2A (Supplementary Table S2) using modified primers p75 and p76 (Supplementary Table S4), flanked by 80 complementary bp positioned before the start codon for the 5' primer and before the stop codon for the 3' primer for each gene.

For the *Caglk1glk4*Δ/Δ mutant, because of the high identity of the *CaGLK1* and *CaGLK4* nucleotide regions, both *CaGLK4* alleles were partially deleted in a *glk1*Δ/Δ strain, to be able to discriminate *CaGLK1* and *CaGLK4* deletions by PCR strategy. For this purpose, *CaGLK4* complementary regions of the deletion primers p100 and p101 (Supplementary Table S4), containing also complementary regions of the *SAT1* flipper cassette, were positioned 380 bp and 617 bp after the start codon, which allowed the deletion of 237 bp of the coding sequence corresponding to the hexose fixation domain.

Couples of primers p84 and p85, p88 and p89 (Supplementary Table S4) were used to amplify the *GFP* tagging cassettes, then used to target insertion to the 3' end of *CaHXK2* and *CaGLK1*, respectively. We made sure that CaGlk1 was tagged (and not CaGlk4) by using primers p80 and p79 (Supplementary Table S4) specific from the 5' regions of *CaGLK1* and *CaGLK4* respectively, and p82 common to both coding sequences.

Supplementary Table S1 . *C. albicans* strains used in this study.

Strains	Parent	Genotype	Reference
SC5314	-	Wild-type strain	Gillum *et al*., 1984
*Cahxk2*Δ/Δ	SC5314	*Δhxk2::FRT/ Δhxk2::FRT*	this study
*Cahxk2*Δ/Δ *c/c*	*Cahxk2*Δ/Δ	*HXK2::FRT/ HXK2::FRT*	this study
*Caglk1*Δ/Δ	SC5314	*Δglk1::FRT/ Δglk1::FRT*	this study
*Caglk1glk4*Δ/Δ	*Caglk1*Δ/Δ	*Δglk1::FRT/ Δglk1::FRT Δglk4::FRT/ Δglk4::FRT*	this study
*Cahxk2glk1*Δ/Δ	*Caglk1*Δ/Δ	*Δhxk2::FRT/ Δhxk2::FRT Δglk1::FRT/ Δglk1::FRT*	this study
CaHXK2-GFP	SC5314	*HXK2/HXK2::GFP-NAT1*	this study
CaGLK1-GFP	SC5314	*HXK2/GLK1::GFP-NAT1*	this study

Supplementary Table S2. Plasmids used in this study.

Plasmid	Characteristics	Source or reference
pSFS2A	pBCSK+ carrying the *SAT1* flipper cassette	Reuβ *et al*., 2004
pGFP-NAT1	pCR2.1 carrying a carboxyterminus GFP protein tagging cassette and the *NAT 1* resistance marker	Milne *et al*., 2011
pCaPC1	pUC18 carrying the *CaHXK2* deletion cassette	This study
pUC*HXK2*	pUC18 carrying the wild type genomic region of *CaHXK2*	This study
pCa*HXK2*c	pCaPC1 carrying the wild type genomic region of *CaHXK2*	This study

Supplementary Table S3 . Primers used in this study.

Name	Use	Sequence 5'->3'
p1 (F)	*CaHXK2* deletion	ATTCGAGCTCGGTACCCGGgctggccccatgggaataacc
p2 (R)	*CaHXK2* deletion	GAGGGGGGGCCCGGTAaccgagatgcaccattgtaag
p3 (F)	*CaHXK2* deletion	GTACCGGGCCCCCCCTCGA
p4 (R)	*CaHXK2* deletion	GGCCGCTCTAGAACTAGTGGATC
p5 (F)	*CaHXK2* deletion	GATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCcgttggtttgttgggtgctt
p6 (R)	*CaHXK2* deletion	CGACTCTAGAGGATCCCCGGGcagcggtttgagaatcacttc
p42 (F)	*CaHXK2* complementation	CAGTGCCAAGCTTGCATGCggccccatgggaataacctg
p43 (R)	*CaHXK2* complementation	GGGATCCTCTAGAGTCGACgggacatcagtggtgtgtg
p44 (F)	*CaHXK2* complementation	CCACTGATGTCCCCGTCGACCttacaatggtgcatctcggt
p45 (R)	*CaHXK2* complementation	TTCGAGCTCGGTACCCGGGcagcgttgagaatcacttcatc
p75 (F)	*CaHXK2* complementation	AGACTGCTTTCCCAAAACTTCTTTTATTGTTTGTTCATTTAA GTTAAACTTTAAACTCTATTAATATCTATATTTCTCCATCATT C gtaccgggcccccccctcga
p76 (R)	*CaHXK2* complementation	TGCGGTACTGGCACACAATGCTGCACCAACGCCTGACCCA TCTTTGGCGATCTTCAAATGAATCTTTTTATTGGTGCCCTTC AAAGggccgctctagaactagtggat
p79 (F)	*CaGLK1* 5'region (specific)	CAAAACTGTGTTATTGTTTCAG
p80 (F)	*CaGLK4* 5'region (specific)	CTATATTTCCCAGGCAAACC
p82 (R)	*CaGLK1/CaGLK4* coding sequence	CATAGGTTGGAATCATAGGC
p84 (F)	*CaHXK2* GFP tagging	GGTAGTGGTGTTGGTGCTGCCGTTATTGCTGCTTTGACCGA AAAGAGATTAAAAGAAGGTAAATCCGTTGGTTTGTTGGGT GCTggtggtggttctaaaggtgaagaattatt
p85 (R)	*CaHXK2* GFP tagging	ATTTTTGTCAAAACTGTCATGATACACATTACAAAACATAA AACATATCTAAACTAAAACCCAGAGTTTAAACATTGTACTT TTTcgttagtatcgaatcgacagc
p88 (F)	*CaGLK1* GFP tagging	CTTTGAAGGGCACCAATAAAAAGATTCATTTGAAGATCGC CAAAGATGGGTCAGGCGTTGGTGCAGCATTGTGTGCCAGT ACCGCAggtggtggttctaaaggtgaagaattatt
p89 (R)	*CaGLK1* GFP tagging	GGTTATAATAGTCTGTATAATATTCGTATATTCAAAACTAC TTTGGTCAACAATTGTAGAAATATTTGAAACCAACAcgttagta tcgaatcgacagc
p100 (F)	*CaGLK4* deletion	AATCCCTGTGGATTTGATGAAAGCAGAAAAGTCCAATGAT TTATTTGGTTTTTTGGCAAAGAAAGTCCAATCTTTCTTACTg taccgggcccccctcga
p101 (R)	*CaGLK4* deletion	TCCTGTACCAAAAATACAACCAATGATTGTGTTTCTGTTTG TCTTTGCTGAGTCATTGGAGTAAGCAGCAGTAAGCAAAGgg ccgctctagaactagtggat
pACT1 (F)	*CaACT1* amplification	ATTGTTTCCAACTGGGACGAT
pACT1 (R)	*CaACT1* amplification	GATGTTCTTCTGGAGCAACTCT
pGLK1 (F)	*CaGLK1* amplification	TTACTGCTGCTTACTCCAATGACT
pGFLK1 (R)	*CaGLK1* amplification	TTATCCAGCTTCTCAAAACCGTA
pHXK2 (F)	*CaHXK2* amplification	TTATCCAGCTTCTCAAAACCGTA
pHXK2 (R)	*CaHXK2* amplification	AATTGACCAGCCTTTAGTCCA
pICL1(F)	*CaICL1* amplification	CTACTTTATCATTGGTGCCACTAACCC
pICL1(R)	*CaICL1* amplification	AGACTCAATGGCAGCTAATTCGTTACC
pPCK1(F)	*CaPCK* amplification	GGTCCAAAAGTTGTCTCTTAATACCG
pPCK1(R)	*CaPCK* amplification	GCACCAGTAGATGAGATAGTAGTACC

Supplementary Table S4. Glucose and ATP binding sites and structural domains of yeast hexokinases and glucokinases

Kinase	**ScHxk2**	**CaHxk2**	**ScGlk1**	**CaGlk1**
Small Domain	75-209	75-208	75-216	62-200
Large Domain	210-458	209-455	217-487	201-459
Glucose binding site	Ser158, Thr175, Lys176, Asp211*, Asn237, Glu269, Glu302	Ser157, Thr174, Lys175, Asp210*, Asn236, Glu268, Glu300	Ser164, Thr181, Lys182, Asp218*, Asn255, Glu289, Glu323	Ser149, Thr166, Lys167, Asp202*, Asn234, Glu260, Glu293
ATP binding site	82-103 (FLAIDLGGTNLRVVLVKLGGDR)	82-103 (YLAIDLGGTNLRVVLVKLGGNR)		69-90 (YLAADLGGTNFRVCSIDLKGDH)
- Phosphate 1	203-223 (IEVVALINDTTGTLVASYYTD)	202-222 (IDVVALINDTTGTLVASMYTD)	81-102 (LLAADLGGTNFRICSVNLH)	194-214 (VKVVAIANDTVGTLLTAAYSN)
- Connect 1	229-248 (GVIFGTGVNGAYYDVCSDIE)	228-247 (GLIFGTGVNGAYFDVVKDIP)	211-230 (KVVALTNDTVGTYLSHCYTS)	226-243 (GCIFGTGTNGAYFESKIP)
- Phosphate 2	411-439 (TGHIAADGSVYNRYPGFKEKAANALKDIY)	411-439 (TAHCAADGSVYNKYPGFKERTAQALR)	247-266 (GCIFGTGTNGCYMEEINKIT)	415-443 (DFEVGCDGSVIEFYPGFRQAVLESIEKIN)
- Adenosine	453-473 (IVPAEDGSGAGAAVIAALAQK)	451-471 (IVPAEDGSGVGAAVIAALTEK)	442-471 (GEVEIGCDGSVVEYYPGFRSMLRHALALSP)	453-471 (LKIAKDGSGVGAALCASTA)
- Connect 2			482-500 (LKIAKDGSGVGAALCALVA)	
Phosphorylation	Ser15	Thr15[1]	n.d.[2]	n.d.[2]
Uniprot	P04807	P83776	P17709	Q59TZ8
PDB	1ig8	n.a. [2]	n.a. [2]	n.a. [2]

* catalytic residue ; [1]: proposed residue located at the same position than Ser15 in ScHxk2 ; [2]: not determined

Résultats : Partie II

Étude des fonctions « moonlight » de l'hexokinase 2 et de leur implication dans le fitness et la virulence de *C. albicans*

Résumé :

Le glucose est l'hexose le plus abondant sur Terre, mais aussi la source de carbone préférentiellement utilisée par la plupart des microorganismes pour soutenir les réactions de leur métabolisme et générer de la biomasse. Suite à son import dans la cellule, le glucose est phosphorylé et entre dans la voie glycolytique. Chez la levure modèle *S. cerevisiae*, la phosphorylation du glucose repose sur 3 enzymes : deux hexokinases *Sc*Hxk1, *Sc*Hxk2 et une glucokinase *Sc*Glk1. Outre son implication dans la phosphorylation du glucose, il a été démontré que l'hexokinase 2 participe à la signalisation glucose en jouant un rôle de co-répresseur transcriptionnel dans le mécanisme de répression glucose. Les deux fonctions de l'hexokinase sont découplées et portées par des domaines différents de la protéine, ce qui classe l'hexokinase 2 de *S. cerevisiae* dans la catégorie des « moonlight » protéines. Chez *C. albicans*, nos précédents travaux ont mis en évidence que les deux fonctions de l'hexokinase 2 (*Ca*Hxk2) ont été conservées. Cependant, l'implication de chacune de ces fonctions dans le fitness et la virulence de cette levure n'a jamais été étudiée. En nous basant sur les données disponibles chez *S. cerevisiae*, nous avons identifié les régions impliquées dans les fonctions catalytiques et régulatrices de la protéine. Nos premiers résultats montrent que nous avons localisé le domaine impliqué dans la fonction catalytique de l'enzyme. En revanche, nous n'avons pas réussi à identifier la région portant spécifiquement les fonctions régulatrices de l'hexokinase. En effet, la mutation du site catalytique de l'hexokinase 2 (*Ca*Hxk2) affecte également la fonction régulatrice de l'enzyme. Ces données remettent en cause le rôle « moonlight » de l'hexokinase 2 chez *C. albicans*. De plus, l'analyse phénotypique démontre que la partie N-terminale de la protéine *Ca*Hxk2, indépendante du site catalytique, jouerait un rôle dans la virulence de la levure en modèle insecte *Galleria mellonella*. Pour conclure, nos données mettent en lumière que, l'analyse structure-fonction de *Ca*Hxk2 n'est pas superposable avec les données établies chez le modèle *S. cerevisiae*.

I. Introduction

Chez la levure modèle *S. cerevisiae*, l'hexokinase 2 est une enzyme bi-fonctionnelle, jouant un rôle prépondérant dans l'assimilation des hexoses, en catalysant la conversion du glucose en glucose-6-phosphate. Cette enzyme est également impliquée dans le mécanisme de la répression glucose en tant que co-répresseur transcriptionnel. La répression glucose est un mécanisme élaboré par les microorganismes pour optimiser l'utilisation du glucose tant que ce dernier est disponible dans l'environnement. Chez *S. cerevisiae*, lorsque du glucose entre dans la cellule et est métabolisé, une cascade de signalisation, aboutissant à l'inactivation de la kinase *ScSnf1* et à la translocation dans le noyau du répresseur transcriptionnel *ScMig1*, est activée (Fig. 18 et 19). Une fraction du pool cellulaire de l'hexokinase 2 (13%) est aussi relocalisée dans le noyau et s'associe à *ScMig1* pour former un complexe répresseur fonctionnel et réprimer l'expression de gènes impliqués dans l'assimilation de sources carbonées alternatives (Pour plus de détails, voir Introduction p. 66 à 72). Des études détaillées de la séquence protéique et des expériences de délétion ciblées ont permis de mettre en évidence que chez *S. cerevisiae*, les fonctions catalytiques et régulatrices de l'hexokinase 2 (*ScHxk2*) sont portées par des domaines distincts. L'activité catalytique de l'enzyme repose sur quatre acides aminés principaux : Asp^{210}, Ser^{158}, Glu^{269} et Glu^{302}, jouant un rôle crucial dans l'interaction et la fixation du glucose (Anderson *et al*., 1978ab ; Bennett et Steitz, 1980 ; Shoham et Steitz, 1982) (Fig. 44). La délétion d'un seul de ces acides aminés conduit à une diminution de plus de 90% de l'activité catalytique de l'enzyme (Arora *et al*., 1990). Le domaine impliqué dans les fonctions régulatrices de l'enzyme est un décapeptide situé en position N-terminale $K^{6}M^{15}$ (Pelaez *et al*., 2010) qui permet l'interaction de *Sc*Hxk2 avec le répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1 (Fig. 44). La sérine en position 14, joue aussi un rôle important dans la mise en place/levée de la répression glucose. En effet, l'état de phosphorylation de ce résidu contrôle la localisation de l'hexokinase 2. En présence de glucose, la sérine 14 n'est pas phosphorylée. *Sc*Hxk2 interagit alors avec les karyophérines (*Sc*Kap60 et *Sc*Kap95). Ces protéines, sont impliquées dans le transport des macromolécules biologiques (ARNs, protéines, …) du cytoplasme vers le noyau ou inversement. Suite à cette interaction, *Sc*Hxk2 entre dans le noyau où elle s'associe avec *Sc*Mig1. Lorsque la concentration en glucose diminue, la sérine en position 14 est phosphorylée ce qui entraine l'export nucléaire de l'hexokinase 2, la déstabilisation du complexe répresseur et conduit *in fine* à la levée de la répression glucose. En plus d'être portées par des régions différentes, Pelaez *et al*, (2010) ont également mis en évidence que les fonctions catalytiques et régulatrices étaient indépendantes l'une de l'autre. En effet, l'abolition de la fonction catalytique de l'hexokinase 2 par mutagénèse dirigée n'affecte pas sa fonction dans le processus de répression glucose et inversement.

Chez *C. albicans*, nos précédents travaux (Laurian *et al*., 2019) ont permis de mettre en évidence que les deux fonctions de la protéine ont été conservées. Nos données ont révélé que l'hexokinase 2 *Ca*Hxk2 était la principale enzyme impliquée dans l'assimilation des hexoses. En effet, nous avons pu démontrer que près de 70% de l'activité glucose kinase de la cellule repose sur l'hexokinase 2. Nos résultats ont également mis en lumière qu'en présence de glucose, *Ca*Hxk2 est relocalisée dans le noyau, où elle participe au mécanisme de la répression glucose. Bien que les principaux acteurs de la répression glucose aient été identifiés chez *C. albicans*, le rôle de *Ca*Mig1 et son interaction avec l'hexokinase 2 n'ont jamais été décrits. L'un des objectifs de cette étude a été également de préciser le rôle de *Ca*Mig1 dans le mécanisme de répression glucose.

Les mutants de délétion *Cahxk2Δ/Δ* présentent une virulence drastiquement atténuée à la fois en modèle insecte *Galleria mellonella* et macrophages (Laurian *et al*., 2019). L'objectif de cette seconde partie de mon travail de thèse a été de découpler les fonctions catalytiques et régulatrices de l'enzyme afin de mieux comprendre la contribution de chacune de ces fonctions dans le fitness et virulence de *C. albicans*. De plus, le rôle de la répression glucose dans la virulence n'ayant encore jamais été mis en évidence chez les pathogènes fongiques, ces travaux pourraient apporter un éclairage nouveau sur les mécanismes de pathogénicité des champignons et conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour mener cette étude, nous avons, par une analyse comparative déterminé les régions potentiellement impliquées dans les fonctions catalytiques ou régulatrices de l'hexokinase 2. Nous avons ensuite construit par mutagenèse dirigée différents mutants de délétion ou de substitution. Afin de délimiter précisément les domaines catalytiques et régulateurs de *Ca*Hxk2, l'activité glucose kinase et la capacité de chaque mutant à mettre en place une répression glucose fonctionnelle ont été analysées. Pour finir, une analyse phénotypique des différents mutants a été effectuée en étudiant particulièrement l'impact des mutations sur la filamentation et la virulence de *C. albicans*.

Cette seconde partie a été initiée très récemment et présente donc des travaux toujours actuellement en cours au laboratoire.

II. Identification des domaines portant les fonctions catalytiques et régulatrices de l'hexokinase 2 chez *C. albicans* et construction de mutants

Chez *S. cerevisiae*, les domaines de l'hexokinase 2 impliqués dans les fonctions catalytiques et régulatrices ont été clairement identifiés (Anderson *et al*., 1978ab ; Bennett et Steitz, 1980 ; Shoham et Steitz, 1982 ; Pelaez *et al*., 2010). Chez *C. albicans*, nous avons précédemment mis en évidence que les deux fonctions de l'hexokinase ont été conservées (Laurian *et al*., 2019). Cependant, aucune étude n'a été entreprise pour déterminer si les régions impliquées dans chacune de ces fonctions sont les mêmes que celles décrites chez la levure modèle *S. cerevisiae*. Afin d'identifier les régions importantes pour ces deux fonctions, nous avons comparé les séquences de *Sc*Hxk2 et *Ca*Hxk2 afin de déterminer si les sites précédemment décrits chez *S. cerevisiae* ont été conservés chez *C. albicans* (Fig. 44).

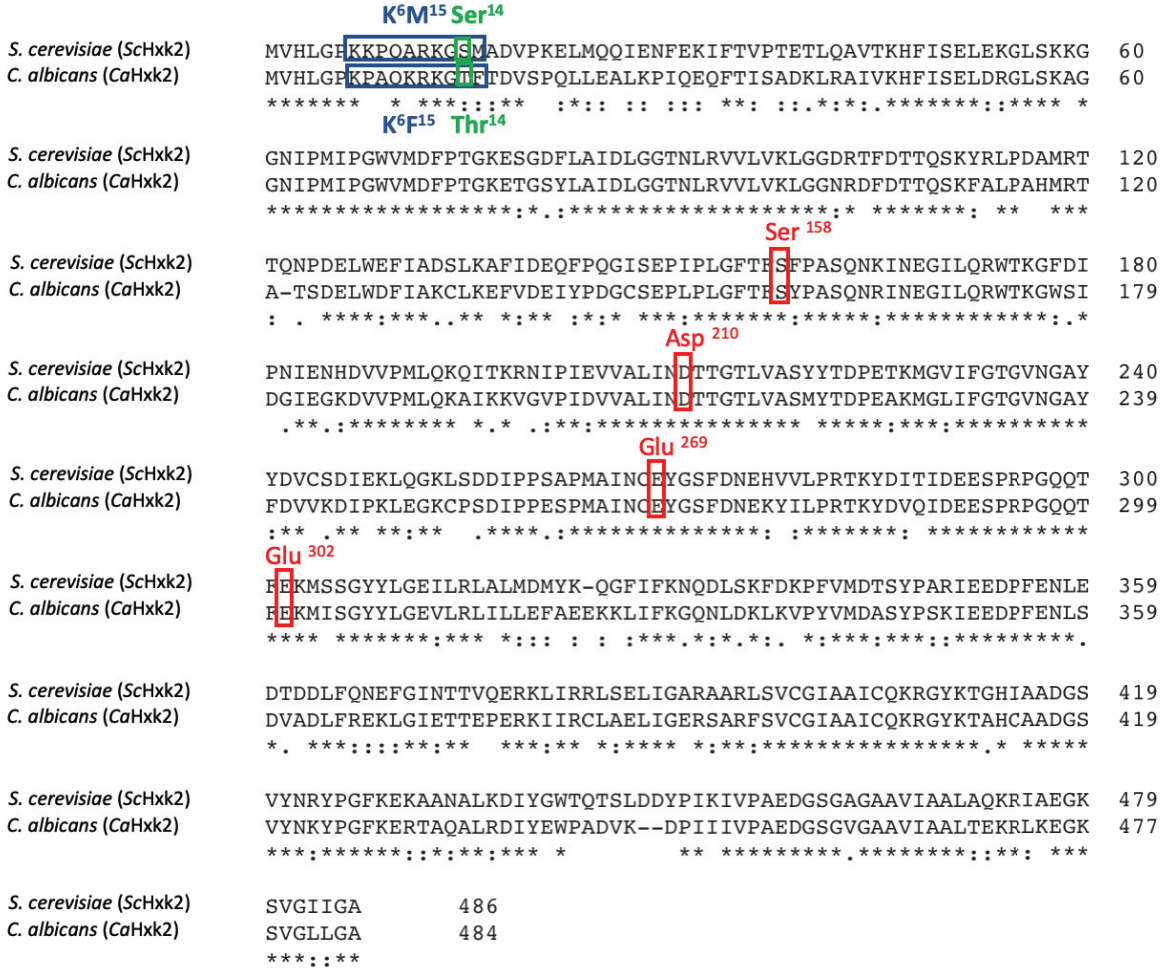


Figure 44 : Alignement des séquences protéiques de l'hexokinase 2 de S. cerevisiae ScHxk2 (en haut) et de C. albicans CaHxk2 (en bas). Les résidus indiqués en rouge ont été identifiés chez S. cerevisiae comme requis pour l'activité catalytique de la protéine ScHxk2. Les résidus figurés en bleu et en vert contrôlent chez S. cerevisiae l'import et l'export nucléaire de l'hexokinase 2 et sont donc importants pour la fonction de co-répresseur transcriptionnel de l'hexokinase 2.

L'alignement des séquences protéiques de *Sc*Hxk2 et *Ca*Hxk2 a révélé que les 4 principaux acides aminés décrits chez *S. cerevisiae* comme étant importants pour la fonction catalytique de l'hexokinase 2 ont été parfaitement conservés chez *C. albicans* (Fig. 44), de même que leur position au sein de la séquence.

Chez *S. cerevisiae*, un décapeptide riche en lysine et situé en position N-terminale, est impliqué dans l'interaction avec le co-répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1. Ce peptide est composé des acides aminés suivant : -KKPQARKGSM- (K^6M^{15}). Chez *C. albicans* un décapeptide enrichi en lysine a également été identifié à la même position (Fig. 44). Composé des acides aminés : -KPAQKRKGTF- (K^6F^{15}), ce peptide présente une identité de séquence de 50% avec celui décrit chez *S. cerevisiae*. Ce pourcentage d'identité ne permet pas de conclure quant à la fonction de ce peptide chez *C. albicans*. Ainsi, sa fonction au sein du processus de la répression glucose pourrait ou non avoir été conservée. Enfin, la sérine en position 14 décrite chez *S. cerevisiae* est remplacée par une thréonine chez *C. albicans* (Fig. 44). Ces deux acides aminés ont des propriétés physico-chimiques relativement similaires, ce qui indique que la fonction de ce résidu pourrait avoir été conservée.

Après avoir identifié les sites potentiels impliqués dans la phosphorylation des hexoses intracellulaire et dans la répression glucose, nous avons entrepris la construction, par mutagenèse dirigée, de mutants ponctuels affectés pour l'une ou l'autre de ces fonctions. Afin de créer un mutant dépourvu d'activité catalytique, nous avons choisi de substituer l'acide aspartique en position 210, par une alanine (*HXK2D210A*). Deux mutants affectés dans la répression glucose ont aussi été construits. Dans le premier cas, nous avons substitué la thréonine en position 14 par une alanine (*HXK2T14A*), mimant ainsi une forme non phosphorylable. Chez *S. cerevisiae*, la phosphorylation de ce résidu est importante pour contrôler l'export nucléaire de l'hexokinase 2 (Fernandez-Garcia *et al*., 2012). Nous nous attendions donc à ce que chez ce mutant, la répression glucose soit constitutivement active. Le second mutant a été délété du décapeptide entre la Lysine 6 et la phénylalanine 15 (*HXK2ΔK^{6}F^{15}*). Cette région contrôle chez *S. cerevisiae*, l'association de l'hexokinase 2 avec le répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1. Le résultat attendu pour ce mutant est donc une incapacité à mettre en place une répression glucose fonctionnelle.

III. L'acide aspartique D210 est-il impliqué dans la phosphorylation des hexoses chez *C. albicans* ?

Afin de déterminer si le résidu D210 de l'hexokinase 2 est impliqué dans la phosphorylation des hexoses chez *C. albicans*, l'activité glucose kinase des différents mutants a été mesurée (Fig. 45). Chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ*, nos données révèlent un effondrement de l'ordre de 65% de l'activité glucose kinase en comparaison avec la souche sauvage (Laurian *et al*., 2019, cette étude). Comme nous l'avons précédemment évoqué, cela démontre que l'hexokinase 2 est la principale enzyme de phosphorylation du glucose dans la cellule (Tableau 3, Fig. 45).

Chez les mutants délétés du décapeptide K^6F^{15} (*HXK2Δ K^{6}F^{15}*) et portant une substitution de la thréonine 14 en alanine (*HXK2T14A*), l'activité glucose kinase mesurée est statistiquement identique à celle de la souche sauvage, ce qui suggère que ces résidus ne sont pas impliqués dans l'activité catalytique de l'hexokinase 2 (Fig. 45).

En revanche, nous avons pu constater que la substitution de l'acide aspartique en position 210 par une alanine (*HXK2D210A*), diminue drastiquement la capacité de phosphorylation de l'hexokinase 2, en effet chez ce mutant, le niveau d'activité glucose kinase mesuré est similaire à celui du mutant nul *Cahxk2Δ/Δ* (Fig. 45). Nos données mettent en évidence que l'acide aspartique en position 210 joue un rôle primordial dans la fonction catalytique de l'hexokinase 2.

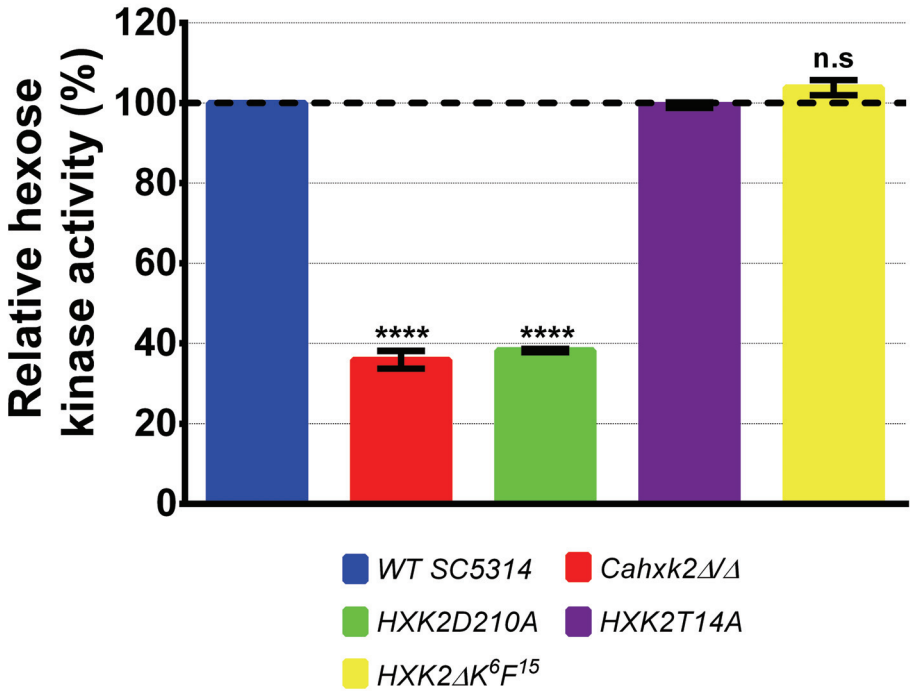


*Figure 45 : Mesure de l'activité glucose kinase dans les différents mutants ponctuels de l'hexokinase 2. Pour chaque souche, la quantité de glucose-6-phosphate produite a été mesurée et exprimée en pourcentage de l'activité de la souche sauvage fixée à 100%. L'histogramme représente la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes effectuées sur des échantillons biologiques différents. ns, non significatif, *** P = 0.0002, **** P < 0.0001. Les valeurs des P_{values} ont été calculées par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.*

Pour confirmer l'implication de ce résidu dans le mécanisme de phosphorylation des hexoses, nous avons utilisé une deuxième approche consistant à mesurer la consommation du glucose extracellulaire par les différents mutants ponctuels de l'hexokinase 2 (Fig. 46). À partir de cultures des différentes souches réalisées en présence de lactate, puis transférées en présence de glucose (0,5%) nous avons mesuré à intervalles de temps réguliers l'évolution de la concentration en glucose dans le milieu. Le profil de consommation du glucose que nous avons établi pour la souche sauvage peut être découpé en 3 phases principales (Fig. 46). Durant les 4 premières heures, la consommation du glucose est très lente évoluant de 25,96 mmol/l à 21,34 mmol/l, ce qui correspond environ à une consommation de 1 mmol/h pour la souche sauvage. Cette phase de latence pourrait être liée à la reprogrammation métabolique de la levure pour assimiler le glucose. Entre 5 et 6 h de culture, nous avons constaté une diminution drastique de la concentration en glucose dans le milieu, de 16,5 mmol/l après 5 h de culture à 0,65 mmol/l une heure plus tard (Fig. 46). Ainsi, au bout de 6 h, la souche sauvage a consommé 97,5% du glucose initialement présent dans le milieu de culture. Enfin, au bout de 7 et 8 h de culture, la phase stationnaire est atteinte et le glucose présent dans le milieu est totalement épuisé (0 mmol/l) (Fig. 46).

Nous avons pu mettre en évidence que le profil de consommation du glucose des mutants *HXK2T14A* et *HXK2ΔK^{6}F^{15}* est strictement identique à celui de la souche sauvage confirmant que le décapeptide K^{6}F^{15} et la thréonine 14 ne sont pas impliqués dans l'activité catalytique de l'hexokinase 2 (Fig. 46). Chez les mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *HXK2D210A* le profil de consommation du glucose est identique à celui de la souche sauvage durant les 4 premières heures de culture (Fig. 46). Cependant, après 6h de culture, nos résultats mettent en évidence que ces mutants ont consommé seulement 40% du glucose initialement présent dans le milieu, tandis qu'à la même période, la souche sauvage avait consommé près de 98% du

glucose présent dans le milieu de culture (Fig. 46). Dans les milieux ensemencés avec les mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *HXK2D210A*, environ 9,64 mmol/l de glucose (37 % du glucose initial) ont été détectées au bout de 7 h, contre 0 mmol/l dans les milieux ensemencés avec la souche sauvage à la même période (Fig. 46). Nos résultats démontrent que le mutant hexokinase 2 nul et le mutant du site catalytique présentent un profil de consommation du glucose altéré et ralenti par rapport à la souche sauvage et confirment le rôle crucial de l'acide aspartique D210 dans la phosphorylation du glucose chez *C. albicans* (Fig. 46).

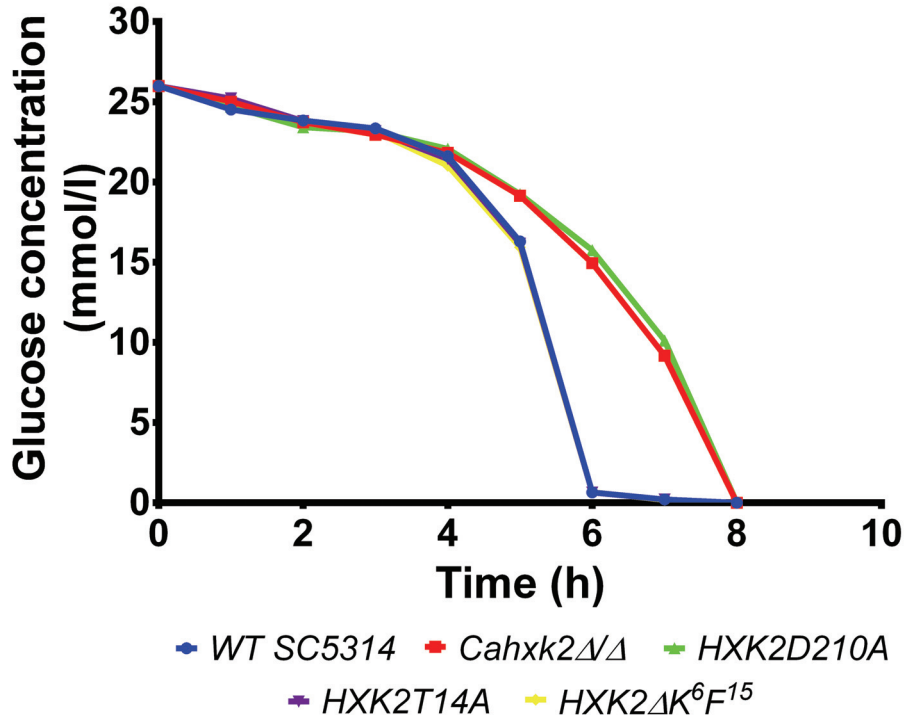


Figure 46 : Évolution de la concentration en glucose extracellulaire dans un milieu ensemencé avec la souche sauvage ou les mutants ponctuels de l'hexokinase 2. Les cellules ont été cultivées dans un milieu riche contenant 2% de lactate jusqu'en début de phase exponentielle de croissance, puis ont été transférées dans un milieu synthétique contenant 0,5% de glucose. La concentration en glucose dans le milieu avant l'ensemencement a été mesurée et établie à 25,96 mmol/l. L'évolution de la concentration a été suivie régulièrement au cours du temps. Les courbes représentent la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes.

IV. Le décapeptide K^6F^{15} et la thréonine 14 de l'hexokinase 2 sont-ils impliqués dans la répression glucose chez *C. albicans* ?

Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré que le décapeptide K^6M^{15} et la thréonine 14 joue un rôle important dans l'import et l'export nucléaire de *Sc*Hxk2 et donc dans la mise en place et la levée de la répression glucose (Pelaez *et al*., 2010). Chez *C. albicans*, le décapeptide (K^6F^{15}) présente 50% d'homologie avec le décapeptide K^6M^{15} identifié chez *S. cerevisiae* et la sérine en position 14 est substituée par une thréonine. Afin de déterminer si ces résidus sont aussi impliqués dans le processus de répression glucose chez *C. albicans*, nous avons analysé par qPCR, l'expression des gènes *CaICL1* et *CaPCK1* (connus pour être réprimés par le glucose chez *C. albicans* (Lorenz, Bender et Fink, 2004 ; Sandai *et al.,* 2012)) chez les différents mutants ponctuels de l'hexokinase 2, en réponse au glucose.

Pour étudier la dynamique de la répression glucose, une cinétique expérimentale permettant d'analyser à la fois la mise en place et la levée de la répression glucose a été mise au point. Les cellules cultivées en présence de lactate 2% comme unique source de carbone, ont été exposées au glucose (2% final), puis, après quatre-vingt-dix minutes en présence de glucose, ont de nouveau été transférées dans un milieu contenant 2% de lactate (Fig. 47).

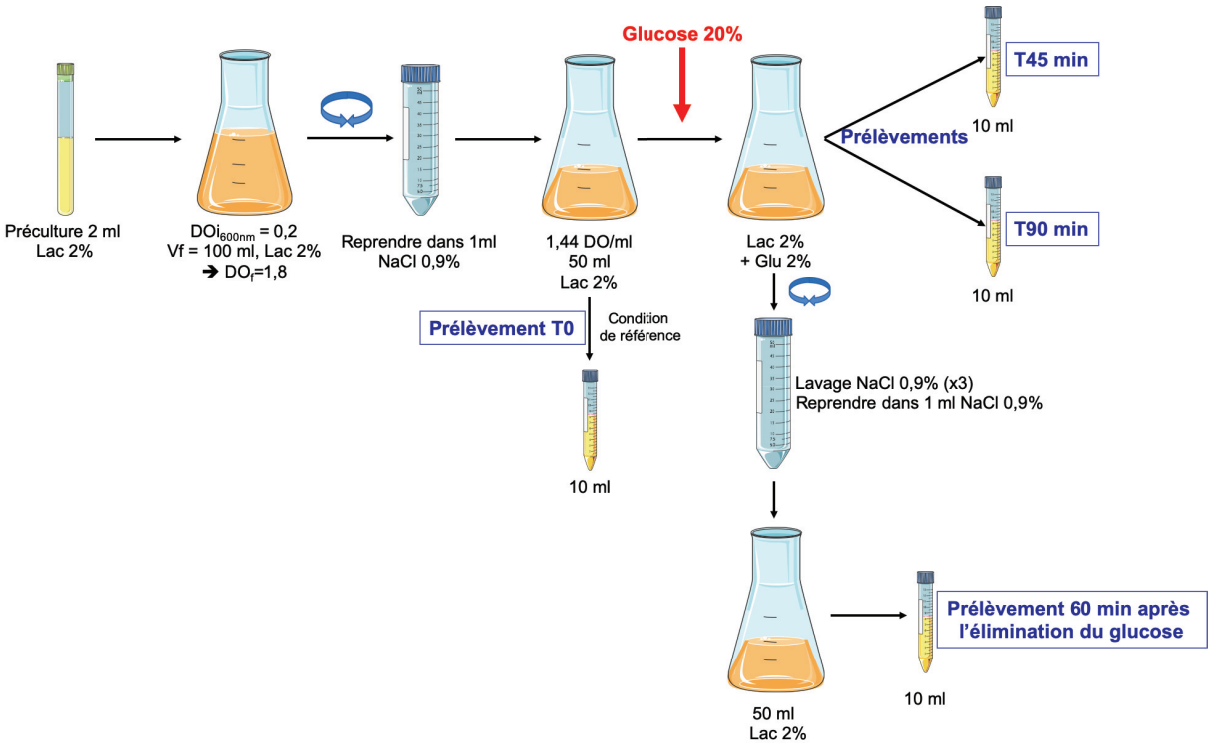


Figure 47 : Plan expérimental ayant permis d'étudier la dynamique de la répression glucose chez la souche sauvage et les mutants ponctuels de l'hexokinase 2. À partir d'une préculture en milieu riche contenant 2% de lactate (YPLac 2%), les cellules ont été ensemencées dans un erlen contenant 100 ml de YPLac 2% jusqu'à DO_{600nm} = 1,8. Les cellules ont ensuite été collectées, puis lavées et réensemencées dans un erlen contenant 50 ml de YPLac 2% à une concentration de 1,44 DO/ml. Dix millilitres de culture ont été prélevée et constituent le temps zéro de l'expérience (T0). Une solution concentrée de glucose 20% a ensuite été ajoutée dans l'erlen de façon à obtenir une concentration en glucose de 2% finale. Cet ajout de glucose permet d'initier la répression glucose. Après respectivement 45 et 90 min d'incubation à 30°C, 10 ml de culture sont à nouveau prélevés, constituant les temps T45' et T90' de l'expérience. Le reste de la culture est ensuite collecté, puis soigneusement lavé, avant d'être réensemencé dans un erlen contenant 50 ml de YPLac 2%. Ce second transfert dans un milieu dépourvu de glucose, permet de lever la répression glucose. Après 60 min d'incubation, 10 ml de culture sont prélevés et constituent le temps (T60' ø Glu). Les prélèvements effectués au cours de l'expérience sont centrifugés, afin de collecter les cellules qui ont ensuite été lavées puis congelées. Les ARNs ont ensuite été extraits et le niveau d'expression des gènes cibles a été analysé par RT-qPCR.

Chez la souche sauvage, les gènes *CaICL1* et *CaPCK1* sont soumis à une répression transcriptionnelle forte en réponse au glucose (Fig. 48A). En effet, 45 minutes après l'ajout de glucose dans le milieu, le niveau de transcription de ces gènes diminue de près de 98%. Quatre-vingt-dix minutes après l'exposition au glucose la répression transcriptionnelle s'exerçant sur ces gènes est toujours détectable. Ainsi, la répression glucose persiste tant que du glucose est disponible dans le milieu. En revanche, 60 minutes après avoir ôté le glucose, une levée de la répression glucose et un retour de la quantité de transcrits à leur niveau basal ont été constatés (Fig. 48A). Les résultats obtenus avec la souche sauvage (SC5314) sont cohérents avec ce qui est décrit chez le modèle *S. cerevisiae* (Sandai *et al*., 2012), confirmant que le modèle expérimental mis en place fonctionne.

Chez le mutant hexokinase 2 nul (*Cahxk2Δ/Δ*), le profil d'expression des gènes *CaICL1* et *CaPCK1* en réponse au glucose est perturbé (Fig. 48B). En effet, 45 minutes après l'exposition au glucose, nous pouvons constater que le niveau d'expression de ces gènes chute d'environ

50%, contre 98% pour la souche sauvage. Ceci démontre que chez ce mutant, la répression transcriptionnelle s'exerçant sur ces gènes est moins forte. De plus, contrairement à la souche sauvage, cette diminution n'est que transitoire puisque la quantité de transcrits des gènes *CaICL1* et *CaPCK1* ré-augmente après 90 minutes alors même que le glucose est toujours présent dans le milieu (Fig. 48B). Le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est donc capable d'initier, mais pas de maintenir une répression glucose fonctionnelle dans le temps. La mise en place transitoire d'une répression glucose affaiblie chez ce mutant, suggère l'implication d'autres acteurs moléculaires dans ce mécanisme. Cependant, l'hexokinase 2 apparait comme un élément central de la voie requis à la fois pour mettre en place, stabiliser et maintenir une répression glucose fonctionnelle. Chez les mutants, *HXK2T14A* et *HXK2ΔK*^{6}*F*^{15}, le profil d'expression des gènes *CaICL1* et *CaPCK1* est identique à celui observé chez la souche sauvage (Fig. 48C et 48D), suggérant que chez *C. albicans*, ces résidus ne sont pas impliqués dans la fonction de répression glucose de l'hexokinase 2. En revanche, l'analyse de l'expression des gènes *CaICL1* et *CaPCK1* chez le mutant *HXK2D210A* a révélé un défaut de fonctionnement de la répression glucose similaire à celle observée chez le mutant nul *Cahxk2Δ/Δ* (Fig. 48E). Ainsi, la substitution de l'acide aspartique D210 en alanine a des conséquences à la fois sur les fonctions de phosphorylation des hexoses et de régulateur transcriptionnel de l'hexokinase 2.

L'expression d'un autre gène cible, la perméase de forte affinité *CaHGT12,* a aussi été analysée. L'expression de ce transporteur est contrôlée par la disponibilité en glucose via la voie SRR et la répression glucose (Fan *et al*., 2002, Laurian *et al*., 2019). En absence de glucose, *CaHGT12* n'est pas transcrit. Les faibles concentrations en glucose induisent une forte activation de la transcription de ce gène. A l'inverse, l'élévation de la concentration en glucose conduit à une répression de l'expression de cette perméase (Fan *et al*., 2002).

Nos données mettent en évidence que lorsque la souche sauvage est transférée dans un milieu contenant 2% de glucose, la transcription du gène *CaHGT12* est transitoirement induite (x 50 à T45'), avant d'être réprimée à T90' (Fig 49A).

Chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ* une très forte activation de la transcription du gène *CaHGT12* a été observée en réponse au glucose (x 100 à T45') (Fig. 49B). De plus, contrairement à ce qui a été observé chez la souche sauvage, l'expression de *CaHGT12* n'est pas réprimée après 90 minutes d'exposition au glucose (Fig. 49B). Ces données confirment que l'hexokinase 2 joue un rôle important dans le contrôle de l'expression des perméases via la répression glucose. Chez les mutants *HXK2T14A* et *HXK2ΔK*^{6}*F*^{15}, le patron d'expression de *CaHGT12* est identique à celui de la souche sauvage (Fig. 49 C et D), ce qui suggère que ces résidus ne sont pas impliqués dans la fonction régulatrice de l'hexokinase 2. En revanche, chez le mutant *HXK2D210A*, présentant un défaut d'activité catalytique, nous avons pu mettre en évidence que, comme chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ*, le gène *CaHGT12* n'est plus soumis à la répression glucose (Fig. 49E).

Collectivement, nos résultats mettent en lumière que chez *C. albicans*, les fonctions catalytiques et régulatrices de l'hexokinase 2 ne semblent pas être découplées et révèlent que la fonction catalytique de l'enzyme, qui repose en partie sur l'acide aspartique 210, est requise pour permettre à la protéine d'assurer sa fonction régulatrice.

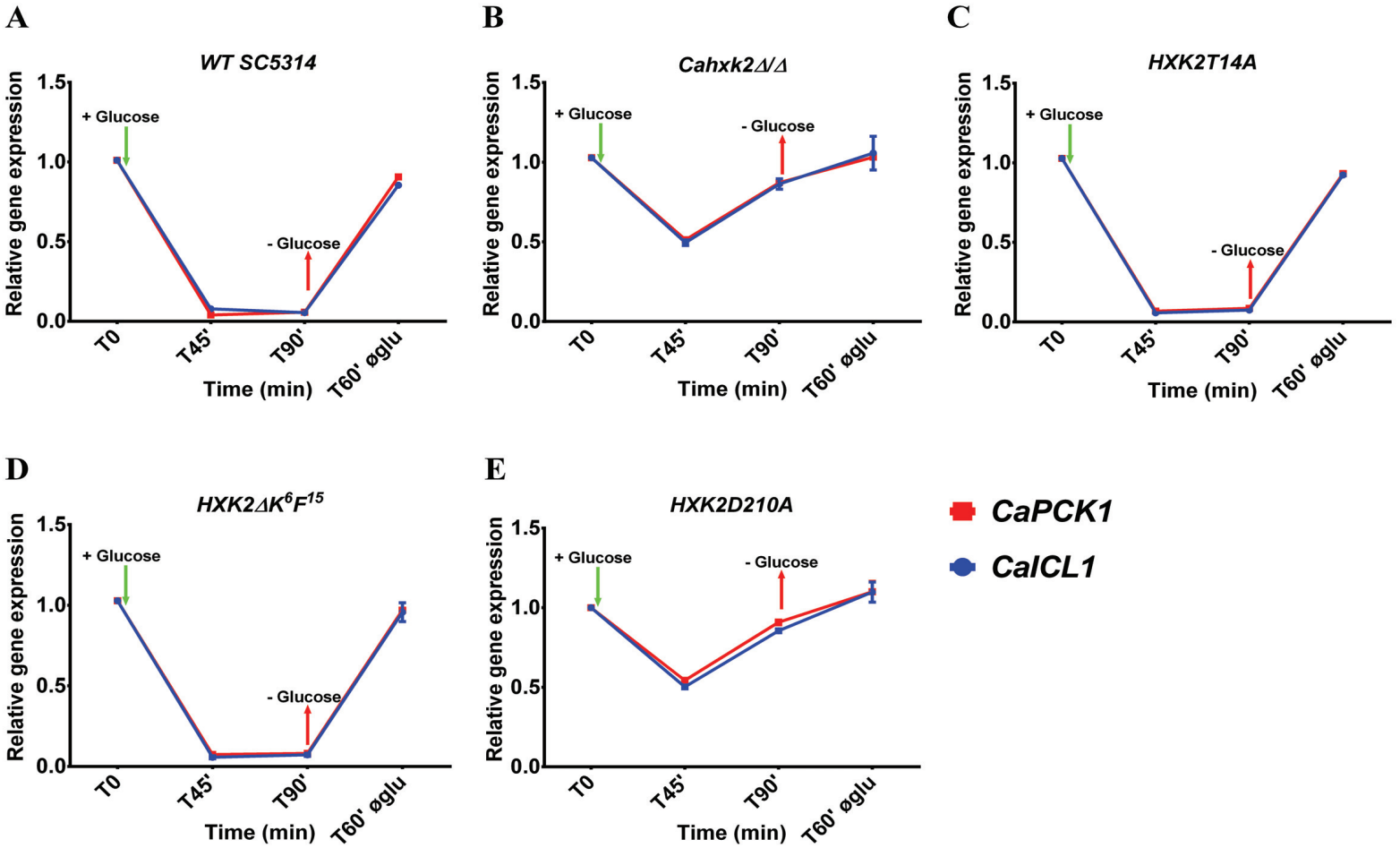


Figure 48 : Analyse du mécanisme de la répression glucose chez la souche sauvage et chez les mutants de l'hexokinase 2. Les cellules ont été cultivées en présence de lactate jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (DO600nm =1.8). Une fraction de la culture a été prélevée et constitue le temps zéro de l'expérience (T0). Une solution concentrée de glucose a ensuite été ajoutée dans le milieu (figurée par une flèche verte). Après 45 et 90 min d'exposition au glucose, une fraction de culture a été prélevée et constitue respectivement les temps 45 (T45') et 90 (T90') min de l'expérience. Après 90 min d'exposition au glucose, les cellules ont été transférées dans un nouveau milieu ne contenant que du lactate (le transfert est figuré par une flèche rouge). 60 min après le transfert, une partie de la culture a été prélevée et correspond au temps 60 min post transfert (T60'øglu). À chaque temps, les ARNs ont été extraits et le niveau d'expression des gènes CaICL1 et CaPCK1 a été mesuré par qRT-PCR. Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène CaACT1, servant de calibreur interne. Le niveau d'expression des gènes CaICL1 et CaPCK1 est exprimé relativement à leur abondance au temps 0, qui a été fixée à 1. Les courbes représentent la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes, effectuées en triplicat. La significativité des résultats a été vérifiée par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.

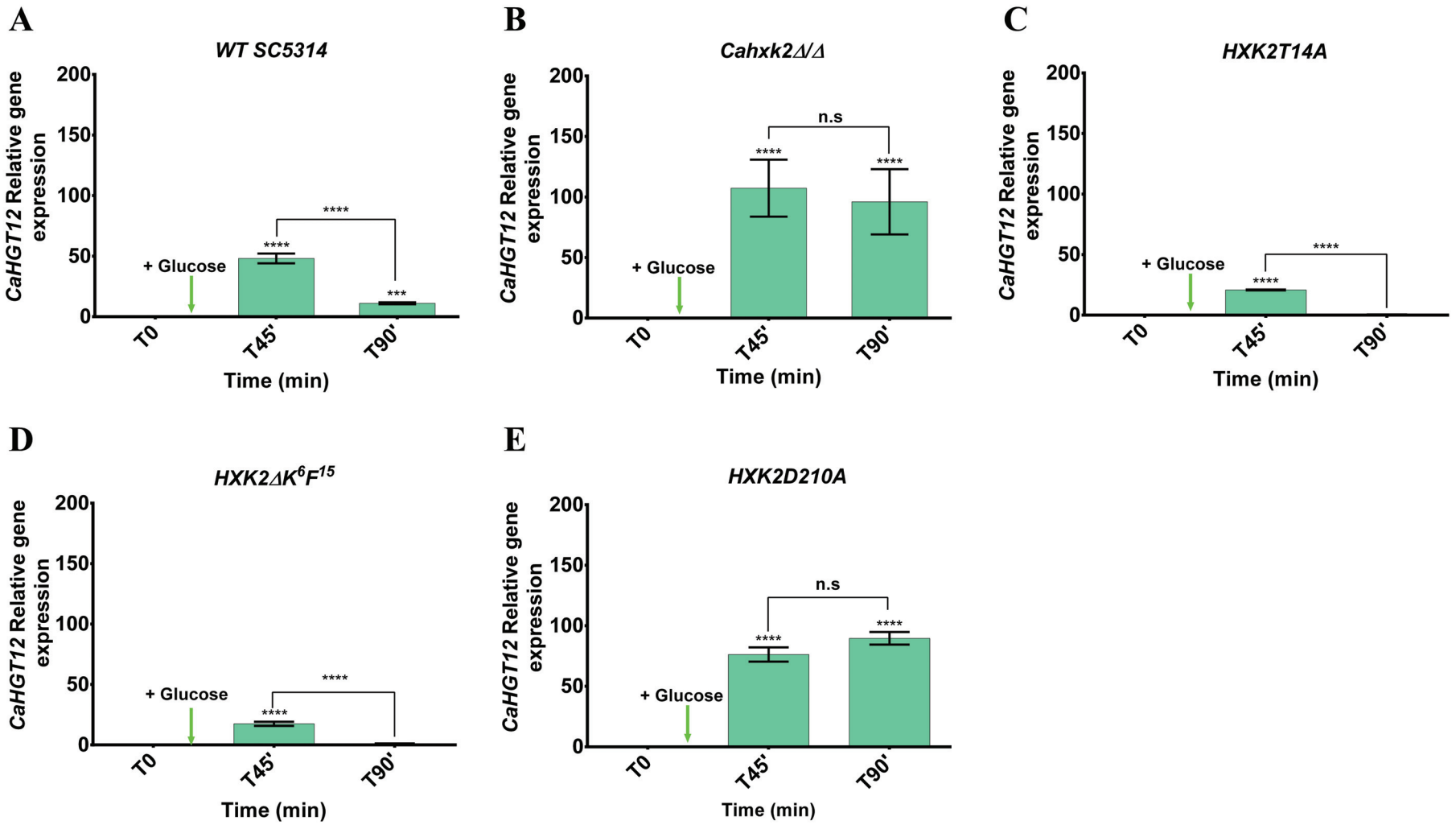


*Figure 49 : Analyse de l'expression de la perméase de forte affinité CaHGT12 en réponse au glucose chez la souche sauvage et les mutants de l'hexokinase 2. Les cellules ont été cultivées en présence de lactate 2% jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (T0), puis une solution concentrée de glucose a été ajoutée dans le milieu (figurée par une flèche verte). L'expression du gène CaHGT12 a été mesurée après 45 et 90 minutes d'exposition au glucose. Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène CaACT1. Le niveau d'expression du gène CaHGT12 est exprimé relativement à son abondance au temps 0 (T0), qui a été fixée à 1. Les histogrammes représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, effectuées en triplicat. ns, non significatif, *** P = 0.0002, **** P < 0.0001. Les valeurs des P_{values} ont été calculées par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.*

V. Le facteur de transcription *Ca*Mig1 est-il impliqué dans la répression glucose ?

Chez *S. cerevisiae*, en présence de glucose, l'hexokinase 2 s'associe avec le répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1, pour former un complexe fonctionnel et réprimer l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation des sources carbonées alternatives. En 2010, Pelaez *et al,* ont mis en évidence que l'interaction entre *Sc*Hxk2 et *Sc*Mig1 impliquait le décapeptide $K^{6}M^{15}$ situé dans la région N-terminale de l'hexokinase 2. La délétion de ce peptide empêche l'interaction avec *Sc*Mig1 et abolit la répression glucose (Pelaez *et al.,* 2010). Chez *C. albicans*, nos résultats ont mis en évidence que la délétion du décapeptide $K^{6}F^{15}$ n'a aucun effet sur la mise en place de la répression glucose. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, il est possible que l'interaction entre *Ca*Hxk2 et *Ca*Mig1 implique des résidus différents de ceux décrits chez *S. cerevisiae*. Deuxièmement, *Ca*Mig1 n'est peut-être pas impliqué dans le mécanisme de répression glucose chez *C. albicans*.

Afin de répondre à cette question, nous avons analysé l'expression du gène *CaICL1* en réponse au glucose, chez le mutant *Camig1Δ/Δ* (Zaragoza *et al*., 2000) (Fig. 50). Les cellules cultivées en présence de lactate comme seule source de carbone ont été exposées au glucose pendant 90 minutes puis à nouveau transférées en milieu contenant du lactate de façon à visualiser les effets de la mise en place et de la levée de la répression glucose sur la transcription du gène *CaICL1* (Fig. 50).

Nos résultats démontrent que le profil d'expression du gène *CaICL1* chez le mutant *Camig1Δ/Δ* en réponse au glucose, est similaire à celui observé chez la souche sauvage (Fig. 50). En effet, nous avons pu constater que l'expression de ce gène est fortement réprimée par la présence de glucose, ceci suggère que *Ca*Mig1 n'est pas impliqué dans la mise en place de la répression glucose. Après avoir transféré les cellules dans un milieu dépourvu de glucose (T60' øglu), le niveau de transcription du gène *CaICL1* dans la souche sauvage revient à son niveau basal (Fig. 50). Chez le mutant *Camig1Δ/Δ* après avoir éliminé le glucose contenu dans le milieu, une légère induction de la transcription du gène *CaICL1* a été observée, mais pas un retour au niveau basal (Fig. 50). Ce qui suggère une levée de la répression glucose plus lente chez ce mutant.

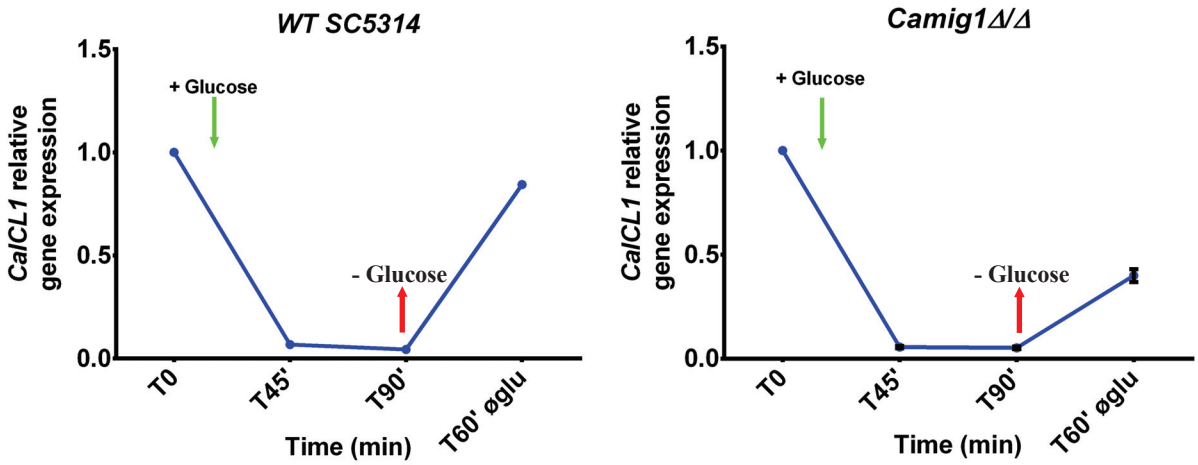


Figure 50 : Expression relative du gène CaICL1 chez la souche sauvage (WT SC5314) et délétée du gène CaMIG1 (Camig1Δ/Δ). Les cellules ont été cultivées en présence de lactate jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (DO600nm =1.8). Une fraction de la culture a été prélevée et constitue le temps zéro de l'expérience (T0). Une solution concentrée de glucose a ensuite été ajoutée dans le milieu (flèche verte). Après 45 et 90 min d'exposition au glucose, des aliquots ont été prélevés et intitulés T45' et T90'. Après 90 min d'exposition au glucose, les cellules ont été transférées dans un nouveau milieu ne contenant que du lactate (2%) (flèche rouge). 60 min après le transfert, une partie de la culture a été prélevée et correspond au point T60'øglu. À chaque temps, les ARNs ont été extraits et le niveau d'expression du gène CaICL1 a été mesuré par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés par rapport au niveau d'expression du gène CaACT1, servant de calibreur interne. Le niveau d'expression du gène CaICL1 est exprimé relativement à son abondance au temps 0, qui a été fixée à 1. Les courbes représentent la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes, effectuées en triplicat. La significativité des résultats a été vérifiée par ANOVA à un facteur selon la méthode de Tukey.

VI. Analyse du phénotype des mutants ponctuels

A. La filamentation est affectée quand la fonction hexose kinase est perturbée

Comme nous l'avons précédemment démontré, le mutant nul *Cahxk2Δ/Δ* est incapable d'adopter un mode de développement filamenteux sur des milieux inducteurs contenant du glucose (milieu sérum) ou du mannitol (milieu Spider) comme source de carbone principale (Fig. 34, Laurian *et al.,* 2019). En revanche, lorsque la source carbonée présente dans le milieu inducteur est de la N-acétylglucosamine (NAG) qui est assimilée indépendamment de l'hexokinase 2, le mutant *Cahxk2Δ/Δ* forme des hyphes de façon similaire à la souche sauvage. Ce résultat nous avait permis de suggérer que le défaut de filamentation du mutant *Cahxk2Δ/Δ* observé en présence de glucose et de mannitol était lié à un défaut de métabolisation de la source carbonée (Fig. 34) (Laurian *et al*., 2019).

Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons analysé la capacité du mutant *HXK2D210A*, présentant une activité catalytique réduite, à former des hyphes en milieu Spider et NAG. Dans le but de mieux comprendre le rôle de la région N-terminale de la protéine, nous avons également testé la capacité des mutants *HXK2T14A* et *HXK2ΔK*^{6}*F*^{15} à adopter un mode de développement filamenteux sur ces milieux (Fig. 51).

Sur un milieu Spider, le mutant *HXK2D210A*, présente un phénotype hypofilamenteux comparable à celui du mutant *Cahxk2Δ/Δ* (Fig. 51). En revanche, en présence de N-acétylglucosamine, le phénotype du mutant *HXK2D210A* est similaire à celui de la souche sauvage (Fig. 51). En effet, au niveau macroscopique, les colonies présentent de nombreux filaments sur leur pourtour. Cette observation se confirme au niveau microscopique où de nombreuses cellules ont initié la formation d'un tube germinatif ou d'un hyphe (Fig. 51). Ces

données suggèrent une fois encore, que la métabolisation de la source carbonée contenue dans le milieu inducteur, et donc une activité catalytique fonctionnelle sont requises pour permettre la transition morphologique de la levure.

Cependant, les données obtenues antérieurement ont révélé que chez le mutant *HXK2D210A*, le mécanisme de la répression glucose est également altéré (Fig. 48 et 49). La perturbation de la fonction régulatrice de l'hexokinase 2 pourrait également être responsable du défaut de filamentation de ce mutant. Toutefois, le milieu Spider étant dépourvu de glucose il parait peu probable que la répression glucose se mette en place sur un tel milieu. Ainsi, il est probable que le mutant *HXK2D210A* soit hypofilamenteux en raison de son activité de phosphorylation du glucose perturbée.

Les mutants *HXK2T14A* et *HXK2ΔK^{6}F^{15}* sont capables d'adopter un mode de développement filamenteux en présence de Spider et de NAG (Fig. 51). Ceci suggère que ces résidus, situés dans la région N-terminale de l'hexokinase 2, ne portent pas de fonction importante dans la transition morphologique de *C. albicans*.

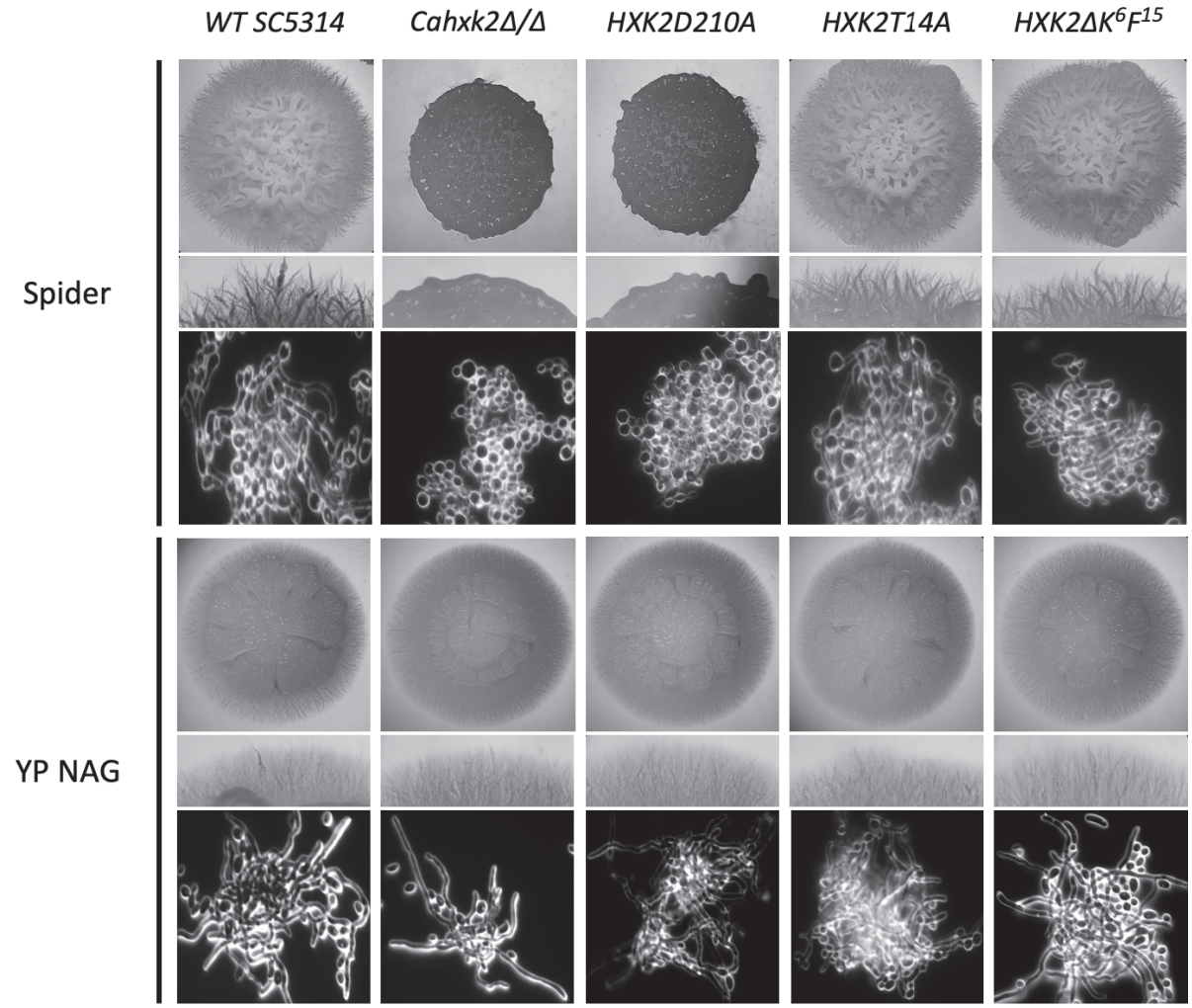


Figure 51 : Analyse macroscopique de la filamentation des différentes souches de C. albicans. Les souches sauvages et mutantes de C. albicans ont été cultivées pendant 3 jours à 37°C sur différents milieux (spider et YP NAG) inducteurs du dimorphisme. Pour chaque milieu, les panels supérieurs et médians, présentent l'aspect macroscopique de la colonie (vue de dessus et bordure des colonies). Les photographies ont été prises à la loupe binoculaire. Dans le panel inférieur, elles ont été obtenues en utilisant le microscope Zeiss Axioskop 2 et présentent l'aspect microscopique des colonies.

B. La virulence des mutants hexokinase diffère en modèle insecte *G. mellonella* et macrophage de souris (J774)

La délétion de l'hexokinase entraine un important défaut de virulence chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ* à la fois en modèle insecte *Galleria mellonella* et en modèle macrophage (Laurian *et al*., 2019).

Au travers de l'analyse de la virulence des différents mutants ponctuels, nous avons souhaité déterminer quelles régions de l'hexokinase 2 pouvaient être requises pour la virulence de la levure en modèle insecte et macrophage.

En modèle *G. mellonella*, nos données mettent en évidence que la souche sauvage et le mutant *HXK2D210* présentent un profil de virulence similaire (Fig. 52). En effet, à l'issue des 7 jours d'expérience, le taux de survie des larves infectées avec ces souches est respectivement de 10 et 16%. Ces résultats suggèrent que dans ce contexte, ni la fonction catalytique ni la fonction régulatrice de l'hexokinase 2 ne sont requises pour la virulence.

Comme nous l'avons précédemment observé, le mutant nul *Cahxk2Δ/Δ* est sévèrement hypovirulent en modèle insecte, puisque 60% des larves infectées par ce mutant survivent à l'issue de l'expérience (Laurian *et al.,* 2019, cette étude, Fig. 52). Combiné avec notre observation précédente, ce résultat démontre que d'autres régions de la protéine sont impliquées dans la virulence de *C. albicans*.

Nos données révèlent que, les mutants ponctuels *HXK2T14A* et *HXK2ΔK⁶F¹⁵* présentent un défaut de virulence statistiquement identique à celui du mutant *Cahxk2Δ/Δ* (Fig. 52). En effet, les taux de survie des larves infectées par ces mutants en fin d'expérience, s'établissent respectivement à 66 et 63% (Fig. 52). Ceci démontre que ces régions précises de la protéine *Ca*Hxk2 : le décapeptide K^6F^{15} et la thréonine 14 sont impliquées dans une ou des fonctions nécessaires à la virulence de la levure dans ce modèle insecte.

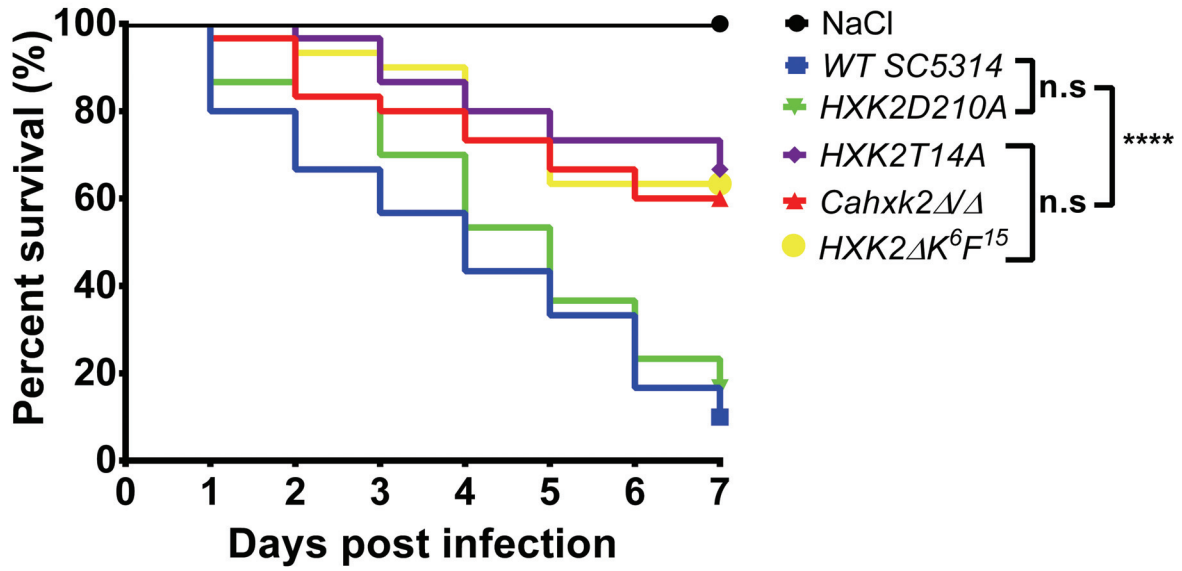


*Figure 52 : Analyse de la virulence des souches sauvages et mutantes de C. albicans en modèle insecte Galleria mellonella. Pour chaque souche, 30 chenilles choisies au hasard ont été infectées avec 2.5x10⁵ cellules. Les cellules ont été injectées dans l'hémolymphe des insectes au niveau de la troisième paire de fausses pattes. Un groupe de chenilles contrôle, ayant reçu une injection de NaCl 0,9% a aussi été ajouté à l'étude. Après l'injection, les chenilles ont été placées dans le noir à 37°C et leur survie a été suivie sur une période de 7 jours. Les données sont représentées sous la forme d'une courbe de survie de Kaplan-Meyer. Des tests Log-Rank ont été effectués pour analyser statistiquement les résultats obtenus. ns, non significatif, **** P < 0.0001. Les souches Cahxk2Δ/Δ, HXK2T14A et HXK2ΔK⁶F¹⁵ sont significativement hypovirulentes par rapport à la souche sauvage (P_{value} <0.0001). Le mutant HXK2D210A présente une virulence statistiquement similaire à la souche sauvage. Les différences observées entre les souches Cahxk2Δ/Δ, HXK2T14A et HXK2ΔK⁶F¹⁵ et celles observées entre la souche sauvage et le mutant KXK2D210A sont non significatives (P_{value} >0.05).*

La virulence des différents mutants a également été testée dans un second pathosystème : les macrophages de souris (J774). Les expériences d'infection des phagocytes ont été réalisées par Karine Dementhon (Dementhon *et al*., 2012 ; Laurian *et al*., 2019), dans le cadre de la collaboration établie avec le laboratoire de Pathogénicité des *Candida,* LMFP, UMR 5234, Université de Bordeaux. L'internalisation des levures et la viabilité des macrophages ont été analysées par cytométrie en flux après 30 min, 4 et 24 h de co-culture (Fig. 53). Après 30 min et 4 heures de co-culture, les résultats ont mis en évidence que les souches sauvages et mutantes présentent un taux d'internalisation dans les macrophages similaire. Les mutants que nous avons construits ne présentent donc pas de défaut d'internalisation dans le macrophage, ce qui suggère que leur capacité à être phagocytés n'est pas altérée. Après 4 h d'infection, une première mesure de la viabilité des macrophages infectés a été réalisée.

Les macrophages co-cultivés avec la souche sauvage de *C. albicans* présentent un taux de survie de 11% (Fig. 53). Comme nous l'avons précédemment observé, le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est hypovirulent en modèle macrophage (Laurian *et al*., 2019). En effet, les macrophages infectés avec ce mutant présentent un taux de survie 3 fois supérieur (34%) à celui des macrophages infectés avec la souche sauvage (Fig. 53).

Au stade 4 h, le pourcentage de survie des macrophages infectés avec les souches *HXK2T14A* et *HXK2K*^{6}*F*^{15} est respectivement de 17 et 16 %, et est donc similaire à celui observé pour les phagocytes infectés avec la souche sauvage de *C. albicans* (11% (Fig. 53)). Ces résultats démontrent que ces résidus ne sont pas requis pour la virulence de *C. albicans* en modèle macrophage.

Enfin, nous avons pu constater qu'après 4 heures de co-culture, la survie des macrophages infectés avec le mutant *HXK2D210A*, muté sur le site catalytique, est 4 fois supérieure (44%) à celle des macrophages infectés avec la souche sauvage (Fig. 53). Ces données suggèrent qu'une hexokinase 2 fonctionnelle à la fois sur le plan catalytique et régulateur pourrait être requise pour la virulence de *C. albicans* en modèle macrophage.

Enfin, après 24 h de co-culture, le taux de survie des macrophages infectés avec les souches sauvages et mutantes est statistiquement identique et est d'environ 4%. Ce qui démontre que les mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *HXK2D210A*, ne sont pas avirulents mais présentent seulement un retard de virulence (Fig. 53).

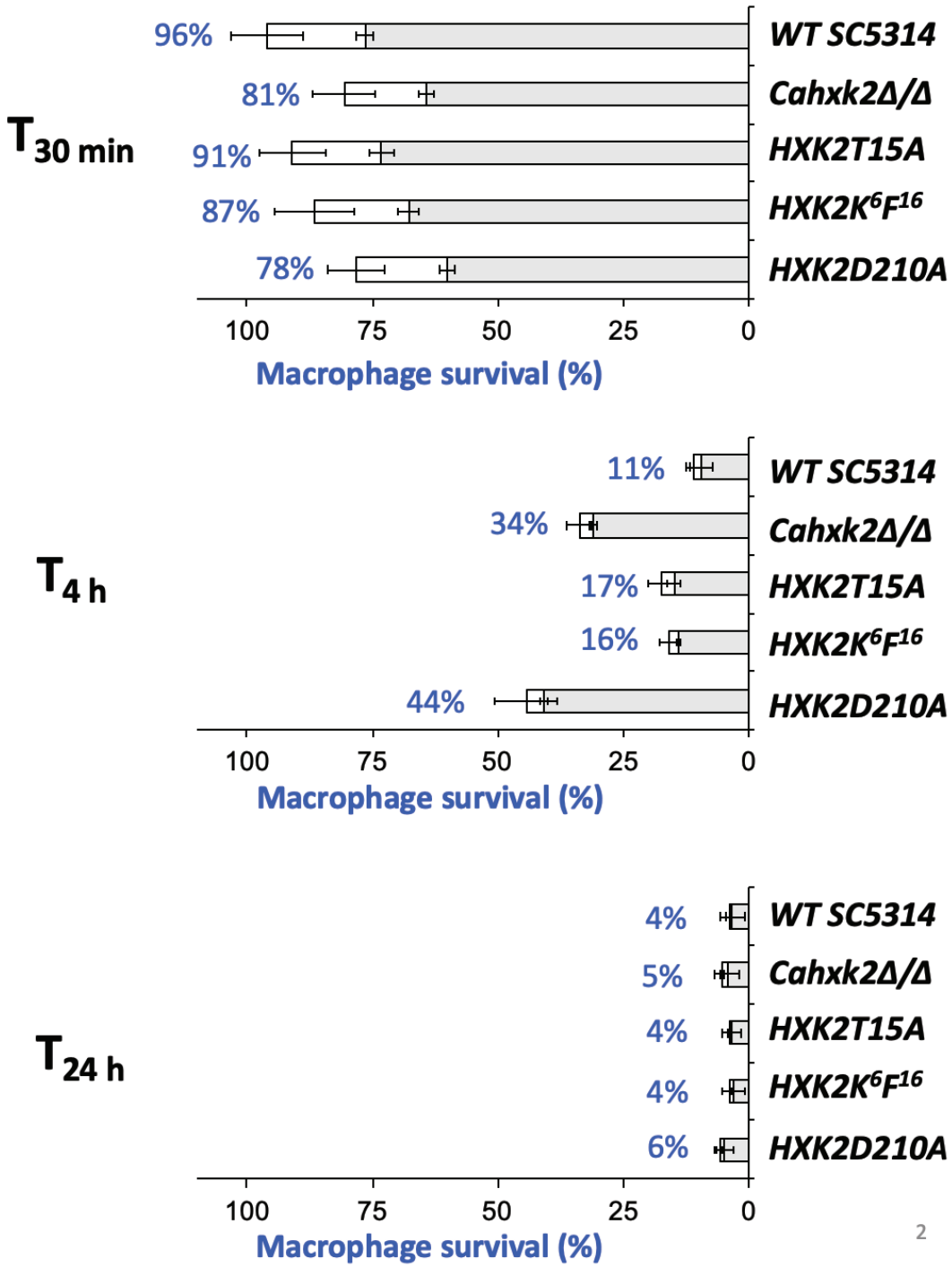


Figure 53 : Analyse de la virulence des souches sauvages et mutantes de C. albicans en modèle macrophage de souris (J774). L'interaction entre les macrophages et les levures à un ratio de 1 macrophage pour 5 levures (MOI 1 :5), a été analysée par cytométrie en flux au cours d'une cinétique de 24 h. Les barres horizontales représentent le taux de survie des macrophages, indiqué en pourcentage (en bleu) sur le côté gauche de la barre. La partie blanche de la barre représente le pourcentage de levures non phagocytées, tandis que la partie grise représente le pourcentage de levures internalisées par les macrophages. Les histogrammes représentent la moyenne (+écart-type) de trois expériences indépendantes.

VII. Discussion & Perspectives

- *Les domaines fonctionnels de l'hexokinase 2 chez C. albicans*

Chez *S. cerevisiae*, les fonctions régulatrices et catalytiques de l'hexokinase 2 *Sc*Hxk2 sont portées par des domaines distincts. La fonction catalytique repose sur 4 acides aminés bien identifiés (Asp^{210}, Ser^{158}, Glu^{269} et Glu^{302}). Ces résidus, situés dans les régions N et C-terminales de la protéine, forment une poche permettant l'interaction et la fixation du glucose au sein de l'hexokinase 2 (Anderson *et al*., 1978ab ; Bennett et Steitz, 1980 ; Shohan et Steitz, 1982). La fonction régulatrice de la protéine est, quant à elle, portée par le décapeptide K^6M^{15} et la sérine 14 situés dans la région N-terminale de la protéine (Pelaez *et al*., 2010).

Les résultats que nous avons précédemment obtenus démontrent qu'en présence de glucose, l'hexokinase 2 est aussi, chez *C. albicans,* relocalisée dans le noyau où elle participe à la répression glucose (Laurian *et al.,* 2019). Ceci suggère l'existence d'une région au sein de la protéine portant les fonctions régulatrices de l'hexokinase 2. Cependant, contrairement à ce qui a été décrit chez la levure modèle *S. cerevisiae* (Pelaez *et al*., 2010), nos données ont mis en évidence que le décapeptide K^6F^{15} situé dans la région N-terminale de l'hexokinase 2, n'est pas impliqué dans les fonctions régulatrices de l'hexokinase chez *C. albicans*. En effet, la délétion de ce peptide ne conduit pas à la modification de l'expression de gènes soumis à la répression glucose. Une étude plus détaillée de la structure de l'hexokinase 2 est actuellement en cours en collaboration avec des biochimistes et bio-informaticiens afin d'établir sur la base de modèles informatiques de nouvelles régions à déléter pour essayer de cibler spécifiquement les fonctions régulatrices de l'hexokinase 2.

En dehors des données disponibles chez *S. cerevisiae*, aucune étude n'a été conduite sur le rôle fonctionnel de ce peptide au sein des hexokinases. Le décapeptide identifié chez *C. albicans*, ne possède que 50% d'identité avec celui décrit chez *S. cerevisiae*, il n'est donc pas complètement surprenant que leur fonction au sein de la protéine puisse être différente. De plus amples analyses sont donc requises pour comprendre le rôle exact de ce domaine. Nos investigations ont également permis de conclure que la délétion de ce peptide n'avait pas de conséquence sur la filamentation en présence d'hexoses. En effet, un mutant délété du peptide K^6F^{15}, conserve en milieu inducteur sa capacité à former des hyphes de façon similaire à la souche sauvage. Par contre, nos données ont mis en évidence une possible implication de ce domaine protéique dans la virulence de *C. albicans* dans le pathosystème insecte *Galleria mellonella*. Une analyse phénotypique plus poussée du mutant *HXK2ΔK⁶F¹⁵* sera poursuivie au laboratoire afin d'étudier le rôle de ce domaine dans différents processus physiologiques comme la croissance, l'adhésion, ou encore la résistance aux stress.

Chez la levure modèle *S. cerevisiae*, l'analyse de la séquence protéique de l'hexokinase 2, ainsi que l'analyse de sa structure tridimensionnelle par des approches de cristallographie, ont permis de mettre en évidence l'existence d'une poche permettant la fixation du glucose. Parmi les acides aminés constituant cette poche, l'acide aspartique 210 (D210) joue un rôle important en interagissant directement avec le glucose et en permettant sa fixation au sein de l'hexokinase 2 (Anderson *et al*., 1978ab ; Bennett et Steitz, 1980 ; Shohan et Steitz, 1982). La délétion de ce résidu, empêche la liaison du glucose à l'enzyme et ainsi abolit son activité catalytique (Bennett *et al*., 1980 ; Arora *et al*., 1990).

En accord avec les travaux d'Anderson *et al*, (1978) chez *S. cerevisiae*, nous avons pu mettre en évidence que chez *C. albicans*, l'acide aspartique en position 210 (D210) est impliqué dans la fonction catalytique de l'hexokinase 2. En effet, chez un mutant *HXK2D210A*, où ce résidu

est substitué par une alanine, l'activité glucose kinase mesurée est similaire à celle mesurée chez un mutant nul *Cahxk2Δ/Δ*.

Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré qu'une mutation au niveau du site catalytique n'affecte pas la fonction de l'hexokinase 2 dans la répression glucose et inversement, indiquant que les deux fonctions de l'enzyme sont totalement découplées (Pelaez *et al*., 2010). Les données que nous avons générées ont mis en lumière que chez *C. albicans*, la substitution de l'acide aspartique D210, affecte aussi la fonction régulatrice de l'hexokinase 2. Nous avons en effet pu démontrer que, contrairement à la souche sauvage, les gènes *CaICL1*, *CaPCK1* et *CaHGT12*, appartenant respectivement au cycle glyoxylique, à la néoglucogenèse et à la famille des perméases de fortes affinités, n'étaient plus réprimés en présence de glucose chez le mutant *HXK2D210A*. À première vue, nos résultats sont donc en contradiction avec ceux obtenus chez *S. cerevisiae*. Ceci suggère que le fonctionnement même de la répression glucose pourrait être différent chez ces deux levures. Cependant, une très récente étude, a mis en évidence qu'une souche de *S. cerevisiae*, présentant une activité catalytique réduite en raison de mutations ponctuelles sur les gènes codant les enzymes de phosphorylation des hexoses (*ScHXK1*, *ScHXK2* et *ScGLK1*), était capable d'assimiler simultanément du glucose et du xylose. Ce comportement particulier traduit un défaut de fonctionnement de la répression glucose dans cette souche (Lane *et al*., 2018). Les données de Lane *et al*, (2018) mettent en exergue que le découplage des fonctions régulatrices et catalytiques de l'hexokinase 2 chez *S. cerevisiae*, n'est donc probablement pas aussi tranché que ce qui était jusqu'à présent décrit. Cette découverte récente donne donc du crédit aux résultats que nous avons obtenus chez *C. albicans*. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer qu'un défaut de l'activité catalytique de l'hexokinase 2 puissent conduire à une altération du fonctionnement de la répression glucose. Chez *S. cerevisiae*, un triple mutant *Schxk1hxk2glk1Δ* est incapable de mettre en place une répression glucose fonctionnelle. L'utilisation de 2 déoxyglucose, pouvant être phosphorylé mais pas métabolisé, conduit à une diminution de l'activité de la kinase *Sc*Snf1 et donc à une mise en place de la répression glucose. Enfin, le 6-déoxyglucose qui est une forme non phosphorylable et non métabolisable du glucose, bloque la mise en place de la répression glucose chez *S. cerevisiae* (Vincent *et al*., 2001 ; Hedbacker *et al*., 2006). Collectivement ces observations suggèrent que le glucose-6-phosphate pourrait être le signal initiant la mise en place de la répression glucose, ce qui établirait un lien direct entre la fonction catalytique de l'hexokinase 2, conduisant à la formation de glucose-6-phosphate et sa fonction régulatrice dans le mécanisme de répression glucose. Si tel est le cas alors chez un mutant *hxk2* nul ou présentant une activité catalytique réduite, le défaut de production de glucose-6-phosphate pourrait expliquer le défaut de mise en place de la répression glucose que nous avons observé.

Chez *S. cerevisiae* et *K. lactis*, il a été démontré qu'une glycolyse fonctionnelle est requise pour permettre l'expression correcte des perméases au glucose (Cairey-Remonnay *et al*., 2015). Dans leur étude de 2018, Lane *et al*, ont démontré que chez une souche de *S. cerevisiae* dépourvue d'activité catalytique, l'expression de la plupart des perméases au glucose était dérégulée, confirmant ainsi ce lien entre le métabolisme et l'expression des transporteurs du glucose. Ce système élaboré par les levures permet de limiter l'import de glucose dans la cellule si celui-ci ne peut pas être métabolisé. Ainsi, dans une souche présentant une activité catalytique réduite, la production de glucose-6-phosphate diminue à cause du défaut de fonctionnement de l'enzyme mais aussi car l'import du glucose dans la cellule s'effondre. Le cumul de ces deux effets pourrait entrainer par un effet « boule de neige » une diminution drastique de la quantité de glucose-6-phosphate intracellulaire. En considérant que le signal

activant la répression glucose est le glucose-6-phosphate ou, comme cela a aussi été suggéré le glucose (Meijer *et al*., 1998 ; Ye *et al*., 1999 ; Ozcan, 2002), alors le défaut d'import de ce sucre pourrait aussi être responsable du défaut de la mise en place de la répression glucose. Si ce lien a été conservé chez *C. albicans*, cela pourrait expliquer le défaut de fonctionnement de la répression glucose que nous avons mis en évidence chez le mutant *HXK2D210A*. Toutefois, les données que nous avons précédemment obtenues ont mis en exergue que ce lien ne semble pas avoir été conservé chez *C. albicans*. En effet chez un mutant *Cahxk2Δ/Δ*, l'expression des perméases de fortes affinités est significativement augmentée (Laurian *et al*., 2019). Cependant, parmi la vingtaine de perméases recensée chez *C. albicans* (Fan *et al*., 2002), nous n'avons analysé l'expression que de quatre d'entre elles. Une analyse globale du profil d'expression de toutes les perméases apparait donc nécessaire pour conclure quant à l'existence de ce lien glycolyse-sensing chez *C. albicans*.

- *Le rôle de CaMig1 dans la répression glucose chez C. albicans*

Chez *S. cerevisiae*, en présence de glucose, une voie de signalisation aboutissant à l'activation du répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1 est activée (Gancedo, 1998 ; Hedbacker 2008). Ce répresseur migre alors dans le noyau et réprime l'expression de gènes impliqués dans l'assimilation de sources carbonées alternatives (galactose, glycérol, sucrose …) (Klein *et al*., 1998 ; Rolland, Winderickx et Thevelein 2002).

La délétion du répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1, conduit à une dérépression, en présence de glucose, des gènes impliqués dans l'assimilation de ces sources carbonées. Par exemple, chez le mutant *Scmig1Δ*, le gène *ScSUC2*, codant pour l'invertase et permettant l'assimilation du sucrose, est induit d'un facteur 20 (Vallier et Carlson, 1994). Plus récemment, il a été mis en évidence que *Sc*Mig1 n'était pas le seul acteur impliqué dans la répression glucose, mais qu'il interagissait avec d'autres protéines pour former un complexe répresseur transcriptionnel fonctionnel. L'un des partenaires de *Sc*Mig1 est l'hexokinase 2 *Sc*Hxk2, qui au-delà de son rôle dans la phosphorylation des hexoses joue aussi chez *S. cerevisiae*, un rôle de co-répresseur transcriptionnel (Herrero *et al*., 1998). Lorsque du glucose est détecté dans l'environnement, l'hexokinase 2 est relocalisée dans le noyau où elle s'associe avec *Sc*Mig1, pour réprimer l'expression des gènes du métabolisme carboné alternatif (néoglucogenèse, cycle glyoxylique, ß oxydation des lipides, métabolisme oxydatif …) (Ahuatzi *et al*., 2004, 2007). Son interaction avec *Sc*Hxk2 permet de protéger *Sc*Mig1 de la phosphorylation par la kinase *Sc*Snf1 et donc de maintenir la répression glucose, tant que ce sucre est disponible dans l'environnement (Ahuatzi *et al*., 2007 ; Pelaez *et al*., 2010). Chez un mutant *Schkx2Δ*, un défaut de fonctionnement du mécanisme de répression glucose a été observé en présence de forte concentration de glucose (Rodriguez *et al*., 2001 ; Schuurmans *et al*., 2008a ; Schuurmans *et al*., 2008b). En 2010, Pelaez *et al*, ont démontré que l'interaction entre *Sc*Mig1 et *Sc*Hxk2 était permise par un petit peptide de 10 acides aminés (K^6M^{15}) situé dans la région N-terminale de l'hexokinase. La délétion de ce peptide, abolit les fonctions régulatrices de l'hexokinase 2 qui ne peut plus interagir avec le répresseur *Sc*Mig1. Il en résulte une levée de la répression glucose et ce même en présence de forte concentration en glucose (Pelaez *et al*., 2010). Collectivement, ces observations démontrent que l'interaction de l'hexokinase 2 et de *Sc*Mig1 est requise pour permettre à *Sc*Mig1 d'exercer correctement sa fonction de répresseur transcriptionnel.

Chez *C. albicans*, nos données démontrent que le décapeptide K^6F^{15}, présentant 50% d'identité avec le peptide K^6M^{15} identifié chez *S. cerevisiae*, n'est pas impliqué dans les

fonctions régulatrices de l'hexokinase 2. En effet, chez un mutant *HXK2ΔK*^{6}*F*^{15}, la mise en place de la répression n'est pas altérée. Ce qui suggère (i) que chez *C. albicans Ca*Mig1 n'interagit peut-être pas avec *Ca*Hxk2 ou (ii) que cette interaction est médiée par un domaine différent de celui décrit chez *S. cerevisiae*. Pour répondre à cette question et mieux comprendre le rôle de *Ca*Mig1 dans la répression glucose chez *C. albicans*, des expériences d'immunoprécipitation sont actuellement en cours au laboratoire afin d'identifier si de façon analogue à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae*, *Ca*Mig1 interagit avec *Ca*Hxk2. Le cas échéant, des versions tronquées de l'hexokinase 2 seront générées par mutagenèse dirigée afin de délimiter le domaine permettant cette interaction. Si l'immunoprécipitation ne révèle pas d'interaction entre l'hexokinase et *Ca*Mig1, une approche complémentaire par double hybride ou co-immunoprécipitation sera utilisée pour confirmer l'absence d'interaction.

Une autre hypothèse envisageable serait que *Ca*Mig1 ait chez *C. albicans* une fonction totalement différente de celle décrite chez *S. cerevisiae* et n'intervienne pas dans la répression glucose. Le rôle de cette protéine dans la répression glucose est d'ailleurs controversé. En effet, deux études indépendantes menées par des groupes différents ont mis en relief des résultats contradictoires concernant le rôle de *Ca*Mig1. En 2000, Zaragoza *et al*. ont démontré que la délétion de *CaMIG1* n'impacte pas l'expression du régulon *GAL* (qui est réprimé par le glucose). Cette observation a ensuite été réfutée par le groupe de Pavelka qui a mis en évidence une augmentation de l'expression de *CaGAL1* chez le mutant *Camig1Δ/Δ* (Cottier *et al*., 2017). À ce jour, le rôle de *Ca*Mig1 dans la répression glucose reste assez mal compris.

Cependant, plusieurs indices clairsemés dans la littérature viennent appuyer l'hypothèse selon laquelle *Sc*Mig1 et *Ca*Mig1 pourraient avoir des rôles différents. Premièrement, contrairement à ce qui est décrit chez *S. cerevisiae*, où *Sc*Snf1 contrôle l'état d'activation de *Sc*Mig1, la protéine *Ca*Mig1 ne porte pas de sites consensus de phosphorylation par *Ca*Snf1 (Van Ende *et al*., 2019). Deuxièmement, toujours en opposition avec ce qui est décrit chez le modèle *cerevisiae*, *CaMIG1* n'est pas régulé par la source carbonée (Zaragoza *et al*., 2000). De plus, les résultats de qPCR que nous avons obtenus corroborent cette hypothèse, en effet, en présence de glucose, le gène *CaICL1* impliqué dans l'assimilation de sources carbonées alternatives telles que le lactate, l'éthanol ou encore l'acétate, est toujours soumis à la répression glucose chez le mutant *Camig1Δ/Δ*. Ce qui suggère que *Ca*Mig1 n'est pas impliqué dans la mise en place de la répression glucose chez *C. albicans*. L'analyse d'autre gènes cibles serait souhaitable pour mieux comprendre le rôle de *Ca*Mig1 dans le processus de répression glucose. De plus notre approche par immunoprécipitation pourrait révéler de nouveaux partenaires de l'hexokinase 2. La création de mutants de délétion pourrait par la suite permettre d'identifier de nouveaux acteurs de la répression glucose spécifiques de *C. albicans*. Curieusement, nos données révèlent que la délétion du gène *CaMIG1* entraine un retard dans la levée de la répression glucose. Ce qui laisse à penser que chez *C. albicans*, *Ca*Mig1 pourrait contrôler non pas la mise en place mais la levée de la répression glucose.

Chez *S. cerevisiae*, un paralogue de *Sc*Mig1 : *Sc*Mig2 a été identifié. Cette protéine partage les fonctions de régulateur transcriptionnel de *Sc*Mig1 et dans certaines conditions interagit avec *Sc*Mig1 pour réprimer l'expression de gènes cibles du métabolisme carboné alternatif (Lutfiyya *et al.,* 1998, Klein *et al.,* 1998). Chez *C. albicans*, des analyses par BLAST dans le génome ont mis en évidence l'existence de *Ca*Mig2. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a été menée sur les fonctions de *Ca*Mig2 et son implication dans le mécanisme de répression glucose reste purement hypothétique. Si comme nos données le suggèrent, *Ca*Mig1 n'intervient pas dans le processus de répression glucose, cette fonction pourrait être portée par *Ca*Mig2. Pour répondre à cette question et améliorer notre compréhension du

fonctionnement de la répression glucose chez *C. albicans*, la construction d'un mutant *Camig2Δ/Δ* est actuellement en cours au laboratoire. L'analyse phénotypique de ce mutant permettra d'élucider les fonctions physiologiques de la protéine *Ca*Mig2. Enfin, une analyse par qPCR du niveau d'expression de certains gènes cibles connus pour être réprimés par le glucose, chez le mutant *Camig2Δ/Δ*, permettra d'attester le cas échéant du rôle de *Ca*Mig2 dans la répression glucose.

- *Le rôle de l'hexokinase 2 dans la virulence de C. albicans*

Nos résultats ont permis de mettre en évidence que ni la fonction catalytique, ni la fonction régulatrice de l'hexokinase 2 ne sont requises pour la virulence de *C. albicans* dans le pathosystème *G. mellonella*. L'environnement colonisé au cours de l'infection de *G. mellonella* est pauvre en hexoses avec une concentration en glucose inférieure à 1 mM (Kanost, 2009) ce qui pourrait expliquer que ces fonctions soient dispensables dans la mise en place de l'infection.
En revanche, nos données démontrent que la région N-terminale de la protéine *Ca*Hxk2, et plus particulièrement, le décapeptide $K^{6}F^{15}$, ainsi que la thréonine en position 14, semblent jouer un rôle important dans la virulence de la levure. L'implication de ces résidus dans la virulence n'a jamais été décrite. Chez ces mutants, le dimorphisme de la levure n'est pas affecté (Fig. 51) ce qui exclut que le défaut de virulence de ces mutants soit lié à un défaut de filamentation. Une autre explication serait que l'hexokinase 2 possède chez *C. albicans*, une autre fonction indéterminée à ce jour et contribuant à la virulence.

Chez *C. albicans*, de nombreuses enzymes de la glycolyse comme l'énolase (*Ca*Eno1) la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*Ca*Tdh3), la triose phosphate isomérase (*Ca*Tpi1), la phosphoglycérate kinase (*Ca*Pgk1) et la phosphoglycérate mutase (*Ca*Gpm1) sont à la fois retrouvées dans le cytoplasme, où elles participent activement à l'assimilation des hexoses, mais aussi à la surface de la cellule, ancrées dans la membrane plasmique ou la paroi, voire libre dans le milieu extracellulaire (Karkowska-Kuleta *et al*., 2011 ; Gil *et al*., 2006 ; Pitarch *et al*., 2001 ; Crowe *et al*., 2003). Le mécanisme conduisant à la « sécrétion » de ces protéines n'est pas clairement défini. En effet, aucune d'elles ne comporte de peptide signal, ce qui suggère qu'elles n'empruntent pas la voie classique des protéines sécrétées (Alloush *et al*., 1997). Cependant, une étude a récemment mis en évidence que ces protéines pourraient être relarguées par le biais de vésicules extracellulaires appelées exosomes (Vargas *et al*., 2015). De nombreuses études ont mis en évidence qu'au niveau pariétal, ces protéines jouent un rôle crucial dans l'adhésion de la levure aux surfaces biotiques. Par exemple, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et l'énolase sont capables d'interagir avec les laminines et la fibronectine (Gil-Navarro *et al*., 1997). La délétion des gènes *CaTDH3* et *CaENO1* codant pour ces protéines se traduit par un sévère défaut d'adhésion de la levure couplé à un défaut de virulence en modèle murin (Gozalbo *et al*., 1998 ; Silva *et al*., 2014). Plus récemment, une fonction transglutaminase a été attribuée à l'énolase de *C. albicans* (Reyna-Beltran *et al.,* 2018). Les transglutaminases sont des enzymes largement distribuées chez les plantes, les animaux, et les microorganismes, et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la régulation de la croissance, la différentiation cellulaire, l'adhésion et le maintien de l'intégrité tissulaire. Chez *C. albicans*, la fonction transglutaminase de l'énolase est requise pour l'adhésion de la levure aux cellules de l'hôte et la formation des hyphes (Reyna-Beltran *et al*., 2018). De plus, la phosphoglycérate mutase *Ca*Gpm1 joue un rôle important dans l'adhésion de *C. albicans* à certains types cellulaires de l'hôte (kératinocytes,

cellules endothéliales, monocytes). L'adhésion est favorisée par une interaction entre la phosphoglycérate mutase et la vitronectine présente à la surface de ces cellules (Lopez *et al*., 2014). La délétion du gène *CaGPM1*, diminue significativement l'adhésion de la levure aux cellules de l'hôte. Ceci suggère que *Ca*Gpm1 joue un rôle important dans la colonisation et l'invasion des tissus de l'hôte et par conséquent dans la virulence de *C. albicans* (Lopez *et al*., 2014). Enfin, la phosphoglycérate kinase (*Ca*Pgk1) est capable de lier avec une forte affinité une protéine de l'hôte appelée plasminogène (Crowe *et al*., 2003). Produit sous forme de pré-protéine, le plasminogène est abondamment retrouvé dans le système circulatoire de l'hôte (flux sanguin). Suite à son activation (plasmine) il catalyse le clivage des composants fibrillaires constituant les tissus conjonctifs et la matrice extracellulaire (fibrines, collagènes…) et joue donc un rôle important dans le remodelage des tissus (Lijnen et collen 1995). *C. albicans* ne produit pas de facteur d'activation du plasminogène mais détourne ceux produits par son hôte. La séquestration et l'activation subséquente d'une importante quantité de plasminogène au niveau de la paroi fongique pourrait favoriser localement la nécrose et l'invasion des tissus de l'hôte en révélant de nouveaux sites de fixation pour la levure (Crowe *et al*., 2003). Chez *C. albicans*, l'adhésion est un facteur de virulence majeur (Wächtler *et al*., 2010). Les protéines glycolytiques présentent à la surface de la cellule pourraient donc, de par leur rôle dans l'adhésion, être directement impliquées dans la virulence de *C. albicans*.
En 2004, une analyse protéomique globale a révélé que des anticorps dirigés contre l'hexokinase 2 de *C. albicans* ont été retrouvés dans le sérum des patients atteints de candidose systémique. Ceci suggère qu'à l'instar d'autres enzymes de la glycolyse, l'hexokinase 2 pourrait être présente à la surface de la cellule (Pitarch *et al*., 2004). Une analyse en microscopie confocale d'une souche exprimant la protéine *Ca*Hxk2 fusionnée en C-terminal avec la GFP, est en cours et pourrait nous permettre d'élucider cette question. La délétion de la partie N-terminale de la protéine diminue drastiquement la virulence de *C. albicans* en modèle insecte. Cette région pourrait donc être impliquée dans l'adhésion aux constituants de l'hôte. L'analyse de l'adhésion des différents mutants ponctuels de l'hexokinase 2 sur un modèle d'épithélium humain reconstitué (RHE) pourrait être entreprise afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

L'analyse de la virulence des mutants ponctuels de l'hexokinase 2 en modèle *G. mellonella* et macrophage a révélé des résultats contradictoires. En modèle insecte, la modification de la région N-terminale de la protéine (délétion du décapeptide K^6F^{15} ou substitution de la thréonine 14 en alanine) diminue la virulence de la levure, tandis que la réduction de l'activité catalytique de l'enzyme n'impacte pas la virulence. À l'inverse, dans un modèle *in vitro* de phagocyte, l'altération des résidus de la région N-terminale n'a aucun effet sur le pouvoir pathogène de *C. albicans*, mais la perte de la fonction catalytique atténue drastiquement la virulence.

La virulence de *C. albicans* en modèle macrophage s'évalue par sa capacité à tuer le phagocyte. L'élimination des phagocytes par la levure repose en grande partie sur sa capacité à adopter un mode de développement filamenteux à l'intérieur des macrophages (Ghosh *et al*., 2009). Les hyphes formés par le champignon exercent une pression mécanique sur la membrane du phagocyte entrainant *in fine* sa rupture. La perte de l'intégrité cellulaire conduit subséquemment à la mort du macrophage. Nos résultats ont révélé que les mutants *HXK2ΔK^{6}F^{15}* et *HXK2T14A* conservent une capacité de filamentation similaire à la souche sauvage, ce qui pourrait expliquer que ces mutants aient un profil de virulence identique à la souche sauvage. En revanche, le mutant *HXK2D210A* est incapable de former des filaments.

Le défaut de virulence de ce mutant pourrait donc être essentiellement lié à son incapacité à adopter un mode de développement filamenteux.

Plus globalement, nous pouvons supposer que les facteurs de virulence mobilisés dans le cadre de l'infection d'un organisme pluricellulaire complexe comme *G. mellonella* sont différents de ceux requis pour infecter une cellule isolée. Comme mentionné précédemment, la survie de la levure à l'intérieur du macrophage requiert la formation d'hyphes. Lors de la colonisation d'un hôte complexe, les mécanismes d'adhésion, le développement d'hyphe et la sécrétion d'enzymes lytiques, favorisent la colonisation et l'invasion de l'hôte et jouent un rôle crucial dans la mise en place d'une infection (Barrett-Bee *et al*., 1985 ; Sundstrom *et al*., 2002 ; Klemba *et al*., 2002 ; Dalle *et al*., 2010 ; Frank et Hostetter, 2007 ; Villar *et al*., 2007 ; Dubin *et al*., 2013).

Dans nos expériences d'infection, les phagocytes ont été cultivés dans un milieu cRPMI contenant du glucose comme principale source de carbone. Les récentes expériences de Tucey *et al*, (2018) ont démontré que le glucose jouait un rôle crucial dans la survie des macrophages au cours de l'interaction avec *C. albicans*. En effet, dans les macrophages activés, les gènes glycolytiques sont fortement induits, tandis que le métabolisme oxydatif est soumis à une répression transcriptionnelle forte (Jha *et al*., 2015). Le glucose est donc la seule source de carbone pouvant être utilisée par les macrophages pour soutenir les réactions de leur métabolisme et mettre en place la réponse immunitaire. Au cours du processus infectieux, les données de dual-RNAseq générées ont révélé une induction concomitante des gènes de la glycolyse à la fois chez la levure et le phagocyte (Tucey *et al*., 2018). Ce qui suggère qu'au cours de l'interaction levure-macrophage, une compétition pour le glucose en tant que nutriment essentiel s'établit entre les deux partenaires. En tant que pathogène *C. albicans* dispose d'outils efficaces de détection et d'assimilation du glucose, et les auteurs ont pu mettre en évidence que dans cette compétition, la levure surpasse le macrophage (Tucey *et al*., 2018). La déplétion en glucose créée par *C. albicans* au cours de l'interaction avec les phagocytes, conduit au dysfonctionnement métabolique des macrophages et à leur mort par apoptose (Garedew *et al*., 2010 ; Tucey *et al*., 2018). La capacité de la levure à éliminer les macrophages repose donc en grande partie sur sa capacité à assimiler efficacement le glucose pour en priver les phagocytes (Tucey *et al*., 2018). Les données de virulence que nous avons obtenu en modèle macrophage semblent appuyer les conclusions de Tucey *et al*, (2018). En effet, nos résultats démontrent que les mutants *HXK2T14A* et *HXK2ΔK*^{6}*F*^{15} qui assimilent le glucose aussi efficacement que la souche sauvage, ne présentent pas de défaut de virulence. À l'inverse, nos données révèlent que chez les mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *HXK2D210A*, qui présentent une activité glucose kinase et une vitesse de consommation du glucose drastiquement réduites, et qui sont donc moins compétitifs pour le glucose, la virulence en modèle macrophage est sévèrement atténuée. Dans les environnements biologiques, le glucose est souvent un élément limitant (Brown *et al*., 2014) et la levure utilise principalement des sources carbonées alternatives pour survivre au sein des niches colonisées. Ceci pourrait expliquer que le mutant *HXK2D210A* ne présente pas de défaut de virulence en modèle insecte.

Ainsi, il semblerait qu'en fonction des ressources carbonées localement disponibles, la fonction catalytique de l'hexokinase mais aussi sa partie N-terminale soit requise pour la virulence optimale de la levure.

Résultats : Partie III

Étude de la reprogrammation métabolique de la levure *C. albicans* au cours des phases précoces de la phagocytose par une approche innovante de droplet digital PCR

Résumé :

Les infections par les levures du genre *Candida*, représentent un problème de santé publique majeur. Le faible nombre d'agents thérapeutiques disponibles et l'apparition rapide de résistances expliquent en partie la gravité et le fort taux de mortalité associé à ces infections. Composante naturelle de la flore commensale humaine, *C. albicans* est un pathogène opportuniste qui devient invasif lorsque le système immunitaire de l'hôte est affaibli ou que certaines barrières de protection sont altérées. En tant que pathogène, *C. albicans* colonise de nombreux microenvironnements complexes (muqueuses, sang, foie, reins, tractus intestinal, macrophages ...) où les ressources carbonées varient en quantité et en qualité. Au sein des macrophages, qui constituent la première ligne de défense de l'hôte, la survie de la levure repose sur sa capacité à (i) s'échapper du phagosome en adoptant un mode de développement filamenteux et (ii) à mobiliser les ressources carbonées disponibles dans son environnement direct. Suite à sa phagocytose, la levure reprogramme son métabolisme et active la transcription de gènes impliqués dans l'assimilation de sources carbonées alternatives comme les lipides, indiquant que le macrophage est un environnement pauvre en sucres simples. Cependant, plusieurs indices clairsemés dans la littérature suggèrent que le métabolisme du glucose pourrait jouer un rôle important pendant les étapes précoces de la phagocytose. Nous avons donc, par une approche fine de ddPCR réalisé une étude de transcriptomique ciblée visant à comprendre comment est mobilisé le métabolisme carboné durant les temps précoces (30 min) de l'interaction entre *C. albicans* et les macrophages. Pour cela, l'expression de gènes appartenant aux principales voies du métabolisme carboné (glycolyse, ß oxydation, cycle glyoxylique et néoglucogenèse) a été analysée. Nos résultats mettent en évidence que, si les perméases permettant l'import du glucose dans la cellule sont fortement surexprimées suite à la phagocytose, le métabolisme du glucose n'est pas sollicité durant les phases précoces. À l'inverse, le métabolisme carboné alternatif est fortement mobilisé et ce dès les premières minutes suivant la phagocytose.

I. Introduction

Les infections fongiques à *Candida* sont le résultat d'une bataille coordonnée entre le champignon et son hôte. Le système immunitaire des mammifères est une barrière efficace contre les infections à *Candida*, et les cellules phagocytaires comme les macrophages et les neutrophiles constituent la première ligne de défense contre les infections microbiennes (Fernandez-Arenas *et al*., 2007). Ces cellules, sont capables de discriminer les éléments du soi et du non-soi. La reconnaissance des corps étrangers est permise par des récepteurs particuliers : les PRR (pathogen recognition receptor) qui sont localisés à la surface des phagocytes. Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement des éléments antigéniques (PAMP, pathogen associated molecular pattern) portés par les pathogènes (Netea *et al*., 2008). La stimulation de ces récepteurs conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation parfois redondantes, permettant la production et la sécrétion d'effecteurs de l'immunité. Ces molécules interviennent notamment dans le recrutement des cellules immunitaires au niveau du site d'infection et stimulent la production des composés anti-microbiens par les cellules épithéliales (Netea *et al*., 2008). Lorsqu'un phagocyte reconnait un élément étranger, l'activation de voies de signalisation particulières entraine un remodelage du cytosquelette de la cellule qui émet des pseudopodes et « engloutit » le microorganisme (Freeman et Grinstein, 2014). Ce mécanisme appelé phagocytose permet l'internalisation et la compartimentalisation du corps étranger (Desjardins *et al*., 2005). Le phagosome contenant l'élément phagocyté est un environnement hostile (pH acide, enzymes lytiques, agents oxydants, carence en nutriment…) (Fernandez-Arenas *et al*., 2007 ; Miramon, Kasper et Hube, 2013). Ces conditions défavorables conduisent le plus souvent à la destruction de l'élément capturé.

Cependant, en tant que pathogène, *C. albicans* a élaboré diverses stratégies pour échapper au phagosome et survivre à l'intérieur du macrophage. De nombreuses études ont mis en évidence que suite à sa phagocytose par les macrophages, *C. albicans* adopte un mode de développement filamenteux lui permettant de quitter le phagosome et *in fine* de sortir du macrophage (Marcil *et al.,* 2002 ; Ghosh *et al.*, 2009). Les facteurs déclenchant la transition morphologique à l'intérieur du macrophage ne sont pas clairement compris. En effet le pH acide et la faible disponibilité en nutriments à l'intérieur du phagosome sont des facteurs inhibiteurs du dimorphisme. Récemment, il a été suggéré que le métabolisme des acides aminés pourrait être responsable du déclenchement de la transition morphologique. En effet la délétion de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'arginine inhibe la formation des hyphes dans le macrophage (Ghosh *et al.,* 2009 ; Jimenez-Lopez *et al.,* 2013). De plus, le catabolisme des acides aminés libère de l'ammonium neutralisant l'acidité du phagosome et induisant le dimorphisme (Vylkova *et al.,* 2011).

Pour survivre au sein des phagocytes qui sont des environnements relativement pauvres en nutriments, *C. albicans* doit être capable de percevoir et d'assimiler efficacement les ressources carbonées disponibles dans son environnement direct. Des analyses transcriptomiques et protéomiques globales ont révélé que durant les phases tardives de la phagocytose (≈ 3 h) la levure reprogramme son métabolisme en réprimant l'expression des gènes de la glycolyse et en activant fortement la transcription des gènes du cycle glyoxylique, de la néoglucogenèse et de la ß-oxydation des lipides (Lorenz et Fink, 2001; Rubin-Bejerano *et al*., 2003 ; Fradin *et al*., 2003, 2005). Ceci suggère que le macrophage est un environnement pauvre en glucose. Des mutations au niveau des gènes clés de ces voies métaboliques

favorisent l'élimination de la levure par les macrophages (Barelle *et al*., 2006 ; Piekarska *et al*., 2006). Ceci révèle l'importance de la flexibilité métabolique dans les processus de survie et de virulence de la levure au sein des phagocytes (Barelle *et al*., 2006 ; Piekarska *et al*., 2006).

Cependant, parmi les nombreuses données générées par ces approches globales, certaines suggèrent que la signalisation et l'assimilation du glucose pourraient être impliquées au cours des phases précoces de l'infection du macrophage. En effet, la surexpression du senseur impliqué dans la détection du glucose (Prigneau *et al*., 2003), de transporteur d'hexoses (Luongo *et al*., 2005), et de la glucokinase 1 (Kitahara *et al*., 2015) a été signalée, mais de façon clairsemée dans différents travaux. De plus, le profil RMN métabolique des macrophages non colonisés révèle une concentration en glucose de 5 mM (Seguin et Le Pape, 1994) ce qui correspond aux conditions d'activation transcriptionnelle des transporteurs de glucose de forte affinité chez *C. albicans* (Fan *et al*., 2002). Enfin, nous avons précédemment démontré que le mutant hexokinase 2 (*Cahxk2Δ/Δ*) qui présente une capacité d'assimilation du glucose diminuée est hypovirulent dans un modèle macrophage (Laurian *et al*., 2019).

Forts de ces arguments, nous avons analysé le métabolisme de la levure durant les phases précoces de l'interaction avec les macrophages. Pour cela, nous avons analysé en ddPCR, les variations du niveau d'expression de gènes clés appartenant aux voies de la glycolyse, de la néoglucogenèse, du cycle glyoxylique et de la ß-oxydation des lipides. L'objectif étant de mieux comprendre la temporalité des reprogrammations métaboliques de la levure au cours de la phagocytose et de déterminer si le glucose est un élément important durant les phases précoces de l'interaction levure-macrophage. Ce projet mené en collaboration avec l'équipe de Pathogénicité de *Candida* (UMR CNRS-5234, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, Université de Bordeaux) et la plateforme technique du DTAMB (Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité, Université Lyon 1), a fait l'objet d'un financement par la Fédération BioEnviS (Bio Environnement et Santé, Université Lyon1).

II. Choix de la méthode et des cibles

Les données de transcriptomique et de protéomique jusqu'à présent disponibles dans la littérature, sont focalisées sur l'analyse des reprogrammations métaboliques de la levure durant les phases tardives de la phagocytose (entre 3 et 6 h post-phagocytose). L'un des principaux verrous techniques s'opposant à l'étude des phases précoces de l'interaction levure-macrophages est que la quantité de levure internalisée par les phagocytes dans ce laps de temps est relativement faible. La quantité limitée de matériel biologique disponible rend donc difficile la détection des variations de l'expression des gènes, avec les techniques classiques de qPCR.

Afin d'explorer, sur le plan transcriptomique, les changements métaboliques de *C. albicans* au cours des 30 premières minutes de la phagocytose, nous avons fait appel aux techniques de PCR de « troisième génération » dites « PCR numérique ». Parmi les méthodes disponibles, nous avons choisi l'approche par digital droplet PCR (ddPCR). Le principe de fonctionnement de la ddPCR repose sur le fractionnement de l'échantillon à analyser en plusieurs milliers de gouttelettes. Chaque gouttelette contient au moins une molécule d'acide nucléique et l'ensemble des réactifs nécessaire pour mener à bien une réaction de PCR classique. Les gouttelettes sont ensuite analysées et triées à l'aide d'un lecteur optique. Les gouttelettes contenant la cible émettent un signal fluorescent, tandis que celles ne contenant pas le gène d'intérêt n'émettent aucun signal. En appliquant la loi de Poisson au ratio du nombre de gouttelettes positives sur le nombre de gouttelettes total, il est possible de quantifier de façon absolue et très précise le nombre de copies de la cible dans l'échantillon de départ.

La faible concentration en acide nucléique au sein des gouttelettes, résultant du partitionnement de l'échantillon, a pour conséquence d'améliorer significativement la sensibilité de la réaction de PCR. La grande sensibilité de la ddPCR permet donc de détecter avec précision les variations de l'expression d'un gène à l'échelle d'une cellule unique. La ddPCR permet également de s'affranchir des réplicats techniques et rend inutile la mise au point d'une gamme étalon, permettant donc un gain de temps important.

Les gènes choisis pour cette étude de transcriptomique ciblée sont listés dans le tableau 4 ci-dessous. Parmi les gènes retenus, certains codent pour des enzymes impliquées dans la détection, le transport et la métabolisation du glucose ou des acides gras. D'autres codent pour des enzymes contrôlant l'orientation du flux métabolique dans la cellule (respiration/fermentation) ou pour des facteurs de transcription. Ensemble, leur étude donne une vision globale des voies métaboliques activées dans la levure suite à sa phagocytose par les macrophages.

Gène	Numéro d'accession *GenBank*	Fonction de la protéine associée
CaHGT3	XM_710040.2	Transporteur putatif du glucose (faible affinité)
CaHGT4	XM_718080.1	Senseur du glucose et du galactose
CaHGT9	XM_019475543.1	Transporteur putatif du glucose
CaHXT10	XM_019475528.1	Transporteur putatif du glucose (forte affinité)
CaHGT12	XM_715292.1	Transporteur des hexoses (forte affinité)
CaHGT17	XM_717658.2	Transporteur putatif du glucose (forte affinité)
CaHGT19	XM_712726.1	Transporteur putatif du glucose et du myo-inositol
CaHXK2	XM_712312.1	Phosphorylation des hexoses
CaGLK1	XM_705084.2	Phosphorylation du glucose et du mannose
CaPFK1	XM_716783.1	Phosphofructokinase, catalysant la 3ème étape de la glycolyse (F6P -> F1,6bP)
CaPDC12	XM_019475363.1	Pyruvate décarboxylase putative (oriente le flux glycolytique vers métabolisme fermentatif)
CaPDX1	XM_717131.1	Protéine X du complexe pyruvate déshydrogénase (oriente le flux glycolytique vers le métabolisme oxydatif)
CaCTF1	XM_717453.2	Facteur de transcription activant l'expression des gènes permettant la dégradation des acides gras
CaFAT1	XM_706233.2	Enzyme putative impliquée dans la biosynthèse des sphingolipides
CaPXA1	XM_713564.2	Import des acides gras dans le peroxysome (transporteur famille ABC)
CaPXA2	XM_711231.2	Import des acides gras dans le peroxysome (transporteur famille ABC)
CaACB1	XM_019475477.1	Protéine impliquée dans le transport des Acyl-CoA
CaFAA2-1	XM_709191.2	Acyl CoA synthétase (activation des acides gras)
CaFAA2-2	XM_714877.2	Acyl CoA synthétase (activation des acides gras)
CaFAA2-3	XM_710112.1	Acyl CoA synthétase (activation des acides gras)
CaFAA4	XM_714261.1	Acyl CoA synthétase (activation des acides gras)
CaFOX3	XM_716682.1	Thiolase putative, impliqué dans la dernière étape de la ß-oxydation
CaICL1	XM_707139.1	Isocitrate lyase (cycle glyoxylique)
CaPCK1	XM_713578.1	Phosphoénolpyruvate carboxykinase, première étape de la néoglucogenèse
CaALS3	XM_705343.2	Adhésine pariétale
CaHWP1	XM_704869.2	Adhésine pariétale

Tableau 4 : Liste des gènes ciblés dans cette étude de transcriptomique et leur fonction dans la cellule.

III. Analyse transcriptomique par ddPCR du métabolisme de *C. albicans* au cours des phases très précoces de la phagocytose

A. Le métabolisme du glucose

Afin de déterminer si le métabolisme du glucose est mobilisé pendant les phases précoces de l'interaction levure macrophage, nous avons comparé le niveau d'expression de gènes impliqués dans la détection, le transport et l'assimilation du glucose chez des levures ayant ou non été exposées à des phagocytes (Fig. 54 et 55). Afin de pourvoir observer un potentiel effet du glucose intracellulaire du macrophage sur l'expression des gènes de levure, les levures et les macrophages ont été co-cultivés en milieu RPMI dépourvu de glucose, mais contenant 0,2% de glycérol comme principale source de carbone. Après 30 minutes de co-culture, les levures internalisées par les macrophages ont été récupérées, leur ARNs extraits et analysés en ddPCR.

Nos données révèlent qu'après 30 minutes au contact des macrophages, l'expression des gènes *CaHGT4*, *CaHGT3* et *CaHGT19*, codant respectivement pour un senseur de forte affinité et des perméases de faible affinité au glucose, reste stable (Fig. 54). En revanche, la transcription des gènes *CaHGT12*, *CaHXT10* et *CaHGT17* codant pour des perméases de forte affinité impliquées dans le transport de traces de glucose est fortement activée suite à la phagocytose de la levure (Fig. 54). Le résultat obtenu avec *CaHGT12* est particulièrement marquant, puisque l'expression de ce gène chez les levures phagocytées est induite d'un facteur 40 (Fig. 54) par rapport aux levures non exposées aux macrophages. La transcription des deux autres perméases de forte affinité (*CaHXT10* et *CaHGT17*) est également activée mais dans une moindre mesure (x 5). Ceci suggère la présence d'une faible concentration de glucose à l'intérieur du macrophage.

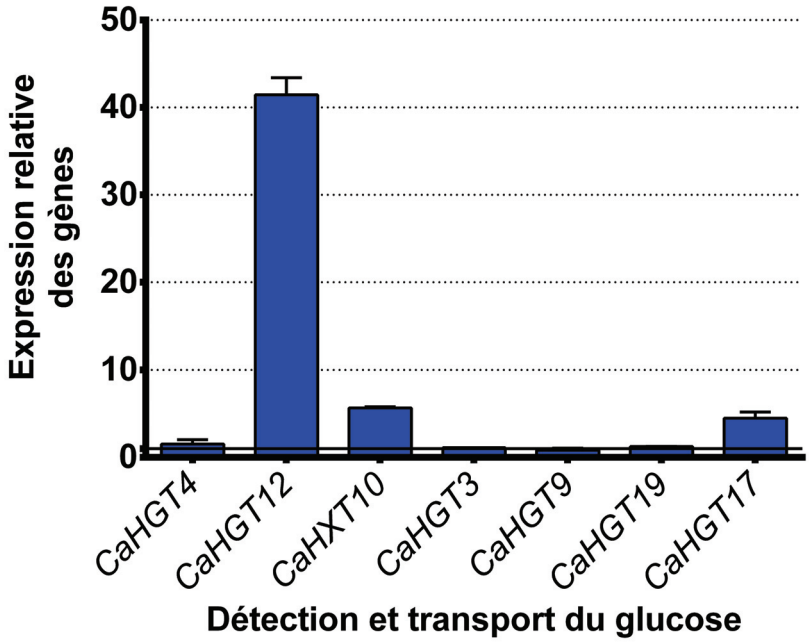


Figure 54 : Expression relative des gènes impliqués dans la détection et le transport du glucose par C. albicans après 30 minutes de phagocytose par des macrophages cultivés en milieu RPMI glycérol 0,2%. Le niveau de transcription des gènes a été mesuré par ddPCR. Les résultats sont exprimés relativement à l'abondance des transcrits présents dans la même souche de levure non phagocytée et cultivée dans un milieu YP contenant 2% de glycérol (ligne noire).

Notre objectif principal était de déterminer si, au cours des phases précoces de la phagocytose, *C. albicans* utilise le glucose contenu dans le macrophage et donc si le métabolisme du glucose pouvait être un élément déterminant de la survie des levures phagocytées. Pour cela, nous avons analysé le niveau d'expression de gènes clés de la glycolyse (Fig. 55). L'expression des gènes *CaHXK2*, *CaGLK1* et *CaPFK1* codant les enzymes impliquées dans les étapes irréversibles de la glycolyse (Fig. 13) a particulièrement été étudiée. Après 30 min de phagocytose, l'expression du gène *CaHXK2*, codant pour la principale enzyme de phosphorylation du glucose intracellulaire (Laurian *et al*., 2019) est fortement réprimée (x 3) (Fig. 55). Curieusement, l'expression du gène *CaGLK1* codant une autre enzyme, impliquée de façon minoritaire dans la phosphorylation des hexoses est légèrement induite (x 1,34) (Fig. 55). Enfin, l'expression du gène *CaPFK1* codant la phosphofructokinase, qui catalyse la 3ème étape irréversible de la glycolyse n'est pas induite (Fig. 55). La forte répression de l'hexokinase 2 qui contrôle l'entrée du glucose dans la voie glycolytique semble indiquer que le métabolisme du glucose n'est pas sollicité durant les phases précoces de la phagocytose. Ce résultat est soutenu par l'absence ou la très faible induction des gènes (*CaGLK1* et *CaPFK1*) codant pour d'autres enzymes de la glycolyse.

Nous avons également analysé le type de métabolisme (fermentaire ou oxydatif) adopté par la levure suite à sa phagocytose. L'expression des gènes *CaPDC12* et *CaPDX1* contrôlant respectivement l'engagement vers la fermentation ou la respiration (Fig. 55) a donc été mesurée. Étonnamment, nos résultats mettent en évidence l'induction simultanée de la transcription de ces deux gènes (Fig. 55). Ce résultat pourrait suggérer l'existence de populations hétérogènes de levures au sein des macrophages

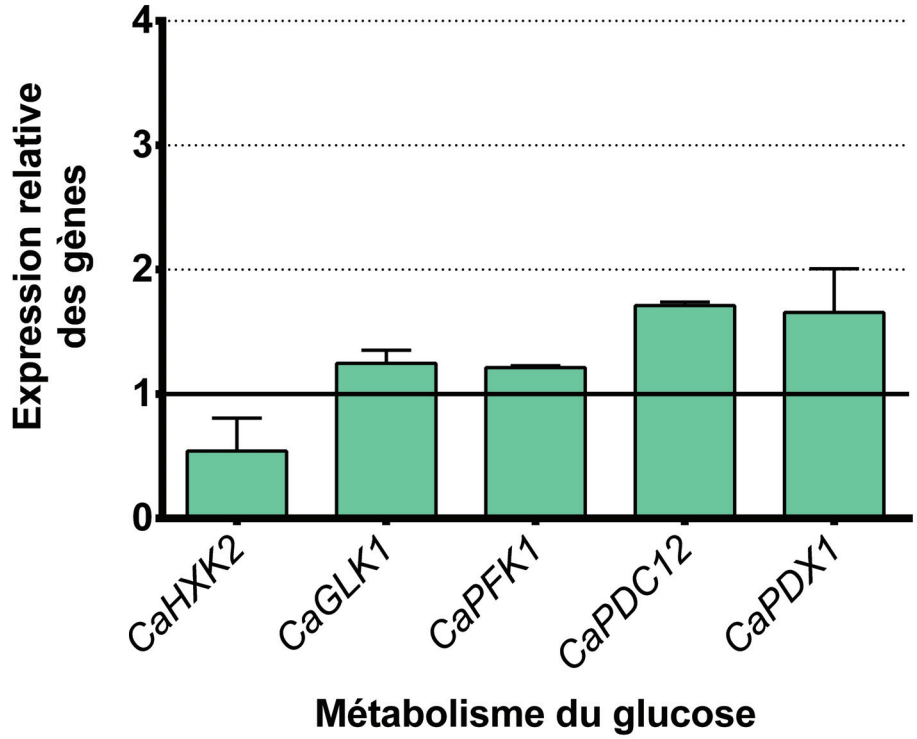


Figure 55 : Expression relative des gènes impliqués dans la métabolisation du glucose après 30 minutes de phagocytose par des macrophages cultivés en milieu RPMI glycérol 0,2%. Le niveau de transcription des gènes a été mesuré par ddPCR. Les résultats sont exprimés relativement à l'abondance des transcrits présents dans la même souche de levure non phagocytée et cultivée dans un milieu YP contenant 2% de glycérol (ligne noire).

B. Le métabolisme carboné alternatif

Les nombreuses données globales de transcriptomique et de protéomique disponibles révèlent que dans les phases tardives (≈ 3 h) de l'interaction avec les phagocytes, les levures reprogramment leur métabolisme et induisent fortement la transcription des gènes de la ß-oxydation des lipides, du cycle glyoxylique et de la néoglucogenèse, permettant l'utilisation des lipides comme principale source de carbone (Fradin *et al*., 2003, 2005 ; Lorenz et Fink, 2001). En revanche, aucune donnée n'est disponible concernant le rôle potentiel du métabolisme carboné alternatif durant les étapes très précoces de la phagocytose. Par conséquent, l'expression de plusieurs gènes appartenant aux principales voies du métabolisme carboné alternatif (ß-oxydation, cycle glyoxylique et néoglucogenèse) a été analysée (Fig. 56).

Trente minutes après le début de la phagocytose, nos résultats mettent en évidence une induction modérée de la transcription du gène *CaCTF1* (x 1,5) (Fig. 56). Ce gène code pour un facteur de transcription contrôlant l'expression des gènes nécessaires à l'assimilation des acides gras. La surexpression d'un activateur global du métabolisme lipidique suggère que, dans les macrophages, les acides gras jouent un rôle particulièrement important dans la physiologie et la survie de la levure.

Le gène *CaFAT1*, codant une perméase permettant l'import des lipides dans la cellule, est fortement surexprimé (x 3,6) (Fig. 56). La transcription des gènes *CaPXA1* et *CaPXA2* codant des transporteurs permettant l'import des acides gras dans les peroxysomes, sièges de la ß-oxydation des lipides, est également induite mais plus modérément (x 1,9) et (x 1,4) respectivement (Fig. 56).

Une fois importés dans la cellule, les lipides doivent être activés avant d'être métabolisés. Cette étape d'activation est catalysée par des Acyl-CoA synthétases qui greffent un groupement Acyl-CoA sur les acides gras. Chez *C. albicans* plusieurs gènes codant Acyl-CoA synthétases ont été identifiés (*CaACB1*, *CaFAA4*, *CaFAA2*-1, *CaFAA2-2*, *CAFAA2-3*). Nos résultats révèlent que l'ensemble des gènes codant les Acyl-CoA synthétases sont, à des degrés divers, rapidement surexprimés suite la phagocytose de la levure (Fig. 56).

Les lipides activés sont ensuite métabolisés au cours d'un processus cyclique appelée l'hélice de Linen. La transcription du gène *CaFOX3* qui code pour la thiolase catalysant la troisième étape de l'hélice est induite d'un facteur 1,7 (Fig. 56). Ce qui suggère que, chez les levures internalisées par les phagocytes, le métabolisme lipidique est actif.

Trois voies métaboliques différentes travaillent de concert pour permettre la métabolisation complète des acides gras : La ß-oxydation des lipides, le cycle glyoxylique et la néoglucogenèse. Suite à la phagocytose, nos données de ddPCR révèlent une activation forte (x 3,34) de la transcription du gène *CaICL1* codant l'isocitrate lyase, enzyme clé du cycle glyoxylique. *CaPCK1,* gène clé de la néoglucogenèse, n'est pas surexprimé au cours de cette phase précoce (Fig. 56). Ce qui pourrait laisser penser que soit la quantité d'enzyme est suffisante pour alimenter la néoglucogenèse soit que son expression sera induite plus tardivement.

Collectivement, nos données démontrent que 30 minutes d'interaction avec les macrophages sont suffisantes pour induire une importante activation de la transcription des gènes dédiés à l'import, à l'activation et à métabolisation des acides gras. Ceci indique que la reprogrammation métabolique de *C. albicans* intervient très rapidement suite à la phagocytose et que dès son entrée dans le macrophage, la levure adopte un métabolisme principalement basé sur l'utilisation des lipides.

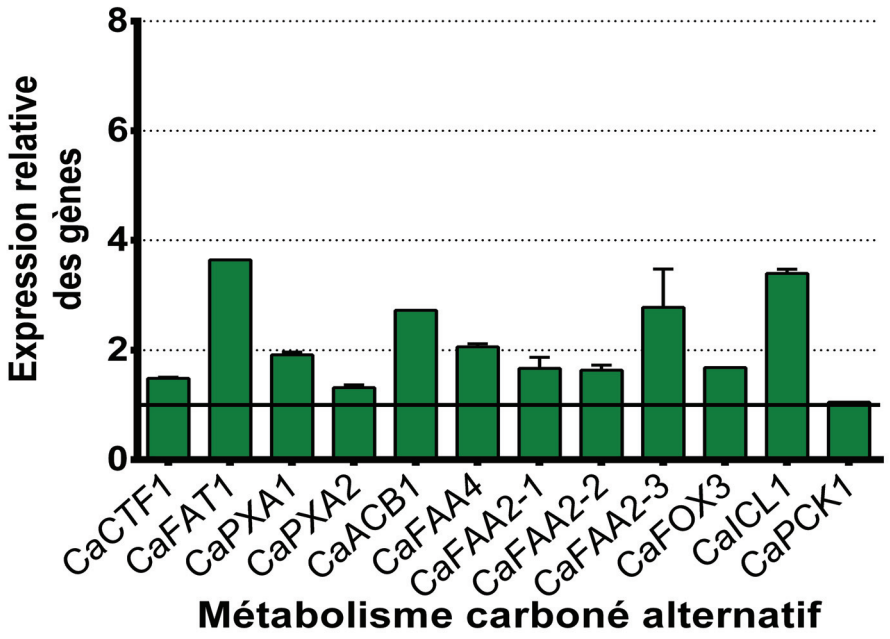


Figure 56 : Expression relative des gènes impliqués dans l'assimilation des sources carbonées alternatives après 30 minutes de phagocytose par des macrophages cultivés en milieu RPMI glycérol 0,2%. Le niveau de transcription des gènes a été mesuré par ddPCR. Les résultats sont exprimés relativement à l'abondance des transcrits présents dans la même souche de levure non phagocytée et cultivée dans un milieu YP contenant 2% de glycérol (ligne noire).

C. Les facteurs de virulence

Afin de pouvoir connecter l'expression des gènes du métabolisme au développement et à la virulence de la levure dans les phases précoces de la phagocytose, l'expression de deux gènes codant pour des adhésines (*CaALS3* et *CaHWP1*), associées à la forme hyphale (Staab *et al*., 2004 ; Modrzewska and Kurnatowski, 2015) a également été analysée (Fig. 57). Nos données mettent en évidence qu'après 30 minutes de phagocytose, la transcription du gène *CaALS3* est induite d'un facteur 5, tandis que l'expression du gène *CaHWP1* est plus modérément activée (x2,35). Nos données indiquent que les adhésines *Ca*Als3 et *Ca*Hwp1 jouent probablement un rôle fondamental au cours de l'interaction avec les phagocytes.

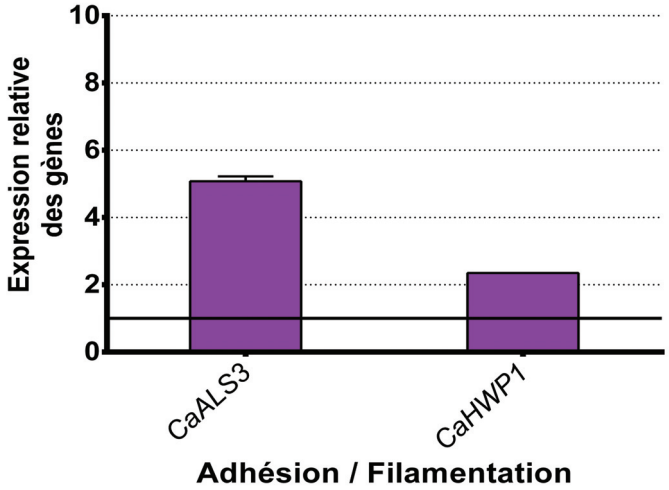


Figure 57 : Expression relative des gènes CaALS3 et CaHWP1 après 30 minutes de la phagocytose par des macrophages cultivés en milieu RPMI glycérol 0,2%. Le niveau de transcription des gènes a été mesuré par ddPCR. Les résultats sont exprimés relativement à l'abondance des transcrits présents dans la même souche de levure non phagocytée et cultivée dans un milieu YP contenant 2% de glycérol (ligne noire).

IV. Conclusion et Discussion

Ce travail, nous a permis de mieux comprendre comment est reprogrammé le métabolisme de la levure au cours des phases précoces de l'interaction avec les macrophages. Les données disponibles dans la littérature et l'hypovirulence du mutant *Cahxk2Δ/Δ* laissaient sous-entendre un rôle potentiellement important du métabolisme du glucose durant les phases précoces de la phagocytose. Cependant, les données de transcriptomique ciblée que nous avons obtenues révèlent que, 30 minutes après le début de la phagocytose, la transcription des gènes impliqués dans la détection, le transport et la métabolisation du glucose n'est globalement pas ou faiblement activée. Ceci suggère que le métabolisme du glucose n'est pas ou très peu sollicité durant les phases précoces de l'interaction levure-macrophage. En revanche, nos résultats apportent un éclairage nouveau sur la mise en place du métabolisme carboné alternatif au cours de l'interaction avec les phagocytes. En effet, toutes les études transcriptomiques et protéomiques menées à ce jour portent sur les phases tardives de la phagocytose et démontrent une réorientation métabolique de la levure en faveur des voies de la ß-oxydation, du cycle glyoxylique et de la néoglucogenèse (Rubin-Berejano *et al*., 2003 ; Fradin *et al*., 2003 ; Fernandez-Arenas *et al*., 2007). Notre travail a permis de mettre en évidence que cette reprogrammation du métabolisme survenait très rapidement après l'internalisation de la levure. L'ensemble des résultats obtenus sont récapitulés sur la figure 58 ci-dessous et dans le tableau 11 en annexe.

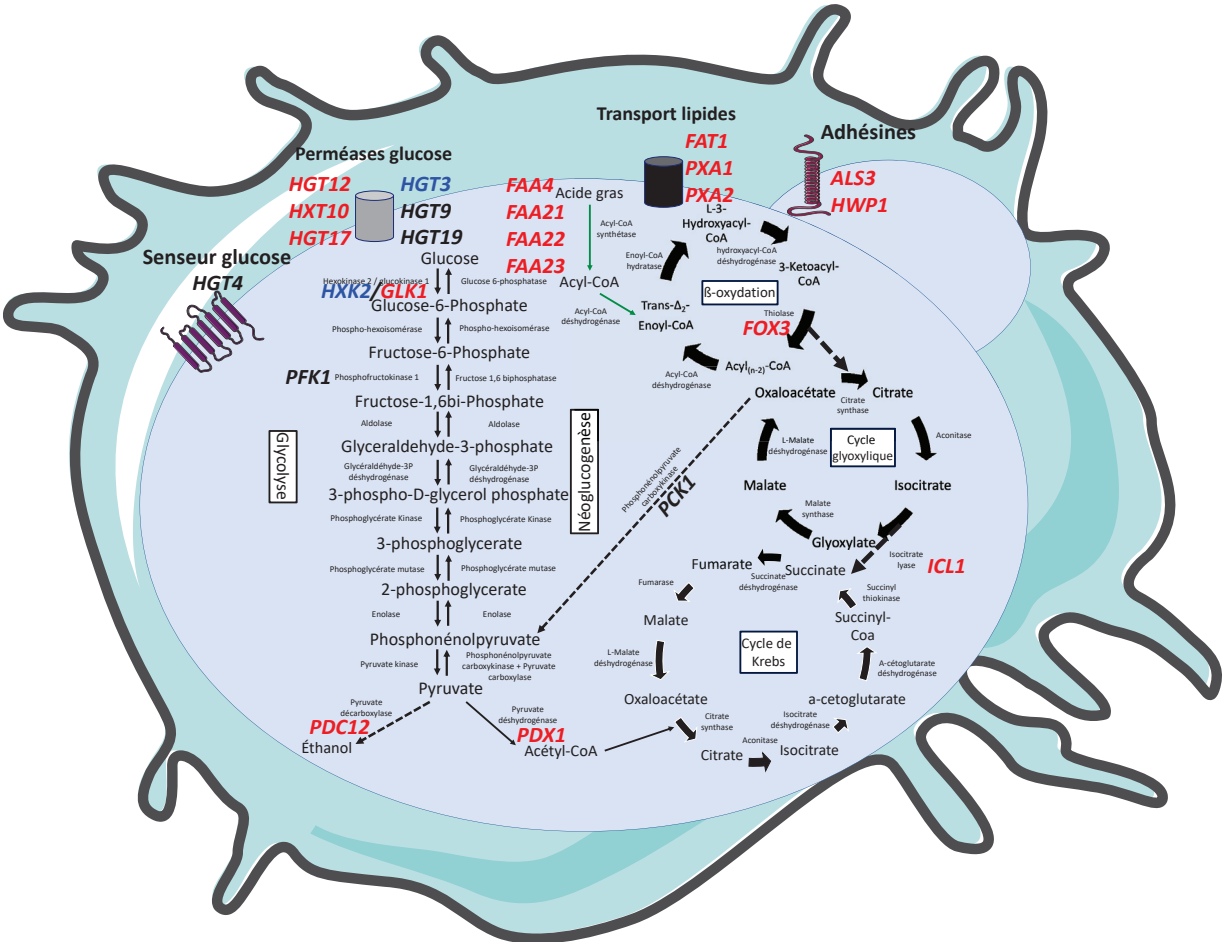


Figure 58 : Vue d'ensemble des reprogrammations métaboliques induites chez la levure C. albicans après 30 minutes de phagocytose par les macrophages de souris (J774). Les gènes figurés en bleu sont réprimés au cours de l'interaction levure-phagocytes, tandis que les gènes figurés en rouge sont induits par le contact avec les phagocytes. L'expression des gènes figurés en noir est stable.

- *Le métabolisme du glucose au cours de l'interaction levure macrophage*

L'analyse en RMN du contenu du macrophage, a révélé une concentration en glucose proche de celle observée dans le flux sanguin (5-10 mM, Seguin et Le Pape, 1994). De telles concentrations sont normalement détectées par le pathogène. En effet, l'expression du gène *CaHXK2* est induite en présence de 0,1 % de glucose (Laurian *et al*., 2019). Pourtant, hormis le gène *CaGLK1*, dont la légère surexpression pourrait être liée à l'environnement hypoxique régnant au sein du phagosome (Laurian *et al*., 2019), les données de ddPCR révèlent que dans les macrophages, les gènes de la glycolyse ne sont globalement pas ou peu surexprimés. Ce qui laisse penser que le glucose contenu dans le macrophage n'est soit pas accessible à la levure, du fait de sa compartimentalisation dans le phagosome, soit que le glucose a été consommé par le macrophage. Plusieurs éléments viennent soutenir cette dernière hypothèse. En effet, nombre d'études ont démontré que l'activation des macrophages suite à la détection d'éléments microbiens (PAMPs) conduit à une surexpression globale des gènes glycolytiques. L'augmentation du flux métabolique qui en résulte fournit aux phagocytes l'énergie nécessaire à la mise en place de la réponse inflammatoire et à la production des cytokines (Freemerman *et al*., 2014 ; Van den Bossche *et al*., 2017). Paradoxalement, l'activation de la glycolyse dans les macrophages activés, s'accompagne d'une répression drastique du métabolisme oxydatif (Jha *et al*., 2015 ; Mills *et al*., 2016 ; Van den Bossche *et al*., 2016). L'accumulation des métabolites mitochondriaux liée au défaut de fonctionnement du cycle de Krebs active un programme transcriptionnel induisant l'expression des gènes glycolytiques du macrophage (Tannahill *et al*., 2013). Ces deux vagues successives de surexpression de la glycolyse laissent présager que le glucose est un élément central dans le fonctionnement des macrophages et que ces derniers consomment le glucose très rapidement pour alimenter leurs mécanismes de défense.

Chez *C. albicans*, l'expression des perméases au glucose est contrôlée par la voie SRR (Fig. 12) via le senseur de forte affinité *Ca*Hgt4 (Brown *et al*., 2006 ; Sabina et Brown, 2009). La surexpression des perméases de forte affinité à l'intérieur du macrophage, suggère que le glucose est perçu par la levure. En revanche, comme les gènes de la glycolyse ne sont globalement pas induits il est probable que ce glucose ne soit pas accessible pour la métabolisation. Dans un contexte physiologique d'infection, une autre hypothèse plausible serait qu'au moment de la phagocytose, le macrophage phagocyte non seulement la levure mais également une fraction du liquide interstitiel qui baigne toutes les cellules de l'hôte. La teneur en glucose de ce liquide est globalement similaire à celle du flux sanguin (≈ 10 mM) (Thennadil *et al*., 2001), ainsi, une faible quantité de glucose pourrait être phagocytée en même temps que la levure et induire l'expression des perméases.

Récemment, Tucey *et al*., (2018) ont analysé en détail l'ensemble des reprogrammations métaboliques successives survenant chez *C. albicans* et les macrophages au cours de la phagocytose. Les auteurs, ont découpé l'interaction levures-phagocytes en différentes phases. Une phase précoce (1 h post phagocytose) qui correspond au début de la phagocytose des levures par les macrophages et une phase intermédiaire (6 h post-phagocytose) correspondant au début de la formation des hyphes par la levure et à son échappement du phagosome ont été choisies. L'étude a également été complétée par l'analyse du métabolisme des deux partenaires dans une phase plus tardive (9 h post-phagocytose) qui correspond à la sortie de *C. albicans* du macrophage et à sa réplication extracellulaire. Durant la phase précoce, les observations de Tucey *et al*. (2018) confirment les résultats que nous avons obtenus et mettent en évidence que la levure adopte un métabolisme principalement basé

sur l'utilisation de sources carbonées alternatives comme en témoigne la forte activation des gènes de la ß-oxydation, du cycle glyoxylique et de la néoglucogenèse (Tucey *et al*., 2018). Ceci confirme que le métabolisme du glucose n'est pas sollicité durant les phases précoces de la phagocytose. En revanche, à 6 et 9 heures post-phagocytose, les auteurs ont noté une importante et concomitante induction des gènes glycolytiques chez la levure et le macrophage (Tucey *et al*., 2018), indiquant qu'au cours des phases plus tardives de la phagocytose, *C. albicans* et le phagocyte entrent en compétition pour le glucose. *C. albicans*, qui possède des outils de détection et d'assimilation efficaces du glucose, surpasse les phagocytes dans la compétition pour le glucose et créée localement des microenvironnements déplétés en glucose (Tucey *et al*., 2018). Dans les macrophages activés, l'inhibition du métabolisme oxydatif, implique que le glucose est la seule source de carbone utilisable par ces cellules pour soutenir leur métabolisme et la réponse inflammatoire. Dans ce contexte, la déplétion en glucose conduit au dysfonctionnement mitochondrial des macrophages et à la mort par apoptose de ces derniers. Nous avons précédemment mis en évidence que le mutant *Cahxk2Δ/Δ* présentant un défaut de phosphorylation du glucose de 70%, possède un phénotype hypovirulent en modèle macrophage (Laurian *et al*., 2019). Collectivement, ces observations démontrent que le métabolisme du glucose joue un rôle crucial non pas dans les phases précoces de l'interaction *Candida* – macrophages, mais plutôt au cours des phases tardives de l'interaction, en particulier pour survivre et échapper à la composante innée du système immunitaire de l'hôte : les cellules phagocytaires.

- *Le métabolisme carboné alternatif au cours de la phagocytose*

Durant les phases tardives de la phagocytose, plusieurs études ont mis en évidence que *C. albicans* induit une reprogrammation de son métabolisme et active fortement la transcription des gènes de la ß-oxydation, du cycle glyoxylique et de la néoglucogenèse (Lorenz et Fink, 2001 ; Tucey *et al*., 2018). Cependant, l'expression des gènes du métabolisme carboné alternatif au cours des phases très précoces de l'interaction levure-phagocyte n'a été que peu étudiée.

Après 30 minutes de phagocytose, nos résultats révèlent une forte induction des gènes impliqués dans le transport et la métabolisation des acides gras, ainsi que des gènes appartenant au cycle du glyoxylate. En réponse au glucose, ces gènes sont soumis à une répression transcriptionnelle forte, grâce au mécanisme de répression glucose, qui permet à *C. albicans* de privilégier l'utilisation du glucose. L'activation rapide des gènes du métabolisme carboné alternatif suite à la phagocytose de la levure, suggère donc que le macrophage et le phagolysosome sont des environnements pauvres en sucres simples, dans lesquels la levure utilise des sources carbonées dites alternatives (lipides, protéines, lactate, …) pour soutenir les réactions de son métabolisme.

Bien que le contenu en nutriments du phagolysosome n'ait jamais été élucidé avec précision, les observations faites par Lorenz et Fink, 2001 suggèrent que cet environnement pourrait être particulièrement riche en lipides et en produits de dégradation de ces molécules (principalement de l'Acétyl-CoA). L'activation concomitante des voies métaboliques de la ß-oxydation, du cycle glyoxylique et de la néoglucogenèse est requise pour permettre l'utilisation efficace des acides gras comme source de carbone principale, ce qui est cohérent avec les résultats que nous avons obtenus.

L'induction continue et forte des gènes du métabolisme carboné alternatif au cours des phases précoces (30 min) et plus tardives (3 h) de la phagocytose, suggère une implication

forte des voies métaboliques associées (ß-oxydation, shunt glyoxylique et néoglucogenèse) dans les processus de survie et de virulence de *C. albicans*, suite à son internalisation dans les phagocytes (Cette étude, Tucey *et al*., 2018). Parmi les données que nous avons obtenues, les gènes permettant l'assimilation des lipides sont les plus fortement induits, ce qui laisse à penser que l'assimilation des acides gras joue un rôle majeur dans la physiologie des levures phagocytées. Plusieurs études menées chez *C. neoformans*, une autre levure pathogène de l'Homme, ont confirmé cette hypothèse. En effet les auteurs ont mis en évidence que, l'assimilation des lipides joue un rôle crucial pour permettre la prolifération et la survie de cette levure à l'intérieur des phagocytes (Fan *et al*., 2005 ; Wright *et al*., 2007).

Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence que des mutations dans les gènes clés du métabolisme carboné alternatif entraine une diminution significative de la virulence de *C. albicans* en modèle murin, démontrant ainsi le rôle essentiel du métabolisme carboné alternatif et de la flexibilité métabolique dans les mécanismes de pathogénicité (Lorenz et Fink, 2001 ; Ramirez et Lorenz, 2006 ; Barelle *et al*., 2006 ; Piekarska *et al*., 2006).

- *Rôle de l'adhésine CaAls3*

L'adhésine *Ca*Als3, en interagissant avec les cadhérines présentes à la surface des cellules épithéliales et endothéliales induit l'endocytose de la levure par ces cellules et favorise l'invasion des tissus de l'hôte (Phan *et al*., 2007). Suite à la phagocytose de la levure, nous avons détecté une forte induction de l'expression du gène *CaALS3* (x 5). Ce qui suggère un rôle particulier pour cette adhésine au cours de l'interaction levure macrophage. McKenzie *et al*., (2010) ont mis en évidence que le taux de phagocytose des mutants *Caals3Δ/Δ* est similaire à celui d'une souche sauvage. Ceci suggère que l'adhésine *Ca*Als3 n'est pas requise pour l'internalisation de la levure et joue probablement un rôle dans les étapes ultérieures de la phagocytose. En 2015, Kitahara *et al*., ont démontré par le biais d'une analyse protéomique globale que cette adhésine était surexprimée au cours de l'interaction avec le phagocyte. Ce qui corrobore et valide les résultats de transcriptomique que nous avons obtenus. Les auteurs supposent que la surexpression de cette adhésine pourrait favoriser l'évasion de la levure du phagosome (Kitahara *et al*., 2015).

Chez *C. albicans*, la colonisation, l'invasion et la prolifération au sein de l'hôte ne sont possibles que si une quantité de fer suffisante est accessible (Ramanan et Wang, 2000 ; Saikia *et al*., 2013). *C. albicans* ne produit pas ses propres sidérophores mais dispose de transporteurs de sidérophores permettant la capture du fer à partir de sidérophores produits par d'autres espèces (Heymann *et al*., 2002 ; Tangen *et al*., 2007). Récemment, Almeida *et al*., (2008) ont démontré que l'adhésine *Ca*Als3 jouait un rôle crucial dans la capture du fer en servant de récepteur de forte affinité pour la ferritine. Au vu du rôle essentiel du fer dans de nombreux processus biologiques ainsi que dans la mise en place des mécanismes de pathogénicité, la surexpression de l'adhésine *Ca*Als3 pourrait non seulement permettre à la levure de capter le fer dont elle a besoin pour assurer ses fonctions vitales mais pourrait aussi contribuer à la mise en place d'un comportement pathogène agressif à l'intérieur du phagocyte.

Plus récemment, Saha *et al*., (2018), ont démontré que chez certaines bactéries comme *E. coli* l'expression des sidérophores, permettant la captation du fer, inhibe la production des espèces réactives de l'oxygène par les phagocytes. Ceci suggère que la production des ROS requiert la présence de fer. Si la forte induction du gène *CaALS3* conduit à une capture plus efficace du fer, alors la déplétion créée localement dans le phagocyte pourrait contribuer à

inhiber les mécanismes oxydatifs du macrophage et ainsi favoriser la survie de la levure au sein du phagocyte.

Suite à sa phagocytose, *C. albicans* adopte un mode de développement filamenteux, lui permettant de s'échapper du phagosome. L'analyse de la morphologie des levures au cours de l'interaction avec les phagocytes, révèle que la transition de la forme levure à la forme hyphale s'opère entre 4 et 6 h après le début de la phagocytose (Tucey *et al*., 2018 ; Laurian *et al*., 2019). Dans le phagosome, la transition morphologique est principalement induite par le CO_2 et l'élévation du pH généré par le catabolisme des acides aminés (Ghosh *et al*., 2009 ; Vylkova *et al*., 2011 ; Jimenez-Lopez *et al*., 2013). Ces signaux sont principalement intégrés par la voie de l'adénylate cyclase et la voie pH, et conduisent à l'activation du facteur de transcription *Ca*Efg1 (Porta *et al*., 1999 ; Hall *et al*., 2010 ; Sudbery, 2011). Une fois activé, ce régulateur majeur du dimorphisme contrôle l'expression d'une multitude de gènes « hyphes spécifiques » permettant le développement hyphal (Stoldt *et al*., 1997 ; Doedt *et al*., 2004). Parmi les cibles de *Ca*Efg1, les gènes *CaALS3* et *CaHwp1* ont été identifiés (Liu et Filler, 2011). Ainsi, la surexpression de ces adhésines pourrait indiquer une activation très précoce du programme génétique induisant la filamentation de la levure.

Pour conclure, ce travail a permis d'apporter un éclairage nouveau sur les reprogrammations métaboliques de la levure *C. albicans* au cours des phases très précoces de la phagocytose. Les résultats que nous avons obtenus ont été récemment validés par les travaux de Tucey *et al*, (2018). Le principal verrou technique de cette étude était la faible biomasse internalisée par les macrophages au bout de 30 minutes. Les techniques d'extraction des levures phagocytées et de ddPCR nous ont permis de contourner cette restriction. De par sa sensibilité et sa spécificité, la ddPCR, autorise la détection et la quantification des transcrits même lorsque ceux-ci sont peu abondants.

Conclusion générale et perspectives

Bien que le glucose soit la principale source de carbone utilisée par les microorganismes pour soutenir les réactions de leur métabolisme, peu d'études ont été consacrées à l'étude de la voie glycolytique chez *C. albicans* et aux conséquences de son dysfonctionnement sur la physiologie et la virulence de la levure. Les travaux conduits pendant ma thèse ont été consacrés à l'étude de cette voie métabolique et plus particulièrement à la première étape irréversible de la glycolyse, à savoir la conversion du glucose en glucose-6 phosphate.

- *Identification et caractérisation du système hexose kinase chez C. albicans*

Dans la première partie de ce travail, nous avons utilisé les séquences nucléotidiques de l'hexokinase 2 et de la glucokinase 1 de *S. cerevisiae*, pour rechercher par BLAST des homologues dans le génome de *C. albicans*. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence l'existence de quatre gènes *CaHXK1*, *CaHXK2*, *CaGLK1* et *CaGLK4*, codant potentiellement pour des enzymes impliquées dans la phosphorylation des hexoses. Les travaux précédemment conduits par l'équipe de Singh *et al*. (2001) ont démontré que la protéine issue du gène *CaHXK1* n'était pas impliquée dans la phosphorylation des hexoses, mais dans celle d'un autre sucre, la N-acétylglucosamine, abondamment présent dans la matrice extracellulaire des cellules animales. En revanche, le rôle des trois autres protéines n'avait encore jamais été exploré. Afin de déterminer l'implication des protéines *Ca*Hxk2, *Ca*Glk1 et *Ca*Glk4 dans la phosphorylation des hexoses, nous avons entrepris la construction de différentes combinaisons de mutants de délétion, puis nous avons analysé la capacité de chacun de ces mutants à phosphoryler le glucose, le fructose et le mannose. Ainsi, nous avons pu démontrer que l'hexokinase 2 (*Ca*Hxk2) est la principale enzyme de phosphorylation des hexoses intracellulaires. En effet l'invalidation du gène *CaHXK2* diminue de plus de 70% la capacité de la cellule à phosphoryler le glucose et le mannose et abolit totalement la phosphorylation du fructose, mettant ainsi en évidence que l'hexokinase 2 est la seule enzyme capable de prendre en charge ce sucre. La délétion des gènes codant pour les glucokinases n'a aucun impact sur l'activité hexose kinase globale de la cellule (Laurian *et al.,* 2019). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce résultat. Il est possible que les glucokinases ne contribuent pas ou de façon très minoritaire à la phosphorylation des hexoses, ou que l'effet de la délétion de ces gènes soit masqué par des phénomènes de compensation. L'analyse de l'activité hexose kinase d'un double mutant *Cahxk2glk1Δ/Δ* a révélé une diminution plus importante de l'activité hexose kinase que celle mesurée chez un simple mutant *Cahxk2Δ/Δ*, confirmant l'implication des glucokinases dans le processus de phosphorylation des hexoses (Laurian *et al.,* 2019). La transcription du gène *CaHXK2* n'étant pas plus fortement induite chez un mutant *Caglk1glk4Δ/Δ*, nous avons pu conclure qu'il n'existe pas de mécanisme de compensation, en tout cas au niveau transcriptionnel (Laurian *et al.,* 2019). Une mesure de l'expression des protéines chez les différents mutants pourrait également permettre d'écarter ou non l'hypothèse d'une compensation au niveau protéique.

À l'issue de cette première partie de notre travail, nous avions réussi à identifier les enzymes impliquées dans la phosphorylation du glucose chez *C. albicans*. Les travaux menés ont également permis de mettre en évidence que ces trois enzymes ne sont pas équivalentes et que l'hexokinase 2 est la principale responsable de la phosphorylation du glucose intracellulaire, alors que les glucokinases ne contribuent que faiblement à l'alimentation du flux glycolytique (Laurian *et al.,* 2019).

Afin de mieux comprendre comment fonctionne le système hexose kinase chez *C. albicans*, nous avons exploré la régulation transcriptionnelle des gènes *CaHXK2*, *CaGLK1* et *CaGLK4*. Les

résultats de cette analyse ont mis en évidence que l'expression du gène *CaHXK2* est induite en présence des sources carbonées qui sont également des substrats de l'enzyme (glucose, fructose, mannose), alors qu'elle est réprimée en présence de lactate et de glycérol (Laurian *et al.,* 2019). Si la transcription des gènes *CaGLK1/4* est également activée en présence de glucose et de mannose, nous avons mis en lumière que l'expression de ces gènes est aussi induite en présence de lactate et de glycérol (Laurian *et al.,* 2019). Bien que surprenant, ces résultats ne sont pas complètement incohérents, en effet l'induction de l'expression des glucokinases par des sources carbonées non fermentescibles a également été mise en évidence chez *S. cerevisiae* et chez *C. tropicalis* (Hirai *et al.,* 1977 ; Herrero *et al.,* 1994). Nos données suggèrent donc que les mécanismes régulant l'expression de l'hexokinase et des glucokinases sont différents. D'autre part l'expression constitutive des glucokinases pourrait signifier que ces enzymes jouent un rôle important dans la physiologie de la levure.

- ***L'hexokinase 2 une enzyme bi-fonctionnelle ?***

Chez la levure modèle *S. cerevisiae*, l'hexokinase 2 participe non seulement à la phosphorylation des hexoses, mais joue aussi un rôle de régulateur transcriptionnel, en participant au mécanisme de la répression glucose (Entian et Frölich, 1984). En présence de glucose, *Sc*Hxk2, migre dans le noyau, interagit avec le régulateur transcriptionnel *Sc*Mig1 et réprime l'expression de gènes impliqués dans l'assimilation des sources carbonées alternatives (Pelaez *et al.,* 2010). Les domaines protéiques impliqués dans chacune de ces fonctions ont été largement étudiés et caractérisés. L'activité catalytique de l'enzyme repose sur 4 acides aminés, Asp^{210}, Ser^{158}, Glu^{269} et Glu^{302} qui forment une partie du site permettant la fixation du glucose, tandis que l'activité régulatrice repose sur un court peptide de 10 acides aminés ($K^{6}M^{15}$) et un résidu sérine (S14), situés dans la partie N-terminale de la protéine (Anderson *et al.,* 1978ab ; Bennett et Steitz, 1980 ; Shoham et Steitz, 1982 ; Harrisson, 1985, Pelaez *et al.,* 2010). En 2010 Pelaez *et al*. ont également démontré que les deux fonctions de l'hexokinase étaient découplées. En effet, une mutation au niveau du site catalytique n'affecte pas la fonction régulatrice et inversement. Cependant, ces observations ont été récemment remises en cause par les expériences de Lane *et al*, (2018) qui ont mis en évidence qu'une diminution de l'activité catalytique de l'hexokinase 2, diminue aussi l'efficacité de la répression exercée sur les gènes du métabolisme carboné alternatif.

Chez *C. albicans*, nous avons démontré que l'hexokinase 2 est la principale enzyme impliquée dans la phosphorylation des hexoses intracellulaires (Laurian *et al.,* 2019). L'analyse de la séquence protéique de l'hexokinase *Ca*Hxk2 a révélé l'existence de deux séquences de localisation nucléaire (NLS, -PAQKRKGTFT- (8-17) et -QKRGYKTAH- (405-413)). Cette possible localisation nucléaire de l'hexokinase 2 chez *C. albicans*, ouvre la perspective d'un rôle régulateur pour cette enzyme. La localisation subcellulaire de l'hexokinase 2 a été explorée en utilisant une souche *CaHXK2::GFP*, portant un tag GFP en C-terminal. En présence de glucose (0,1 ou 2%), nos résultats ont mis en évidence une relocalisation de la protéine dans le noyau. En revanche, en absence de glucose, l'hexokinase 2 est localisée dans le cytoplasme et est exclue du noyau (Laurian *et al.,* 2019). Afin de déterminer si l'hexokinase 2 est également impliquée dans le mécanisme de répression glucose chez *C. albicans*, nous avons analysé l'expression des *CaICL1* et *CaPCK1* (impliqués dans l'assimilation de sources carbonées alternatives) chez un mutant *cahxk2Δ/Δ*. En présence de glucose, nos données mettent en évidence une diminution de la répression exercée sur ces gènes chez le mutant hexokinase 2, ce qui démontre l'implication de cette enzyme dans le mécanisme de répression glucose

(Laurian *et al.,* 2019). Ainsi, les deux fonctions de l'hexokinase 2 ont été conservées chez *C. albicans*.

Sur la base des connaissances établies chez *S. cerevisiae*, nous avons cherché à identifier les domaines de la protéine portant les fonctions catalytiques et régulatrices. Un mutant portant une substitution de l'acide aspartique 210 en alanine (D210A) a été construit pour muter l'activité catalytique de l'enzyme. En parallèle, deux mutants, l'un délété du décapeptide K^6F^{15} et l'autre portant une substitution de la thréonine 14 en alanine (T14A), ont été construits pour affecter la fonction régulatrice de l'enzyme. Les analyses que nous avons conduites par la suite nous ont permis de confirmer que l'acide aspartique 210 joue un rôle crucial dans la fonction catalytique de l'enzyme. En accord avec les observations de Lane *et al*, (2018), nous avons pu mettre en évidence que la réduction du flux glycolytique dans la cellule, résultant d'une mutation sur la fonction catalytique de l'hexokinase 2, affecte aussi la répression glucose chez *C. albicans*.

Chez *S. cerevisiae*, la région N-terminale de l'hexokinase 2 contrôle la localisation de l'enzyme et permet l'interaction de *Sc*Hxk2 avec le répresseur transcriptionnel *Sc*Mig1. La délétion du décapeptide K^6M^{15} (séquence NLS), bloque l'import nucléaire de l'hexokinase, conduisant à une levée de la répression glucose, même en présence de glucose (Pelaez *et al.,* 2010). Chez *C. albicans*, en revanche, le domaine N-terminal de la protéine ne semble pas porter la fonction régulatrice de l'hexokinase 2. En effet, la délétion du décapeptide n'a aucun effet sur l'expression des gènes du métabolisme carboné alternatif. Une analyse de la localisation subcellulaire de l'hexokinase 2, par une approche de microscopie confocale, sera prochainement initiée, afin de déterminer si les mutations de la région N-terminale affectent la localisation de la protéine. Cependant, la conservation d'une répression glucose fonctionnelle chez les mutants *HXK2*$K^6F^{15}\Delta$ et *HXK2T14A*, suggère (i) que l'enzyme est toujours capable d'entrer dans le noyau, (ii) que la fonction régulatrice de l'hexokinase 2 est portée, chez *C. albicans*, par des domaines différents de ceux décrits chez *S. cerevisiae* et (iii) un fonctionnement différent de la répression glucose chez ces levures.

Les données que nous avons obtenues au cours de cette étude mettent donc en lumière, que si les deux fonctions de l'hexokinase ont été conservées chez *C. albicans*, les domaines portant ces fonctions ne l'ont pas forcément été. Si le rôle de l'acide aspartique 210 dans la fonction catalytique a pu être démontré il n'en est pas de même pour le domaine N-terminal qui ne porte pas chez *C. albicans* la fonction régulatrice de l'hexokinase 2. Se pose alors la question du rôle de cette région N-terminale. L'analyse phénotypique que nous avons initiée démontre que cette région ne porte pas de fonction requise pour le dimorphisme de la levure. En revanche, des mutations au niveau du domaine N-terminal de la protéine diminuent drastiquement la virulence de la levure en modèle insecte, suggérant que cette région porte des fonctions importantes pour la virulence.

- *L'hexokinase 2 une enzyme majeure de la physiologie du champignon*

Dans la suite de cette étude, nous avons analysé les conséquences de la délétion des hexoses kinases sur le fitness et la virulence de *C. albicans*. Les données issues de nos analyses phénotypiques ont révélé que l'invalidation du gène *CaHXK2*, conduit à un défaut ou retard de croissance de la levure en présence d'hexose, alors que la délétion des gènes codant les glucokinases n'a aucun effet sur la croissance. Ceci démontre qu'une phosphorylation efficace des hexoses est requise pour permettre la croissance optimale de la levure et mettant une nouvelle fois en évidence le rôle physiologique mineur des glucokinases (Laurian *et al.,* 2019).

Au cours du processus infectieux, *C. albicans* adopte un mode de développement filamenteux, lui permettant de coloniser et d'envahir efficacement son hôte. Ce changement de la morphologie cellulaire est considéré comme un facteur de virulence majeur de *C. albicans* (Sudberry, 2011). En effet, la plupart des enzymes permettant l'adhésion de la levure aux constituants de l'hôte, ainsi que la majorité des enzymes lytiques et toxines produites par *C. albicans*, le sont par la forme hyphale. Des analyses de protéomique globale ont révélé que la croissance hyphale de *C. albicans* mobilise fortement le métabolisme carboné. Une importante surexpression des enzymes glycolytiques a notamment pu être mise en évidence (Doedt *et al*., 2004). Nous nous sommes donc demandé quelle pourrait être la conséquence de la délétion des enzymes catalysant la première étape de la glycolyse, sur la capacité de la levure à adopter une forme filamenteuse ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé différents milieux inducteurs de la filamentation afin d'évaluer la capacité des différents mutants hexoses kinases à former des hyphes. Sur des milieux inducteurs contenant du glucose ou du mannitol, dont l'assimilation dépend du fonctionnement de l'hexokinase 2, le mutant *Cahxk2Δ/Δ* est incapable d'adopter une croissance hyphale. En revanche, l'utilisation d'un milieu inducteur contenant, une source carbonée assimilée indépendamment de l'hexokinase 2, n'altère pas la capacité du mutant *Cahxk2Δ/Δ* à former des hyphes (Laurian *et al.,* 2019). Les mutants *Caglk1Δ/Δ* et *Caglk1glk4Δ/Δ* respectivement délétés de l'une ou des deux glucokinases, ont un phénotype similaire à la souche sauvage sur tous les milieux testés. Collectivement, ces données démontrent que les mutants *Cahxk2Δ/Δ* conservent une capacité intrinsèque à former des hyphes et que le défaut de filamentation observé est probablement dû à un défaut de métabolisation de la source carbonée.

D'un point de vue énergétique, le passage d'une forme levure à une forme filamenteuse, représente un coût important pour la cellule qui doit synthétiser *de novo* les composés nécessaires à l'élaboration de la paroi et de la membrane plasmique. Le défaut de métabolisation du glucose observé chez le mutant *Cahxk2Δ/Δ* pourrait donc conduire à un déficit énergétique important dans la cellule qui, serait de fait incapable d'initier sa transition morphologique. Cependant, chez *C. neoformans*, un dosage de la quantité d'ATP intracellulaire, effectué chez un double mutant *Cnhxk1hkx2Δ* n'a pas révélé de différence significative par rapport à une souche sauvage (Price *et al.,* 2011). Par ailleurs, les essais de dosages que nous avons effectués chez *C. albicans* n'ont pas permis de révéler de grandes différences dans le contenu en ATP intracellulaire des mutants *Cahxk2Δ/Δ* et *Cahxk2glk1Δ/Δ* en comparaison avec une souche sauvage.

Ainsi, le défaut de filamentation du mutant *Cahxk2Δ/Δ* pourrait avoir une cause plus profonde qu'un simple défaut énergétique.

Chez les bactéries, certains intermédiaires de la glycolyse comme le pyruvate sont connus pour augmenter l'activité de l'adénylate cyclase, une enzyme responsable de la production d'AMPc (Cozzone, 1998). Chez *C. albicans* l'AMPc est responsable de l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui contrôle elle-même l'activation du facteur de transcription *Ca*Efg1, principal activateur de la transition morphologique (Doedt *et al.,* 2004 ; Shapiro *et al.,* 2011). Si ce mécanisme est conservé chez les levures, alors le défaut de production des intermédiaires de la glycolyse chez un mutant *Cahxk2Δ/Δ* pourrait expliquer son phénotype hypofilamenteux.

Nos données ont également mis en lumière que les mutants hexokinase présentent une plus grande sensibilité au stress osmotique, oxydant et pariétal (Laurian *et al.,* 2019). Chez les levures, la résistance au stress repose partiellement sur l'accumulation d'osmolytes protecteurs comme l'arabitol, le tréhalose et le glycérol, qui sont des dérivés de la voie glycolytique (Alvarez-Peral *et al.,* 2002 ; Kayingo et Wong, 2005 ; Li *et al.,* 2009).

L'appauvrissement du flux glycolytique constaté chez les mutants hexokinase (*Cahxk2Δ/Δ* et *Cahxk2glk1Δ/Δ*) pourrait donc conduire à un défaut de production de ces composés, ce qui se traduirait par une augmentation de la sensibilité de la levure aux stress environnementaux. Les données obtenues avec les mutants glucokinase (*Caglk1Δ/Δ* et *Caglk1glk4Δ/Δ*), qui présentent un flux glycolytique optimal, corroborent cette hypothèse. En effet chez ces mutants, la résistance au stress n'est pas affectée (Laurian *et al.,* 2019). Afin de prouver notre hypothèse, nous avons essayé d'analyser, par chromatographie sur couche mince, le contenu de nos différents mutants en arabitol, glycérol et tréhalose. Les données préliminaires que nous avons obtenues montrent une importante dérégulation de la quantité de ces composés chez les mutants hexokinase (données non présentées). Une analyse plus précise, par une approche de chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC), permettrait de confirmer nos observations et de quantifier avec précision les variations de la concentration de ces différents composés chez les mutants hexoses kinases.

Enfin, l'analyse de la virulence des différents mutants, *in vivo*, dans un pathosystème larvaire de *G. mellonella* et *in vitro*, en modèle macrophage a révélé une hypovirulence significative du mutant *Cahxk2Δ/Δ*. Dans un contexte physiologique d'infection, *C. albicans* est reconnue et phagocytée par les macrophages qui constituent la première ligne de défense de l'hôte contre les infections fongiques. Dans les phagosomes, les signaux perçus par la levure (CO_2, pH alcalin, …) induisent sa transition vers une forme hyphale, lui permettant de percer, de s'échapper et d'éliminer le macrophage (Marcil *et al.,* 2002 ; Ghosh *et al.,* 2009 ; Vylkova *et al.,* 2011). Dans ce pathosystème, le développement des hyphes joue donc un rôle important dans la virulence de la levure. Or les données que nous avons obtenues démontrent que les mutants hexokinase sont incapables de former des hyphes à l'intérieur du macrophage (Laurian *et al.,* 2019). Ce défaut de filamentation, couplé avec la plus grande sensibilité des mutants au stress oxydant, particulièrement intense dans le phagosome, pourrait favoriser l'élimination de la levure par le phagocyte, réduisant ainsi sa virulence. Plus récemment, l'équipe d'Ana Traven (Tucey *et al.*, 2018) a mis en lumière l'existence d'une compétition pour le glucose lors de l'interaction levure phagocyte. Les deux partenaires consomment activement le glucose pour assurer leur survie et mettre en place une infection ou une réponse immunitaire efficace. *C. albicans* possède des outils performants de détection et d'assimilation du glucose et prive le macrophage du glucose nécessaire à sa survie, entrainant sa mort par apoptose (Tucey *et al.,* 2018). Le mutant hexokinase étant moins compétitif dans l'assimilation du glucose du fait de son flux glycolytique amoindri, cela pourrait favoriser la survie des macrophages et expliquer en partie la diminution de la virulence de ce mutant.

Dans un modèle *Galleria mellonella*, le développement des hyphes joue aussi un rôle important dans la colonisation du tractus digestif de l'insecte (Perdoni *et al.,* 2014). Nos données ont révélé que les mutants hexokinase 2 sont incapables de former des hyphes sur des milieux inducteurs contenant des sources de carbone métabolisées via l'hexokinase 2 (glucose, mannitol). Cependant, dans les systèmes biologiques, les hexoses simples, comme le glucose sont rarement disponibles ou en très faible quantité. De nombreux autres signaux sont susceptibles d'induire la transition morphologique de la levure. Nous ne pouvons donc pas affirmer avec certitude l'existence d'un défaut de filamentation de la levure dans les larves de *Galleria*, ni même que ce défaut de filamentation, s'il existe, soit responsable de la diminution de la virulence observée. Des coupes histologiques des larves infectées, permettraient de définir la capacité des mutants hexokinase 2 à adopter une croissance filamenteuse au sein de la chenille. Le défaut de virulence pourrait aussi être simplement lié au défaut de croissance des mutants hexokinase 2, ce qui se traduirait par une diminution de

la capacité de la levure à coloniser son hôte. Cette hypothèse est renforcée par les observations de Price *et al*, (2011) qui ont mis en évidence que dans un modèle murin de cryptococcose à *C. neoformans*, les mutants *Cnhxk1hxk2Δ*, présentent un sévère défaut de colonisation de certaines niches au sein de leur hôte. Afin de déterminer la capacité des mutants hexokinase à coloniser la chenille, l'analyse de la charge fongique des larves infectées pourrait être entreprise.

- ***Quel est le rôle physiologique des glucokinases ?***

Au cours de cette analyse phénotypique, nous avons pu mettre en évidence que l'hexokinase 2 joue un rôle important dans la physiologie de *C. albicans*. En effet, nos données démontrent l'implication de cette enzyme dans les processus de croissance, de filamentation, de résistance au stress et de virulence. En revanche, l'analyse des mutants glucokinase n'a révélé aucun phénotype remarquable, ce qui pose la question du rôle physiologique de ces enzymes. Des études de transcriptomique récentes démontrent qu'au cours de la croissance en hypoxie, la transcription des gènes glycolytiques est globalement induite (Setiadi *et al*., 2006 ; Sellam *et al*., 2014). Nous avons donc analysé par qPCR l'évolution de l'expression des gènes *CaGLK1/4* en présence et en absence d'oxygène (Laurian *et al.,* 2019). Les données obtenues révèlent une induction forte de la transcription de ces gènes en condition hypoxique, ce qui suggère que les glucokinases pourraient être impliquées dans l'adaptation de la levure aux environnements pauvres en oxygène.

Chez la levure *K. lactis*, la mutation de l'hexokinase, conduisant à une glycolyse non fonctionnelle, inhibe l'expression des perméases au glucoses. Ce lien entre la glycolyse et l'expression des transporteurs, a aussi été identifié chez *S. cerevisiae* et est supposé empêcher l'import du glucose dans une cellule qui ne pourrait pas le métaboliser (Cairey-Remonnay *et al.,* 2014). Chez *C. albicans*, nos données n'ont pas révélé l'existence d'un tel lien, en effet, chez un mutant *Cahxk2Δ/Δ* la transcription des perméases de forte affinité est même fortement activée. Les conséquences diamétralement opposées de l'invalidation du gène *HXK2* chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* illustre le mode de vie totalement différent de ces deux levures. En effet, *S. cerevisiae*, de par sa distribution écologique est confrontée à des environnements riches en glucose, l'élaboration d'un système permettant de se protéger, en cas de défaut métabolique, des effets nocifs d'un excès de glucose fait donc sens. En revanche pour *C. albicans*, qui évolue au sein d'un hôte animal, le glucose est rarement présent à de fortes concentrations. Dans le flux sanguin par exemple, sa concentration oscille entre 5 et 10 mM (0.05 et 0,1%) selon les études (Barelle *et al*., 2006 ; Miramón et Lorenz, 2017). Le glucose étant présent à l'état de traces, il n'est pas surprenant que la levure n'ait pas développé ou conservé un tel système.

Cependant, nos données suggèrent que les glucokinases pourraient être impliquées dans le contrôle de l'expression des transporteurs de glucose. En effet, l'invalidation des gènes *CaGLK1* et *CaGLK4* a pour conséquence un effondrement du niveau de transcription des perméases dépendantes de la voie Sugar Receptor Repressor (SRR) (Laurian *et al.,* 2019). Ceci suggère que les glucokinases pourraient être des acteurs directs ou indirects de cette voie de signalisation. Une analyse de la séquence protéique des glucokinases n'a pas révélé l'existence de séquences de localisation nucléaire, ce qui semble exclure un rôle de régulateur transcriptionnel pour ces enzymes. Chez *K. lactis*, le défaut d'expression des perméases, chez un mutant hexokinase, est lié à un défaut de localisation du senseur du glucose *Kl*Rag4, qui est séquestré au niveau du cytoplasme (Cairey-Remonnay *et al.,* 2014). Un mécanisme

analogue pourrait exister chez le mutant *Caglk1glk4Δ/Δ* chez *C. albicans*. La construction d'une souche *CaHGT4::GFP* portant un tag GFP en C-terminal, ainsi que l'analyse de la localisation du senseur pourrait permettre de répondre à cette question. Chez *C. albicans*, la délétion des glucokinases ne perturbe pas le flux glycolytique, ce qui suggère que le signal inhibant l'expression des perméases au glucose n'est pas un défaut métabolique. Les glucokinases pourraient servir de senseur intracellulaire et répondre à un signal de nature encore inconnu en modulant l'expression des perméases au glucose.

- ***Le métabolisme du glucose est-il actif durant les phases très précoces de la phagocytose ?***

La dernière partie des travaux de cette thèse a été consacrée à l'étude des reprogrammations métaboliques de la levure au cours de son interaction avec les phagocytes.

Nous avons donc analysé l'expression d'un certain nombre de gènes cibles impliqués dans la détection, le transport et l'assimilation du glucose, après 30 minutes de phagocytose. Afin de pallier la faible quantité de biomasse internalisée par les macrophages en 30 minutes, une approche sensible d'analyse de la transcription par digital droplet PCR a été utilisée.

Les données que nous avons obtenues révèlent que les gènes impliqués dans la métabolisation du glucose sont globalement peu ou pas induits au cours des phases précoces de l'interaction levure macrophage. Ceci suggère que cette source de carbone est peu accessible à la levure lors de sa phagocytose. Les résultats que nous avons obtenus ont été confirmés par les analyses de Tucey *et al.,* (2018), qui ont démontré que *C. albicans* ne métabolise pas le glucose durant les phases précoces de la phagocytose, mais pendant les phases beaucoup plus tardives (entre 6 et 9h post phagocytose). Les auteurs ont également mis en évidence que cette assimilation tardive du glucose joue un rôle crucial dans l'élimination des phagocytes par la levure.

L'expression des gènes cibles appartenant aux voies du métabolisme carbonée alternatif, a permis de mettre en évidence que dès son internalisation, la levure initie un programme métabolique basé sur l'utilisation des lipides, comme en témoigne l'importante surexpression des gènes de la ß-oxydation, et du cycle glyoxylique.

Pour conclure, ce travail nous a permis d'identifier et de caractériser les enzymes impliquées dans la première étape irréversible de la glycolyse chez *C. albicans*. Une hexokinase (*Ca*Hxk2) et deux glucokinases (*Ca*Glk1 et *Ca*Glk4) ont été trouvées. Le rôle majeur de l'hexokinase 2, dans le processus de phosphorylation, dans le mécanisme de la répression glucose mais aussi dans la physiologie et la virulence de *C. albicans*, a notamment pu être mis en évidence. L'exploration du rôle physiologique des glucokinases a révélé quelques spécificités inédites comme leur rôle dans le contrôle de l'expression des perméases au glucose. Cependant, les mécanismes moléculaires régissant ce contrôle restent flous et demandent à être élucidés. L'analyse plus précise des domaines fonctionnels de l'hexokinase 2 a révélé des similitudes mais aussi des divergences avec les données disponibles chez le modèle *S. cerevisiae*. Les travaux en cours au laboratoire auront pour objectif de comprendre comment se met en place la répression glucose chez *C. albicans*, et quelle fonction importante pour la virulence porte la partie N-terminale de l'hexokinase 2.

Matériels et Méthodes

I. Souches, milieux et conditions de culture

A. Les levures

1. Souches

Les souches de *C. albicans* utilisées au cours de ce travail sont listées dans le tableau 6. La plupart des souches utilisées ont été construites au laboratoire au cours de mes 3 années de thèse, à partir de la souche de référence SC5314 ou des souches mutantes dérivées de celle-ci.

2. Milieux

Les levures ont été cultivées en milieu YP riche contenant : 1% de peptone, 1% d'extrait de levure et 2% de source carbonée variée (glucose, fructose, mannose, galactose, glycérol ou lactate). La plupart des expériences effectuées ont nécessité le passage par une phase de préculture. Pour cette étape, une colonie isolée d'une souche de *C. albicans* a été prélevée puis incubée à 30°C pendant 24 h dans 2 ml de milieu YPG 2% (1% de peptone, 1% d'extrait de levure et 2% glucose), sous une agitation orbitale de 180 rpm. Les cultures en milieu liquide ont été réalisées dans des volumes compris entre 2 et 100 ml. Quand nécessaire, le glucose a été ajouté dans le milieu à différentes concentrations (0,01 à 2%). Les milieux solides ont été obtenus en ajoutant au mélange précèdent 2% d'agar (m/v).

3. Conditions de culture

a) Tester le dimorphisme

Les tests permettant d'évaluer la capacité de *C. albicans* à passer d'une forme levure à une forme hyphale ont été effectués sur différents milieux solides inducteurs de la filamentation. La transition morphologique a été étudiée en incubant les cellules pendant 48 h à 37 °C en milieu Spider (1% Nutrient Broth, 1% mannitol, 0,2% KH_2PO_4, 2% agar) ou pendant 96 h sur un milieu YP solide (1% extrait de levure, 2% peptone, 2% agar) contenant 2,5 mM de N-acétyl-glucosamine. Un milieu contenant 5% de sérum a également été utilisé pour induire la transition morphologique de *C. albicans* après une période d'incubation de 2 à 5 jours à 37°C.

b) Analyser la croissance au TECAN

La croissance de *C. albicans* en présence de sources carbonées variées et sa sensibilité à différents composés (5 mM H_2O_2, 1,2 M KCl, 0,05% SDS, 5 mM caféine) ont été déterminées spectrophotométriquement en milieu YP liquide à 30°C en utilisant un lecteur de plaque (Tecan Infinity 200 Pro Serie). À partir d'une préculture en phase stationnaire de croissance, 5 ml d'un nouveau milieu YPG ont été ensemencés à une DO_{600nm} de 0,2. Une fois le début de la phase exponentielle de croissance atteinte (DO_{600nm} = 0,6), 10 µl de culture ont été utilisés pour inoculer 180 µl de milieu liquide réparti dans les puits d'une plaque 96 puits et contenant la source de carbone ou les composés appropriés. Les plaques ont été scellées avec un film plastique perméable au gaz, puis la DO_{600nm} a été mesurée toutes les 30 min sur une période de 48h avec une agitation de 380 rpm. Les données de croissances obtenues représentent la moyenne de trois expériences indépendantes effectuées en triplicat.

c) Analyser la croissance en hypoxie

Pour la croissance en condition hypoxique, des erlens ont été inoculés à une DO_{600nm} = 0,2 à partir d'une préculture en phase stationnaire. Les cellules ont ensuite été cultivées jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} = 1,8). L'hypoxie a été créée en transférant la suspension cellulaire dans un tube Falcon hermétique et rempli à ras-bord. Différents temps de culture suite à la transition normoxie-hypoxie ont été considérés (30, 60, 90 et 120 min). Les cellules ont ensuite été collectées par centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min, lavées deux fois avec de l'eau stérile puis ont été rapidement congelées à -20°C. Pour chaque échantillon, trois réplicats biologiques ont été effectués. Pour la croissance en plaque 96 puits, l'anoxie a été créée en ajoutant 50 µl d'huile minérale de paraffine dans chaque puits.

d) Analyser les variations du niveau d'expression des transcrits

Pour analyser l'effet de la source de carbone sur le niveau d'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4*, les cellules ont été cultivées pendant la nuit dans 2 ml de milieu YP contenant du lactate 2%. Un erlen contenant 100 ml de YP lactate 2% a ensuite été ensemencé à une DO_{i600nm} = 0,2 avec les cellules issues de la préculture. Une fois le début de la phase exponentielle de croissance atteinte (DO_{600nm} = 1,8), les cellules ont été centrifugées pendant 10 min à 2500 rpm, lavées dans 5 ml d'eau stérile, et centrifugées à nouveau. Le culot a ensuite été repris dans 1 ml d'eau stérile, puis 200 µl de la suspension cellulaire ont été transférés dans des erlens contenant 25 ml de milieu YP : lactate, glucose, fructose, mannose ou glycérol à 2%. Les cellules ont été incubées 1 h supplémentaire à 30°C sous agitation. Pour finir, les cellules ont été centrifugées 10 min à 2500 rpm, puis les culots secs ont été congelés à -80°C en attendant de procéder à l'extraction des ARNs totaux.

L'effet de la concentration en glucose sur l'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* a également été analysé. Pour cela, les cellules ont été cultivées de manière similaire à ce qui a été décrit ci-dessus. Après, la première étape de centrifugation, le culot est repris dans 1 ml d'eau stérile, puis 200 µl de la suspension cellulaire ont été transférés dans des erlens contenant 25 ml YP lactate 2%, de YP glucose 2% ou de YP glucose 0,1%. Après 1 h d'incubation à 30°C sous agitation, les cellules ont été collectées, puis les culots ont été congelés à -80°C.

Pour analyser l'effet de la concentration en oxygène sur le niveau d'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4,* des cellules issues d'une préculture en phase stationnaire ont été utilisées pour ensemencer en parallèle 2 erlens contenant chacun 50 ml de YPG 2% à une DO_{i600nm} = 0,2. Une fois la phase exponentielle de croissance atteinte (DO_{600nm} = 1), 30 ml de culture ont été prélevés dans l'un des deux erlens et répartis dans 2 tubes Falcons. Ces tubes ont été remplis à ras-bord et les bouchons ont été entourés de scotch et de parafilm pour créer un environnement hypoxique. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 et 60 min à 30°C sans agitation. Après le temps approprié, les cellules ont été collectées et le culot sec a été congelé à -80°C. Dans le deuxième Erlen, 15 ml de cellules ont été collectés aux mêmes temps, centrifugés et congelés à -80°C. Ces cellules constituent les témoins en normoxie.

Pour étudier le mécanisme de la répression glucose, les cellules ont été cultivées pendant la nuit dans 2 ml de YP lactate 2%, puis utilisées pour ensemencer un Erlen contenant 100 ml de YP lactate 2% à une DO_{i600nm} = 0,2. Une fois la phase exponentielle de croissance atteinte, les cellules ont été collectées, lavées dans 5 ml de NaCl 0,9% puis transférées dans un nouvel

erlen contenant 50 ml de milieu YP lactate 2% neuf. Dix millilitres de culture ont été récupérés juste après le transfert et constituent le temps 0 de l'expérience. Ensuite, une solution de glucose concentrée (20%) a été ajoutée dans l'erlen, pour arriver à une concentration finale en glucose de 2%. Les cellules ont été incubées à 30°C sous agitation. Quarante-cinq et quatre-vingt-dix min après l'ajout du glucose, 10 ml de culture ont été prélevés, centrifugés et les culots secs ont été congelés. Afin d'éliminer le glucose, le reste de la culture a été centrifugé, lavé 2 fois avec 5 ml de NaCl 0,9 %, puis le culot a été repris dans 1 ml de NaCl 0,9%. La totalité de la suspension cellulaire a été transférée dans un nouvel erlen contenant du YP lactate 2%. Une heure après transfert, les cellules ont été collectées, lavées et congelées à -80°C.

Afin d'évaluer le niveau de transcription des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* au cours du processus de filamentation, les cellules ont été cultivées pendant la nuit dans 2 ml de YPG 0,5%. À partir de la préculture, un erlen contenant 100 ml de YPG 0,5 % a été ensemencé à une DO_{i600nm} de 0,2, puis incubé à 30°C jusqu'à une DO_{600nm} de 1,8. Les cellules ont ensuite été collectées, lavées, puis reprises dans 1 ml de NaCl 0,9%. La suspension cellulaire a été répartie dans des erlens contenant 20 ml d'une solution de sérum à 5%. Des prélèvements ont été réalisés après 0, 5, 10, 20, 30 et 60 min d'incubation à 37°C en présence de sérum. Pour finir, les cellules ont été collectées, lavées, centrifugées et congelées à -80°C.

Pour évaluer l'existence d'un phénomène de compensation au niveau transcriptionnel entre les gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4*, les souches sauvages et mutantes de *C. albicans* ont été cultivées sur la nuit dans 2 ml de YPG 2%. À partir de la préculture, un erlen contenant 100 ml de YPG 2% a été ensemencé à une DO_{i600nm} de 0,2, puis incubé à 30°C jusqu'à une DO_{600nm} de 1,8. Les cellules ont ensuite été collectées, lavées, et le culot sec a été congelé a -80°C.

Sauf mention contraire toutes les expériences impliquant l'analyse du niveau de transcription des gènes ont été effectuées en triplicats biologiques et en duplicats techniques.

B. Les bactéries

Au cours de cette étude, nous avons utilisé des bactéries *Escherichia coli* DH5α pour amplifier les plasmides contenant les cassettes de délétion et de complémentation destinées à la transformation de *C. albicans*. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB (Luria-Bertani) liquide (1% de peptone, 0,5% d'extrait de levure, 1% NaCl), à 37°C, avec une agitation linéaire de 180 rpm. La sélection des bactéries transformantes a été réalisée en milieu LB supplémenté avec de l'ampicilline (100 µg/ml).

II. Méthodes de génétique et de biologie moléculaire

A. Transformation

1. Transformation des levures par la méthode du lithium acétate

1 µg d'ADN transformant a été utilisé pour transformer les cellules selon la méthode décrite par Walther *et al*., 2003. Brièvement : À partir d'une culture de levure en phase stationnaire de croissance, un erlen contenant 50 ml de milieu riche YPG a été ensemencé de façon à obtenir une $D.O_{600nm}$ initiale environ égale à 0,2. Après 4 h d'incubation sous agitation (180 rpm) à 30 °C, les cellules ont été collectées grâce à une étape de centrifugation à 2500 rpm, à 4°C pendant 5 min. Le culot a été lavé avec 10 ml d'eau stérile, puis re-suspendu dans 1 ml de tampon LiAc / TE 1X (LiAc 1M, pH 8, Tris-HCl 100 mM, EDTA 0,5 M, pH 8). Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 20 sec à 3000 rpm, puis re-suspendues dans 500 µl de tampon LiAc/TE 1X. Dans un nouveau tube ont été ajoutés successivement : 10 µl d'ADN de sperme de saumon, 1 µg d'ADN transformant et 100 µl de cellules. Après une étape d'incubation de 30 min à température ambiante, 700 µl de PEG/LiAc/TE ont été ajoutés à la suspension cellulaire. Le mélange a été incubé pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, un choc thermique a été effectué en incubant les cellules pendant 15 min à 44°C. Après 30 sec de centrifugation à 3000 rpm, le culot a été repris dans 5 ml de milieu YPG puis incubé au moins 4 h à 30°C. Les transformants ont été sélectionnés sur un milieu YPG supplémenté avec 200 µg/ml de nourséothricine. La délétion du second allèle, nécessite au préalable d'éliminer le marqueur de sélection. Les cellules ayant intégré le module *SAT1-flipper* au locus désiré, ont été cultivées pendant la nuit dans 2 ml de milieu YPG 2% afin d'induire l'expression de la *FLP-recombinase*. Cette dernière est à l'origine du processus de recombinaison homologue entre les séquences FRT, conduisant à l'élimination du gène de résistance. Les cellules ayant perdu le marqueur de sélection ont été étalées sur un milieu YPG 2% supplémenté avec 20 µg/ml de nourséothricine. Avant de procéder à une vérification moléculaire, la taille des colonies a été utilisée comme critère d'identification des clones ayant perdu le module *SAT1-flipper*. En effet, *C. albicans* présentant une résistance naturelle aux faibles concentrations en nourséothricine, les cellules dépourvues du gène de résistance présenteront une taille inférieure aux cellules l'ayant conservé. Par la suite, les cellules ont de nouveau été transformées avec la cassette de délétion pour éliminer le deuxième allèle. Des analyses moléculaires par PCR ont permis d'analyser la délétion des gènes cibles au niveau des deux allèles et l'élimination de la cassette.

2. Transformation des bactéries

a) Préparation des cellules compétentes

À partir d'une préculture d'*Escherichia coli* DH5α en phase stationnaire de croissance, un erlen contenant 50 ml de milieu LB a été ensemencé à une DO_{600nm} initiale de 0,2, puis incubé jusqu'à ce qu'une DO_{600nm} de 0,4 soit atteinte. La culture a ensuite été refroidie sur la glace pendant quelques minutes. Toutes les opérations suivantes ont ensuite été effectuées à 4°C et en évitant de sortir les cellules de la glace. Les cellules ont été centrifugées 10 min à 7000 rpm à 4°C, puis reprises dans 10 ml de $CaCl_2$ 100 mM froid. La suspension est vortexée puis incubée 30 min dans la glace avant d'être centrifugée pendant 10 min à 7000 rpm à 4°C. Le culot est ensuite repris dans 2,5 ml de $CaCl_2$ 100 mM froid. La compétence des cellules a été

testée, en calculant l'efficacité de transformation avec un ADN contrôle. Les bactéries compétentes ont été conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

b) Transformation bactérienne par choc thermique

Dans un tube Eppendorf ont été successivement ajoutés : 100 µl de TCM (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM), 10 µl d'ADN transformant et 100 µl de cellules compétentes (DH5α). Le mélange a ensuite été incubé pendant 30 min sur la glace, puis un choc thermique a été appliqué pendant 1 min à 42°C. Après 2 min d'incubation sur la glace, 900 µl de milieu LB ont été ajoutés à la suspension cellulaire. Les cellules ont été ensuite incubées pendant 45 min à 37°C sans agitation. Les transformants ont été sélectionnés sur un milieu LB supplémenté avec de l'ampicilline après 24 h d'incubation à 37°C.

B. Construction des souches mutantes de *C. albicans*

Pour construire les mutants utilisés au cours de cette étude, nous avons fait appel aux propriétés du module *SAT1-flipper* (Reuß *et al*., 2004) (Fig. 59), qui possède un marqueur éliminable permettant de réutiliser le même marqueur pour déléter le second allèle du gène cible.

Figure 59 : Représentation schématique du module SAT1-flipper utilisé pour construire les mutants de délétion. Le module est constitué en 5' et 3' de régions homologues au gène à déléter (bleues). Le promoteur MAL2 est un promoteur inductible par le mannose ou le glucose qui permet l'expression de la FLP recombinase en présence de ces sucres. Le terminateur ACT1T est placé en 3' du gène FLP. Enfin, le marqueur de résistance codé par le gène SAT1 possède son propre promoteur et terminateur. Les séquences figurées en noires sont les séquences FRT.

À partir de ce module, deux techniques différentes ont été utilisées pour construire les cassettes de délétion ou de complémentation. La méthode de « Long Flanking Homology » qui consiste à greffer de part et d'autre du module *SAT1* de longues régions (500 pb) homologues au gène cible (Fig. 60) et la méthode de « Short Flanking Homology ». Avec cette seconde méthode, le module SAT1 est directement amplifié à l'aide d'amorces possédant une région flottante de 85 pb homologue au gène à supprimer (Fig. 60).

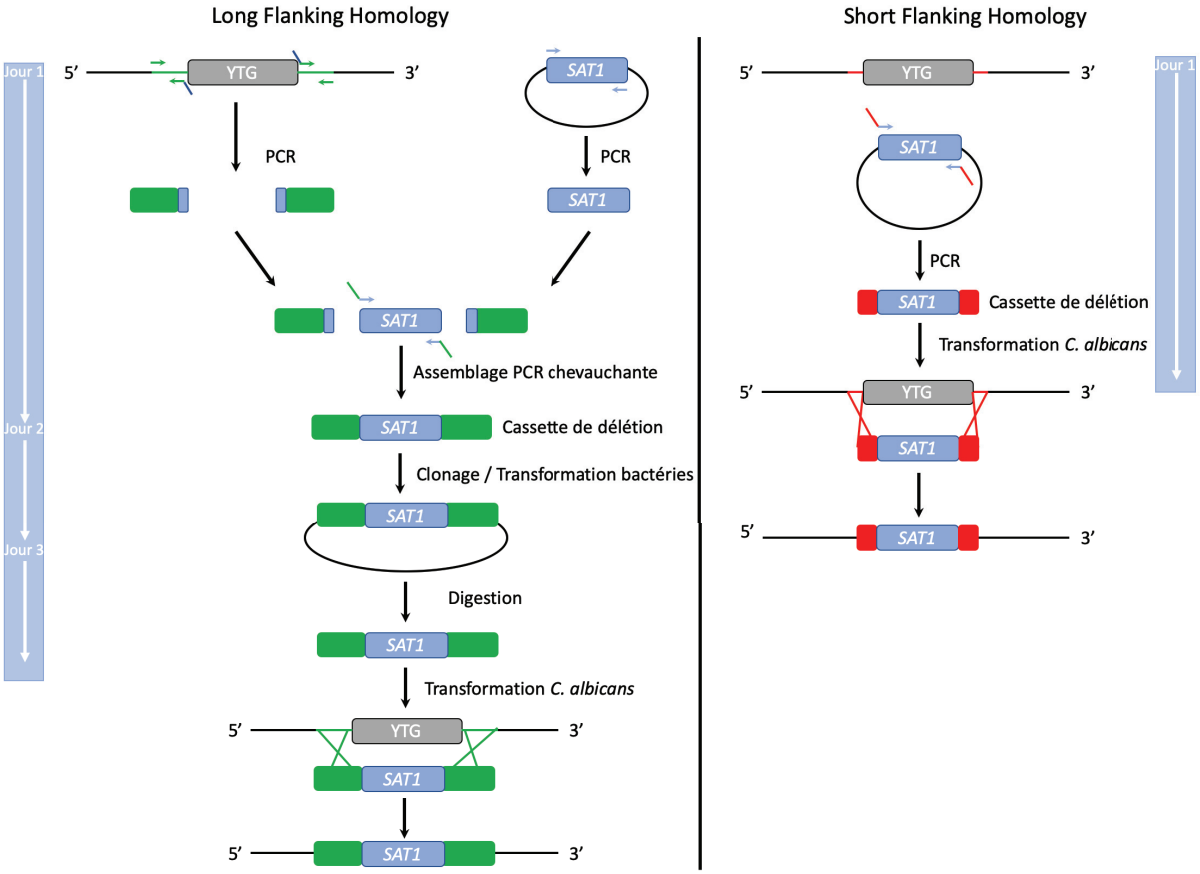


Figure 60 : Vue d'ensemble des techniques de « Long Fragment Homology » (LFH) à gauche et « Short Fragment Homology » à droite. Pour la LFH, des régions de 500 pb situées en 5' et 3' du gène cible sont amplifiées par PCR, à l'aide d'oligonucléotides chimères comportant une partie homologue au marqueur de sélection SAT1-flipper. Le module SAT1 est amplifié par PCR, puis les trois fragments sont assemblés par PCR « chevauchante ». La cassette de délétion ainsi créée est clonée dans un plasmide, et amplifiée chez E. coli. La cassette, libérée du plasmide par digestion peut être utilisée pour transformer C. albicans. Pour la méthode SFH, le module SAT1 est directement amplifié à l'aide d'amorces chimères comportant une partie complémentaire au module SAT1 et une partie flottante de 85 pb homologue aux régions 5' et 3' du gène cible. La cassette ainsi obtenue peut être utilisée directement pour transformer C. albicans.

1. Construction du mutant *Cahxk2Δ/Δ*

Le gène *CaHXK2* a été interrompu par insertion d'une cassette de délétion contenant le module *SAT1- flipper* (Fig. 59). Des régions, 5' et 3' situées respectivement en amont du codon START et en aval du codon STOP ont été amplifiées par PCR puis assemblées avec le module *SAT1*. La région 5' du gène *CaHXK2* (nucléotide -463 à -5) a été amplifiée par PCR en utilisant les primers p1 et p2 (Tableau 7). L'amorce p1 est composé de deux parties, la première est homologue à la région à amplifier, la seconde est flottante et comprend 20 pb homologue au site multiple de clonage du plasmide pUC18 et inclus le site de restriction *Sma*1. Les primers p3 et p4 (Tableau 7) ont été utilisés pour amplifier la cassette *SAT1-flipper* à partir du plasmide pSFS2A (fourni par J. Morschhäuser + référence de l'article). La région 3' du gène *CaHXK2* a été amplifiée par PCR avec les primers p5 et p6 (Tableau 7). L'amorce p6 comporte une partie flottante homologue à une partie du plasmide pUC18 et porte un site de restriction Sma1. Les régions 5' et 3' du gène *CaHXK2* ont ensuite été assemblées avec le module *SAT1-flipper* par LFH-PCR (Long Flanking Homology) en utilisant la PrimeStar Max DNA polymerase (Takara). La cassette ainsi assemblée a été purifiée sur colonne puis clonée par SLIC (one-step Sequence and Ligation Independent Cloning, Li et Elledge, 2012) dans le plasmide pUC18 au niveau du site de restriction *Sma*1 pour générer le plasmide pCaPC1 (Tableau 8). Une fois amplifié chez

E. coli, le plasmide a été extrait par miniprep, puis digéré par *Sma*1 pour libérer la cassette de délétion qui a ensuite été utilisée pour transformer la souche sauvage (SC5314) de *C. albicans*.

2. Complémentation de la mutation *Cahxk2Δ/Δ*

La région génomique du gène *CaHXK2* s'étendant de 473 pb avant le codon START à 363 pb après le codon STOP a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces p42 et p43 (Tableau 7) contenant respectivement les sites de restriction *Sph*1 et *Sal*1. La région amplifiée, a été clonée par SLIC dans le plasmide pUC18 pour générer le plasmide pUC*HXK2*. Le module *SAT1-flipper* flanqué de 483 pb homologues à la région 3' du gène Ca*HXK2* a été amplifié avec les primers p44 et p45 (Tableau 7), contenant les sites de restriction *Sal*1 et *Xma*1, à partir du plasmide pCaPC1 (Tableau 8). Ce fragment a ensuite été cloné par SLIC dans le pUC*HXK2* linéarisé par *Sal*1 et *Xma*1 pour former le plasmide pCa*HXK2*c (Tableau 8). La cassette de complémentation a été libérée en digérant le plasmide pCa*HXK2*c à l'aide des enzymes de restriction *Sph*1 et *Sal*1. Le produit de la digestion a été utilisé pour transformer la souche *Cahxk2Δ/Δ* de *C. albicans.*

3. Construction du mutant *Caglk1Δ/Δ* par « Short Flanking Homology »

La méthode SFH-PCR (Short Flanking Homology, Fig. 60) a été utilisée pour interrompre le gène *GLK1* de *C. albicans* par recombinaison homologue. Pour cela, le module *SAT1-flipper* a été amplifié réalisé grâce à des oligonucléotides chimères permettant de placer aux extrémités du module les séquences homologues aux régions 5' et 3' de *CaGLK1*. Les oligonucléotides comprennent une partie 3' constituée de 20 pb homologue à la séquence du module *SAT1-flipper* et une partie 5' d'une longueur de 85 pb homologue à la région du gène ciblé. Le mélange réactionnel de PCR est composé de : 2,5 µl des primers p75 et p76 (Tableau 7) à 10 µM, 1 unité de la polymérase Q5 (New England Biolabs), 1 µl de dNTP 10 mM, 10 µl de tampon 5X Q5 et de 50 à 100 ng d'ADN génomique. Le programme d'amplification utilisé est le suivant : 30 sec à 98°C, 30 cycles (10 sec à 98°C ; 30 sec à 50°C ; 3 min à 72°C), 5 min à 72°C. Le produit PCR a été directement utilisé pour transformer une souche sauvage (SC5314) de *C. albicans*.

4. Construction du double mutant *Caglk1glk4Δ/Δ*

Du fait de la forte homologie de séquence entre les gènes *CaGLK1* et *CaGLK4* nous n'avons pas été en mesure de déléter la séquence codante complète du gène *CaGLK4.* Nous avons donc opté pour une délétion partielle de la région codante de *CaGLK4*. Une région de 237 pb, s'étendant entre les nucléotides 380 et 617 après l'ATG et comprenant le site de fixation des hexoses a donc été délétée. Pour cela, le plasmide pSFS2A (Tableau 8) contenant le module *SAT1-flipper* a été amplifié à l'aide des oligonucléotides p100 et p101 (Tableau 7) qui possèdent 20 paires de bases homologues au module *SAT1-flipper* en 3' et 80 paires de bases homologues à la région du gène à déléter. L'amplification de la cassette de délétion a été effectuée par PCR en utilisant la polymérase PrimeStar Max High-Fidelity (Takara) en présence du mélange réactionnel suivant : 25 µl de PrimeStar Max, 2,5 µl de chaque primer à 10 µM et de 1 à 10 ng de matrice plasmidique et en utilisant le programme PCR suivant : 30 sec à 98°C, 30 cycles [10 sec à 98°C ; 15 sec à 55°C ;20 sec à 72°C]. La cassette ainsi amplifiée a été utilisée pour transformer une souche *Caglk1Δ/Δ* de *C. albicans*.

5. Construction du double mutant *Caglk1hxk2* et du triple mutant *Caglk1glk4hxk2Δ/Δ*

La cassette de délétion du gène *CaHXK2* contenue dans le plasmide pCaPC1 (Tableau 8) a été libérée par digestion enzymatique grâce à l'enzyme de restriction *Sma*1. Le produit de digestion a été utilisé pour transformer les mutants *Caglk1Δ/Δ* ou *Caglk1glk4Δ/Δ* de *C. albicans*.

6. Construction des mutants *HXK2D210A*, *HXK2T15A et HXK2ΔK6F16* par mutagenèse dirigée

Pour construire les mutants ponctuels du gène *CaHXK2*, nous avons utilisé une souche *Cahxk2Δ/Δ* dans laquelle, les deux allèles du gène *CaHXK2* portant les mutations d'intérêts seront réintroduits. Le plasmide pCa*HXK2*c (9,6 kb) contenant la cassette de complémentation du gène *CaHXK2* a servi de matrice pour la mutagenèse dirigée. Le plasmide a été amplifié avec un couple d'oligonucléotides partiellement chevauchant et comportant la mutation d'intérêt (Fig. 61 et Tableau 7). Les températures d'hybridation des amorces ont été calculées grâce à la formule mathématique disponible sur (http://www.stratagene.com/).
Les étapes d'amplification par PCR ont été effectuées en utilisant la PrimeStar Max High Fidelity Polymerase (Takara) dans 50 µl de mélange réactionnel composé de 50 ng de matrice, 2,5 µl de chaque primers à 10 µM, 10 µM de chaque dNTPs et 2 unités d'ADN polymérase et avec le programme d'amplification suivant : une étape de dénaturation initiale à 98°C pendant 3 min, puis 16 cycles à : 98°C pendant 1 min, 55°C pendant 1 min et 72°C pendant 9 min. La réaction a été achevée par une étape d'incubation à 19°C pendant 5 min. La qualité et la taille des produits amplifiés par PCR ont été évaluées par migration sur gel d'électrophorèse. Les produits d'amplification ont ensuite été digérés par l'enzyme de restriction *Dpn*1 afin d'éliminer la matrice plasmidique de départ. 270 ng de produit PCR ont ensuite été utilisés pour transformer des bactéries compétentes DH5α. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB ampicilline (100 µg/ml). Pour chaque transformation, les plasmides de 5 colonies choisies au hasard ont été extraits par Miniprep grâce au kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). L'intégration de la mutation désirée a été vérifiée par pyroséquençage de Sanger réalisé par la plate-forme Biofidal™ (Vaulx-en-Velin, France).
Les plasmides contenant les mutations d'intérêts ont ensuite été digérés à l'aide des enzymes de restriction *Sph1* et *Xma1*. Cette étape a permis de libérer l'insert utilisé pour transformer le mutant *Cahxk2Δ/Δ* de *C. albicans*.

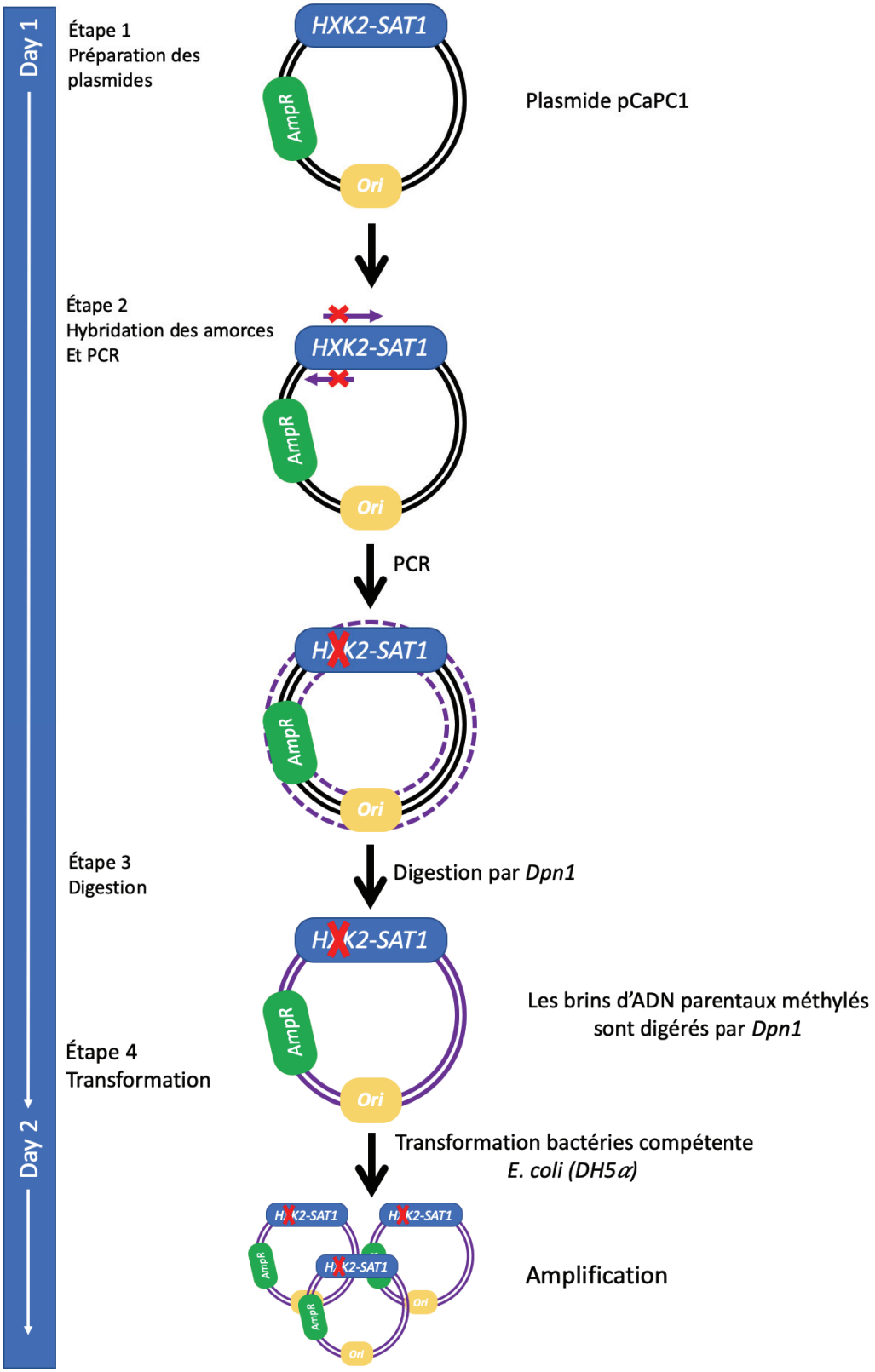


Figure 61 : Représentation schématique du processus de mutagenèse dirigée. Le plasmide pCaPC1 a été extrait par Miniprep de bactéries compétentes DH5α. Pour intégrer la mutation d'intérêt, le plasmide a été amplifié avec un couple d'amorces partiellement chevauchant (mauve). La mutation à insérer est figurée par une croix rouge. Après une étape de PCR, le mélange réactionnel contient un mélange de brins parentaux (sans mutation) et de brins nouvellement synthétisés, comportant la mutation d'intérêt. Pour éliminer la matrice de départ (non mutée), les produits PCR ont été traités avec l'enzyme de restriction Dpn1 qui digère spécifiquement l'ADN méthylé. Le produit de digestion est ensuite utilisé pour transformer une souche compétente d'E. coli (DH5α). Cette étape de transformation permet d'amplifier les plasmides ayant potentiellement intégré la mutation désirée.

7. Construction des souches *CaHXK2*, *CaGLK1* et *CaGLK4* portant un tag GFP en C-terminal

Le module *GFP-NAT1* a été amplifié à partir du plasmide pGFP-NAT (Milne *et al*., 2011), à l'aide d'oligonucléotides chimères. Les amorces p84, p85, p88 et p89 (Tableau 7) ont été utilisées respectivement pour placer le tag GFP en fusion avec les gènes *CaHXK2* et *CaGLK1*. Ces primers sont composés d'une partie 5' homologue aux 80 nucléotides précédant ou suivant le codon STOP, et d'une partie 3' composée de 20 pb homologue au plasmide pGFP-NAT. Les produits PCR amplifiés ont été utilisés pour transformer la souche sauvage (SC5314) de *C. albicans*.

C. Extraction, amplification, purification et quantification des acides nucléiques

1. ADN génomique de levure

Deux ml de culture de levure en phase stationnaire ont été transférés dans un tube Eppendorf à bouchon vissé puis centrifugés pendant 30 s à 13000 rpm. Le culot obtenu a été rincé avec 1 ml d'eau stérile. Après une nouvelle étape de centrifugation, les cellules ont été reprises dans 200 µl de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, pH 8, NaCl 100 mM, Triton X-100 2% (m/v) et SDS 1%). Environ 300 µg de billes de verre (diamètre de 0,5 mm) et 200 µl d'une solution de phénol : chloroforme : alcool isoamylique ont été ajoutés à la suspension cellulaire. Les cellules ont ensuite été vigoureusement agitées pendant 5 min en utilisant un vortex. 200 µl d'une solution de TE 1X ont été ajoutés au mélange, qui a ensuite été vortexé pendant 1 min, puis centrifugé pendant 5 min à 13000 rpm. La phase aqueuse supérieure a été transférée dans un nouveau tube Eppendorf et 400 µl d'une solution de chloroforme ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été vortexé pendant 1 min puis centrifugé 2 min à 13000 rpm. La phase aqueuse supérieure a été prélevée puis traitée à la RNAse A. Pour cela, une quantité de RNAse A correspondant à une concentration finale de 0,1 mg/ml a été ajoutée au mélange puis celui-ci a été incubé pendant 10 min à 37 °C. Un volume correspondant à 1/10 du volume total de Na acétate 3 M, pH 5,2 et deux volumes et demi d'éthanol absolu froid ont été ensuite ajoutés. Le mélange a été homogénéisé par inversion, puis centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm. Le culot obtenu a été rincé avec 500 µl d'éthanol 70% froid et centrifugé pendant 2 min à 13000 rpm. Le culot a été alors séché au Speedvac puis solubilisé dans 100 µl d'eau ultra-pure.
La concentration en ADN a été déterminée par le biais d'un dosage spectrophotométrique à 260 nm, à l'aide du Nanodrop2000™ (Thermo Scientific). La pureté de l'ADN extrait a été mesurée en analysant les valeurs des ratios A_{260nm}/A_{280nm} et A_{260nm}/A_{230nm}.

2. ADN plasmidique d'*E. coli*

Miniprep : À partir de 5 ml d'une culture de bactérie DH5α en phase stationnaire de croissance, les cellules ont été récoltées par centrifugation pendant 30 sec, à 11000 g. L'ADN plasmidique des cellules a été extrait grâce au kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) en suivant les recommandations du fournisseur. Les plasmides ainsi extraits ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

3. Amplification de séquence d'ADN par PCR

La réaction de polymérisation en chaine (PCR, acronyme anglais de *polymerase chain reaction*) est une technique de biologie moléculaire utilisée pour amplifier des molécules d'ADN. Les enzymes responsables de l'amplification sont des ADN polymérases, couramment appelées « Taq ». La spécificité du fragment amplifié est assurée par le choix d'un couple d'amorces qui s'hybride spécifiquement au fragment d'intérêt.
Il existe une large gamme d'ADN polymérase possédant chacune leur propre caractéristique. Les PCR ont été effectuées avec l'une des ADN polymérase suivantes selon les cas :

- L'Econotaq polymérase (Lucigen®) pour la sélection des transformants d'intérêts ou la vérification de construction
- La Q5 High Fidelity Polymérase (NEB™) pour l'amplification haute-fidélité de fragment à cloner, la construction de cassette par collage de fragment, et la vérification de l'insertion des cassettes de délétion ou de complémentation dans le génome de *C. albicans*.
- La PrimeStar Max Polymérase (Takara®) pour l'amplification haute-fidélité de fragments d'ADN de grande taille à partir d'une matrice plasmidique.

Les mélanges réactionnels et les programmes d'amplification génériques utilisés pour chacune de ces enzymes sont décrits dans le tableau suivant. Dans la plupart des cas, le volume final du mélange réactionnel était de 25 ou 50 µl. Selon leur utilisation, les produits PCR ont été purifiés grâce au kit de purification des acides nucléique Macherey-Nagel, utilisé en suivant les recommandations du fournisseur.

Enzymes	**EconoTaq**	**Q5 High-Fidelity**	**PrimeStar Max**
Mélange réactionnel 50 µl	Amorce sens 5 µM Amorce antisens 5 µM EconoTaq Supermix 25 µl H_20 qsp 50 µl	Amorce sens 1 µM Amorce antisens 1 µM Tampon Q5 5X = 10 µl dNTP 1 mM Q5 1 unité H_20 qsp 50 µl	Amorce sens 1 µM Amorce antisens 1 µM PrimeStar Mix 2X 25 µL H_20 qsp 50 µl
Programme PCR	94°C, 2 min 94°C, 30 sec Tm, 30 sec 72°C, 1 min/kb *30 cycles* 72°C, 5 min 4°C, 10 min	98°C, 30 sec 98°C, 10 sec Tm, 30 sec 72°C, 20 sec/kb *30 cycles* 72°C, 5 min 19°C, 10 min	98°C, 3 min 98°C, 10 sec 55°C, 15 sec 72°C, 5 sec/kb *30 cycles* 19°C, 5 min

Tableau 5 : Composition du mélange réactionnel et programme PCR type utilisé en fonction de l'ADN polymérase utilisée.

4. Extraction des ARNs totaux de levure par la méthode du phénol acide et synthèse des ADNs complémentaires

a) Extraction des ARNs totaux

Afin de limiter l'action des RNases, toutes les étapes de l'expérience ont été effectuées sur la glace et avec des gants. Le matériel utilisé est certifié RNase Free, les solutions aqueuses utilisées ont été préalablement traitées au DEPC (diéthyl pyrocarbonate) afin d'éliminer les RNases.

À partir d'une suspension de levure en phase stationnaire, des erlens contenant 10 ou 20 ml de milieux de culture ont été ensemencés de façon à obtenir une D.O initiale de 0,2. Une fois la phase exponentielle de croissance atteinte (DO_{600nm} = 1,8), les cultures ont été centrifugées pendant 3 min, à 4000 rpm, à 4°C. Le culot a ensuite été ensuite rincé avec 1 ml d'eau traitée au DEPC. La suspension cellulaire a été centrifugée pendant 1 min à 13000 rpm et a 4°C. Le culot a alors été solubilisé dans 400 µl d'une solution de TES (Tris 10mM, pH 7,5, EDTA 10 mM et SDS 0,5%) traitée au DEPC. 400 µl d'une solution de phénol acide ont été ajoutés avant d'agiter vigoureusement le mélange au vortex pendant 10 sec. Après une incubation de 10 min à 65°C, le mélange a été placé 5 min sur la glace avant d'être centrifugé pendant 5 min, à 13000 rpm, à 4°C. La phase aqueuse supérieure a été prélevée et 400 µl de phénol acide ont été de nouveau ajoutés. Le mélange a ensuite été vortexé pendant 10 sec puis centrifugé pendant 5 min à 13000 rpm, à 4°C. La phase aqueuse supérieure a été récupérée et les ARN ont été précipités en ajoutant 1/10ème de volume de Na acétate 3M, pH 5,3 traité au DEPC et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Le mélange a été homogénéisé par inversion des tubes et incubé 20 min à -80°C. Après une étape de centrifugation de 10 min, à 13000 rpm, à 4°C, le culot a été rincé avec 500 µl d'éthanol 70% froid, puis centrifugé une nouvelle fois pendant 5 min, à 13000 rpm, à 4°C. Le culot a ensuite été séché à l'air libre pendant 10 min puis repris dans 50 µl d'eau DEPC. Enfin, les ARN ont été incubés pendant 5 min à 65°C afin d'être bien re-solubilisés, puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

b) Contrôle de la qualité des ARNs extraits

Après leur extraction, l'intégrité des ARNs totaux a été analysée par migration sur un gel d'agarose à 1,2%. Si l'extraction n'a pas compromis l'intégrité des acides ribonucléiques, le profil obtenu sur gel doit être le suivant :

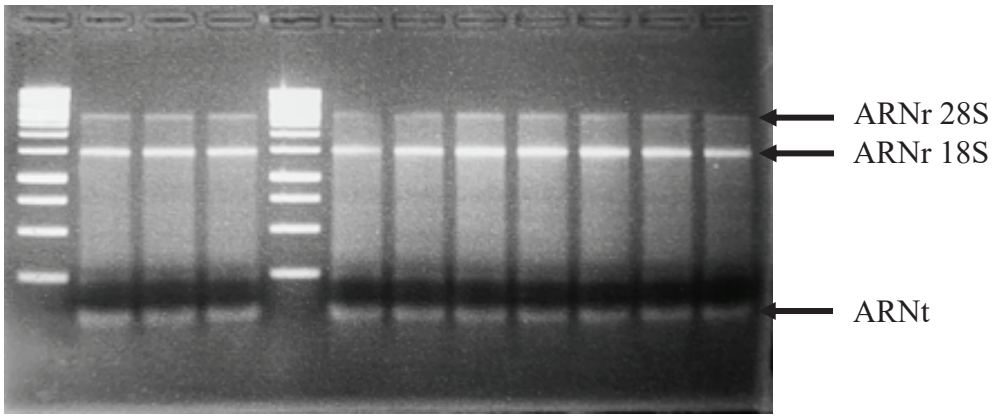


Figure 62 : Photographie d'un gel d'agarose, sur lequel des échantillons d'ARN totaux ont été chargés puis séparés par l'application d'un champ électrique. Les bandes supérieures correspondent aux ARNs ribosomiques, tandis que la bande inférieure correspond aux ARNs de transferts. Le smear correspond à un mélange ARNm et ADN.

Les ARNs ribosomiques 28S et 18S, ainsi que les ARNs de transferts doivent être présents sous la forme de bande bien distincte.

c) Traitement des ARNs à la DNAse Ambion

Afin d'éliminer les traces d'ADN génomique pouvant être présentes dans les échantillons, les ARNs extraits ont été traités à la DNAse Ambion, selon le protocole suivant :

Un volume correspondant à une quantité de 10 µg d'ARN a été prélevé. 5 µl de 10 X DNAse buffer et 1 µl de DNAse (2 U) ont ensuite été ajoutés puis le volume a été ajusté à 44 µl avec de l'eau DEPC. Le mélange a été incubé pendant 30 min à 37°C, puis 5 µl d'agent inactivant la DNAse ont été ajoutés. Après deux minutes d'incubation à température ambiante, le mélange centrifugé pendant 1,5 min à 10000 g. Le surnageant contenant les ARN a été récupéré puis stocké à -80°C. L'absence de contamination ADN a été testée par PCR en utilisant les amorces du gène *CaHXK2*.

d) Réverse transcription : la synthèse des ADN complémentaires

Les ADNs complémentaires (ADNc) ont été synthétisés à partir des ARNs totaux préalablement traités à la DNAse. Le kit « RevertAid H Minus Reverse Transcriptase » (Thermo Scientific) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, dans un tube RNAse free, 12 µl d'ARN traité à la DNAse (environ 2,4 µg), 1 µl de dNTP 10 mM et 1 µl de primer à 50 µM généré aléatoirement (« random decamers », Ambion) ont été mélangés. Les éléments suivants ont ensuite été ajoutés dans le mix réactionnel : 4 µl de tampon de réaction 5X, 1 µl de DTT (Dithiothréitol) 0,1 M et 1 µl de RevertAid H Minus Reverse transcriptase (200 U). Le mélange réactionnel a ensuite été incubé pendant 10 min à 25°C puis 60 min à 42°C. La reverse transcriptase a été inactivée par une étape de chauffage de 10 min à 70°C. Les ADNc ainsi générés sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.
L'omission de la transcriptase inverse dans le mélange réactionnel permet de générer un contrôle négatif (-RT). Ce témoin nous permet de juger de l'efficacité du traitement DNAse. Une amplification constatée pour ce contrôle au cours de la réaction de RT-qPCR indique la présence de traces d'ADN dans les échantillons.

5. Quantification des transcrits par qPCR

a) Principe de la qPCR

La PCR quantitative ou qPCR permet de mesurer de façon relative ou absolue le niveau d'expression d'un gène dans une condition donnée. La technique fait appel à un fluorophore SYBR Green 1 qui s'intercale entre les nucléotides de la molécule d'ADN. Lorsqu'il est libre dans le milieu, la fluorescence émise par ce fluorophore est très faible. En revanche, lorsqu'il se lie au petit sillon de la double hélice d'ADN, l'intensité du signal émis est largement amplifiée (Yue, Singer *et al*. 1997.) Complexé à de l'ADN bicaténaire, le SYBR Green absorbe dans le bleu ($\lambda_{ex}= 488\text{nm}$) et émet dans le vert ($\lambda_{em}=520\text{nm}$). Ainsi, au fur et à mesure que la réaction de PCR progresse, et que la quantité d'ADN double brin formé dans le mélange réactionnel augmente, l'intensité du signal fluorescent émis par le SYBR Green s'intensifie.
La réaction de qPCR est suivie à l'aide un thermocycleur couplé à un fluorimètre. Le thermocycleur permet de faire varier la température au cours de la réaction tandis que le fluorimètre mesure à la fin de chaque cycle l'intensité du signal fluorescent émis par le mélange réactionnel. Les données collectées par le fluorimètre sont traitées informatiquement pour générer une courbe d'amplification dont le profil général est présenté ci-dessous (Fig. 63). Sur cette courbe, quatre phases distinctes peuvent être identifiées. Une phase de latence au cours de laquelle, le produit PCR d'intérêt est amplifié, mais où le signal fluorescent est trop faible pour être distingué du bruit de fond. Cette phase de latence est suivie de la phase exponentielle, durant laquelle la quantité de la cible double à chaque cycle. Cette phase est caractérisée par la présence en abondance de l'ensemble des réactifs

nécessaire à l'accomplissement de la réaction de PCR. La phase linéaire marque le début de l'épuisement de certains réactifs, conduisant à un ralentissement global de la réaction. Enfin la phase plateau, est caractérisée par l'épuisement complet des réactifs entrainant l'arrêt de la réaction de PCR. Dans les expériences de qPCR, c'est la phase exponentielle qui est utilisée pour quantifier le niveau d'expression d'un gène. Quand le signal de fluorescence émis par le mélange réactionnel franchi le seuil de détection le séparant du bruit de fond, une valeur appelée « Cq » pour Cycle quantification peut être déterminée. Plus l'échantillon de départ est concentré, plus le nombre de cycles nécessaire pour atteindre le « Cq » sera faible. À l'inverse si le gène cible est peu représenté dans le mélange initial, le nombre de cycles nécessaire pour franchir le seuil de détection sera plus important (Fig. 63).

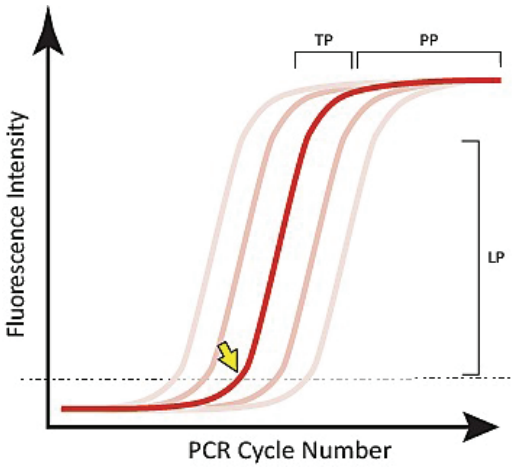


Figure 63 : Profil général d'une courbe d'amplification obtenu à l'issue de la réaction de qPCR, représentant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles PCR. Quatre phases sont visibles sur cette courbe, une phase de latence, une phase exponentielle, une phase de ralentissement et une phase plateau. Le seuil de détection de fluorescence est représenté par une ligne noire en pointillé. La valeur de Cq utilisée pour calculer l'abondance relative d'un gène dans une condition donnée est indiquée par une flèche jaune.

La valeur de Cq est utilisée pour quantifier de façon relative l'abondance de la cible entre 2 ou plusieurs échantillons ou pour calculer de façon absolue la quantité de la cible en se référant à une gamme étalon. L'équation générale décrivant la courbe étalon est :

$$Log(N0) = -Log(E+1)xCq + Log(Nt)$$

Équation 1 : Formule mathématique caractérisant la droite étalon d'une réaction de qPCR. Où N_0 est la quantité d'ADN initiale, E l'efficacité de la réaction, Cq le cycle où l'intensité du signal fluorescent émis croise le seuil de détection et Nt le nombre d'amplicons au seuil.

La forme générale de l'équation est celle d'une équation du second degré (Y = -ax+b) mettant ainsi en évidence une relation inversement proportionnelle entre la valeur Cq et le Log de la concentration en ADN. En rapportant la valeur Cq obtenue pour le gène que l'on souhaite quantifier, sur la droite de la gamme étalon, on peut estimer la quantité d'ADN dans le mélange initial.

b) La réaction de qPCR

Pour chaque gène dont on souhaite mesurer le niveau d'expression, un mélange réactionnel contenant 5 µl de SYBRGreen SsoAdvenced® (Biorad™), 0,25 µl des amorces sens et antisens (spécifique du gène d'intérêt (0,25 µM), Tableau 9) et 3,5 µl d'eau RNAse Free traitée au DEPC a été préparé. Neuf µl de ce mix ont été déposés dans les puits d'une microplaque 96 puits et

1 µl de matrice ADNc a été ajoutée au mélange. La quantification des transcrits nécessite la comparaison des valeurs obtenues avec une gamme étalon d'ADN génomique dont la concentration en acides nucléiques est connue. Pour la plupart des gènes dont l'expression a été mesurée, la gamme étalon était constituée des dilutions $\frac{1}{8}, \frac{1}{32}, \frac{1}{64}, \frac{1}{256}$ et $\frac{1}{1024}$ d'une solution mère d'ADNg à 380 ng/µl. Les ADNc ont été amplifiés au cours de 40 cycles grâce au BioRad CFX96. Le programme d'amplification qui a été utilisé est le suivant : 60 sec à 95°C ; [15 sec à 95°C ; 30 sec à 60°C]x40 ;10 sec à 95°C ;5 sec à 65°C et 5min à 95°C. La quantification des transcrits a été normalisée en utilisant le gène *CaACT1* comme calibreur interne. L'analyse des résultats a été faite à l'aide du logiciel CFX96 Manager Software®.

c) Quantification des transcrits par ddPCR

La droplet digital PCR (ddPCR™) est une évolution de la qPCR, permettant de quantifier de façon absolue le nombre de copies d'un ADN cible au sein d'un échantillon complexe. La technique repose sur le partitionnement des échantillons en plusieurs milliers de gouttelettes par émulsion eau-huile. Les matrices présentes dans chacune des gouttelettes individuelles sont ensuite amplifiées par PCR et le nombre de copies/µl de la cible est calculé en s'appuyant sur la loi statistique des évènements rares (ou loi de Poisson). De par sa grande sensibilité, cette technique est particulièrement bien adaptée pour la détection de gènes très faiblement exprimés. Pour chaque gène dont on souhaite connaitre le niveau d'expression, un mélange réactionnel contenant 10 µl de SsoFast Evagreen Supermix® (BioRad™), 0,2 µl des amorces sens et antisens (spécifique du gène d'intérêt (100 nM), Tableau 10), 4,1 µl d'eau RNAse Free traitée au DEPC et 50 ng de matrice ADNc a été préparé. Les gouttelettes ont été générées en transférant le mélange réactionnel dans le générateur de gouttelettes (QX200 Droplet Generator) (BioRad) et en suivant les recommandations du fournisseur. Les gouttelettes ont ensuite été délicatement transférées dans une plaque 96 puits, qui a été thermoscellée avec une feuille d'aluminium. La réaction de PCR a été effectuée en utilisant le thermocycleur BioRad CFX96 (BioRad) avec les paramètres suivants : 5 min à 95 °C ; [30 sec à 95°C ; 60 sec à 60°C]x40 ; 5 min à 4°C et 5 min à 90 °C. Suite à la réaction de PCR, la plaque 96 puits a été transférée dans le lecteur de gouttelettes (QX200 Droplet Reader, BioRad). La fluorescence émise par chacune des gouttelettes a été analysée individuellement, permettant une quantification précise du nombre de gouttelettes positives (contenant le gène d'intérêt) et négatives (vides ou ne contenant pas le gène cible). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel QuantaSoft®.

III. Techniques de biochimie

A. Extraction des protéines en conditions natives

A partir d'un inoculum en phase stationnaire de croissance, les cellules ont été diluées puis remises en culture dans 50 ml de YPG 0,1% jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} = 1). Après une étape de centrifugation de 5 min à 2500 rpm, les culots ont été repris dans 500 µl de tampon Tris-HCl 0,1 M supplémenté avec 10% de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Dans un tube Eppendorf ont été successivement ajoutés environ 1,5 ml de billes de verre (diamètre 0,5 µm) et 500 µl de suspension cellulaire. Les protéines ont été extraites par broyage en utilisant le FastPrep®-24 (MP Biomedicals). Une succession de cinq broyages (6,5 m/s pendant 30 sec) a été effectuée. Entre chaque broyage,

un temps de repos de 5 min durant lesquels les échantillons ont été placés dans la glace, a été observé. Suite à cette étape, le lysat cellulaire a été collecté par une étape de centrifugation « en tube percé » de 10 min à 2500 rpm à 4°C.

B. Dosage de l'activité hexose kinase

Le dosage des activités hexose kinase a été effectué en mesurant indirectement la quantité de glucose-6-phosphate qui se forme par le biais d'une réaction couplée. La réaction de phosphorylation du glucose en glucose 6-phosphate a été couplée à une réaction de déshydrogénation conduisant à la formation de phosphogluconolactone et de NADPH, (H^+) facilement dosable à 340nm. La quantité de NADPH, (H^+) formée est directement proportionnelle à la quantité de glucose-6-phosphate produite. L'activité des enzymes phosphorylant le glucose a donc été déterminée spectrophotométriquement, en mesurant la formation du NADPH, (H^+) au cours du temps. Les réactions ont été effectuées à température ambiante dans une cuve spectrophotométrique de 1 ml contenant : 100 µl de tampon HEPES pH 7.5 (25 mM), 100 µl de $MgCl_2$ (10 mM), 100 µl de NADP (1 mM), 2 unités de glucose-6-phosphate déshydrogénase, un volume d'extrait cellulaire correspondant à une quantité de 500 µg de protéine et (i) 100 µl de D-glucose (10 mM) pour le dosage de l'activité glucose kinase, (ii) 100 µl de D-fructose (10 mM) et 2 unités de phosphogluco-isomérase pour le dosage de l'activité fructokinase ou (iii) 100 µl de D-mannose (10 mM), 2 unités de phosphogluco-isomérase et 2 unités de phosphomannose isomérase pour le dosage de l'activité mannokinase. Le volume est ajusté à 900 µl avec de l'eau ultra-pure puis la réaction est initiée en ajoutant 100 µl d'ATP (5 mM). L'avancée de la réaction a été suivie en mesurant en continu l'évolution de la DO à 340 nm pendant 10 min. L'activité hexose kinase a été déterminée à l'aide de la formule mathématique suivante :

$$Activité\ Hexose\ kinase = \frac{\Delta}{\varepsilon}\ x\ m$$

Équation 2 : Formule mathématique permettant de déterminer l'activité hexose kinase. Δ représente la pente de la droite sur sa partie linéaire, ε est le coefficient d'extinction molaire du NADH,H^+ ($6.255x10^3$ mol/l/cm) et m la quantité de protéine utilisée en milligramme.

Les résultats présentés représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, effectuées en triplicat (n=9) et sont exprimés en nmol/min/mg. Les constantes de Michaelis-Mentens des enzymes ont été calculées en utilisant le logiciel Dynafit.

C. Extraction des protéines en conditions dénaturantes

Les protéines ont été extraites selon la méthode de Kushnirov (Kushnirov, 2000). Brièvement, les cellules d'une préculture en phase stationnaire ont été ensemencées dans un erlen contenant 50 ml de YPG. Une fois le début de la phase exponentielle de croissance atteint (DO_{600nm} =1,2), les cultures ont été centrifugées pendant 5 min à 2500 rpm, puis le culot de cellule a été repris dans une solution contenant 100 µl d'eau ultra-pure et 200 µl de NaOH 0,1 M. La suspension cellulaire est ensuite vortexée puis incubée 5 min à température ambiante avant d'être centrifugée 2 min à 13 000 rpm. Le culot est repris dans 80 µl de tampon de Laemmli, chauffé 3 min à 95°C puis les protéines ont été dosées au Nanodrop. Les échantillons protéiques ont été conservés à -20°C en attendant leur utilisation.

D. Western-Blot

Les protéines séparées par SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF) en utilisant le système Mini- PROTEAN® Tetra Cell Systems (BioRad). Le transfert a été effectué pendant la nuit, en chambre froide (4°C), à une intensité de 85 mA. Après transfert, les sites aspécifiques de la membrane ont été saturés par une étape d'incubation dans une solution de Tris Buffer Saline (TBS) contenant 5% de lait. La membrane a ensuite été incubée pendant 24 h à 4°C, avec l'anticorps primaire de souris anti-GFP dilué au 1/5000ème dans du TBS + lait 5%. Après trois lavages de 15 min dans une solution de TBS supplémentée avec 0,1% de Tween (TBS-T), la membrane a été incubée 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) dilué au 1/10000ème dans du TBS-T + lait 5%. Une nouvelle série de trois lavages de 15 min dans une solution de TBS-T a été effectuée, puis la membrane a été lavée une dernière fois pendant 15 min dans une solution de TBS. Pour finir, la membrane a été incubée 5 min en présence du substrat de la peroxydase de raifort (Luminata Forte). Ce susbtrat chimio-luminescent, émet de la lumière en présence de l'enzyme (HRP). La lumière émise est imprimée sur un film autoradiographique (Autoradiography Film™, Genesee Scientific).

E. Dosage de la concentration en glucose

À partir d'une préculture de levure en phase stationnaire de croissance, un erlen contenant 50 ml de YPG 2% a été ensemencé à une DO_{600nm} de 0,2. La concentration en glucose est mesurée dans le milieu grâce au kit : Glucose Colorimetric Assay (GOD-POD method, Elabscience®). Brièvement, après avoir prélevé et centrifugé 1 ml de culture, 10 µl du surnageant ont été mélangés avec 500 µl de phénol et 500 µl du mix enzymatique. La solution a ensuite été vortexée vigoureusement, puis incubée à 37°C pendant 25 min dans un bain marie. L'apparition d'une coloration rose traduit la présence de glucose dans le milieu. La concentration en glucose dans le milieu est directement proportionnelle à l'intensité de la coloration, qui a été mesurée spectrophotométriquement à 505 nm.
La concentration en glucose est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$[Glucose](mM) = \frac{DO_{\text{Échantillon}} - DO_{Blanc}}{DO_{Standard} - DO_{Blanc}} \; x \; [Glucose]_{Standard} \; x \; Facteur\ de\ dilution$$

Équation 3 : Formule mathématique permettant de déterminer la concentration en glucose dans un échantillon donné. Les valeurs de DO des différents tubes ont été déterminées spectrophotométriquement à 505 nm. La concentration en glucose de la solution standard est de 5 mmol/l.

Les tubes « Blanc » et « Standard » ont été obtenus en mélangeant respectivement 10 µl d'eau distillée, ou 10 µl de la solution de L-glucose à 5 mmol/l avec les réactifs du kit.

IV. Méthodes d'infection

A. Infection des larves de *Galleria mellonella* avec *C. albicans*

À partir d'une préculture en phase stationnaire de croissance, 50 ml de YPG ont été ensemencés et cultivés pendant la nuit à 30°C sous agitation jusqu'à DO_{600nm} = 5. La culture cellulaire a ensuite été centrifugée pendant 5 min à 3000 rpm puis, les cellules ont été lavées

trois fois dans 5 ml de NaCl 0,9%. Après une nouvelle de centrifugation, les cellules ont été mises en suspension dans 1 ml de NaCl 0,9% et dénombrées à la cellule de Kovac. Les larves de *Galleria mellonella* ont été obtenues auprès de la société Sud-Est-Appats (Queige, France) qui commercialise des larves calibrées (300 mg en moyenne). Les larves de *Galleria mellonella* ont été infectées par injection de 10 µl d'une suspension cellulaire contenant 2,5 x 10^5 cellules au niveau de la troisième paire de fausses pattes arrière. Les larves infectées ont été incubées à 37°C dans le noir pendant toute la durée de l'expérience. Leur survie a été analysée quotidiennement sur une période de 7 jours. La mort de l'insecte est déterminée par l'absence de réaction à un stimulus tactile et l'incapacité de la larve à se repositionner sur ses pattes. Les résultats présentés représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, où chaque réplicat est constitué de 10 insectes sélectionnés au hasard.

B. Infection des macrophages de souris (J774) par *C. albicans*

1. Préparation des levures et des macrophages en vue de l'infection

Le processus d'infection des macrophages par *C. albicans* a été suivi sur une durée de 24h. Les temps 30 min, 4h et 24 h post-infection ont été choisis pour effectuer les mesures de survie des macrophages. Les macrophages sont maintenus en culture dans des flasques de culture cellulaire contenant de 100 à 500 ml de milieu cRPMI (milieu RPMI-1640 sans rouge phénol et supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 1 mM de pyruvate de sodium et 2 g/l de bicarbonate de sodium). La veille de l'infection, les macrophages cultivés en milieu cRPMI ont été récoltés, à l'aide d'un râteau stérile, dénombrés avec un hématimètre de Malassez et mis à adhérer. Pour cela, les puits d'une microplaque 96 puits contenant 200 µl de milieu cRPMI ont été ensemencés avec 2 x 10^5 macrophages. La plaque a ensuite été incubée pendant la nuit à 37°C dans une étuve à atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2. Pour chaque point de mesure (30 min, 4h et 24h), une plaque 96 puits a été préparée. Afin d'éliminer les variations intrinsèques à l'expérience, chaque point est représenté en quintuplât. Après l'étape d'adhésion, le milieu de culture des macrophages a été éliminé, puis ceux-ci ont été lavés avec du PBS (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na_2HPO_4 1,44 g/l, KH_2PO_4 0,24 g/l, pH 7,4) stérile. Le produit de lavage a été ensuite récupéré et un dénombrement des macrophages non adhérés a été effectué. Cette mesure permet de déterminer que la proportion de macrophages qui n'ont pas adhéré à la plaque est inférieure à 2% de la population initiale. Parallèlement, les levures issues d'une préculture dans 5 ml de YPG additionné de 5 µg/ml de Calcofluor White (CFW, Sigma), ont été collectées par centrifugation et reprises dans de l'eau stérile. Le CWF est un marqueur fluorescent se liant à la chitine composant la paroi des levures. Ce marquage a été utilisé pour suivre le devenir des levures au cours de l'infection. La concentration de la suspension a été déterminée par la mesure de la DO, puis ajustée à la concentration désirée dans du cRPMI plus 5 µg/ml de CFW en fonction du MOI (Multiplicity of Infection) voulu. Les infections ont été effectuées en mettant en co-culture, dans du cRPMI plus 5 µg/ml de CFW, les macrophages et 200 µl d'une suspension (à la concentration requise) de levures marquées au CFW. Des contrôles, macrophages non infectés, PBS seul (contrôle négatif de fluorescence) et levures seules ont été inclus dans chaque plaque.

2. Analyse de l'infection des macrophages par cytométrie en flux

Le taux de survie des macrophages au cours de la cinétique d'infection ainsi que le pourcentage de phagocytes associés aux levures ont été déterminé par une analyse de cytométrie en flux d'après les travaux de K Dementhon *et al.,* (2014). Après avoir observé au microscope à chaque point de l'expérience que les levures avaient bien été phagocytées par les macrophages, les 200 µl constituant le surnageant d'infection ont été délicatement ôtés. Les macrophages ayant adhéré ont ensuite été lavés avec 200 µl de PBS stérile. Les phagocytes étant des cellules extrêmement sensibles aux variations de température, le milieu de lavage a préalablement été chauffé à 37°C. Les macrophages ont ensuite été détachés de la plaque en appliquant un traitement enzymatique avec 50 µl de trypsine-PBS (Trypsine 0,5 g/l (Sigma), NaHCO3 0,58 g/l, NaCl 8 g/l, KCl 0,4 g/l, Glucose 1 g/l, EDTA 0,2 g/l, PBS) pendant 20 min à 37°C, puis ont été placés à 4°C pendant 20 min. L'ajout de 150 µl de milieu d'infection (cRPMI) préalablement porté à 37°C a permis de mettre fin à l'activité de la trypsine. Les macrophages en suspension ont ensuite été marqués à l'aide de différents fluorochromes : 0,2 µM de calcéine-AM (AcetoxyMethyl ester, Sigma) (excitation / émission : 485 / 520 nm) et 0,2 µg/ml d'anticorps anti-CD16-APC (AlloPhycoCyanine, Beckman Coulter) anti-souris (excitation / émission : 600 / 630 nm). Le marquage à la calcéine permet de discriminer les cellules vivantes des cellules mortes, tandis que les anticorps anti-CD16-APC se fixent sur une protéine présente dans la membrane des macrophages. Ce double marquage permet donc de détecter, au sein d'une population de phagocytes : les macrophages vivants. Afin de déterminer le bruit de fond des différents fluorochromes, les puits contenant les levures seules ont été traités à la calcéine et avec les anticorps anti CD16-APC, tandis que les puits contenant les macrophages seuls ont été traités au CFW. Le taux de survie des macrophages aux différents temps de la cinétique a été mesuré à l'aide du cytomètre de flux FACS CantoII (Becton Dickinson) équipé de filtres permettant la mesure de la fluorescence du CFW, de la calcéine et de l'APC. Un volume constant de 60 µl a été analysé par l'appareil à une vitesse de 2 µl/s. Chaque population est séparée et identifiée selon sa fluorescence et les données obtenues ont été analysées en utilisant le logiciel FACS Diva (Becton Dickinson).

3. Analyse de l'internalisation des levures par fluorimétrie

L'internalisation des levures au cours du processus de phagocytose, a été suivie par fluorimétrie, selon le modèle développé par Karine Dementhon *et al*., (2014). Des levures marquées au CFW ont été mises au contact des macrophages à un ratio 3 :1 ou 5 :1 dans les puits d'une microplaque 96 puits. La proportion de levures internalisées par les macrophages au cours du processus infectieux a été déterminée 30 min, 4h et 24 h post infection. À chaque temps, la plaque a été centrifugée pendant 5 min à 2200 g, et les puits ont été délicatement lavés avec 200 µl de PBS. Du bleu trypan a été ajouté dans les puits pour éteindre la fluorescence du CFW. On parle alors de « Quenching ». Ce colorant n'étant pas en mesure de franchir la membrane plasmique des cellules viables, seules les levures n'ayant pas été internalisées seront soumises à l'action du bleu trypan. Ainsi, les levures phagocytées par les macrophages continueront à émettre un signal fluorescent correspondant au CFW. Pour chaque puits, la valeur de fluorescence obtenue après quenching au bleu trypan a été comparée à la fluorescence totale avant quenching, ce qui permet de déterminer la quantité relative de levures internalisées au cours du temps. Des contrôles macrophages seuls et levures seules ont été ajoutés à l'expérience pour évaluer la fluorescence résiduelle non

imputable aux levures et l'efficacité du quenching au bleu trypan respectivement. Les valeurs de fluorescence ont été obtenues grâce au fluorimètre FluoStar Optima (BMG Labtech) et les résultats sont exprimés en unité arbitraire de fluorescence (UAF). Pour suivre la multiplication de la biomasse fongique au cours de l'infection, la fluorescence CFW totale aux temps 4h et 24 h a été comparée à la fluorescence initiale à 30 min. Un facteur de multiplication de la biomasse a ainsi pu être calculé.

4. Extraction des levures internalisées

$3x10^7$ macrophages cultivés dans un milieu cRPMI contenant 0,2% de glycérol, ont été infectés avec $1,5x10^8$ levures (MOI 1 :5) selon la méthode précédemment décrite (Dementhon *et al.,* 2014). Après 30 minutes de phagocytose, les macrophages ont été collectés à l'aide d'un râteau et resuspendus dans 10 ml d'eau froide. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 min à 4500 g et à 4°C, puis le culot a été repris dans 30 ml de tampon de lyse des macrophages froid (0,2% Triton 100X, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA). Une série de 6 broyages de 30 sec a été effectuée à l'aide d'un vortex. Entre chaque broyage, une période de repos de 5 min, pendant laquelle les cellules étaient incubées sur la glace, a été observée. La lyse des macrophages a été contrôlée par le biais d'une observation au microscope. Un comptage sur cellule de Malassez ou CovaSlide a été fait pour quantifier le nombre de levures internalisées ayant été libérées. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée pendant 10 min à 4500g et à 4°C, puis le culot a été repris dans 1 ml d'eau froide. La chromatine des macrophages, libérée au cours de l'étape de lyse, forme un réseau dense de fibre pouvant piéger les levures et réduire la biomasse récupérée. Une étape de traitement à la DNAse Ambion a donc été ajoutée afin de dégrader l'ADN des macrophages. Le lysat a ensuite été centrifugé 5 min à 7000 g à 4°C, puis le culot a été lavé une nouvelle fois dans 1 ml d'eau froide. Le culot contenant les levures a ensuite été collecté, puis stocké à -80 °C jusqu'à l'extraction des ARNs. Un contrôle « levure seule » a été ajouté à l'expérience. Les levures ont été cultivées pendant 24 h dans 5 ml de milieu YPG 2%, puis diluées dans 10 ml de milieu cRPMI contenant 0,2% de glycérol, de façon à obtenir une solution ayant une concentration de $5x10^7$ levures/ml. Après 30 min d'incubation dans ce milieu, les levures ont été collectées, puis lavées avec 10 ml d'eau froide. Le culot de cellules a été placé à -80 °C jusqu'à extraction des ARNs.

V. Méthodes cellulaires : la microscopie à fluorescence

Les souches de *C. albicans CaHXK2::GFP* et *CaGLK1::GFP* exprimant les protéines CaHxk2 et CaGlk1 fusionnées en C-ter avec un tag GFP ont été cultivées jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (DO600nm = 0,8) dans un milieu YP liquide contenant des concentrations variables en glucose (0,05, 0,1 ou 2%) ou du lactate 2%. Les noyaux ont été marqués en ajoutant au milieu de culture 10 µg/ml de DAPI. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 60 min à 28°C avec une agitation de 180 rpm. Après une étape de centrifugation, les cellules ont été lavées deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS) (10 mM Na_2HPO_4, 1,76 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl et 2,7 mM de KCl), puis le culot a été re-suspendu dans 20 µl de PBS. Les marquages GFP et DAPI ont été détectés dans les cellules vivantes en utilisant le microscope à fluorescence Zeiss Axioskop 2 Plus. Les images ont été capturées à l'aide d'une caméra Zeiss AxioCam MR et du logiciel Axio Vision. La luminosité et le contraste des clichés ont été retouchés à l'aide du logiciel LiveQuartz Images Editor™.

VI. Protocoles d'adhésion et d'évaluation de la biomasse du biofilm

À partir d'une préculture en phase stationnaire de croissance, dans 2 ml de milieu riche contenant 2% de glucose, de fructose, de glycérol ou de galactose, les cellules ont été diluées dans du PBS 1X stérile de façon à obtenir une concentration de 10^7 cellules/ml.
Dans les puits d'une plaque 96 puits, 100 µl de cellules ont été déposés. La plaque a ensuite été placée pendant 90 min à 37°C sans agitation. Cette étape permet aux cellules d'adhérer au fond des puits de la microplaque. Après cette période d'incubation, les cellules ont été délicatement lavées deux fois avec 200 µl de PBS stérile, afin d'éliminer les cellules n'ayant pas adhéré.

- Pour mesurer l'adhésion initiale

100 µl d'une solution de Crystal Violet à 1% ont été ajoutés dans les puits de la plaque, qui a ensuite été incubée pendant 20 min à 37°C. Les cellules ont été précautionneusement lavées avec 200 µl de PBS stérile. Cette étape de lavage a été répétée trois fois, puis 200 µl d'éthanol 95% ont été ajoutés dans les puits de la plaque de façon à solubiliser le Crystal Violet retenu dans les cellules. Après une période d'incubation de 15 min à température ambiante, l'absorbance dans chaque puit a été mesurée à 595 nm. Pour chaque souche, la valeur d'absorbance obtenue a été comparée à celle de la souche sauvage (SC5314) dont le taux d'adhésion a été fixée à 100%.

- Pour mesurer la biomasse du biofilm

La biomasse du biofilm a été évaluée à 24, 48 et 72 h. Pour chaque temps, une microplaque différente a été utilisée. Dans les puits de chaque plaque, 100 µl de cellules ont été placés en condition d'adhésion comme précedemment décrit. Après l'étape de lavage au PBS, les cellules ont été recouvertent avec 100 µl de milieu YPG 2%. Les plaques ont ensuite été incubées jusqu'à 72h à 37°C sans agitation, pour permettre la formation du biofilm. Afin d'éviter l'évaporation du milieu de culture, celui-ci a été délicatement changé toutes les 24 h. La biomasse du biofilm a été mesurée aux différents temps par le biais d'un test au Crystal Violet en suivant le même protocole que celui décrit ci-dessus.

Souches	Caractéristiques	Souche parent	Génotype	Origine
WT SC5314	Souche sauvage de référence		Souche sauvage	Isolat clinique (Fonzi *et al.,* 1993)
Camig1Δ/Δ	Souche délétée du gène *MIG1*	*RM1000*	*mig1 :: hisG-CaURA3-hisG/mig1::CaHIS1*	Zaragoza *et al.,* 2000
Cahxk2Δ/Δ	Souche délétée du gène *HXK2*	*SC5314*	*Δhxk2::FTR/ Δhxk2 ::FRT*	Ce travail
Cahxk2Δ/Δc/c	Souche complémentée pour les deux allèles avec le gène *HXK2* sauvage	*Cahxk2Δ/Δ*	*HXK2::FRT/ HXK2::FRT*	Ce travail
Caglk1Δ/Δ	Souche délétée du gène *GLK1*	*SC5314*	*Δglk1::FRT/ Δglk1::FRT*	Ce travail
Caglk1hxk2Δ/Δ	Souche délétée des gènes *HXK2* et *GLK1*	*Cahxk2Δ/Δ*	*Δglk1::FRT/ Δglk1::FRT Δhxk2::FRT/ Δhxk2::FRT*	Ce travail
Caglk1glk4Δ/Δ	Souche délétée des gènes *GLK1* et *GLK4*	*Caglk1Δ/Δ*	*Δglk1::FRT/ Δglk1::FRT Δglk4::FRT/ Δglk4::FRT*	Ce travail
Caglk1glk4hxk2Δ/Δ	Souche délétée des gènes *HXK2*, *GLK1* et *GLK4*	*Caglk1glk4Δ/Δ*	*Δglk1::FRT/ Δglk1::FRT Δglk4::FRT/ Δglk4::FRT Δhxk2::FRT/ Δhxk2::FRT*	Ce travail
CaHXK2-GFP	Souche portant un tag GFP en fusion C-terminale avec le gène *HXK2*	*SC5314*	*HXK2/HXK2::GFP-NAT1*	Ce travail
CaGLK1-GFP	Souche portant un tag GFP en fusion C-terminale avec le gène *GLK1*	*SC5314*	*GLK1/GLK1::GFP-NAT1*	Ce travail
CaGLK4-GFP	Souche portant un tag GFP en fusion C-terminale avec le gène *GLK4*	*SC5314*	*GLK4/GLK4::GFP-NAT1*	Ce travail
CaHXK2D210A	Souche complémentée pour les deux allèles avec le gène *HXK2* muté sur le site catalytique.	*Cahxk2Δ/Δ*	*HXK2D210A::FRT/ HXK2D210A::FRT*	Ce travail
CaHXK2T15A	Souche complémentée pour les deux allèles avec le gène *HXK2* muté sur la Thréonine 15	*Cahxk2Δ/Δ*	*HXK2T15A::FRT/ HXK2T15A::FRT*	Ce travail
CaHXK2ΔK6F16	Souche complémentée pour les deux allèles avec le gène *HXK2* délété du décapeptide K6F16 en N-term	*Cahxk2Δ/Δ*	*HXK2ΔK6F16::FRT/ HXK2ΔK6F16::FRT*	Ce travail
CaHXK2D210A-GFP	Souche portant un tag GFP en fusion C-terminale avec le gène *HXK2D210A*	*Cahxk2Δ/Δ::HXK2D210A/ HXK2D210A*	*HXK2D210::FRT/HXK2D210A::FRT::GFP-NAT1*	Ce travail
CaHXK2T15A-GFP	Souche portant un tag GFP en fusion C-terminale avec le gène *HXK2T15A*	*Cahxk2Δ/Δ::HXK2T15A/ HXK2T15A*	*HXK2T15A::FRT/HXK2T15AA::FRT::GFP-NAT1*	Ce travail
CaHXK2K6F16-GFP	Souche portant un tag GFP en fusion C-terminale avec le gène *HXK2ΔL6P15*	*Cahxk2Δ/Δ::HXK2ΔK6F16 /HXK2ΔK6F16*	*HXK2ΔK6F16::FRT/HXK2ΔK6F16::FRT::GFP-NAT1*	Ce travail

Tableau 6 : Liste des souches utilisées et construites au cours de ce travail.

Nom	Usage	Séquence 5'->3'
p1 (F)	Délétion *CaHXK2*	ATTCGAGCTCGGTACCCGGgctggccccatgggaataacc
p2 (R)	Délétion *CaHXK2*	GAGGGGGGGCCCGGTAaccgagatgcaccattgtaag
p3 (F)	Délétion *CaHXK2*	GTACCGGGCCCCCCCTCGA
p4 (R)	Délétion *CaHXK2*	GGCCGCTCTAGAACTAGTGGATC
p5 (F)	Délétion *CaHXK2*	GATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCcgttggtttgttgggtgctt
p6 (R)	Délétion *CaHXK2*	CGACTCTAGAGGATCCCCGGGcagcggtttgagaatcacttc
p42 (F)	Complémentation *CaHXK2*	CAGTGCCAAGCTTGCATGCggccccatgggaataacctg
p43 (R)	Complémentation *CaHXK2*	GGGATCCTCTAGAGTCGACgggacatcagtggtgtgtg
p44 (F)	Complémentation *CaHXK2*	CCACTGATGTCCCCGTCGACCttacaatggtgcatctcggt
p45 (R)	Complémentation *CaHXK2*	TTCGAGCTCGGTACCCGGGcagcgttgagaatcacttcatc
p75 (F)	Délétion *CaGLK1*	AGACTGCTTTCCCAAAACTTCTTTTATTGTTTGTTCATTTA AGTTAAACTTTAAACTCTATTAATATCTATATTTCTCCATC ATC gtaccgggccccccctcga
p76 (R)	Délétion *CaGLK1*	TGCGGTACTGGCACACAATGCTGCACCAACGCCTGACCC ATCTTTGGCGATCTTCAAATGAATCTTTTTATTGGTGCCCT TCAAAGggccgctctagaactagtggat
p79 (F)	*GLK1* 5'region (spécifique)	CAAAACTGTGTTATTGTTTCAG
p80 (F)	*GLK4* 5'region (spécifique)	CTATATTTCCCAGGCAAACC
p82 (R)	*GLK1/GLK4* séquence codante	CATAGGTTGGAATCATAGGC
p84 (F)	Tag GFP *CaHXK2*	GGTAGTGGTGTTGGTGCTGCCGTTATTGCTGCTTTGACC GAAAAGAGATTAAAAGAAGGTAAATCCGTTGGTTTGTTG GGTGCTggtggtggttctaaaggtgaagaattatt
p85 (R)	Tag GFP *CaHXK2*	ATTTTTGTCAAAACTGTCATGATACACATTACAAAACATA AAACATATCTAAACTAAAACCCAGAGTTTAAACATTGTAC TTTTTcgttagtatcgaatcgacagc
p88 (F)	Tag GFP *CaGLK1*	CTTTGAAGGGCACCAATAAAAAGATTCATTTGAAGATCG CCAAAGATGGGTCAGGCGTTGGTGCAGCATTGTGTGCC AGTACCGCAggtggtggttctaaaggtgaagaattatt
p89 (R)	Tag GFP *CaGLK1*	GGTTATAATAGTCTGTATAATATTCGTATATTCAAAACTA CTTTGGTCAACAATTGTAGAAATATTTGAAACCAACAcgtt agtatcgaatcgacagc
p100 (F)	Délétion *CaGLK4*	AATCCCTGTGGATTTGATGAAAGCAGAAAAGTCCAATGA TTTATTTGGTTTTTTGGCAAAGAAAGTCCAATCTTTCTTAC Tgtaccgggccccccctcga
p101 (R)	Délétion *CaGLK4*	TCCTGTACCAAAAATACAACCAATGATTGTGTTTCTGTTT GTCTTTGCTGAGTCATTGGAGTAAGCAGCAGTAAGCAAA Gggccgctctagaactagtggat

p159 (F)	Mutagénèse dirigée : remplacement D210A dans *CaHXK2*	GTTGATCAACGCAACCACAGGTACATTAGTTGCTTCTATG
p160 (R)	Mutagénèse dirigée : remplacement D210A dans *CaHXK2*	TACCTGTGGTTGCGTTGATCAACGCAACAACATCAATTGG
p161 (F)	Mutagénèse dirigée : remplacement T15A dans *CaHXK2*	GAAAGGGAGCATTCACTGATGTTTCTCCTCAATTATTAGAAGC
p162 (R)	Mutagénèse dirigée : remplacement T15A dans *CaHXK2*	CATCAGTGAATGCTCCCTTTCTTTTTTGAGCTGGTTTTGG
p163 (F)	Mutagénèse dirigée : Délétion K6F16 dans *CaHXK2*	CATCTCGGTCCAACTGATGTTTCTCCTCAATTATTAGAAGC
p164 (R)	Mutagénèse dirigée : Délétion K6F16 dans *CaHXK2*	GAAACATCAGTTGGACCGAGATGCACCATTGTAAG

Tableau 7 : Liste des primers utilisés dans ce travail pour construire les souches mutantes ou complémentées de C. albicans.

Plasmide	Caractéristiques	Origine
pSFS2A	pBCSK+ portant le module *SAT1-flipper*	Reuß *et al.,* 2004
pGFP-NAT1	pCR2.1 portant une cassette permettant d'étiqueter les protéines en C-terminal avec la GFP et le marqueur de résistance *NAT1*	Milne *et al.,* 2011
pCaPC1	pUC18 portant la cassette de délétion du gène *CaHXK2*	Ce travail
pUCHXK2	pUC18 contenant la séquence codante + 500 pb en amont et en aval du gène *CaHXK2*	Ce travail
pCaHXK2	pCaPC1 contenant en plus la région génomique *CaHXK2*	Ce travail

Tableau 8 : Liste des plasmides utilisés dans cette étude.

Nom	Usage	Séquence 5'->3'
pACT1 (F)	Amplification *CaACT1*	ATTGTTTCCAACTGGGACGAT
pACT1 (R)	Amplification *CaACT1*	GATGTTCTTCTGGAGCAACTCT
pGLK1 (F)	Amplification *CaGLK1*	TTACTGCTGCTTACTCCAATGACT
pGLK1 (R)	Amplification *CaGLK1*	TTATCCAGCTTCTCAAAACCGTA
pHXK2 (F)	Amplification *CaHXK2*	TTATCCAGCTTCTCAAAACCGTA
pHXK2 (R)	Amplification *CaHXK2*	AATTGACCAGCCTTTAGTCCA
pICL1 (F)	Amplification *CaICL1*	CTACTTTATCATTGGTGCCACTAACCC
pICL1(R)	Amplification *CaICL1*	AGACTCAATGGCAGCTAATTCGTTACC
pPCK1(F)	Amplification *CaPCK1*	GGTCCAAAAGTTGTCTCTTAATACCG
pPCK1(R)	Amplification *CaPCK1*	GCACCAGTAGATGAGATAGTAGTACC
pHGT7 (F)	Amplification *CaHGT7*	ATACTGGTACTATTTCCGG
pHGT7 (R)	Amplification *CaHGT7*	TGGACAAGAATAATGCACCAA
pHGT8 (F)	Amplification *CaHGT8*	CCACCATTTTCAAGTCTGTCGG
pHGT8 (R)	Amplification *CaHGT8*	ATACCAACAAAAGTGGACGCAAA
pHXT10 (F)	Amplification *CaHXT10*	TGGCACCTTCAACAACCAT
pHXT10(R)	Amplification *CaHXT10*	TAGAGCGAAACAAGACTCCC
pHGT12(F)	Amplification *CaHGT12*	GGTACTCAATTCTTCAAGCGTTC
pHGT12(R)	Amplification *CaHGT12*	GACGCCATAACAACACTACCG

Tableau 9 : Liste des primers utilisés dans les analyses de qPCR.

Nom	Usage	Séquence 5'->3'
pHGT3 (F)	Amplification *CaHGT3*	TTCTTCAAAAATCATGGGGG
pHGT3 (R)	Amplification *CaHGT3*	AAGATGATCATGCTATGAGTG
pHGT4 (F)	Amplification *CaHGT4*	GTTCCGTTATATCAAGCTGAAGTGTC
pHGT4 (R)	Amplification *CaHGT4*	GAAACTAAAAGTCCGGCAGTTATACTCC
pHGT9 (F)	Amplification *CaHGT9*	TGATTGTCACCTGTTCCACC
pHGT9 (R)	Amplification *CaHGT9*	CTGAAATAAGAGGAGCTAACACT
pHXT10 (F)	Amplification *CaHTX10*	TGGCACCTTCAACAACCAT
pHXT10(R)	Amplification *CaHXT10*	TAGAGCGAAACAAGACTCCC
pHGT12(F)	Amplification *CaHGT12*	GGTACTCAATTCTTCAAGCGTTC
pHGT12(R)	Amplification *CHGT12*	GACGCCATAACAACACTACCG
pHGT17 (F)	Amplification *CaHGT17*	AAGAACGAATACCCAAGGGG
pHGT17 (R)	Amplification *CaHGT17*	GGTGTTGATTTAAGTGGATCGAA
pHGT19 (F)	Amplification *CaHGT19*	TACCAAAACTCTTGTGGGGC
pHGT19 (R)	Amplification *CaHGT19*	TACACCAAAACACGTTAGAGG
pHXK2 (F)	Amplification *CaHXK2*	TTATCCAGCTTCTCAAAACCGTA
pHXK2(R)	Amplification *CaHXK2*	AATTGACCAGCCTTTAGTCCA
pGLK1(F)	Amplification *CaGLK1*	TTACTGCTGCTTACTCCAATGACT
pGLK1(R)	Amplification *CaGLK1*	TTATCCAGCTTCTCAAAACCGTA
pPFK1 (F)	Amplification *CaPKF1*	TCTGCTGGTTTAAATGCTGCCACTC
pPFK1 (R)	Amplification *CaPKF1*	TTCTGAACCACCAAGACTATGCCATC
pPDC12 (F)	Amplification *CaPDC12*	GCTTTAAATGGAATAGCAGGT
pPDC12 (R)	Amplification *CaPDC12*	ATTCCCTAAAGTATGGTGCAA
pPDX1 (F)	Amplification *CaPDX1*	TAATATTTCCAACGAAGATGCCT

pPDX1 (R)	Amplification *CaPDX1*	ACCTGTATCAATCTTTCCGAG
pCTF1 (F)	Amplification *CaCTF1*	CATTGCCTTTGGAAGACCCGTTG
pCTF1 (R)	Amplification *CaCTF1*	AATACCCGTGATTTCAGCAAGTTTGAC
pFAT1 (F)	Amplification *CaFAT1*	CATTGATGAACTTGCCTTGTTTGATCG
pFAT1 (R)	Amplification *CaFAT1*	CACAAGCAGAAGAATCGGTATCTTGAG
pPXA1 (F)	Amplification *CaPXA1*	TGGTTACGCTGATATCCAA
pPXA1 (R)	Amplification *CaPXA1*	GTGCATATTCTGATCCTTCG
pPXA2 (F)	Amplification *CaPXA2*	ACTTTGGATTTGATATTATGTGC
pPXA2 (R)	Amplification *CaPXA2*	TAGTTGAGAAATGAGCCAACA
pACB1 (F)	Amplification *CaACB1*	AAAAGCTAATCAAGTTTC
pACB1 (R)	Amplification *CaACB1*	TTATTATCACCAACAGTAG
pFAA4 (F)	Amplification *CaFAA4*	TGCGACCAACCGATTCTAAAGCC
pFAA4 (R)	Amplification *CaFAA4*	CAATGACATCTTTCAAATCACGCCAAG
pFAA2-1 (F)	Amplification *CaFAA2-1*	GGATATTCCGCTCATGACA
pFAA2-1 (R)	Amplification *CaFAA2-1*	CATCTTCATCAACCGCTTT
pFAA2-2 (F)	Amplification *CaFAA2-2*	CTTTTGGAGCATACACGTT
pFAA2-2 (R)	Amplification *CaFAA2-2*	TATGAGTATCGCTGTCAGTC
pFAA2-3 (F)	Amplification *CaFAA2-3*	TTTATGGCGAACGTACCAAG
pFAA2-3 (R)	Amplification *CaFAA2-3*	GCGTTTAGTTTCAATGGCTC
pFOX3 (F)	Amplification *CaFOX3*	TACCTTATTCAGTTCCATTTGTTGCCC
pFOX3 (R)	Amplification *CaFOX3*	CCAGCTAAACCACATTCAATTTCACCAG
pICL1 (F)	Amplification *CaICL1*	GACCCCATACATTGACTTCTTGAGACC
pICL1 (R)	Amplification *CaICL1*	CTTCAATATGGATACCAGCAGCACCTC
pPCK1 (F)	Amplification *CaPCK1*	GGTCCAAAAGTTGTCTCTTAATACCG
pPCK1 (R)	Amplification *CaPCK1*	GCACCAGTAGATGAGATAGTAGTACC
pALS3 (F)	Amplification *CaALS3*	TGTGGCTACTACCAGAACAGTTACAGA
pALS3 (R)	Amplification *CaALS3*	AATTGTCTTAGTTTTGTCGCGGTTAGG
pHWP1 (F)	Amplification *CaHWP1*	CAACTGCTCAACTTATTGCTATCGC
pHWP1 (R)	Amplification *CaHWP1*	TTCCTCTGTTTCACCTTGACCGTCTAC

Tableau 10 : Liste des primers utilisés dans l'étude de transcriptomique ciblée de ddPCR.

Communications

Les résultats obtenus durant ces trois années de thèse ont fait l'objet de présentations lors de congrès nationaux et internationaux, que ce soit sous la forme de communication orale ou affichée par le biais de poster.

- LAURIAN R., DEMENTHON K., COTTON P. (12 Décembre 2017) 18ème rencontre G-REEMI Lyon (Groupe Régional de Recherche en Microbiologie des Interactions). Lyon, France. "Insight into the essential role of hexokinase and glucokinase in fitness and virulence of the pathogenic yeast *Candida albicans."* (**Oral** Communication LAURIAN R.).

- LAURIAN R., DEMENTHON K., COTTON P. (1-3 Octobre 2018) 14ème Congrès de la société Française de Microbiologie. Cité des sciences et de l'industrie, La Villette, France. "Hexokinases and glucokinases are essential for virulence and fitness in the pathogenic yeast *Candida albicans."* (**Poster**).

- LAURIAN R., DEMENTHON K., DOUMECHE B., RAVENT J., COTTON P. (18-22 Aout 2019) 29th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB) Götebord, Suede. "Hexokinases and glucokinases are essential for virulence and fitness in the pathogenic yeast *Candida albicans."* **(Oral** Communication LAURIAN R.).

Au cours de ma thèse j'ai également été invité à présenter mes travaux de recherche aux membres de l'Unité Mixte de Recherche 5557 : Laboratoire d'Écologie Microbienne.

- LAURIAN R., DEMENTHON K., COTTON P. (15 Juin 2018) Journée de rencontre entre le laboratoire d'écologie microbienne (LEM UMR5557) et le laboratoire de microbiologie adaptation et pathogénie (MAP UMR5240). Lyon, France. "Insight into the essential role of hexokinase and glucokinases in fitness and virulence of pathogenic yeast *Candida albicans."* (**Oral** Communication Laurian R.).

Un poster a également été présenté au cours de l'évènement « Décrypthèse 2018 » organisé par l'école doctorale : ED 341 « Évolution Écosystème Microbiologie et Modélisation » (E2M2).

- LAURIAN R., DEMENTHON K., COTTON P. (2 Mai 2018) Journée de rencontre des doctorants « Décrypthèse ». Lyon, France. "Insight into the essential role of hexokinase and glucokinases in fitness and virulence of the pathogenic yeast *Candida albicans*." (**Poster**, 1er prix).

Les résultats du projet ddPCR ont été présentés par le biais d'un poster lors de l'assemblée générale de la Fr BioEnviS

- LAURIAN R., JACOT DES COMBES C., BASTIAN F., DEMENTHON K., COTTON P. (24 Janvier 2019) Journée de la FR Bio environnement santé (BioenviS, Université Lyon 1) Lyon, France. "Expression des gènes du métabolisme carboné au cours de la phagocytose de la levure pathogène *Candida albicans* par les macrophages." (**Poster**).

Poster présenté à l'occasion du 14ème congrès de la SFM, Paris, France (2018) et de la 29ème édition du congrès ICYGMB, Göteborg, Suède (2019)

Hexokinase and Glucokinases are essential for virulence and fitness in the pathogenic yeast *Candida albicans*

Romain Laurian[1], Karine Dementhon[2], Pascale Cotton[1]

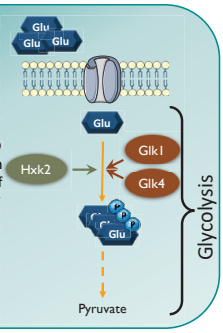
[1]Génétique Moléculaire des Levures, UMR-CNRS-5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénie. Université Lyon 1, Villeurbanne, France

[2]Candida et Pathogénicité, UMR-CNRS-5234 Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité. Université de Bordeaux, Bordeaux, France

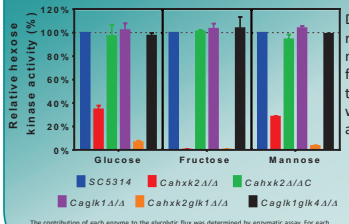
Contacts:
Romain.laurian@etu.univ-lyon1.fr
Karine.dementhon@u-bordeaux.fr
Pascale.cotton@univ-lyon1.fr

Introduction

Candida albicans exists as a relatively harmless commensal yeast ir the oral, gastrointestinal and urogenital microflora of 40-80% of the population. However, when host defences decrease, *C. albicans* switch from commensal to pathogenic behaviour and trigger ar infection. *C. albicans* can thrive in the blood-stream, ultimately colonizing and forming lesions in internal organs. To cause infection and grow in theses diverse niches, cells must assimilate locally available carbon sources, including hexoses and complex carbon sources. Among them, glucose is preferentially used by most of microorganisms to sustain growth and metabolism. Our work was focused on glucose assimilation by *C. albicans*, and particularly or the first step of glycolysis. We identified 1 hexokinase CaHxk2 and 2 glucokinases CaGlk1 and CaGlk4 and evaluated the contribution of these enzymes to the physiology and virulence. A set of gene deletion strains was constructed: *Cahxk2Δ/Δ, Cahxk2Δ/Δc/c Caglk1Δ/Δ, Cahxk2glk1Δ/Δ, Caglk1glk4Δ/Δ*



Hexose phosphorylation principally occurs through the activity of hexokinase 2



The contribution of each enzyme to the glycolytic flux was determined by enzymatic assay. For each strain the amount of glucose-6-phosphate produced was measured and expressed as a percentage as compared to the wild type strain.

Deletion of *CaHXK2* drastically reduced the level of glucose and mannose phosphorylation, while fructose phosphorylation was totally abolished. Glucokinases weakly contribute to hexose activation.

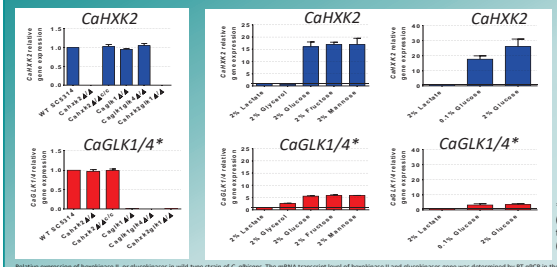
Glucose affinity

Hexokinase II = 104,87 µM
Glucokinase I = 84,86 µM
Glucokinase IV = **3900 µM**

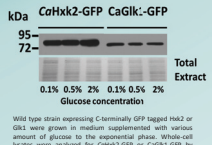
Hexokinase and glucokinases are not expressed in parallel

❖ Does cross regulation mechanisms exist ?

❖ Is hexose kinase gene expression regulated by carbon source ?



Relative expression of hexokinase II or glucokinases in wild type strain of *C. albicans*. The mRNA transcript level of hexokinase II and glucokinases gene was determined by RT-qPCR in the wild-type strain. Expression levels were normalized to *CaACT1* transcript level. The means of the relative-expression data from three biological replicates with standard deviation (error bars) are represented.

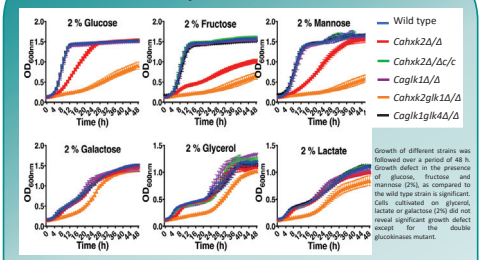


Wild type strain expressing C-terminally GFP tagged Hxk2 or Glk1 were grown in medium supplemented with various amount of glucose to the exponential phase. Whole-cell lysates were analyzed for *CaHxk2*-GFP or CaGlk1-GFP by Western blotting.

* Due to the very high sequence homology (98%) the transcription level corresponds to the sum of *CaGLK1* and *CaGLK4* transcripts (*CaGLK1/4*)

There is no compensation between the expression of hexokinase and glucokinases. Hexose kinase gene transcription is induced by hexoses. The expression of *CaHXK2* is correlated to the presence of glucose in a dose dependent manner. Hexokinase II is more expressed than glucokinases(x4).

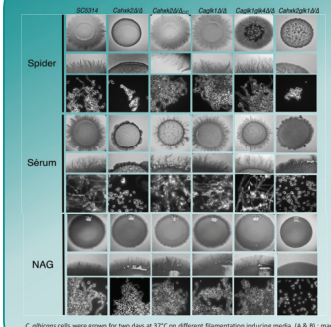
CaHXK2 is necessary to sustain proper growth in the presence of hexoses



Growth of different strains was followed over a period of 48 h. Growth defect in the presence of glucose, fructose and mannose (2%), as compared to the wild type strain is significant. Cells cultivated on glycerol, lactate or galactose (2%) did not reveal significant growth defect except for the double glucokinases mutant.

Growth of the hexokinase mutant was affected in the presence of glucose, mannose and fructose. Deletion of glucokinases did not impact the growth of *Candida albicans*. Severe growth defect was observed in the double mutant *Cahxk2glk1Δ/Δ*, regardless of the carbon source.

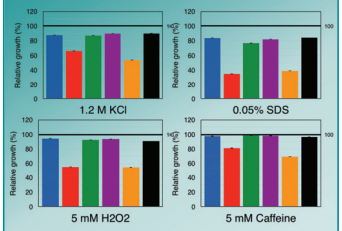
Hexokinase II mutant is hypofilamentous



C. albicans cells were grown for two days at 37°C on different filamentation inducing media. (A & B) : macroscopic aspect of colonies, (C) : Microscopic aspect of cells.

Hexose phosphorylation by CaHxk2 is necessary to filamentation

Hexokinase II deletion leads to an increased sensitivity to environmental stresses

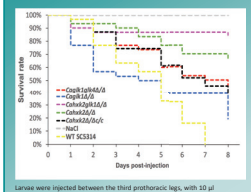


Growth of the different strains exposed to various stresses was expressed as a percentage of growth in absence of stress which was set to 100% (black line).

Hexokinase 2 enzyme mediates protection during harmful environmental challenges

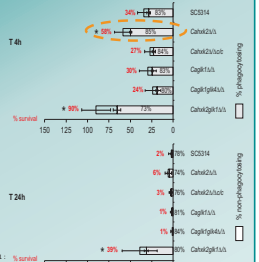
Hexokinase mutant is hypovirulent in *Galleria mellonella and macrophages* infection models

❖ *Galleria mellonella*



Larvae were injected between the third prothoracic legs, with 10 µl of cells suspension (2,5 x 10^5 cells) containing wild type strain (SC5314), the hexokinase double mutant strain (*hxk2Δ/Δ*) or the complemented strain (*hxk2Δ/Δ$_{hxk2}$*). Three replicates of 10 larvae were injected. As a control, injection of NaCl (0,9%) solution did not kill any *Galleria* over nine days. Double mutant is significantly less virulent than the wild type (P < 0.0001, log-rank test).

❖ Macrophages

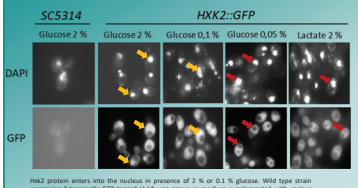


Macrophage J774 were co-cultivated with *C. albicans* strains at MOI 1 : 5 during 4 h or 24 h. After appropriate incubation time, macrophages were collected and their survey were analyzed by FACS.

The hexokinase II mutant strains (*Cahxk2Δ/Δ* and *Cahxk2glk1Δ/Δ*) were significantly less virulent than the wild type strain *SC5314* in both models. On the opposite the deletion of one or two glucokinases had no impact the virulence.

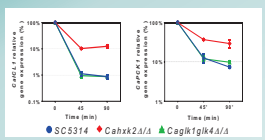
CaHxk2 is a moonlight protein which contributes to glucose repression

❖ CaHxk2::GFP localization



Hxk2 protein enters into the nucleus in presence of 2 % or 0.1 % glucose. Wild type strain expressing C-terminally GFP tagged Hxk2 was grown in medium supplemented with various amount of glucose to the exponential phase. Nuclei were stained by addition of DAPI. GFP and DAPI localization was monitored in live cells cultures.

❖ Impact of CaHxk2 deletion on glucose repression of *CaICL1* et *CaPCK1*

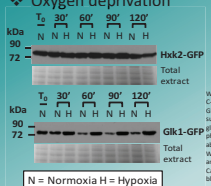


Wild type, *Cahxk2Δ/Δ* and *Caglk1glk4Δ/Δ* strains were grown on medium containing 2% lactate to mid log phase (OD_{600nm} = 1.8). Following the glucose addition, expression level of *CaICL1* and *CaPCK1* was measured by qPCR in each strain and normalized to the level of the *CaACT1* mRNA internal control. The relative levels of these mRNAs were expressed as a percentage of their abundance at time zero, which was set to 100%.

At high glucose level, CaHxk2 enters into the nucleus and participates to the glucose repression phenomenon

New roles for glucokinases & future prospects...

❖ Oxygen deprivation

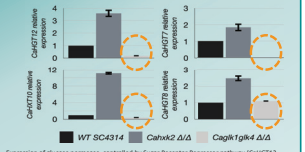


Wild type strain expressing C-terminally GFP tagged Glk1 was grown in medium supplemented with glucose to the exponential phase in presence (N) or absence of oxygen (H). Whole-cell lysates were analyzed for *Caglk1*-GFP or *Cahxk2*-GFP by Western blotting.

N = Normoxia H = Hypoxia

Glucokinase I is overexpressed under hypoxic conditions. Glucokinase could maintain the glycolytic flux during fermentation in oxygen – poor niches

❖ Expression of glucose permeases



Expression of glucose permease, controlled by Sugar Receptor Repressor pathway (*CaHGT12, CaHXT10* and *CaHGT7*) or not (*CaHGT8*) was measured by qPCR in each strain. Expression level were normalized to the expression of *CaACT1*. For each permease, the mRNA level was expressed relatively to their abundance in the wild type strain, which was set at 1.

Glucokinases seem to be involved in control expression of glucose permease in *C. albicans*

Poster présenté, au cours de l'évènement « Décrypthèse 2018 » organisé par l'école doctorale ED 341 « Évolution Écosystème Microbiologie et Modélisation » (E2M2)

Insight into the essential role of hexokinase and glucokinases in fitness and virulence of the pathogenic yeast *Candida albicans*

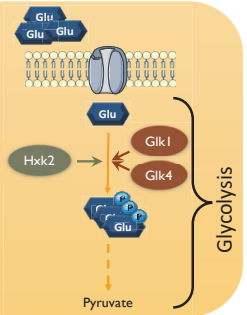
Laurian Romain, Karine Dementhon & Pascale Cotton

Génétique Moléculaire des Levures, UMR5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénie

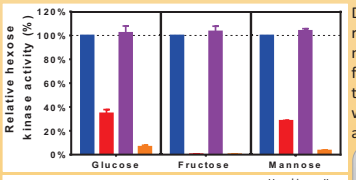
Université Lyon 1,Bât LWOFF, 10 rue Raphaël Dubois 69622 Villeurbanne cedex, France.

Introduction

Candida albicans exists as a relatively harmless commensal yeast in the oral, gastrointestinal and urogenital microflora of 40-80% of the population. However, when the host defences decrease, *C. albicans* can switch from commensal to pathogenic behaviour and trigger an infection. In immunocompromised patients, *C. albicans* can thrive in the blood-stream, ultimately colonizing and forming lesions in internal organs. Up to half of these infections are lethal. To cause infection and grow in theses diverse niches, cells must assimilate locally available carbon sources, including hexoses and complex carbon sources. Among them, glucose is preferentially used by most of microorganisms to sustain growth and metabolism. Our work were focused on glucose assimilation by *C. albicans*, and particularly on the first step of glycolysis leading to the production of glucose-6-phosphate, an essential metabolic crossroad.



Hexose phosphorylation principally occurs through the activity of hexokinase 2



The contribution of each enzyme to the glycolytic flux was determined by enzymatic assay. For each strain the amount of glucose-6-phosphate produced was measured and expressed as a percentage as compared to the wild type strain.

Deletion of *HXK2* gene drastically reduced the level of glucose and mannose phosphorylation, while fructose phosphorylation was totally abolished. Glucokinases weakly contribute to hexose activation

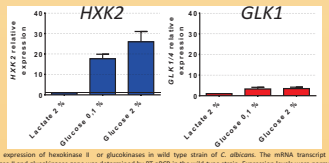
Glucose affinity

Hexokinase II = Very high

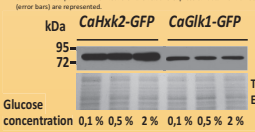
Glucokinase I = Very high

Glucokinase IV = Very low

Hexose kinase enzymes are differently regulated



Relative expression of hexokinase II or glucokinases in wild type strain of *C. albicans*. The mRNA transcript level of hexokinase II and glucokinases gene was determined by RT-qPCR in the wild-type strain. Expression levels were normalized to *CaACT1* transcript level. The means of the relative-expression data from three biological replicates with standard deviation (error bars) are represented.

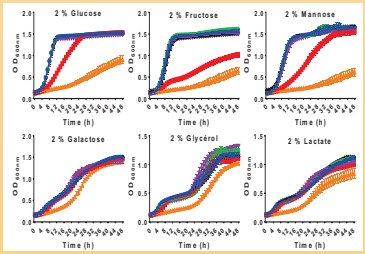


Wild type strain expressing C-terminally GFP tagged Hxk2 or Glk1 were grown in medium supplemented with various amount of glucose to the exponential phase. Whole-cell lysates were analyzed for *Ca*Hxk2-GFP or *Ca*Glk1-GFP by Western blotting.

Transcription of hexokinase and glucokinases genes is induced by glucose.

Hexokinase is more expressed than glucokinase

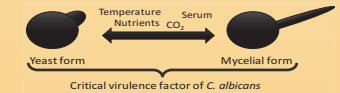
HXK2 is necessary to sustain proper growth in the presence of hexoses



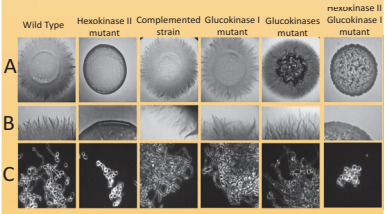
Growth of different strains was followed over a period of 48 h. Growth defect in the presence of glucose, fructose and mannose (2%), as compared to the wild type strain is significant. Cells cultivated on glycerol, lactate or galactose (2%) did not reveal significant growth defect except for the double glucokinases mutant.

Growth of the hexokinase mutant is affected in the presence of glucose, mannose and fructose. Deletion of glucokinases doesn't impact the growth of *Candida albicans*. Deletion of both glucokinase I and hexokinase II lead to a drastic growth defect in the presence of all carbon sources.

Hexokinase II mutant is hypofilamentous



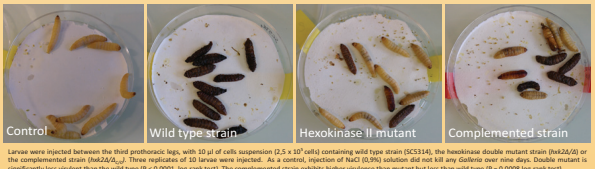
Critical virulence factor of *C. albicans*



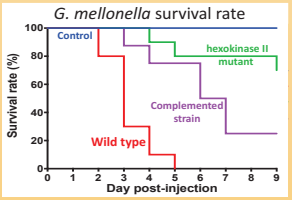
C. albicans cells were grown for two days at 37°C on spider medium inducer of filamentation. (A & B) : macroscopic aspect of colonies, (C) : Microscopic aspect of cells.

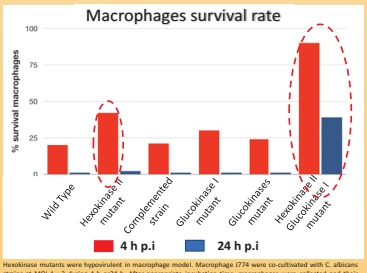
A functional glycolysis is necessary to sustain filamentous growth in *C. albicans*

Hexokinase mutant is hypovirulent in *Galleria mellonella and macrophages* infection models



Larvae were injected between the third prothoracic legs, with 10 µl of cells suspension (2,5 x 10^5 cells) containing wild type strain (SC5314), the hexokinase double mutant strain (hxk2Δ/Δ) or the complemented strain (hxk2Δ/Δ_pl). Three replicates of 10 larvae were injected. As a control, injection of NaCl (0,9%) solution did not kill any *Galleria* over nine days. Double mutant is significantly less virulent than the wild type ($P < 0.0001$, log-rank test). The complemented strain exhibits higher virulence than mutant but less than wild type ($P = 0.0008$ log-rank test).

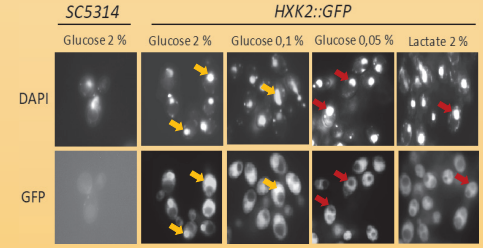




Hexokinase mutants were hypovirulent in macrophage model. Macrophage J774 were co-cultivated with *C. albicans* strains at MOI 1 : 3 during 4 h or24 h. After appropriate incubation time, macrophages were collected and their survey were analyzed by FACS.

The hexokinase II mutant *was* significantly less virulent than the wild type strain *SC5314* in both *Galleria mellonella* and macrophages models. The simultaneous deletion of Hexokinase II and Glucokinase I, drastically reduced the virulence in both models, while the deletion of one or two glucokinases does not impact the virulence of the pathogen. Injection of complemented strain cells revealed a partial restoration of virulence.

Hxk2 is a moonlight protein which enters into the nucleus

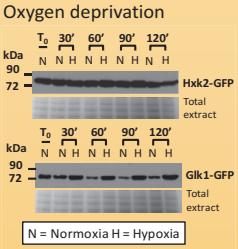


Hxk2 protein enters into the nucleus in presence of 2 % or 0.1 % glucose. Wild type strain expressing C-terminally GFP tagged Hxk2 was grown in medium supplemented with various amount of glucose to the exponential phase. Then nuclei were stained by addition of 2µg DAPI. GFP and DAPI localization was monitored in live cells cultures using a Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescence microscope. Images were taken with a Zeiss AxioCam MR camera using AxioVision software.

Nuclear localization of Hxk2 in presence of high level of glucose

New roles for glucokinases…

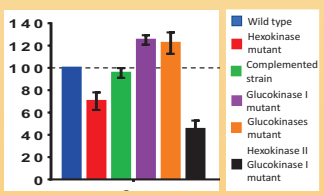
➢ Oxygen deprivation



Glucokinase I is overexpressed in presence of low oxygen level. Wild type strain expressing C-terminally GFP tagged Glk1 was grown in medium supplemented with glucose to the exponential phase in presence (N) or absence of oxygen (H). Whole-cell lysates were analyzed for *Ca*Glk1-GFP by Western blotting.

Under hypoxic condition, glucokinase I is strongly expressed compared to the control condition. Glucokinases could be important for poor oxygen rate adaptation

➢ Adhesion to abiotic surfaces



Glucokinases mutant have an increased adhesion to plastic surfaces . Adhesion were evaluated by Crystal violet assay. The means of the adhesion data from three biological replicates with standard deviation (error bars) are represented.

Deletion of glucokinases increased the adhesion of *C. albicans* cells to plastic surfaces

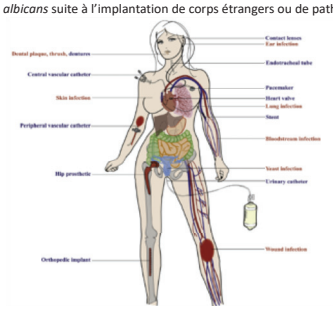
Poster présenté lors de la journée de la FrBioEnviS :

Expression des gènes du métabolisme carboné au cours des phases précoces de la phagocytose de la levure pathogène *Candida albicans* par les macrophages

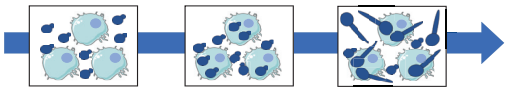
Romain Laurian[1], Cécile Jacot-des-Combes[2], Fabiola Bastian[2], Karine Dementhon[3], Pascale Cotton[1]
[1] Génétique Moléculaire des Levures, UMR CNRS 5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénies, Université Lyon1
[2] DTAMB - FR Bio-environnement et Santé, Faculté des Sciences et Technologies - Université Lyon 1
[3] Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR CNRS 5234, Université de Bordeaux

Candida albicans est une levure opportuniste appartenant à la flore commensale humaine qui peut adopter un statut pathogène invasif à l'origine d'infections systémiques chez les patients immunodéprimés ou lorsque certaines barrières de protection sont altérées.
C. albicans colonise et infecte de nombreux organes et environnements du corps humain grâce à l'expression coordonnée des facteurs de virulence (passage forme levure, forme hyphale, facteurs d'adhésion, sécrétion d'enzymes lytiques, adaptation au pH et au stress, altération de la réponse immunitaire…). Cependant, parmi les atouts de ce pathogène, la capacité à adapter son métabolisme aux sources carbonées disponibles dans les différentes niches environnementales du corps humain a retenu notre attention.

C. albicans suite à l'implantation de corps étrangers ou de pathologies.



Cinétique de phagocytose de *C. albicans* par les macrophages.



Le système immunitaire via les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles…) constitue la première ligne de défense contre contre les infections fongiques systémiques. L'interaction *C. albicans*/macrophage constitue donc un modèle incontournable.
C. albicans survit à la phagocytose dans le macrophage. La levure adopte un mode de développement filamenteux qui s'accompagne de la mort des cellules macrophagiques.
Sur le plan métabolique les approches globales portant sur la phase tardive de la phagocytose (4h) ont montré la reprogrammation du métabolisme carboné de la levure vers l'utilisation de sources de carbone alternatives. Cependant les macrophages contenant environ 10 mM de glucose, l'hypothèse que la levure puisse utiliser ce glucose dans les phases précoces de la phagocytose a été formulée.

Objectif du projet :
L'objectif général du projet est d'étudier l'impact du métabolisme carboné sur sur la virulence de *C. albicans* en suivant l'expression de gènes métaboliques clés, de régulateurs et de transporteurs ou cours de la phase précoce de la phagocytose (30 min) de la levure par les macrophages.
L'expression des gènes a été suivie par digital droplet PCR (dd-PCR) en collaboration avec le DTAMB.
Cette technique sensible, précise et reproductible permet de détecter des gènes faiblement exprimés avec une quantification absolue.

Stratégie expérimentale:

Culture des levures en YPGlycérol 2%

Incubation 30 min en présence de Macrophages (5/1) en milieu RPMI sans source carbonée

Elimination des levures non phagocytées par lavage

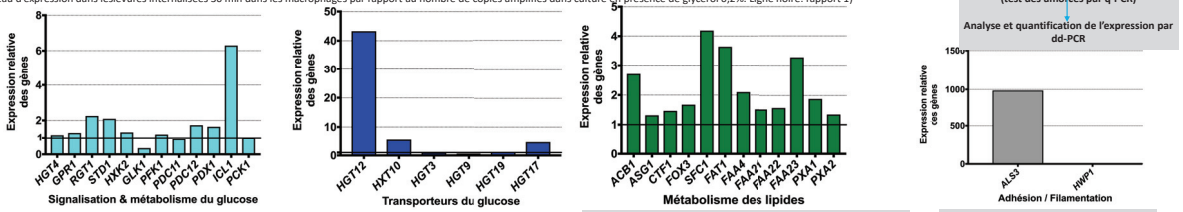
Congélation des macrophages infectés

Extraction des ARNs

Synthèse d'ADNc (test des amorces par q-PCR)

Analyse et quantification de l'expression par dd-PCR

Expression des gènes = nombre de copies amplifiées /µl de mélange réactionnel
Niveau d'expression dans leslevures internalisées 30 min dans les macrophages par rapport au nombre de copies amplifiés dans culture en présence de glycérol 0,2%. Ligne noire: rapport 1)

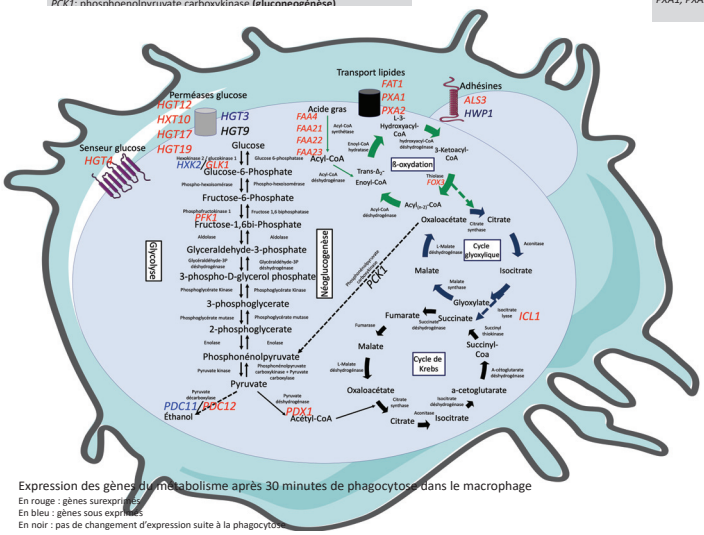


HGT4, GPR1: récepteurs **(détection du glucose)**
RGT1, STD1: répresseurs transcriptionnels **(détection du glucose)**
HXK2: hexokinase , GLK1: glucokinase, PFK1: phosphofructokinase**(glycolyse)**
PDC11, 12: pyruvate décarboxylase **(glycolyse)**
PDX1: pyruvate dehydrogenase **(respiration)**
ICL1 : isocitrate lyase **(cycle glyoxylique)**
PCK1: phosphoenolpyruvate carboxykinase **(gluconeogénèse)**

HGT12 , HXT10, HGT3, HGT9, HGT19, HGT17: **transporteurs d'hexose** de forte affinité

ACB1: acetyl-CoA binding protein
ASG1, CTF1: facteur de transciption (beta oxydation des acides gras)
FOX3 : thiolase (peroxysomes)
SCF1 : navette succinate fumarate
FAT1: transport des acides gras
FAA4, FAA22, FAA23: acetyl-CoA-synthase
PXA1, PXA2: import des acides gras
(métabolisme des lipides)

ALS3 : Adhésine (invasine) induisant l'endocytose
HWP1 : protéine spécifique de l'hyphe



Expression des gènes du métabolisme après 30 minutes de phagocytose dans le macrophage
En rouge : gènes surexprimés
En bleu : gènes sous exprimés
En noir : pas de changement d'expression suite à la phagocytose

Au stade précoce de phagocytose, les données de ddPCR traduisent principalement la surexpression des gènes du métabolisme des lipides (beta oxydation) et du cycle glyoxylique. Les voies de production d'énergie à partie de source-carbonées alternatives (lipides membranaires du macrophage, acides aminés) sont nettement surexprimées.
Par contre les gènes de la glycolyse ne sont pas ou peu surexprimés ce qui laisse penser que le glucose du macrophage soit n'est pas accessible à la levure soit a été consommé par ce dernier pour alimenter ses mécanismes de défense.
Le résultat marquant de cette étude est la sur expression des transporteurs de glucose, notamment *HGT12* (X 40), ce qui laisse penser que la levure phagocytée se prépare à un changement métabolique au sortir du macrophage.
Une étude approfondie des caractéristiques du transporteur d'hexoses Hgt12 pourrait constituer une suite à cette étude.

Références bibliographiques

Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y. S., Wang, Z., et al. (2017). Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. *Int J Mol Sci* 19. doi:10.3390/ijms19010048.

Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T., and Moreno, F. (2004). The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* 279, 14440–14446. doi: 10.1074/jbc.M31341200.

Ahuatzi, D., Riera, A., Peláez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2007). Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *J. Biol. Chem.* 282, 4485–4493. doi: 10.1074/jbc.M606854200.

Alber, T., and Kawasaki, G. (1982). Nucleotide sequence of the triose phosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 419–434.

Alblova, M., Smidova, A., Kalabova, D., Lentini Santo, D., Obsil, T., and Obsilova, V. (2019). Allosteric activation of yeast enzyme neutral trehalase by calcium and 14-3-3 protein. *Physiol Res* 68, 147–160. doi: 10.33549/physiolres.933950.

Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H., and Douglas, L. J. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell* 5, 1770–1779. doi:10.1128/EC.00219-06..

Alim, D., Sircaik, S., and Panwar, S. L. (2018). The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. *Journal of Fungi* 4, 140. doi:10.3390/jof4040140..

Alloush, H. M., López-Ribot, J. L., Masten, B. J., and Chaffin, W. L. (1997). 3-phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 143 (Pt 2), 321–330. doi:10.1099/00221287-143-2-321.

Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E., et al. (2008). the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog.* 4, e1000217. doi:10.1371/journal.ppat.1000217.

Alvarez, V., and Jiménez, J. (1998). Un papel regulator de la fosfofructokinasa 2(PFK2) en el ciclo celular de la levadura S. pombe.

Alvarez-Peral, F. J., Zaragoza, O., Pedreno, Y., and Ärguelles, J. C. (2002). Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in Candida albic... - PubMed - NCBI. *Microbiology.* 148, 2599–2606. doi:10.1099/00221287-148-8-2599.

Anderson, C. M., Stenkamp, R. E., McDonald, R. C., and Steitz, T. A. (1978a). A refined model of the sugar binding site of yeast hexokinase B. *J. Mol. Biol.* 123, 207–219. doi:10.1016/0022-2836(78)90321-2.

Anderson, C. M., Stenkamp, R. E., and Steitz, T. A. (1978b). Sequencing a protein by x-ray crystallography. II. Refinement of yeast hexokinase B co-ordinates and sequence at 2.1 A resolution. *J. Mol. Biol.* 123, 15–33. doi:10.1016/0022-2836(78)90374-1.

Anderson, C. M., Zucker, F. H., and Steitz, T. A. (1979). Space-filling models of kinase clefts and conformation changes. *Science* 204, 375–380. doi:10.1126/science.220706.

Anderson, T. M., Clay, M. C., Cioffi, A. G., Diaz, K. A., Hisao, G. S., Tuttle, M. D., et al. (2014). Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* 10, 400–406. doi:10.1038/nchembio.1496.

Angiolella, L., Facchin, M., Stringaro, A., Maras, B., Simonetti, N., and Cassone, A. (1996). Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J. Infect. Dis.* 173, 684–690. doi:10.1093/infdis/173.3.684.

Arora, K. K., Fanciulli, M., and Pedersen, P. L. (1990). Glucose phosphorylation in tumor cells. Cloning, sequencing, and overexpression in active form of a full-length cDNA encoding a mitochondrial bindable form of hexokinase. *J. Biol. Chem.* 265, 6481–6488.

Asakura, M., Okuno, T., and Takano, Y. (2006). Multiple contributions of peroxisomal metabolic function to fungal pathogenicity in Colletotrichum lagenarium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6345–6354. doi:10.1128/AEM.00988-06.

Askew, C., Sellam, A., Epp, E., Hogues, H., Mullick, A., Nantel, A., et al. (2009). Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5, e1000612. doi:10.1371/journal.ppat.1000612.

Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 42–47.

Bader, O., Krauke, Y., and Hube, B. (2008). Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, C. glabrata, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiol.* 8, 116. doi:10.1186/1471-2180-8-116.

Bagg, J., and Silverwood, R. W. (1986). Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. *J. Med. Microbiol.* 22, 165–169. doi:10.1099/00222615-22-2-165.

Bahn, Y.-S., Staab, J., and Sundstrom, P. (2003). Increased high-affinity phosphodiesterase PDE2 gene expression in germ tubes counteracts CAP1-dependent synthesis of cyclic AMP, limits hypha production and promotes virulence of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 50, 391–409.

Baillie, G. S., and Douglas, L. J. (1998). Effect of Growth Rate on Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1900–1905.

Ballou, E. R., Avelar, G. M., Childers, D. S., Mackie, J., Bain, J. M., Wagener, J., et al. (2016). Lactate signalling regulates fungal β-glucan masking and immune evasion. *Nat Microbiol* 2, 16238. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.238.

Bamford, C. V., d'Mello, A., Nobbs, A. H., Dutton, L. C., Vickerman, M. M., and Jenkinson, H. F. (2009). Streptococcus gordonii modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infect. Immun.* 77, 3696–3704. doi:10.1128/IAI.00438-09.

Bär, J., Schellenberger, W., and Kopperschläger, G. (1997). Purification and characterization of phosphofructokinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 13, 1309–1317. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199711)13:14<1309::AID-YEA181>3.0.CO;2-#.

Barelle, C. J., Priest, C. L., Maccallum, D. M., Gow, N. A. R., Odds, F. C., and Brown, A. J. P. (2006). Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell. Microbiol.* 8, 961–971. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00676.x.

Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R. G., and Ryley, J. F. (1985). A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1217–1221. doi:10.1099/00221287-131-5-1217.

Barrett-Bee, K., Newboult, L., and Pinder, P. (1991). Biochemical changes associated with the antifungal action of the triazole ICI 153,066 on *Candida albicans* and Trichophyton quinckeanum. *FEMS Microbiol. Lett.* 63, 127–131. doi:10.1016/0378-1097(91)90074-k.

Bassilana, M., Blyth, J., and Arkowitz, R. A. (2003). Cdc24, the GDP-GTP exchange factor for Cdc42, is required for invasive hyphal growth of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 2, 9–18. doi:10.1128/ec.2.1.9-18.2003.

Basson, N. J. (2000). Competition for glucose between *Candida albicans* and oral bacteria grown in mixed culture in a chemostat. *J. Med. Microbiol.* 49, 969–975. doi:10.1099/0022-1317-49-11-969.

Bastidas, R. J., and Heitman, J. (2009). Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 351–352. doi:10.1073/pnas.0811994106.

Bennett, W. S., and Steitz, T. A. (1980). Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. II. Detailed comparisons of conformation and active site configuration with the native hexokinase B monomer and dimer. *J. Mol. Biol.* 140, 211–230. doi:10.1016/0022-2836(80)90103-5.

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. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04350.x.

Berman, J., and Sudbery, P. E. (2002). Candida Albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat. Rev. Genet.* 3, 918–930. doi:10.1038/nrg948.

Bernardo, S. M. H., Gray, K.-A., Todd, R. B., Cheetham, B. F., and Katz, M. E. (2007). Characterization of regulatory non-catalytic hexokinases in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Genet. Genomics* 277, 519–532. doi:10.1007/s00438-006-0203-z.

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. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199602)12:2%3C115::AID-YEA889%3E3.0.CO;2-E.

Bianchi, M. M., Tizzani, L., Destruelle, M., Frontali, L., and Wésolowski-Louvel, M. (1996). The "petite-negative" yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. *Mol. Microbiol.* 19, 27–36.

Biswas, K., and Morschhäuser, J. (2005). The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 56, 649–669. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04576.x.

Biswas, S., Van Dijck, P., and Datta, A. (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 348–376. doi:10.1128/MMBR.00009-06.

Blankenship, J. R., and Mitchell, A. P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 588–594. doi:10.1016/j.mib.2006.10.003.

Boles, E., and Hollenberg, C. P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 21, 85–111. doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00346.x.

Bonhomme, J., Chauvel, M., Goyard, S., Roux, P., Rossignol, T., and d'Enfert, C. (2011). Contribution of the glycolytic flux and hypoxia adaptation to efficient biofilm formation by *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 80, 995–1013. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07626.x.

Braun, B. R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., et al. (2005). A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet.* 1, 36–57. doi:10.1371/journal.pgen.0010001.

Brown, A. J. P., Brown, G. D., Netea, M. G., and Gow, N. A. R. (2014). Metabolism impacts upon Candida immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol.* 22, 614–622. doi:10.1016/j.tim.2014.07.001.

Brown, A. J. P., Gow, N. A. R., Warris, A., and Brown, G. D. (2019). Memory in Fungal Pathogens Promotes Immune Evasion, Colonisation, and Infection. *Trends Microbiol.* 27, 219–230. doi:10.1016/j.tim.2018.11.001.

Brown, V., Sabina, J., and Johnston, M. (2009). Specialized sugar sensing in diverse fungi. *Curr. Biol.* 19, 436–441. doi:10.1016/j.cub.2009.01.056.

Brown, V., Sexton, J. A., and Johnston, M. (2006). A glucose sensor in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 5, 1726–1737. doi:10.1128/EC.00186-06.

Brumell, J. H., Tang, P., Mills, S. D., and Finlay, B. B. (2001). Characterization of Salmonella-induced filaments (Sifs) reveals a delayed interaction between Salmonella-containing vacuoles and late endocytic compartments. *Traffic* 2, 643–53.

Bruno, V. M., Wang, Z., Marjani, S. L., Euskirchen, G. M., Martin, J., Sherlock, G., et al. (2010). Comprehensive annotation of the transcriptome of the human fungal pathogen *Candida albicans* using RNA-seq. *Genome Res.* 20, 1451–1458. doi:10.1101/gr.109553.110.

Buffo, J., Herman, M. A., and Soll, D. R. (1984). A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 85, 21–30.

Cairey-Remonnay, A., Deffaud, J., Wésolowski-Louvel, M., Lemaire, M., and Soulard, A. (2015). Glycolysis controls plasma membrane glucose sensors to promote glucose signaling in yeasts. *Mol. Cell. Biol.* 35, 747–757. doi:10.1128/MCB.00515-14.

Canonaco, F., Hess, T. A., Heri, S., Wang, T., Szyperski, T., and Sauer, U. (2001). Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 247–252. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10892.x.

Cao, F., Lane, S., Raniga, P. P., Lu, Y., Zhou, Z., Ramon, K., et al. (2006). The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 17, 295–307. doi:10.1091/mbc.e05-06-0502.

Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., and Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1401, 242–264. doi:10.1016/s0167-4889(97)00150-x.

Carlisle, P. L., Banerjee, M., Lazzell, A., Monteagudo, C., López-Ribot, J. L., and Kadosh, D. (2009). Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 599–604. doi:10.1073/pnas.0804061106.

Cass, A., Finkelstein, A., and Krespi, V. (1970). The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* 56, 100–124. doi:10.1085/jgp.56.1.100.

Cassone, A. (2015). Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG* 122, 785–794. doi:10.1111/1471-0528.12994.

Castermans, D., Somers, I., Kriel, J., Louwet, W., Wera, S., Versele, M., et al. (2012). Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell Res.* 22, 1058–1077. doi:10.1038/cr.2012.20.

Celenza, J. L., and Carlson, M. (1989). Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5034–5044. doi:10.1128/mcb.9.11.5034.

Celenza, J. L., Eng, F. J., and Carlson, M. (1989). Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5045–5054. doi:10.1128/mcb.9.11.5045.

Chabasse, D., Bouchara, J. P., de Gentile, L., and Chennebault, J. M. (1988). [*Candida albicans* chlamydospores observed in vivo in a patient with AIDS]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 46, 817–818.

Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 495–544. doi:10.1128/MMBR.00032-07.

Chambers, A. (1997). Phosphoglycerate kinase In: Yeast Sugar Metabolism. Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Application. *Technomic*.

Chambers, A., Packham, E. A., and Graham, I. R. (1995). Control of glycolytic gene expression in the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Curr. Genet.* 29, 1–9.

Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., and Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183, 5385–5394. doi:10.1128/jb.183.18.5385-5394.2001.

Chandra, J., McCormick, T. S., Imamura, Y., Mukherjee, P. K., and Ghannoum, M. A. (2007). Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect. Immun.* 75, 2612–2620. doi:10.1128/IAI.01841-06.

Chauhan, N., Latge, J.-P., and Calderone, R. (2006). Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 435–444. doi:10.1038/nrmicro1426.

Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., and Fink, G. R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 5048–5052. doi:10.1073/pnas.0401416101.

Cheng, S., Clancy, C. J., Xu, W., Schneider, F., Hao, B., Mitchell, A. P., et al. (2013). Profiling of *Candida albicans* gene expression during intra-abdominal candidiasis identifies biologic processes involved in pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 208, 1529–1537. doi:10.1093/infdis/jit335.

Cheng, S.-C., Joosten, L. A. B., Kullberg, B.-J., and Netea, M. G. (2012). Interplay between *Candida albicans* and the Mammalian Innate Host Defense. *Infection and Immunity* 80, 1304–1313. doi:10.1128/IAI.06146-11.

Chibana, H., Beckerman, J. L., and Magee, P. T. (2000). Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res.* 10, 1865–1877. doi:10.1101/gr.148600.

Childers, D. S., Raziunaite, I., Mol Avelar, G., Mackie, J., Budge, S., Stead, D., et al. (2016). The Rewiring of Ubiquitination Targets in a Pathogenic Yeast Promotes Metabolic Flexibility, Host Colonization and Virulence. *PLoS Pathog.* 12, e1005566. doi:10.1371/journal.ppat.1005566.

Choo, J. H., Han, C., Lee, D. W., Sim, G. H., Moon, H. Y., Kim, J.-Y., et al. (2018). Molecular and functional characterization of two pyruvate decarboxylase genes, PDC1 and PDC5, in the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3723–3737. doi:10.1007/s00253-018-8862-3.

Ciriacy, M., and Breitenbach, I. (1979). Physiological effects of seven different blocks in glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 139, 152–160.

Clifton, D., and Fraenkel, D. G. (1982). Mutant studies of yeast phosphofructokinase. *Biochemistry* 21, 1935–1942. doi:10.1021/bi00537a037.

Cole, G. T., Seshan, K. R., Pope, L. M., and Yancey, R. J. (1988). Morphological aspects of gastrointestinal tract invasion by *Candida albicans* in the infant mouse. *J. Med. Vet. Mycol.* 26, 173–185.

Compagno, C., Boschi, F., Daleffe, A., Porro, D., and Ranzi, B. M. (1999). Isolation, nucleotide sequence, and physiological relevance of the gene encoding triose phosphate isomerase from *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4216–4219.

Compagno, C., Boschi, F., and Ranzi, B. M. (1996). Glycerol production in a triose phosphate isomerase deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 12, 591–595. doi:10.1021/bp960043c.

Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Texeira, M., and Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 254–99.

Corvey, C., Koetter, P., Beckhaus, T., Hack, J., Hofmann, S., Hampel, M., et al. (2005). Carbon Source-dependent assembly of the Snf1p kinase complex in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 280, 25323–25330. doi:10.1074/jbc.M503719200.

Cottier, F., Tan, A. S. M., Xu, X., Wang, Y., and Pavelka, N. (2015). *MIG1* Regulates Resistance of *Candida albicans* against the Fungistatic Effect of Weak Organic Acids. *Eukaryotic Cell* 14, 1054–1061. doi:10.1128/EC.00129-15.

Cottier, F., Tan, A. S. M., Yurieva, M., Liao, W., Lum, J., Poidinger, M., et al. (2017). The Transcriptional Response of *Candida albicans* to Weak Organic Acids, Carbon Source, and *MIG1* Inactivation Unveils a Role for *HGT16* in Mediating the Fungistatic Effect of Acetic Acid. *G3 (Bethesda)* 7, 3597–3604. doi:10.1534/g3.117.300238.

Cozzone, A. J. (1998). Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 127–164. doi:10.1146/annurev.micro.52.1.127.

Crowe, J. D., Sievwright, I. K., Auld, G. C., Moore, N. R., Gow, N. A. R., and Booth, N. A. (2003). *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 47, 1637–1651.

Da Silva, S., Robbe-Masselot, C., Ait-Belgnaoui, A., Mancuso, A., Mercade-Loubière, M., Salvador-Cartier, C., et al. (2014). Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 307, G420-429. doi:10.1152/ajpgi.00290.2013.

Dalle, F., Wächtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., et al. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell. Microbiol.* 12, 248–271. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01394.x.

Darouiche, R. O. (2004). Treatment of infections associated with surgical implants. *N. Engl. J. Med.* 350, 1422–1429. doi:10.1056/NEJMra035415.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., and Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res.* 14, 826–832. doi:10.1111/1567-1364.12161.

Davis, D., Edwards, J. E., Mitchell, A. P., and Ibrahim, A. S. (2000). *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 68, 5953–5959. doi:10.1128/iai.68.10.5953-5959.2000.

Davis-Hanna, A., Piispanen, A. E., Stateva, L. I., and Hogan, D. A. (2008). Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Mol. Microbiol.* 67, 47–62.

Day, J. N., Chau, T. T. H., and Lalloo, D. G. (2013). Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* 368, 2522–2523. doi:10.1056/NEJMc1305981.

De la Rosa, J. M., Ruíz, T., and Rodríguez, L. (2000). Cloning and characterization of a *Candida albicans* gene homologous to fructose-1,6-bisphosphatase genes. *Curr. Microbiol.* 41, 384–387.

de Oliveira Santos, G. C., Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J. O., de Sousa Cartágenes, M. do S., Filho, A. K. D. B., do Nascimento, F. R. F., et al. (2018). Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Front Microbiol* 9, 1351. doi:10.3389/fmicb.2018.01351.

Delaloye, J., and Calandra, T. (2014). Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence* 5, 161–169. doi:10.4161/viru.26187.

Dementhon, K., El-Kirat-Chatel, S., and Noël, T. (2012). Development of an in vitro model for the multi-parametric quantification of the cellular interactions between Candida yeasts and phagocytes. *PLoS ONE* 7, e32621. doi:10.1371/journal.pone.0032621.

Desjardins, M., Houde, M., and Gagnon, E. (2005). Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 207, 158–165. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00319.x.

Diezmann, S., Cox, C. J., Schönian, G., Vilgalys, R. J., and Mitchell, T. G. (2004). Phylogeny and evolution of medical species of Candida and related taxa: a multigenic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5624–5635. doi:10.1128/JCM.42.12.5624-5635.2004.

Dinauer, M. C. (1993). The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 30, 329–369. doi:10.3109/10408369309082591.

Dmochowska, A., Dignard, D., Maleszka, R., and Thomas, D. Y. (1990). Structure and transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* POX1 gene encoding acyl-coenzyme A oxidase. *Gene* 88, 247–252.

Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmühl, D. P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C. L., et al. (2004). APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 15, 3167–3180. doi:10.1091/mbc.e03-11-0782.

Dolan, S. K., and Welch, M. (2018). The Glyoxylate Shunt, 60 Years On. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 309–330. doi:10.1146/annurev-micro-090817-062257.

Donnarumma, G., Molinaro, A., Cimini, D., De Castro, C., Valli, V., De Gregorio, V., et al. (2014). *Lactobacillus crispatus* L1: high cell density cultivation and exopolysaccharide structure characterization to highlight potentially beneficial effects against vaginal pathogens. *BMC Microbiol.* 14, 137. doi:10.1186/1471-2180-14-137.

Dubin, G., Koziel, J., Pyrc, K., Wladyka, B., and Potempa, J. (2013). Bacterial proteases in disease - role in intracellular survival, evasion of coagulation/ fibrinolysis innate defenses, toxicoses and viral infections. *Curr. Pharm. Des.* 19, 1090–1113.

Dunn, M. F., Ramírez-Trujillo, J. A., and Hernández-Lucas, I. (2009). Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology (Reading, Engl.)* 155, 3166–3175. doi:10.1099/mic.0.030858-0.

Edwards, S. R., Braley, R., and Chaffin, W. L. (1999). Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 211–216. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13734.x.

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.

Eggimann, P., and Pittet, D. (2002). Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 295–309.

El Barkani, A., Kurzai, O., Fonzi, W. A., Ramon, A., Porta, A., Frosch, M., et al. (2000). Dominant active alleles of RIM101 (PRR2) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4635–4647. doi:10.1128/mcb.20.13.4635-4647.2000.

Ene, I. V., Cheng, S.-C., Netea, M. G., and Brown, A. J. P. (2013). Growth of *Candida albicans* cells on the physiologically relevant carbon source lactate affects their recognition and phagocytosis by immune cells. *Infect. Immun.* 81, 238–248. doi:10.1128/IAI.01092-12.

Eng, C., Kiuru, M., Fernandez, M. J., and Aaltonen, L. A. (2003). A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 3, 193–202. doi:10.1038/nrc1013.

Entian, K. D. (1980). Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 178, 633–637.

Entian, K. D., and Frölich, K. U. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering c... - PubMed - NCBI. *J. Bacteriol.* 158, 29–35.

Fan, D., Coughlin, L. A., Neubauer, M. M., Kim, J., Kim, M. S., Zhan, X., et al. (2015). Activation of HIF-1α and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. *Nat. Med.* 21, 808–814. doi:10.1038/nm.3871.

Fan, J., Chaturvedi, V., and Shen, S.-H. (2002). Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *J. Mol. Evol.* 55, 336–346. doi:10.1007/s00239-002-2330-4.

Fan, W., Kraus, P. R., Boily, M.-J., and Heitman, J. (2005). *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryotic Cell* 4, 1420–1433. doi:10.1128/EC.4.8.1420-1433.2005.

Fanning, S., Xu, W., Solis, N., Woolford, C. A., Filler, S. G., and Mitchell, A. P. (2012a). Divergent targets of *Candida albicans* biofilm regulator Bcr1 in vitro and in vivo. *Eukaryotic Cell* 11, 896–904. doi:10.1128/EC.00103-12.

Fanning, S., Xu, W., Solis, N., Woolford, C. A., Filler, S. G., and Mitchell, A. P. (2012b). Divergent Targets of *Candida albicans* Biofilm Regulator Bcr1 In Vitro and In Vivo. *Eukaryot Cell* 11, 896–904. doi:10.1128/EC.00103-12.

Felis, G. E., and Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol* 8, 44–61.

Felk, A., Kretschmar, M., Albrecht, A., Schaller, M., Beinhauer, S., Nichterlein, T., et al. (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. doi:10.1128/iai.70.7.3689-3700.2002.

Feng, Q., Summers, E., Guo, B., and Fink, G. (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181, 6339–6346.

Fernandes, P. A., Sena-Esteves, M., and Moradas-Ferreira, P. (1995). Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family from Kluyveromyces marxianus--polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism as a tool for the study of multigenic families. *Yeast* 11, 725–733. doi:10.1002/yea.320110804.

Fernández-Arenas, E., Bleck, C. K. E., Nombela, C., Gil, C., Griffiths, G., and Diez-Orejas, R. (2009). *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell. Microbiol.* 11, 560–589. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01274.x.

Fernández-Arenas, E., Cabezón, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., et al. (2007). Integrated Proteomics and Genomics Strategies Bring New Insight into *Candida albicans* Response upon Macrophage Interaction. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 460–478. doi:10.1074/mcp.M600210-MCP200.

Fernández-Arenas, E., Molero, G., Nombela, C., Diez-Orejas, R., and Gil, C. (2004). Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in protection against systemic candidiasis. *Proteomics* 4, 1204–1215. doi:10.1002/pmic.200300678.

Fernández-García, P., Peláez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2012). Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling. *J. Biol. Chem.* 287, 42151–42164. doi:10.1074/jbc.M112.401679.

Fernandez-Mora, E., Polidori, M., Lührmann, A., Schaible, U. E., and Haas, A. (2005). Maturation of *Rhodococcus* equi-containing vacuoles is arrested after completion of the early endosome stage. *Traffic* 6, 635–653. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00304.x.

Fernie, A. R., Carrari, F., and Sweetlove, L. J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 254–261. doi:10.1016/j.pbi.2004.03.007.

Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E., Stajich, J. E., and Butler, G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.* 6, 99. doi:10.1186/1471-2148-6-99.

Fleck, C. B., and Brock, M. (2010). *Aspergillus fumigatus* catalytic glucokinase and hexokinase: expression analysis and importance for germination, growth, and conidiation. *Eukaryotic Cell* 9, 1120–1135. doi:10.1128/EC.00362-09.

Flipphi, M., van de Vondervoort, P. J. I., Ruijter, G. J. G., Visser, J., Arst, H. N., and Felenbok, B. (2003). Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 11849–11857. doi:10.1074/jbc.M209443200.

Flores, C. L., Rodríguez, C., Petit, T., and Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 507–529. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00553.x.

Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C., et al. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* 56, 397–415. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04557.x.

Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C., and Hube, B. (2003). Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* 47, 1523–1543. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03396.x.

Frank, C. F., and Hostetter, M. K. (2007). Cleavage of E-cadherin: a mechanism for disruption of the intestinal epithelial barrier by *Candida albicans*. *Transl Res* 149, 211–222. doi:10.1016/j.trsl.2006.11.006.

Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv. Genet.* 81, 33–82. doi:10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6.

Freeman, S. A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol. Rev.* 262, 193–215. doi:10.1111/imr.12212.

Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., et al. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* 289, 7884–7896. doi:10.1074/jbc.M113.522037.

Friis, R. M. N., Wu, B. P., Reinke, S. N., Hockman, D. J., Sykes, B. D., and Schultz, M. C. (2009). A glycolytic burst drives glucose induction of global histone acetylation by picNuA4 and SAGA. *Nucleic Acids Res.* 37, 3969–3980. doi:10.1093/nar/gkp270.

Fu, Y., Ibrahim, A. S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C. F., and Ghannoum, M. A. (1997). Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 143 (Pt 2), 331–340. doi:10.1099/00221287-143-2-331.

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

Funayama, S., Gancedo, J. M., and Gancedo, C. (1980). Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur. J. Biochem.* 109, 61–66. doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb04767.x.

Gácser, A., Stehr, F., Kröger, C., Kredics, L., Schäfer, W., and Nosanchuk, J. D. (2007). Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 75, 4710–4718. doi:10.1128/IAI.00372-07.

Gancedo, C., and Schwerzmann, K. (1976). Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 109, 221–225.

Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 334–361.

Gancedo, J. M. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 673–704. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00117.x.

Gancedo, J. M., Clifton, D., and Fraenkel, D. G. (1977). Yeast hexokinase mutants. *J. Biol. Chem.* 252, 4443–4444.

Gangloff, S. P., Marguet, D., and Lauquin, G. J. (1990). Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (ACO1) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3551–3561. doi:10.1128/mcb.10.7.3551.

Garedew, A., Henderson, S. O., and Moncada, S. (2010). Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 17, 1540–1550. doi:10.1038/cdd.2010.27.

Gaur, N. K., and Klotz, S. A. (1997). Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect. Immun.* 65, 5289–5294.

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 (Reading, Engl.)* 150, 277–284. doi:10.1099/mic.0.26738-0.

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.

Geiger, J., Wessels, D., Lockhart, S. R., and Soll, D. R. (2004). Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 72, 667–677. doi:10.1128/iai.72.2.667-677.2004.

Georgopapadakou, N. H., and Walsh, T. J. (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 279–291.

Gertz, J., Siggia, E. D., and Cohen, B. A. (2009). Analysis of combinatorial cis-regulation in synthetic and genomic promoters. *Nature* 457, 215–218. doi:10.1038/nature07521.

Ghanem, A., Kitanovic, A., Holzwarth, J., and Wölfl, S. (2017). Mutational analysis of fructose-1,6-bis-phosphatase FBP1 indicates partially independent functions in gluconeogenesis and sensitivity to genotoxic stress. *Microb Cell* 4, 52–63. doi:10.15698/mic2017.02.557.

Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 122–43.

Ghosh, S., Navarathna, D. H. M. L. P., Roberts, D. D., Cooper, J. T., Atkin, A. L., Petro, T. M., et al. (2009). Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect. Immun.* 77, 1596–1605. doi:10.1128/IAI.01452-08.

Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387–391. doi:10.1038/nature00935.

Gil, M. L., Dagan, S., Eren, R., and Gozalbo, D. (2006). Evaluation of the usefulness of anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibodies as a treatment for invasive candidiasis in a murine model. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89, 345–350. doi:10.1007/s10482-005-9037-7.

Gilbert, A. S., Wheeler, R. T., and May, R. C. (2014). Fungal Pathogens: Survival and Replication within Macrophages. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5, a019661. doi:10.1101/cshperspect.a019661.

Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martínez, J. P., and Gozalbo, D. (1997). The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol.* 179, 4992–4999. doi:10.1128/jb.179.16.4992-4999.1997.

Goffrini, P., Wésolowski-Louvel, M., and Ferrero, I. (1991). A phosphoglucose isomerase gene is involved in the Rag phenotype of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 228, 401–409.

Gomaa, E. Z. (2013). Full Paper Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates , biofilm formation and aggregation ability. 436.

Gomes, A. C., Miranda, I., Silva, R. M., Moura, G. R., Thomas, B., Akoulitchev, A., et al. (2007). A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome Biol.* 8, R206. doi:10.1186/gb-2007-8-10-r206.

Gow, N. A. (1997). Germ tube growth of *Candida albicans*. *Curr Top Med Mycol* 8, 43–55.

Gow, N. A., Perera, T. H., Sherwood-Higham, J., Gooday, G. W., Gregory, D. W., and Marshall, D. (1994). Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Scanning Microsc.* 8, 705–710.

Gow, N. A. R., and Hube, B. (2012). Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 406–412. doi:10.1016/j.mib.2012.04.005.

Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorín, I., Renau-Piqueras, J., Martínez, J. P., and Gil, M. L. (1998). The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect. Immun.* 66, 2052–2059.

Gropp, K., Schild, L., Schindler, S., Hube, B., Zipfel, P. F., and Skerka, C. (2009). The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol. Immunol.* 47, 465–475. doi:10.1016/j.molimm.2009.08.019.

Hajjeh, R. A., Sofair, A. N., Harrison, L. H., Lyon, G. M., Arthington-Skaggs, B. A., Mirza, S. A., et al. (2004). Incidence of bloodstream infections due to Candida species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1519–1527. doi:10.1128/jcm.42.4.1519-1527.2004.

Hall, R. A. (2015). Dressed to impress: impact of environmental adaptation on the *Candida albicans* cell wall. *Mol. Microbiol.* 97, 7–17. doi:10.1111/mmi.13020.

Hall, R. A., De Sordi, L., Maccallum, D. M., Topal, H., Eaton, R., Bloor, J. W., et al. (2010). CO(2) acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 6, e1001193. doi:10.1371/journal.ppat.1001193.

Hall, R. A., Turner, K. J., Chaloupka, J., Cottier, F., De Sordi, L., Sanglard, D., et al. (2011). The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 10, 1034–1042. doi:10.1128/EC.05060-11.

Han, B.-K., and Emr, S. D. (2013). The phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P2)-dependent Tup1 conversion (PIPTC) regulates metabolic reprogramming from glycolysis to gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 288, 20633–20645. doi:10.1074/jbc.M113.452813.

Hardie, D. G., Carling, D., and Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67, 821–855. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.821.

Haw, R., Devi Yarragudi, A., and Uemura, H. (2001). Isolation of GCR1, a major transcription factor of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 18, 729–735. doi:10.1002/yea.718.

Hawser, S. P., Baillie, G. S., and Douglas, L. J. (1998). Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 47, 253–256. doi:10.1099/00222615-47-3-253.

Hedbacker, K., and Carlson, M. (2006). Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase. *Eukaryotic Cell* 5, 1950–1956. doi:10.1128/EC.00256-06.

Hedbacker, K., and Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci.* 13, 2408–2420. doi:10.2741/2854.

Hedbacker, K., Townley, R., and Carlson, M. (2004). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1836–1843. doi:10.1128/mcb.24.5.1836-1843.2004.

Heinisch, J., Kirchrath, L., Liesen, T., Vogelsang, K., and Hollenberg, C. P. (1993). Molecular genetics of phosphofructokinase in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.* 8, 559–570.

Herrero, P., Galíndez, J., Ruiz, N., Martínez-Campa, C., and Moreno, F. (1995). Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae HXK1*, *HXK2* and *GLK1* genes. *Yeast* 11, 137–144. doi:10.1002/yea.320110205.

Herrero, P., Martínez-Campa, C., and Moreno, F. (1998). The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the SUC2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 434, 71–76. doi:10.1016/s0014-5793(98)00872-2.

Heymann, P., Gerads, M., Schaller, M., Dromer, F., Winkelmann, G., and Ernst, J. F. (2002). The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect. Immun.* 70, 5246–5255. doi:10.1128/iai.70.9.5246-5255.2002.

Hiller, E., Zavrel, M., Hauser, N., Sohn, K., Burger-Kentischer, A., Lemuth, K., et al. (2011). Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host--focus on the function of cell wall proteins. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 384–389. doi:10.1016/j.ijmm.2011.04.004.

Hiltunen, J. K., Filppula, S. A., Koivuranta, K. T., Siivari, K., Qin, Y. M., and Häyrinen, H. M. (1996). Peroxisomal beta-oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 804, 116–128. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb18612.x.

Hiltunen, J. K., Mursula, A. M., Rottensteiner, H., Wierenga, R. K., Kastaniotis, A. J., and Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 35–64. doi:10.1016/S0168-6445(03)00017-2.

Hirai, M., Ohtani, E., Tanaka, A., and Fukui, S. (1977). Glucose-phosphorylating enzymes of Candida yeasts and their regulation in vivo. - PubMed - NCBI. *Biochim. Biophys. Acta* 480, 357–366. doi:10.1016/0005-2744(77)90028-6.

Hirschfeld, J. (2014). Dynamic interactions of neutrophils and biofilms. *J Oral Microbiol* 6, 26102. doi:10.3402/jom.v6.26102.

Höfs, S., Mogavero, S., and Hube, B. (2016). Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J. Microbiol.* 54, 149–169. doi:10.1007/s12275-016-5514-0.

Hogan, D. A., and Kolter, R. (2002). Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* 296, 2229–2232. doi:10.1126/science.1070784.

Hohmann, S., and Cederberg, H. (1990). Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes PDC1 and PDC5. *European Journal of Biochemistry* 188, 615–621. doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15442.x.

Holland, M. J., and Holland, J. P. (1978). Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 17, 4900–4907. doi:10.1021/bi00616a007.

Holmes, A. R., McNab, R., and Jenkinson, H. F. (1996). *Candida albicans* binding to the oral bacterium Streptococcus gordonii involves multiple adhesin-receptor interactions. *Infect. Immun.* 64, 4680–4685.

Hong, S.-P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8839–8843. doi:10.1073/pnas.1533136100.

Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., et al. (2001). Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Appl Environ Microbiol* 67, 2982–2992. doi:10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001.

Hove, H., Nordgaard-Andersen, I., and Mortensen, P. B. (1994). Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *Am. J. Clin. Nutr.* 59, 74–79. doi:10.1093/ajcn/59.1.74.

Hoyer, L. L. (2001). The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9, 176–180.

Hromatka, B. S., Noble, S. M., and Johnson, A. D. (2005). Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. *Mol. Biol. Cell* 16, 4814–4826. doi:10.1091/mbc.e05-05-0435.

Hube, B., and Naglik, J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology (Reading, Engl.)* 147, 1997–2005. doi:10.1099/00221287-147-8-1997.

Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., and Schäfer, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch. Microbiol.* 174, 362–374.

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. doi:10.1126/science.285.5431.1271.

Hwang, C.-S., Rhie, G., Oh, J.-H., Huh, W.-K., Yim, H.-S., and Kang, S.-O. (2002). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology (Reading, Engl.)* 148, 3705–3713. doi:10.1099/00221287-148-11-3705.

Idnurm, A., and Howlett, B. J. (2002). Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus Leptosphaeria maculans to canola (Brassica napus). *Eukaryotic Cell* 1, 719–724. doi:10.1128/ec.1.5.719-724.2002.

Iida, H., and Yahara, I. (1985). Yeast heat-shock protein of M r 48,000 is an isoprotein of enolase. *Nature* 315, 688–690. doi:10.1038/315688a0.

Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., and Hube, B. (2012). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10, 85–93. doi:10.1558/eri.11.152.

Jacoby, J., Hollenberg, C. P., and Heinisch, J. J. (1993). Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway. *Mol. Microbiol.* 10, 867–876.

Jacquet, M. (1997). [Ras proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, their partners and their activation]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 191, 221–235.

Jamasbi, E., Mularski, A., and Separovic, F. (2016). Model Membrane and Cell Studies of Antimicrobial Activity of Melittin Analogues. *Curr Top Med Chem* 16, 40–45.

Jayatilake, J. a. M. S., Samaranayake, Y. H., and Samaranayake, L. P. (2005). An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *J. Oral Pathol. Med.* 34, 240–246. doi:10.1111/j.1600-0714.2005.00307.x.

Jha, A. K., Huang, S. C.-C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., et al. (2015a). Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 42, 419–430. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.005.

Jha, A. K., Huang, S. C.-C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., et al. (2015b). Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 42, 419–430. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.005.

Jia, Y. K., Bécam, A. M., and Herbert, C. J. (1997). The CIT3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a second mitochondrial isoform of citrate synthase. *Mol. Microbiol.* 24, 53–59.

Jiang, R., and Carlson, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* 10, 3105–3115. doi:10.1101/gad.10.24.3105.

Jiménez-López, C., Collette, J. R., Brothers, K. M., Shepardson, K. M., Cramer, R. A., Wheeler, R. T., et al. (2013). *Candida albicans* induces arginine biosynthetic genes in response to host-derived reactive oxygen species. *Eukaryotic Cell* 12, 91–100. doi:10.1128/EC.00290-12.

Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., et al. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 7329–7334. doi: 10.1073/pnas.0401648101.

Jung, S.-I., Rodriguez, N., Irrizary, J., Liboro, K., Bogarin, T., Macias, M., et al. (2017). Yeast casein kinase 2 governs morphology, biofilm formation, cell wall integrity, and host cell damage of *Candida albicans*. *PLoS ONE* 12, e0187721. doi:10.1371/journal.pone.0187721.

Jung, W. H., and Stateva, L. I. (2003). The cAMP phosphodiesterase encoded by CaPDE2 is required for hyphal development in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 2961–2976. doi:10.1099/mic.0.26517-0.

Kaewsrichan, J., Peeyananjarassri, K., and Kongprasertkit, J. (2006). Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48, 75–83. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00124.x.

Kamai, Y., Kubota, M., Kamai, Y., 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. doi:10.1128/iai/70.9.5256-5258.2002.

Kanost, M. R. (2009). "Hemolymph," in *Encyclopedia of Insects* (Elsevier). doi:10.1016/B978-0-12-374144-8.X0001-X.

Karkowska-Kuleta, J., Kedracka-Krok, S., Rapala-Kozik, M., Kamysz, W., Bielinska, S., Karafova, A., et al. (2011). Molecular determinants of the interaction between human high molecular weight kininogen and *Candida albicans* cell wall: Identification of kininogen-binding proteins on fungal cell wall and mapping the cell wall-binding regions on kininogen molecule. *Peptides* 32, 2488–2496. doi:10.1016.j.peptides.2011.10.021.

Katz, M. E., Masoumi, A., Burrows, S. R., Shirtliff, C. G., and Cheetham, B. F. (2000). The *Aspergillus nidulans* xprF gene encodes a hexokinase-like protein involved in the regulation of extracellular proteases. *Genetics* 156, 1559–1571.

Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J., and Iwasaki, S. (1989). The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast Candida cylindracea. *Nature* 341, 164–166. doi:10.1038/341164a0.

Kayingo, G., and Wong, B. (2005). The MAP kinase Hog1p differentially regulates stress-induced production and accumulation of glycerol and D-arabitol in *Candida albicans*. - PubMed - NCBI. *Microbiology.* 151, 2987–2999. doi:10.1099/mic.0.28040-0.

Kelly, M. T., MacCallum, D. M., Clancy, S. D., Odds, F. C., Brown, A. J. P., and Butler, G. (2004). The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence. *Mol. Microbiol.* 53, 969–983. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04185.x.

Kettner, K., Krause, U., Mosler, S., Bodenstein, C., Kriegel, T. M., and Rödel, G. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* gene YMR291W/TDA1 mediates the in vivo phosphorylation of hexokinase isoenzyme 2 at serine-15. *FEBS Lett.* 586, 455–458. doi:10.1016/j.febslet.2012.01.030.

Kettner, K., Müller, E.-C., Otto, A., Rödel, G., Breunig, K. D., and Kriegel, T. M. (2007). Identification and characterization of a novel glucose-phosphorylating enzyme in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 7, 683–692. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00259.x.

Kim, J., and Sudbery, P. (2011). *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J. Microbiol.* 49, 171–177. doi:10.1007/s12275-011-1064-7.

Kim, J.-H., Brachet, V., Moriya, H., and Johnston, M. (2006). Integration of transcriptional and posttranslational regulation in a glucose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 5, 167–173. doi:10.1128/EC.5.1.167-173.2006.

Kim, J.-H., and Johnston, M. (2006). Two glucose-sensing pathways converge on Rgt1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281, 26144–26149. doi:10.1074/jbc.M603636200.

Kim, J.-H., Polish, J., and Johnston, M. (2003). Specificity and Regulation of DNA Binding by the Yeast Glucose Transporter Gene Repressor Rgt1. *Mol Cell Biol* 23, 5208–5216. doi:10.1128/MCB.23.15.5208-5216.2003.

Kitahara, N., Morisaka, H., Aoki, W., Takeda, Y., Shibasaki, S., Kuroda, K., et al. (2015). Description of the interaction between *Candida albicans* and macrophages by mixed and quantitative proteome analysis without isolation. *AMB Express* 5, 127. doi:10.1186/s13568-015-0127-2.

Kitanovic, A., and Wölfl, S. (2006). Fructose-1,6-bisphosphatase mediates cellular responses to DNA damage and aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 594, 135–147. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.08.005.

Klein, C. J., Olsson, L., and Nielsen, J. (1998). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology (Reading, Engl.)* 144 (Pt 1), 13–24. doi:10.1099/00221287-144-1-13.

Klemba, M., and Goldberg, D. E. (2002). Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 275–305. doi:10.1146/annurev.biochem.71.090501.145453.

Klengel, T., Liang, W.-J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schröppel, K., Naglik, J. R., et al. (2005). Fungal adenylyl cyclase integrates CO2 sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr. Biol.* 15, 2021–2026. doi:10.1016/j.cub.2005.10.040.

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., and De Groot, P. W. J. (2006). Trends and highlights in Candida research. The 8th ASM Conference about Candida and Candidiasis, Denver (Colorado, USA), 13-17 March 2006. *FEMS Yeast Res.* 6, 667–668. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00112.x.

Klotz, S. A., Pendrak, M. L., and Hein, R. C. (2001). Antibodies to alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins react with *Candida albicans* alcohol dehydrogenase. *Microbiology (Reading, Engl.)* 147, 3159–3164. doi:10.1099/00221287-147-11-3159.

Knoll, L. J., Johnson, D. R., and Gordon, J. I. (1995). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* strains containing fatty acid activation gene (FAA) deletions with a mammalian acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 270, 10861–10867. doi:10.1074/jbc.270.18.10861.

Ko, H.-C., Hsiao, T.-Y., Chen, C.-T., and Yang, Y.-L. (2013). *Candida albicans ENO1* null mutants exhibit altered drug susceptibility, hyphal formation, and virulence. *J. Microbiol.* 51, 345–351. doi:10.1007/s12275-013-2577-z.

Köhler, G. A., Assefa, S., and Reid, G. (2012). Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2012, 636474. doi:10.1155/2012/636474.

Köhler, J. R., and Fink, G. R. (1996). *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13223–13228. doi:10.1073/pnas.93.23.13223.

Kojic, E. M., and Darouiche, R. O. (2004). Candida infections of medical devices. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 255–267. doi:10.1128/cmr.17.2.255-267.2004.

Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W., Donaton, M. C., Van Dijck, P., et al. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* 32, 1002–1012.

Kruppa, M., Krom, B. P., Chauhan, N., Bambach, A. V., Cihlar, R. L., and Calderone, R. A. (2004). The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 3, 1062–1065. doi:10.1128/EC.3.4.1062-1065.2004.

Kumamoto, C. A. (2005). A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5576–5581.

Kumamoto, C. A., and Vinces, M. D. (2005). Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 113–133. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121034.

Kuser, P., Cupri, F., Bleicher, L., and Polikarpov, I. (2008). Crystal structure of yeast hexokinase PI in complex with glucose: A classical “induced fit” example revised. *Proteins* 72, 731–740. doi:10.1002/prot.21956.

Lafuente, M. J., Gancedo, C., Jauniaux, J. C., and Gancedo, J. M. (2000). Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35, 161–172.

Lane, S., Xu, H., Oh, E. J., Kim, H., Lesmana, A., Jeong, D., et al. (2018). Glucose repression can be alleviated by reducing glucose phosphorylation rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* 8, 2613. doi:10.1038/s41598-018-20804-4.

Lastauskienė, E., Zinkevičienė, A., Girkontaitė, I., Kaunietis, A., and Kvedarienė, V. (2014). Formic acid and acetic acid induce a programmed cell death in pathogenic Candida species. *Curr. Microbiol.* 69, 303–310. doi:10.1007/s00284-014-0585-9.

Laurian, R., Dementhon, K., Doumèche, B., Soulard, A., Noel, T., Lemaire, M., et al. (2019). Hexokinase and Glucokinases Are Essential for Fitness and Virulence in the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *Front Microbiol* 10, 327. doi:10.3389/fmicb.2019.00327.

Leberer, E., Harcus, D., Broadbent, I. D., Clark, K. L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., et al. (1996). Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13217–13222. doi:10.1073/pnas.93.23.13217.

Lee, H. J., Kim, S. J., and Lee, K. B. (1964). STUDY ON THE GLYOXYLATE CYCLE IN GERMINATING SESAME SEED EMBRYOS. *Arch. Biochem. Biophys.* 107, 479–484.

Lee, K. K., Maccallum, D. M., Jacobsen, M. D., Walker, L. A., Odds, F. C., Gow, N. A. R., et al. (2012). Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 208–217. doi:10.1128/AAC.00683-11.

Leech, A., Nath, N., McCartney, R. R., and Schmidt, M. C. (2003). Isolation of mutations in the catalytic domain of the snf1 kinase that render its activity independent of the snf4 subunit. *Eukaryotic Cell* 2, 265–273. doi:10.1128.ec.2.2.265.273.2003.

Lehrer, R. I., and Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 23–27.

Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., et al. (1998). Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 273, 26078–26086. doi:10.1074/jbc.273.40.26078.

Lemaire, M., and Wésolowski-Louvel, M. (2004). Enolase and glycolytic flux play a role in the regulation of the glucose permease gene RAG1 of *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 168, 723–731. doi:10.1534/genetics.104.029876.

Leuker, C. E., Sonneborn, A., Delbrück, 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, F., and Palecek, S. P. (2003). EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryotic Cell* 2, 1266–1273. doi:10.1128/ec.2.6.1266-1273.2003.

Li, F., Svarovsky, M. J., Karlsson, A. J., Wagner, J. P., Marchillo, K., Oshel, P., et al. (2007). Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryotic Cell* 6, 931–939. doi:10.1128/EC.0049-07.

Li, L., Ye, Y., Pan, L., Zhu, Y., Zhen, S., and Lin, Y. (2009). The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. - PubMed - NCBI. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 778–783. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.113.

Li, R., Kumar, R., Tati, S., Puri, S., and Edgerton, M. (2013). *Candida albicans* flu1-mediated efflux of salivary histatin 5 reduces its cytosolic concentration and fungicidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1832–1839. doi:10.1128/AAC.00295-12.

Lijnen, H. R., and Collen, D. (1995). Fibrinolytic agents: mechanisms of activity and pharmacology. *Thromb. Haemost.* 74, 387–390.

Liu, H., Köhler, J., and Fink, G. R. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science* 266, 1723–1726. doi:10.1126/science.7992058.

Liu, Y., and Filler, S. G. (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryotic Cell* 10, 168–173. doi:10.1128/EC.00279-10.

Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939–949.

Lobo, Z., and Maitra, P. K. (1977). Physiological role of glucose-phosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 639–645.

Lopez, C. M., Wallich, R., Riesbeck, K., Skerka, C., and Zipfel, P. F. (2014). *Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin. *PLoS ONE* 9, e90796. doi:10.1371/journal.pone.0090796.

López, M. C., and Baker, H. V. (2000). Understanding the growth phenotype of the yeast gcr1 mutant in terms of global genomic expression patterns. *J. Bacteriol.* 182, 4970–4978. doi:10.1128/jb.182.17.4970-4978.2000.

Lorberg, A., Kirchrath, L., Ernst, J. F., and Heinisch, J. J. (1999). Genetic and biochemical characterization of phosphofructokinase from the opportunistic pathogenic yeast *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.* 260, 217–226. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00132.x.

Lorenz, M. C. (2013). Carbon catabolite control in *Candida albicans*: new wrinkles in metabolism. *MBio* 4, e00034-00013. doi:10.1128/mBio.00034-13.

Lorenz, M. C., Bender, J. A., and Fink, G. R. (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell* 3, 1076–1087. doi:10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004.

Lorenz, M. C., and Fink, G. R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 412, 83–86. doi:10.1038/35083594.

Lowman, D. W., Greene, R. R., Bearden, D. W., Kruppa, M. D., Pottier, M., Monteiro, M. A., et al. (2014). Novel structural features in *Candida albicans* hyphal glucan provide a basis for differential innate immune recognition of hyphae versus yeast. *J. Biol. Chem.* 289, 3432–3443. doi:10.1074/jbc.M113.529131.

Lu, Y., Su, C., Unoje, O., and Liu, H. (2014). Quorum sensing controls hyphal initiation in *Candida albicans* through Ubr1-mediated protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 1975–1980. doi:10.1073/pnas.1318690111.

Ludin, K., Jiang, R., and Carlson, M. (1998). Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6245–6250. doi:10.1073/pnas.95.11.6245.

Luo, S., Blom, A. M., Rupp, S., Hipler, U.-C., Hube, B., Skerka, C., et al. (2011). The pH-regulated antigen 1 of *Candida albicans* binds the human complement inhibitor C4b-binding protein and mediates fungal complement evasion. *J. Biol. Chem.* 286, 8021–8029. doi:10.1074/jbc.M110.130138.

Luo, S., Hartmann, A., Dahse, H.-M., Skerka, C., and Zipfel, P. F. (2010). Secreted pH-regulated antigen 1 of *Candida albicans* blocks activation and conversion of complement C3. *J. Immunol.* 185, 2164–2173. doi:10.4049/jimmunol.1001011.

Luo, S., Poltermann, S., Kunert, A., Rupp, S., and Zipfel, P. F. (2009). Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol. Immunol.* 47, 541–550. doi:10.1016/j.molimm.2009.07.017.

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.* 45, 471–478. doi:10.1016/j.femsim.2005.06.007.

Lutfiyya, L. L., Iyer, V. R., DeRisi, J., DeVit, M. J., Brown, P. O., and Johnston, M. (1998). Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 1377–1391.

Maidan, M. M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., et al. (2005a). The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 1971–1986. doi:10.1091/mbc.e04-09-0780.

Maidan, M. M., Thevelein, J. M., and Van Dijck, P. (2005b). Carbon source induced yeast-to-hypha transition in *Candida albicans* is dependent on the presence of amino acids and on the G-protein-coupled receptor Gpr1. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 291–293. doi:10.1042/BST0330291.

Maitra, P. K. (1971). Glucose and fructose metabolism in a phosphoglucoisomeraseless mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 107, 759–769.

Manzoni, P., Mostert, M., Leonessa, M. L., Priolo, C., Farina, D., Monetti, C., et al. (2006). Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies rhamnosus prevents enteric colonization by Candida species in preterm neonates: a randomized study. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1735–1742. doi:10.1086/504324.

Marcil, A., Harcus, D., Thomas, D. Y., and Whiteway, M. (2002). *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of Candida genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect. Immun.* 70, 6319–6329. doi:10.1128/iai.70.11.6319-6329.2002.

Marshall-Carlson, L., Celenza, J. L., Laurent, B. C., and Carlson, M. (1990). Mutational analysis of the SNF3 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1105–1115. doi:10.1128/mcb.10.3.1105.

Martchenko, M., Levitin, A., and Whiteway, M. (2007). Transcriptional activation domains of the *Candida albicans* Gcn4p and Gal4p homologs. *Eukaryotic Cell* 6, 291–301. doi:10.1128/EC.00183-06.

Martinez, L., and Falson, P. (2014). Multidrug resistance ATP-binding cassette membrane transporters as targets for improving oropharyngeal candidiasis treatment. *Advances in Cellular and Molecular Otolaryngology* 2. doi:10.3402/acmo.v2.23955.

Martinez-Lopez, R., Monteoliva, L., Diez-Orejas, R., Nombela, C., and Gil, C. (2004). The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 150, 3341–3354. doi:10.1099/mic.0.27320-0.

Martinez-Lopez, R., Park, H., Myers, C. L., Gil, C., and Filler, S. G. (2006). *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryotic Cell* 5, 140–147. doi:10.1128/EC.5.1.140-147.2006.

Mason, A. B., Buckley, H. R., and Gorman, J. A. (1993). Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* enolase gene. *J. Bacteriol.* 175, 2632–2639. doi:10.1128/jb.175.9.2632-2639.1993.

Massey, S. E., Moura, G., Beltrão, P., Almeida, R., Garey, J. R., Tuite, M. F., et al. (2003). Comparative evolutionary genomics unveils the molecular mechanism of reassignment of the CTG codon in Candida spp. *Genome Res.* 13, 544–557. doi:10.1101/gr.811003.

Mates, N., Kettner, K., Heidenreich, F., Pursche, T., Migotti, R., Kahlert, G., et al. (2014). Proteomic and functional consequences of hexokinase deficiency in glucose-repressible *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell Proteomics* 13, 860–875. doi:10.1074/mcp.M113.032714.

Mathé, L., and Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Genet* 59, 251–264. doi:10.1007/s00294-013-0400-3.

Mayer, F. L., Wilson, D., and Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4, 119–128. doi:10.4161/viru.22913.

Mayer, F. V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M. J., Carmena, D., McCartney, R. R., et al. (2011). ADP regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 14, 707–714. doi:10.1016/j.cmet.2011.09.009.

McAlister, L., and Holland, M. J. (1982). Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J. Biol. Chem.* 257, 7181–7188.

McAlister, L., and Holland, M. J. (1985). Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J. Biol. Chem.* 260, 15019–15027.

McCartney, R. R., and Schmidt, M. C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 36460–36466. doi:10.1074/jbc.M104418200.

McKenzie, C. G. J., Koser, U., Lewis, L. E., Bain, J. M., Mora-Montes, H. M., Barker, R. N., et al. (2010). Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect. Immun.* 78, 1650–1658. doi:10.1128/IAI.00001-10.

McKinney, J. D., Höner zu Bentrup, K., Muñoz-Elías, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., et al. (2000). Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735–738. doi:10.1038/35021074.

Meijer, M. M., Boonstra, J., Verkleij, A. J., and Verrips, C. T. (1998). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *J. Biol. Chem.* 273, 24102–24107. doi:10.1074/jbc.273.37.24102.

Meiller, T. F., Hube, B., Schild, L., Shirtliff, M. E., Scheper, M. A., Winkler, R., et al. (2009). A novel immune evasion strategy of *Candida albicans* : proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS ONE* 4, e5039. doi:10.1371/journal.pone.0005039.

Mercado, J. J., and Gancedo, J. M. (1992). Regulatory regions in the yeast FBP1 and PCK1 genes. *FEBS Lett.* 311, 110–114. doi:10.1016/0014-5793(92)81379-z.

Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.-M., et al. (2013). *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol.* 36, 296–304. doi:10.1016/j.fm.2013.05.010.

Mills, E. L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A. S. H., Varma, M., Bryant, C. E., et al. (2016). Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell* 167, 457-470.e13. doi:10.1016/j.cell.2016.08.064.

Miramón, P., Kasper, L., and Hube, B. (2013). Thriving within the host: Candida spp. interactions with phagocytic cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 202, 183–195. doi:10.1007/s00430-013-0288-z.

Miramón, P., and Lorenz, M. C. (2017). A feast for Candida: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. *PLoS Pathog.* 13, e1006144. doi:10.1371/journal.ppat.1006144.

Miranda, I., Rocha, R., Santos, M. C., Mateus, D. D., Moura, G. R., Carreto, L., et al. (2007). A genetic code alteration is a phenotype diversity generator in the human pathogen *Candida albicans*. *PLoS ONE* 2, e996. doi:10.1371/journal.pone.0000996.

Miseta, A., Tökés-Füzesi, M., Aiello, D. P., and Bedwell, D. M. (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant unable to convert glucose to glucose-6-phosphate accumulates excessive glucose in the endoplasmic reticulum due to core oligosaccharide trimming. *Eukaryotic Cell* 2, 534–541. doi:10.1128/ec.2.3.534-541.2003.

Mitchell, A. P. (2016). Microbiology: Fungus produces a toxic surprise. *Nature* 532, 41–42. doi:10.1038/nature17319.

Mitchell, K. F., Zarnowski, R., Sanchez, H., Edward, J. A., Reinicke, E. L., Nett, J. E., et al. (2015). Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 4092–4097. doi:10.1073/pnas.1421437112.

Mitts, M. R., Grant, D. B., and Heideman, W. (1990). Adenylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae* is a peripheral membrane protein. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3873–3883. doi:10.1128/mcb.10.8.3873.

Miwa, T., Takagi, Y., Shinozaki, M., Yun, C.-W., Schell, W. A., Perfect, J. R., et al. (2004). Gpr1, a putative G-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 3, 919–931. doi:10.1128/EC.3.4.919-931.2004.

Modrzewska, B., and Kurnatowski, P. (2015). Adherence of Candida sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol* 61, 3–9.

Mora-Montes, H. M., Netea, M. G., Ferwerda, G., Lenardon, M. D., Brown, G. D., Mistry, A. R., et al. (2011). Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect. Immun.* 79, 1961–1970. doi:10.1128/IAI.01282-10.

Moreno, F., Ahuatzi, D., Riera, A., Palomino, C. A., and Herrero, P. (2005). Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 265–268. doi:10.1042/BST0330265.

Morgenstern, D. E., Gifford, M. A., Li, L. L., Doerschuk, C. M., and Dinauer, M. C. (1997). Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J. Exp. Med.* 185, 207–218. doi:10.1084/jem.185.2.207.

Moriya, H., and Johnston, M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 1572–1577. doi:10.1073/pnas.0305901101.

Morschhäuser, J., Virkola, R., Korhonen, T. K., and Hacker, J. (1997). Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 349–355. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12595.x.

Moseley, J. B., and Goode, B. L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 605–645. doi:10.1128/MMBR.00013-06.

Motshwene, P., Brandt, W., and Lindsey, G. (2003). Significant quantities of the glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase are present in the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 369, 357–362. doi:10.1042/BJ20021352.

Moyes, D. L., Richardson, J. P., and Naglik, J. R. (2015). *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence* 6, 338–346. doi:10.1080/21505594.2015.1012981.

Moyes, D. L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., Thavaraj, S., et al. (2010). A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell Host Microbe* 8, 225–235. doi:10.1016/j.chom.2010.08.002.

Moyes, D. L., Shen, C., Murciano, C., Runglall, M., Richardson, J. P., Arno, M., et al. (2014). Protection against epithelial damage during *Candida albicans* infection is mediated by PI3K/Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *J. Infect. Dis.* 209, 1816–1826. doi:10.1093/infdis/jit824.

Moyes, D. L., Wilson, D., Richardson, J. P., Mogavero, S., Tang, S. X., Wernecke, J., et al. (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* 532, 64–8.

Mukherjee, P. K., Chandra, J., Retuerto, M., Sikaroodi, M., Brown, R. E., Jurevic, R., et al. (2014). Oral mycobiome analysis of HIV-infected patients: identification of *Pichia* as an antagonist of opportunistic fungi. *PLoS Pathog.* 10, e1003996. doi:10.1371/journal.ppat.1003996.

Mukherjee, P. K., Mohamed, S., Chandra, J., Kuhn, D., Liu, S., Antar, O. S., et al. (2006). Alcohol dehydrogenase restricts the ability of the pathogen *Candida albicans* to form a biofilm on catheter surfaces through an ethanol-based mechanism. *Infect. Immun.* 74, 3804–3816. doi:10.1128/IAI.00161-06.

Murad, A. M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., et al. (2001a). Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol. Microbiol.* 42, 981–993.

Murad, A. M., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Tournu, H., Tekaia, F., Talibi, D., et al. (2001b). Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol. Microbiol.* 42, 981–993. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02713.x.

Murillo, L. A., Newport, G., Lan, C.-Y., Habelitz, S., Dungan, J., and Agabian, N. M. (2005). Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 4, 1562–1573. doi:10.1128/EC.4.9.1562-1573.2005.

Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., et al. (1988). Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (GPA2) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1374–1378. doi:10.1073/pnas.85.5.1374.

Nath, N., McCartney, R. R., and Schmidt, M. C. (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3909–3917. doi:10.1128/mcb.23.11.3909-3917.2003.

Neely, A. N., Law, E. J., and Holder, I. A. (1986). Increased susceptibility to lethal Candida infections in burned mice preinfected with Pseudomonas aeruginosa or pretreated with proteolytic enzymes. *Infect. Immun.* 52, 200–204.

Neil, H., Lemaire, M., and Wésolowski-Louvel, M. (2004). Regulation of glycolysis in *Kluyveromyces lactis*: role of KlGCR1 and KlGCR2 in glucose uptake and catabolism. *Curr. Genet.* 45, 129–139. doi:10.1007/s00294-003-0473-5.

Nemecek, J. C., Wüthrich, M., and Klein, B. S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312, 583–588. doi:10.1126/science.1124105.

Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., and Gow, N. A. R. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 67–78. doi:10.1038/nrmicro1815.

Nett, J. E., Marchillo, K., Spiegel, C. A., and Andes, D. R. (2010). Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. *Infect. Immun.* 78, 3650–3659. doi:10.1128/IAI.00480-10.

Nett, J. E., Sanchez, H., Cain, M. T., Ross, K. M., and Andes, D. R. (2011). Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryotic Cell* 10, 1660–1669. doi:10.1128/EC.05126-11.

Niedenthal, R., Riles, L., Güldener, U., Klein, S., Johnston, M., and Hegemann, J. H. (1999). Systematic analysis of *S. cerevisiae* chromosome VIII genes. *Yeast* 15, 1775–1796. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199912)15:16<1775::AID-YEA496>3.0.CO;2-U.

Nobile, C. J., Fox, E. P., Nett, J. E., Sorrells, T. R., Mitrovich, Q. M., Hernday, A. D., et al. (2012). A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell* 148, 126–138. doi:10.1016/j.cell.2011.10.048.

Nobile, C. J., and Mitchell, A. P. (2006). Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell. Microbiol.* 8, 1382–1391. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00761.x.

Nobile, C. J., Nett, J. E., Andes, D. R., and Mitchell, A. P. (2006). Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryotic Cell* 5, 1604–1610. doi:10.1128/EC.00194-06.

Nobile, C. J., Nett, J. E., Hernday, A. D., Homann, O. R., Deneault, J.-S., Nantel, A., et al. (2009). Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. *PLoS Biol.* 7, e1000133. doi:10.1371/journal.pbio.1000133.

Nobile, C. J., Schneider, H. A., Nett, J. E., Sheppard, D. C., Filler, S. G., Andes, D. R., et al. (2008). Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr. Biol.* 18, 1017–1024. doi:10.1016/j.cub.2008.06.034.

Noble, S. M., French, S., Kohn, L. A., Chen, V., and Johnson, A. D. (2010). Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat. Genet.* 42, 590–598. doi:10.1038/ng.605.

Noble, S. M., Gianetti, B. A., and Witchley, J. N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 96–108. doi:10.1038/nrmicro.2016.157.

Noverr, M. C., and Huffnagle, G. B. (2004). Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infect. Immun.* 72, 6206–6210. doi:10.1128/IAI.72.11.6206-6210.2004.

Nucci, M., and Anaissie, E. (2001). Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin. Infect. Dis.* 33, 1959–1967. doi:10.1086/323759.

Odds, F. C. (1990). F. C. Odds, Candida and Candidosis, A Review and Bibliography (Second Edition). X + 468 S., 97 Abb., 92 Tab. u. 22 Farbtafeln. London—Philadelphia—Toronto—Sydney—Tokyo 1988. Baillière Tindall (W. B. Saunders). £ 35.00. ISBN: 0–7020–1265–3. *Journal of Basic Microbiology* 30, 382–383. doi:10.1002/jobm.3620300522.

Oh, K. B., Miyazawa, H., Naito, T., and Matsuoka, H. (2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 4664–4668. doi:10.1073/pnas.071404698.

Ohno, A., Müller, E., Fraek, M. L., Thurau, K., and Beck, F. (1997). Solute composition and heat shock proteins in rat renal medulla. *Pflugers Arch.* 434, 117–122. doi:10.1007/s004240050371.

Orlova, M., Barrett, L., and Kuchin, S. (2008). Detection of endogenous Snf1 and its activation state: application to Saccharomyces and Candida species. *Yeast* 25, 745–754. doi:10.1002/yea.1628.

Otzen, C., Müller, S., Jacobsen, I. D., and Brock, M. (2013). Phylogenetic and phenotypic characterisation of the 3-ketoacyl-CoA thiolase gene family from the opportunistic human pathogenic fungus *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 13, 553–564. doi:10.1111/1567-1364.12057.

Ozcan, S. (2002). Two different signals regulate repression and induction of gene expression by glucose. *J. Biol. Chem.* 277, 46993–46997. doi:10.1074/jbc.M208726200.

Ozcan, S., Dover, J., and Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 2566–2573. doi:10.1093/emboj/17.9.2566.

Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wölfl, S., and Johnston, M. (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12428–12432. doi:10.1073/pnas.93.22.12428.

Ozcan, S., and Johnston, M. (1995a). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1564–1572. doi:10.1128/mcb.15.3.1564.

Ozcan, S., and Johnston, M. (1995b). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1564–1572. doi:10.1128/mcb.15.3.1564.

Ozcan, S., and Johnston, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 554–569.

Pandey, N., Malik, R. K., Kaushik, J. K., and Singroha, G. (2013). Gassericin A: a circular bacteriocin produced by lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1977–1987. doi:10.1007/s11274-013-1368-3.

Papini, M., Nookaew, I., Scalcinati, G., Siewers, V., and Nielsen, J. (2010). Phosphoglycerate mutase knock-out mutant *Saccharomyces cerevisiae*: physiological investigation and transcriptome analysis. *Biotechnol J* 5, 1016–1027. doi:10.1002/biot.201000199.

Papon, N., Noël, T., Florent, M., Gibot-Leclerc, S., Jean, D., Chastin, C., et al. (2007). Molecular mechanism of flucytosine resistance in Candida lusitaniae: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 369–371. doi:10.1128/AAC.00824-06.

Parolin, C., Marangoni, A., Laghi, L., Foschi, C., Ñahui Palomino, R. A., Calonghi, N., et al. (2015). Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-Candida Activity. *PLoS ONE* 10, e0131220. doi:10.1371/journal.pone.0131220.

Pasula, S., Chakraborty, S., Choi, J. H., and Kim, J.-H. (2010). Role of casein kinase 1 in the glucose sensor-mediated signaling pathway in yeast. *BMC Cell Biol.* 11, 17. doi:10.1186/1471-2121-11-17.

Peeters, K., Van Leemputte, F., Fischer, B., Bonini, B. M., Quezada, H., Tsytlonok, M., et al. (2017). Fructose-1,6-bisphosphate couples glycolytic flux to activation of Ras. *Nat Commun* 8, 922. doi:10.1038/s41467-017-01019-z.

Peláez, R., Fernández-García, P., Herrero, P., and Moreno, F. (2012). Nuclear import of the yeast hexokinase 2 protein requires α/β-importin-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 3518–3529. doi:10.1074/jbc.M111.317230.

Peláez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2009). Nuclear export of the yeast hexokinase 2 protein requires the Xpo1 (Crm1)-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 20548–20555. doi:10.1074/jbc.M109.013730.

Peláez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2010). Functional domains of yeast hexokinase 2. *Biochem. J.* 432, 181–190. doi:10.1042/BJ20100663.

Perdoni, F., Falleni, M., Tosi, D., Cirasola, D., Romagnoli, S., Braidotti, P., et al. (2014). A histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Histochem* 58, 2428. doi:10.4081/ejh.2014.2428.

Pérez, J. C., Kumamoto, C. A., and Johnson, A. D. (2013). *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. *PLoS Biol.* 11, e1001510. doi:10.1371/journal.pbio.1001510.

Perlroth, J., Choi, B., and Spellberg, B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med. Mycol.* 45, 321–346. doi:10.1080/13693780701218689.

Peschel, A., and Sahl, H.-G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 529–536. doi:10.1038/nrmicro1441.

Peterkofsky, A., and Gazdar, C. (1978). The *Escherichia coli* adenylate cyclase complex: activation by phosphoenolpyruvate. *J. Supramol. Struct.* 9, 219–230. doi:10.1002/jss.400090207.

Petter, R., Chang, Y. C., and Kwon-Chung, K. J. (1997). A gene homologous to *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 appears to be essential for the viability of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 65, 4909–4917.

Petter, R., and Kwon-Chung, K. J. (1996). Disruption of the SNF1 gene abolishes trehalose utilization in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Infect. Immun.* 64, 5269–5273.

Pfaller, M. A., and Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 133–163. doi:10.1128/CMR.00029-06.

Pfeffer, S. R., and Rothman, J. E. (1987). Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 829–852. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.004145.

Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., et al. (2007). Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol.* 5, e64. doi:10.1371/journal.pbio.0050064.

Piekarska, K., Hardy, G., Mol, E., van den Burg, J., Strijbis, K., van Roermund, C., et al. (2008). The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Microbiology (Reading, Engl.)* 154, 3061–3072. doi:10.1099/mic.0.2008/020289-0.

Piekarska, K., Mol, E., van den Berg, M., Hardy, G., van den Burg, J., van Roermund, C., et al. (2006). Peroxisomal fatty acid beta-oxidation is not essential for virulence of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 5, 1847–1856. doi:10.1128/EC.00093-06.

Pitarch, A., Abian, J., Carrascal, M., Sánchez, M., Nombela, C., and Gil, C. (2004). Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics* 4, 3084–3106. doi:10.1002/pmic.200400903.

Pitarch, A., Díez-Orejas, R., Molero, G., Pardo, M., Sánchez, M., Gil, C., et al. (2001). Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics* 1, 550–559. doi:10.1002/1615-9861(200104)1:4<550::AID-PROT550>3.0.CO;2-W.

Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T., and Hiltunen, J. K. (2006). Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1413–1426. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.034.

Polke, M., Hube, B., and Jacobsen, I. D. (2015). Candida survival strategies. *Adv. Appl. Microbiol.* 91, 139–235. doi:10.1016/bs.aambs.2014.12.002.

Poltermann, S., Kunert, A., von der Heide, M., Eck, R., Hartmann, A., and Zipfel, P. F. (2007). Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 282, 37537–37544. doi:10.1074/jbc.M707280200.

Porta, A., Ramon, A. M., and Fonzi, W. A. (1999). PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* palF, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181, 7516–7523.

Poulain, D., Tronchin, G., Dubremetz, J. F., and Biguet, J. (1978). Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: study of its constitutive layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides. *Ann. Microbiol. (Paris)* 129, 141–153.

Prado, S. M. D., Cerdán, M. E., and González Siso, M. I. (2004). Isolation and transcriptional regulation of the *Kluyveromyces lactis* FBA1 (fructose-1,6-bisphosphate aldolase) gene. *Can. J. Microbiol.* 50, 645–652. doi:10.1139/w04-038.

Price, M. S., Betancourt-Quiroz, M., Price, J. L., Toffaletti, D. L., Vora, H., Hu, G., et al. (2011). *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. *MBio* 2, e00103-00111. doi:10.1128/mBio.00103-11.

Prigneau, O., Porta, A., Poudrier, J. A., Colonna-Romano, S., Noël, T., and Maresca, B. (2003). Genes involved in beta-oxidation, energy metabolism and glyoxylate cycle are induced by *Candida albicans* during macrophage infection. *Yeast* 20, 723–730. doi:10.1002/yea.998.

Prior, C., Mamessier, P., Fukuhara, H., Chen, X. J., and Wesolowski-Louvel, M. (1993). The hexokinase gene is required for transcriptional regulation of the glucose transporter gene RAG1 in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3882–3889. doi:10.1128/mcb.13.7.3882.

Pugh, D., and Cawson, R. A. (1977). The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia* 15, 29–35.

Puri, S., Kumar, R., Chadha, S., Tati, S., Conti, H. R., Hube, B., et al. (2012). Secreted aspartic protease cleavage of *Candida albicans* Msb2 activates Cek1 MAPK signaling affecting biofilm formation and oropharyngeal candidiasis. *PLoS ONE* 7, e46020. doi:10.1371/journal.pone.0046020.

Raghevendran, V., Gombert, A. K., Christensen, B., Kötter, P., and Nielsen, J. (2004). Phenotypic characterization of glucose repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae* using experiments with 13C-labelled glucose. *Yeast* 21, 769–779. doi:10.1002/yea.1136.

Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., and López-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5459–5463. doi:10.1128/aem.68.11.5459-5463.2002.

Ramanan, N., and Wang, Y. (2000). A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* 288, 1062–1064. doi:10.1126/science.288.5468.1062.

Ramírez, M. A., and Lorenz, M. C. (2007). Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryotic Cell* 6, 280–290. doi:10.1128/EC.00372-06.

Ramírez, M. A., and Lorenz, M. C. (2009). The transcription factor homolog CTF1 regulates {beta}-oxidation in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 8, 1604–1614. doi:10.1128/EC.00206-09.

Ramírez-Zavala, B., Mottola, A., Haubenreißer, J., Schneider, S., Allert, S., Brunke, S., et al. (2017). The Snf1-activating kinase Sak1 is a key regulator of metabolic adaptation and in vivo fitness of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 104, 989–1007. doi:10.1111/mmi.13674.

Ramírez-Zavala, B., Reuss, O., Park, Y.-N., Ohlsen, K., and Morschhäuser, J. (2008). Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 4, e1000089. doi:10.1371/journal.ppat.1000089.

Rao, G. R., Sirsi, M., and Ramakrishnan, T. (1962). Enzymes in *Candida albicans*. II. Tricarboxylic acid cycle and related enzymes. *J. Bacteriol.* 84, 778–783.

Rao, K. H., Ghosh, S., Natarajan, K., and Datta, A. (2013). N-acetylglucosamine kinase, *HXK1* is involved in morphogenetic transition and metabolic gene expression in *Candida albicans*. *PLoS ONE* 8, e53638. doi:10.1371/journal.pone.0053638.

Rao, K. H., Ruhela, D., Ghosh, S., Abdin, M. Z., and Datta, A. (2014). N-acetylglucosamine kinase, *HXK1* contributes to white-opaque morphological transition in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445, 138–144. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.123.

Ratnakumar, S., Kacherovsky, N., Arms, E., and Young, E. T. (2009). Snf1 controls the activity of adr1 through dephosphorylation of Ser230. *Genetics* 182, 735–745. doi:10.1534/genetics.109.103432.

Ratnakumar, S., and Young, E. T. (2010). Snf1 dependence of peroxisomal gene expression is mediated by Adr1. *J. Biol. Chem.* 285, 10703–10714. doi:10.1074/jbc.M109.079848.

Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., and Morschhäuser, J. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341, 119–127. doi:10.1016/j.gene.2004.06.021.

Reyna-Beltrán, E., Iranzo, M., Calderón-González, K. G., Mondragón-Flores, R., Labra-Barrios, M. L., Mormeneo, S., et al. (2018). The *Candida albicans ENO1* gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection. *J. Biol. Chem.* 293, 4304–4323. doi:10.1074/jbc.M117.810440.

Rizzo, A., Losacco, A., and Carratelli, C. R. (2013). *Lactobacillus crispatus* modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human β-defensins 2 and 3. *Immunol. Lett.* 156, 102–109. doi:10.1016/j.imlet.2013.08.013.

Robbins, N., Uppuluri, P., Nett, J., Rajendran, R., Ramage, G., Lopez-Ribot, J. L., et al. (2011). Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathog.* 7, e1002257. doi:10.1371/journal.ppat.1002257.

Rodaki, A., Bohovych, I. M., Enjalbert, B., Young, T., Odds, F. C., Gow, N. A. R., et al. (2009). Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 20, 4845–4855. doi:10.1091/mbc.e09-01-0002.

Rodaki, A., Young, T., and Brown, A. J. P. (2006). Effects of depleting the essential central metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase on the growth and viability of *Candida albicans*: implications for antifungal drug target discovery. *Eukaryotic Cell* 5, 1371–1377. doi:10.1128/EC.00115-06.

Rodríguez, A., De La Cera, T., Herrero, P., and Moreno, F. (2001). The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 355, 625–631. doi:10.1042/bj3550625.

Rolland, F., De Winde, J. H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J. M., and Winderickx, J. (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol. Microbiol.* 38, 348–358.

Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2, 183–201. doi:10.1111/j.1567-1364.2002.tb00084.x.

Román, E., Alonso-Monge, R., Gong, Q., Li, D., Calderone, R., and Pla, J. (2009). The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 9, 942–955. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00545.x.

Roy, A., Shin, Y. J., Cho, K. H., and Kim, J.-H. (2013). Mth1 regulates the interaction between the Rgt1 repressor and the Ssn6-Tup1 corepressor complex by modulating PKA-dependent phosphorylation of Rgt1. *Mol. Biol. Cell* 24, 1493–1503. doi:10.1091/mbc.E13-01-0047.

Rubenstein, E. M., McCartney, R. R., Zhang, C., Shokat, K. M., Shirra, M. K., Arndt, K. M., et al. (2008). Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. *J. Biol. Chem.* 283, 222–230. doi:10.1074/jbc.M707957200.

Rubin-Bejerano, I., Fraser, I., Grisafi, P., and Fink, G. R. (2003). Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11007–11012. doi:10.1073/pnas.1834481100.

Rüchel, R., de Bernardis, F., Ray, T. L., Sullivan, P. A., and Cole, G. T. (1992). Candida acid proteinases. *J. Med. Vet. Mycol.* 30 Suppl 1, 123–132.

Ruhnke, M. (2002). "Skin and mucous membrane infection," in *Candida and Candidiasis* (ASM Press), 307–325.

Rui, O., and Hahn, M. (2007). The Botrytis cinerea hexokinase, Hxk1, but not the glucokinase, Glk1, is required for normal growth and sugar metabolism, and for pathogenicity on fruits. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 2791–2802. doi:10.1099/mic.0.2007/006338-0.

Sabina, J., and Brown, V. (2009). Glucose sensing network in *Candida albicans*: a sweet spot for fungal morphogenesis. *Eukaryotic Cell* 8, 1314–1320. doi:10.1128/EC.00138-09.

Saha, P., Yeoh, B. S., Olvera, R. A., Xiao, X., Singh, V., Awasthi, D., et al. (2017). Bacterial Siderophores Hijack Neutrophil Functions. *J. Immunol.* 198, 4293–4303. doi:10.4049/jimmunol.1700261.

Sandai, D., Yin, Z., Selway, L., Stead, D., Walker, J., Leach, M. D., et al. (2012). The evolutionary rewiring of ubiquitination targets has reprogrammed the regulation of carbon assimilation in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *MBio* 3. doi:10.1128/mBio.00495-12.

Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F. C., and Gow, N. A. (1997). A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect. Immun.* 65, 3539–3546.

Santangelo, G. M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282. doi:10.1128/MMBR.70.1.253-282.2006.

Sanz, P., Alms, G. R., Haystead, T. A., and Carlson, M. (2000). Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1321–1328. doi:10.1128/mcb.20.4.1321-1328.2000.

Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K., and Yamaguchi, H. (2009). Candida auris sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol.* 53, 41–44. doi:10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x.

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. *Eukaryotic Cell* 2, 1053–1060. doi:10.1128/ec.2.5.1053-1060.2003.

Schaller, M., Bein, M., Korting, H. C., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., et al. (2003). The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect. Immun.* 71, 3227–3234. doi:10.1128/iai.71.6.3227-3234.2003.

Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., and Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48, 365–377. doi:10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x.

Schaller, M., Korting, H. C., Schäfer, W., Bastert, J., Chen, W., and Hube, B. (1999). Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol. Microbiol.* 34, 169–180.

Schaller, M., Schackert, C., Korting, H. C., Januschke, E., and Hube, B. (2000). Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 114, 712–717. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00935.x.

Schaller, M., Schäfer, W., Korting, H. C., and Hube, B. (1998). Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol. Microbiol.* 29, 605–615.

Schauber, J., Svanholm, C., Termén, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., et al. (2003). Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut* 52, 735–741. doi:10.1136/gut.52.5.735.

Schmidt, M. C., McCartney, R. R., Zhang, X., Tillman, T. S., Solimeo, H., Wölfl, S., et al. (1999). Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4561–4571. doi:10.1128/mcb.19.7.4561.

Schrenzel, J., Serrander, L., Bánfi, B., Nüsse, O., Fouyouzi, R., Lew, D. P., et al. (1998). Electron currents generated by the human phagocyte NADPH oxidase. *Nature* 392, 734–737. doi:10.1038/33725.

Schrevens, S., Van Zeebroeck, G., Riedelberger, M., Tournu, H., Kuchler, K., and Van Dijck, P. (2018). Methionine is required for cAMP-PKA-mediated morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 108, 258–275. doi:10.1111/mmi.13933.

Schüller, H.-J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 43, 139–160. doi:10.1007/s00294-003-0381-8.

Schuurmans, J. M., Boorsma, A., Lascaris, R., Hellingwerf, K. J., and Teixeira de Mattos, M. J. (2008a). Physiological and transcriptional characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains with modified expression of catabolic regulators. *FEMS Yeast Res.* 8, 26–34. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00309.x.

Schuurmans, J. M., Rossell, S. L., van Tuijl, A., Bakker, B. M., Hellingwerf, K. J., and Teixeira de Mattos, M. J. (2008b). Effect of hxk2 deletion and HAP4 overexpression on fermentative capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 8, 195–203. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00319.x.

Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Röllinghoff, M., and Schröppel, K. (2000). The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 38, 435–445.

Schwelberger, H. G., Kohlwein, S. D., and Paltauf, F. (1989). Molecular cloning, primary structure and disruption of the structural gene of aldolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 180, 301–308. doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb14648.x.

Sedivy, J. M., and Fraenkel, D. G. (1985). Fructose bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, disruption and regulation of the FBP1 structural gene. *J. Mol. Biol.* 186, 307–319.

Segal, E. S., Gritsenko, V., Levitan, A., Yadav, B., Dror, N., Steenwyk, J. L., et al. (2018). Gene Essentiality Analyzed by In Vivo Transposon Mutagenesis and Machine Learning in a Stable Haploid Isolate of *Candida albicans*. *MBio* 9. doi:10.1128/mBio.02048-18.

Seguin, F., and Le Pape, A. (1994). 31P and 13C nuclear magnetic resonance studies of macrophages. *Immunomethods* 4, 179–187.

Sellam, A., van het Hoog, M., Tebbji, F., Beaurepaire, C., Whiteway, M., and Nantel, A. (2014). Modeling the transcriptional regulatory network that controls the early hypoxic response in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 13, 675–690. doi:10.1128/EC.00292-13.

Setiadi, E. R., Doedt, T., Cottier, F., Noffz, C., and Ernst, J. F. (2006). Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J. Mol. Biol.* 361, 399–411. doi:10.1016/j.jmb.2006.06.040.

Sexton, J. A., Brown, V., and Johnston, M. (2007). Regulation of sugar transport and metabolism by the *Candida albicans* Rgt1 transcriptional repressor. *Yeast* 24, 847–860. doi:10.1002/yea.1514.

Shapiro, R. S., Robbins, N., and Cowen, L. E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 213–267. doi:10.1128/MMBR.00045-10.

Shapiro, R. S., Uppuluri, P., Zaas, A. K., Collins, C., Senn, H., Perfect, J. R., et al. (2009). Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. *Curr. Biol.* 19, 621–629. doi:10.1016/j.cub.2009.03.017.

Shashkova, S., Wollman, A. J. M., Leake, M. C., and Hohmann, S. (2017). The yeast Mig1 transcriptional repressor is dephosphorylated by glucose-dependent and -independent mechanisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 364. doi:10.1093/femsle/fnx133.

Shepherd, M. G. (1987). Cell envelope of *Candida albicans*. *Crit. Rev. Microbiol.* 15, 7–25. doi:10.3109/10408418709104445.

Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Phan, Q. T., Fu, Y., Ibrahim, A. S., et al. (2004). Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 279, 30480–30489. doi:10.1074/jbc.M401929200.

Shoham, M., and Steitz, T. A. (1982). The 6-hydroxymethyl group of a hexose is essential for the substrate-induced closure of the cleft in hexokinase. *Biochim. Biophys. Acta* 705, 380–384. doi:10.1016/0167-4838(82)90260-6.

Silva, R. C., Padovan, A. C. B., Pimenta, D. C., Ferreira, R. C., da Silva, C. V., and Briones, M. R. S. (2014). Extracellular enolase of *Candida albicans* is involved in colonization of mammalian intestinal epithelium. *Front Cell Infect Microbiol* 4, 66. doi:10.3389/fcimb.2014.00066.

Singh, P., Ghosh, S., and Datta, A. (2001). Attenuation of virulence and changes in morphology in *Candida albicans* by disruption of the N-acetylglucosamine catabolic pathway. *Infect. Immun.* 69, 7898–7903. doi:10.1128/IAI.69.12.7898-7903.2001.

Smallbone, K., Messiha, H. L., Carroll, K. M., Winder, C. L., Malys, N., Dunn, W. B., et al. (2013). A model of yeast glycolysis based on a consistent kinetic characterisation of all its enzymes. *FEBS Lett.* 587, 2832–2841. doi:10.1016/j.febslet.2013.06.043.

Smith, D. A., Nicholls, S., Morgan, B. A., Brown, A. J. P., and Quinn, J. (2004). A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 15, 4179–4190. doi:10.1091/mbc.e04-03-0181.

Sobel, J. D. (1988). Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 544, 547–557. doi:10.1111/j.1749-6632.1988.tb40450.x.

Solomon, P. S., Lee, R. C., Wilson, T. J. G., and Oliver, R. P. (2004). Pathogenicity of Stagonospora nodorum requires malate synthase. *Mol. Microbiol.* 53, 1065–1073. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04178.x.

Srikantha, T., and Soll, D. R. (1993). A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *Gene* 131, 53–60.

Staab, J. F., Bahn, Y.-S., Tai, C.-H., Cook, P. F., and Sundstrom, P. (2004). Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J. Biol. Chem.* 279, 40737–40747. doi:10.1074/jbc.M406005200.

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. doi:10.1126/science.283.5407.1535.

Staib, P., and Morschhäuser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50, 1–12. doi:10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x.

Staniszewska, M., Bondaryk, M., Rabczenko, D., Smoleńska-Sym, G., and Kurzatkowski, W. (2013). Cell wall carbohydrates content of pathogenic *Candida albicans* strain morphological forms. *Med Dosw Mikrobiol* 65, 119–128.

Steffan, J. S., and McAlister-Henn, L. (1992). Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 267, 24708–24715.

Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E., and Ernst, J. F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* 16, 1982–1991. doi:10.1093/emboj/16.8.1982.

Stucka, R., Valdés-Hevia, M. D., Gancedo, C., Schwarzlose, C., and Feldmann, H. (1988). Nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 16, 10926. doi:10.1093/nar/16.22.10926.

Su, C., Li, Y., Lu, Y., and Chen, J. (2009). Mss11, a transcriptional activator, is required for hyphal development in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 8, 1780–1791. doi:10.1128/EC.00190-09.

Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 737–748. doi:10.1038/nrmicro2636.

Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 12, 317–324. doi:10.1016/j.tim.2004.05.008.

Sugita, T., and Nakase, T. (1999). Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus Candida. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 79–86. doi:10.1016/S0723-2020(99)80030-7.

Suh, S.-O., Blackwell, M., Kurtzman, C. P., and Lachance, M.-A. (2006). Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia* 98, 1006–1017.

Sun, J. N., Solis, N. V., Phan, Q. T., Bajwa, J. S., Kashleva, H., Thompson, A., et al. (2010). Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog.* 6, e1001181. doi:10.1371/journal.ppat.1001181.

Sundstrom, P., Balish, E., and Allen, C. M. (2002). Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *J. Infect. Dis.* 185, 521–530. doi:10.1086/338836.

Sutak, R., Lesuisse, E., Tachezy, J., and Richardson, D. R. (2008). Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol.* 16, 261–268. doi:10.1016/j.tim.2008.03.005.

Sutherland, C. M., Hawley, S. A., McCartney, R. R., Leech, A., Stark, M. J. R., Schmidt, M. C., et al. (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr. Biol.* 13, 1299–1305.

Swidergall, M., Ernst, A. M., and Ernst, J. F. (2013). *Candida albicans* mucin Msb2 is a broad-range protectant against antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3917–3922. doi:10.1128/AAC.00862-13.

Swidergall, M., and Ernst, J. F. (2014). Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory. *Eukaryotic Cell* 13, 950–957. doi:10.1128/EC.00093-14.

Swidergall, M., Solis, N. V., Lionakis, M. S., and Filler, S. G. (2018). EphA2 is an epithelial cell pattern recognition receptor for fungal β-glucans. *Nat Microbiol* 3, 53–61. doi:10.1038/s41564-017-0059-5.

Synnott, J. M., Guida, A., Mulhern-Haughey, S., Higgins, D. G., and Butler, G. (2010). Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 9, 1734–1746. doi:10.1128/EC.00159-10.

Szafranski-Schneider, E., Swidergall, M., Cottier, F., Tielker, D., Román, E., Pla, J., et al. (2012). Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides. *PLoS Pathog.* 8, e1002501. doi:10.1371/journal.ppat.1002501.

Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., et al. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1β through HIF-1α. *Nature* 496, 238–242. doi:10.1038/nature11986.

Tao, L., Zhang, Y., Fan, S., Nobile, C. J., Guan, G., and Huang, G. (2017). Integration of the tricarboxylic acid (TCA) cycle with cAMP signaling and Sfl2 pathways in the regulation of CO2 sensing and hyphal development in *Candida albicans*. *PLoS Genet.* 13, e1006949. doi:10.1371/journal.pgen.1006949.

Theiss, S., Ishdorj, G., Brenot, A., Kretschmar, M., Lan, C.-Y., Nichterlein, T., et al. (2006). Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 405–420. doi:10.1016/j.ijmm.2006.03.003.

Thennadil, S. N., Rennert, J. L., Wenzel, B. J., Hazen, K. H., Ruchti, T. L., and Block, M. B. (2001). Comparison of glucose concentration in interstitial fluid, and capillary and venous blood during rapid changes in blood glucose levels. *Diabetes Technol. Ther.* 3, 357–365. doi:10.1089/15209150152607132.

Thevelein, null, Cauwenberg, null, Colombo, null, De Winde JH, null, Donation, null, Dumortier, null, et al. (2000). Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 819–825.

Thevelein, J. M., and de Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33, 904–918.

Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., et al. (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40, 27–36.

Tortorano, A. M., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Kibbler, C. C., Faure, O., et al. (2004). Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 317–322. doi:10.1007/s10096-004-1103-y.

Towle, H. C. (2005). Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 489–494. doi:10.1016/j.tem.2005.10.003.

Treitel, M. A., and Carlson, M. (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by *MIG1*, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3132–3136. doi:10.1073/pnas.92.8.3132.

Tucey, T. M., Verma, J., Harrison, P. F., Snelgrove, S. L., Lo, T. L., Scherer, A. K., et al. (2018). Glucose Homeostasis Is Important for Immune Cell Viability during Candida Challenge and Host Survival of Systemic Fungal Infection. *Cell Metab.* 27, 988-1006.e7. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.019.

Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F., and Soontorngun, N. (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res.* 10, 2–13. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00555.x.

Tzamarias, D., and Struhl, K. (1995). Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev.* 9, 821–831. doi:10.1101/gad.9.7.821.

Uemura, H., and Fraenkel, D. G. (1990). gcr2, a new mutation affecting glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6389–6396. doi:10.1128/mcb.10.12.6389.

Ueno, K., Matsumoto, Y., Uno, J., Sasamoto, K., Sekimizu, K., Kinjo, Y., et al. (2011). Intestinal resident yeast *Candida glabrata* requires Cyb2p-mediated lactate assimilation to adapt in mouse intestine. *PLoS ONE* 6, e24759. doi:10.1371/journal.pone.0024759.

Uhl, M. A., Biery, M., Craig, N., and Johnson, A. D. (2003). Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*. *EMBO J.* 22, 2668–2678. doi:10.1093/emboj/cdg256.

Umezawa, K., Takai, K., Tsuji, S., Kurashina, Y., and Hayaishi, O. (1974). Adenylate cyclase from *Brevibacterium liquefaciens*. III. In situ regulation of adenylate cyclase by pyruvate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 4598–4601. doi:10.1073/pnas.71.11.4598.

Uno, I., Mitsuzawa, H., Matsumoto, K., Tanaka, K., Oshima, T., and Ishikawa, T. (1985). Reconstitution of the GTP-dependent adenylate cyclase from products of the yeast CYR1 and RAS2 genes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7855–7859. doi:10.1073/pnas.82.23.7855.

Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., et al. (2010a). Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog.* 6, e1000828. doi:10.1371/journal.ppat.1000828.

Uppuluri, P., Pierce, C. G., Thomas, D. P., Bubeck, S. S., Saville, S. P., and Lopez-Ribot, J. L. (2010b). The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryotic Cell* 9, 1531–1537. doi:10.1128/EC.00111-10.

Urban, C., Sohn, K., Lottspeich, F., Brunner, H., and Rupp, S. (2003). Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett.* 544, 228–235. doi:10.1016/s0014-5793(03)00455-1.

Ushinsky, S. C., Harcus, D., Ash, J., Dignard, D., Marcil, A., Morchhauser, J., et al. (2002). CDC42 is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 1, 95–104. doi:10.1128/ec.1.1.95-104.2002.

Valdés-Hevia, M. D., de la Guerra, R., and Gancedo, C. (1989). Isolation and characterization of the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 258, 313–316. doi:10.1016/0014-5793(89)81682-5.

Vallier, L. G., and Carlson, M. (1994). Synergistic release from glucose repression by mig1 and ssn mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137, 49–54.

Van den Bossche, J., Baardman, J., Otto, N. A., van der Velden, S., Neele, A. E., van den Berg, S. M., et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep* 17, 684–696. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.008.

Van den Bossche, J., O'Neill, L. A., and Menon, D. (2017). Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol.* 38, 395–406. doi:10.1016/j.it.2017.03.001.

Van Ende, M., Wijnants, S., and Van Dijck, P. (2019). Sugar Sensing and Signaling in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Front Microbiol* 10, 99. doi:10.3389/fmicb.2019.00099.

Vanden Bossche, H. (1985). Biochemical targets for antifungal azole derivatives: hypothesis on the mode of action. *Curr Top Med Mycol* 1, 313–351.

Vanden Bossche, H., Dromer, F., Improvisi, I., Lozano-Chiu, M., Rex, J. H., and Sanglard, D. (1998). Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 36 Suppl 1, 119–128.

Vanden Bossche, H., Marichal, P., Le Jeune, L., Coene, M. C., Gorrens, J., and Cools, W. (1993). Effects of itraconazole on cytochrome P-450-dependent sterol 14 alpha-demethylation and reduction of 3-ketosteroids in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2101–2105. doi:10.1128/aac.37.10.2101.

Vargas, G., Rocha, J. D. B., Oliveira, D. L., Albuquerque, P. C., Frases, S., Santos, S. S., et al. (2015). Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell. Microbiol.* 17, 389–407. doi:10.1111/cmi.12374.

Vega, M., Riera, A., Fernández-Cid, A., Herrero, P., and Moreno, F. (2016). Hexokinase 2 Is an Intracellular Glucose Sensor of Yeast Cells That Maintains the Structure and Activity of Mig1 Protein Repressor Complex. *J. Biol. Chem.* 291, 7267–7285. doi:10.1074/jbc.M115.711408.

Vélot, C., Lebreton, S., Morgunov, I., Usher, K. C., and Srere, P. A. (1999). Metabolic effects of mislocalized mitochondrial and peroxisomal citrate synthases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 38, 16195–16204. doi:10.1021/bi991695n.

Vieira, A., Harrison, R. E., Scott, C. C., Stenmark, H., Alexander, D., Liu, J., et al. (2004). Acquisition of Hrs, an essential component of phagosomal maturation, is impaired by mycobacteria. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4593–4604.

Villar, C. C., Kashleva, H., Nobile, C. J., Mitchell, A. P., and Dongari-Bagtzoglou, A. (2007). Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect. Immun.* 75, 2126–2135. doi:10.1128/IAI.00054-07.

Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., and Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* 15, 1104–1114. doi:10.1101/gad.879301.

Vinces, M. D., and Kumamoto, C. A. (2007). The morphogenetic regulator Czf1p is a DNA-binding protein that regulates white opaque switching in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 2877–2884. doi:10.1099/mic.0.2007/005983-0.

Vylkova, S., Carman, A. J., Danhof, H. A., Collette, J. R., Zhou, H., and Lorenz, M. C. (2011). The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio* 2, e00055-00011. doi:10.1128/mBio.00055-11.

Wächtler, B., Citiulo, F., Jablonowski, N., Förster, S., Dalle, F., Schaller, M., et al. (2012). *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS ONE* 7, e36952. doi:10.1371/journal.pone.0036952.

Wächtler, B., Wilson, D., and Hube, B. (2011). *Candida albicans* adhesion to and invasion and damage of vaginal epithelial cells: stage-specific inhibition by clotrimazole and bifonazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4436–4439. doi:10.1128/AAC.00144-11.

Wagner, R. D., Pierson, C., Warner, T., Dohnalek, M., Farmer, J., Roberts, L., et al. (1997). Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 65, 4165–4172.

Walsh, R. B., Clifton, D., Horak, J., and Fraenkel, D. G. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* null mutants in glucose phosphorylation: metabolism and invertase expression. *Genetics* 128, 521–527.

Walter, J. (2008). Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4985–4996. doi:10.1128/AEM.00753-08.

Wang, L., Cao, H., Liu, L., Wang, B., Walker, W. A., Acra, S. A., et al. (2014). Activation of epidermal growth factor receptor mediates mucin production stimulated by p40, a *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived protein. *J. Biol. Chem.* 289, 20234–20244. doi:10.1074/jbc.M114.553800.

Wang, Y. (2013). Fungal adenylyl cyclase acts as a signal sensor and integrator and plays a central role in interaction with bacteria. *PLoS Pathog.* 9, e1003612. doi:10.1371/journal.ppat.1003612.

Wang, Z.-Y., Thornton, C. R., Kershaw, M. J., Debao, L., and Talbot, N. J. (2003). The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus Magnaporthe grisea. *Mol. Microbiol.* 47, 1601–1612.

Warnock, D. W. (2007). Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 48, 1–12.

Webster, K. A. (2003). Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J. Exp. Biol.* 206, 2911–2922. doi:10.1242/jeb.00516.

Weinberger, M., Leibovici, L., Perez, S., Samra, Z., Ostfeld, I., Levi, I., et al. (2005). Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non-*albicans Candida* species and predictors of mortality. *J. Hosp. Infect.* 61, 146–154. doi:10.1016/j.jhin.2005.02.009.

White, T. C., Marr, K. A., and Bowden, R. A. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 382–402.

Whiteway, M., and Oberholzer, U. (2004). Candida morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 350–357. doi:10.1016/j.mib.2004.06.005.

Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P., and Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 464, 123–128. doi:10.1016/s0014-5793(99)01698-1.

Wilson, W. A., Hawley, S. A., and Hardie, D. G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.* 6, 1426–1434.

Wolfe, K. H., and Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708–713. doi:10.1038/42711.

Wright, L. C., Santangelo, R. M., Ganendren, R., Payne, J., Djordjevic, J. T., and Sorrell, T. C. (2007). Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. *Eukaryotic Cell* 6, 37–47. doi:10.1128/EC.00262-06.

Xu, W., Solis, N. V., Ehrlich, R. L., Woolford, C. A., Filler, S. G., and Mitchell, A. P. (2015). Activation and Alliance of Regulatory Pathways in *C. albicans* during Mammalian Infection. *PLoS Biol* 13. doi:10.1371/journal.pbio.1002076.

Xu, X.-L., Lee, R. T. H., Fang, H.-M., Wang, Y.-M., Li, R., Zou, H., et al. (2008). Bacterial peptidoglycan triggers *Candida albicans* hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase Cyr1p. *Cell Host Microbe* 4, 28–39. doi:10.1016/j.chom.2008.05.014.

Xu, Z., Cao, Y.-B., Zhang, J.-D., Cao, Y.-Y., Gao, P.-H., Wang, D.-J., et al. (2005). cDNA array analysis of the differential expression change in virulence-related genes during the development of resistance in *Candida albicans*. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 37, 463–472. doi:10.1111/j.1745-7270.2005.00063.x.

Yamada-Okabe, T., Sakamori, Y., Mio, T., and Yamada-Okabe, H. (2001). Identification and characterization of the genes for N-acetylglucosamine kinase and N-acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.* 268, 2498–2505. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02135.x.

Ye, L., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A., and van Dam, K. (1999). Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *J. Bacteriol.* 181, 4673–4675.

Young, E. T., Kacherovsky, N., and Van Riper, K. (2002). Snf1 protein kinase regulates Adr1 binding to chromatin but not transcription activation. *J. Biol. Chem.* 277, 38095–38103. doi:10.1074/jbc.M206158200.

Zaragoza, O., Rodríguez, C., and Gancedo, C. (2000). Isolation of the *MIG1* gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J. Bacteriol.* 182, 320–326. doi:10.1128/jb.182.2.320-326.2000.

Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., et al. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 39, 372–385. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.003.

Zhang, P., Wei, D., Li, Z., Sun, Z., Pan, J., and Zhu, X. (2015). Cryptococcal phosphoglucose isomerase is required for virulence factor production, cell wall integrity and stress resistance. *FEMS Yeast Res.* 15. doi:10.1093/femsyr/fov072.

Zhang, Y.-Q., and Rao, R. (2008). A spoke in the wheel: calcium spikes disrupt yeast cell cycle. *Cell Cycle* 7, 870–873. doi:10.4161/cc.7.7.5616.

Zhang, Z., Dmitrieva, N. I., Park, J.-H., Levine, R. L., and Burg, M. B. (2004). High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9491–9496. doi:10.1073/pnas.0402961101.

Zhao, F.-Q., and Keating, A. F. (2007). Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr. Genomics* 8, 113–128.

Zhao, X., Daniels, K. J., Oh, S.-H., Green, C. B., Yeater, K. M., Soll, D. R., et al. (2006). *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology (Reading, Engl.)* 152, 2287–2299. doi:10.1099/mic.0.28959-0.

Zhao, X., Oh, S.-H., Cheng, G., Green, C. B., Nuessen, J. A., Yeater, K., et al. (2004). *ALS3* and *ALS8* represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology (Reading, Engl.)* 150, 2415–2428. doi:10.1099/mic.0.26943-0.

Zhao, X., Oh, S.-H., and Hoyer, L. L. (2007a). Deletion of *ALS5*, *ALS6* or *ALS7* increases adhesion of *Candida albicans* to human vascular endothelial and buccal epithelial cells. *Med. Mycol.* 45, 429–434. doi:10.1080/13693780701377162.

Zhao, X., Oh, S.-H., and Hoyer, L. L. (2007b). Unequal contribution of *ALS9* alleles to adhesion between *Candida albicans* and human vascular endothelial cells. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 2342–2350. doi:10.1099/mic.0.2006/005017-0.

Zhao, X., Oh, S.-H., Yeater, K. M., and Hoyer, L. L. (2005). Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 1619–1630. doi:10.1099/mic.0.27763-0.

Zhu, W., and Filler, S. G. (2010). Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 12, 273–282. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01412.x.

Znaidi, S., Barker, K. S., Weber, S., Alarco, A.-M., Liu, T. T., Boucher, G., et al. (2009). Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryotic Cell* 8, 806–820. doi:10.1128/EC.00002-09.

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Position actuelle des levures du genre Candida au sein du règne des Fungi 19
Figure 2 : Vue d'ensemble des différentes formes morphologiques de *C. albicans*. 22
Figure 3 : Représentation schématique des différents éléments constitutifs de la paroi des levures .24
Figure 4 : Mode d'action des principaux antifongiques. 29
Figure 5 : Les principaux mécanismes de résistance aux antifongiques. 31
Figure 6 : Les cellules épithéliales sont capables de distinguer la forme levure de la forme hyphale par le biais d'une cascade de MAPK bi-phasique. 34
Figure 7 : Signaux extracellulaires et voies de signalisations induisant la transition morphologique chez *C. albicans*. 39
Figure 8 :Les différentes étapes du développement d'un biofilm mature chez *C. albicans* 42
Figure 9 : Mode d'action de la candidalysine *Ca*Ece1p. 45
Figure 10 : Reconnaissance de *C. albicans* par les cellules de l'hôte.. 46
Figure 11 : Stratégies développées par *C. albicans* pour échapper au système immunitaire.....48
Figure 12: Voies de signalisation permettant la perception du glucose chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* 53
Figure 13 : Représentation schématique des différentes étapes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates. 54
Figure 14 : Le pyruvate : un carrefour métabolique 63
Figure 15 : Le cycle de Krebs. 67
Figure 16 : Analyse transcriptomique de la régulation des gènes du métabolisme carboné central par les régulateurs *Ca*Gal4 et *Ca*Tye7 69
Figure 17 : Représentation schématique du métabolisme carboné central et de sa régulation par les régulateurs transcriptionnels Gal4 et Tye7 chez la levure pathogène *C. albicans*.....70
Figure 18 : Représentation schématique de la répression glucose et des principaux acteurs impliqués chez *S. cerevisiae*.....71
Figure 19 : La protéine kinase *Sc*Snf1 : acteur majeur de la répression glucose.....75
Figure 20 :Niches colonisées par C. albicans au sein de l'hôte et les nutriments disponibles. 77
Figure 21 : Vue d'ensemble du métabolisme carboné alternatif mis en place en absence de glucose 79
Figure 22 : La ß oxydation des lipides dans l'hélice de Linen. 80
Figure 23 : Vue d'ensemble du shunt glyoxylate (flèches rouges) et de son interaction avec le cycle TCA 82
Figure 24 : La néoglucogenèse. 85
Figure 25 : Organisation de la région génomique du chromosome R chez *C. albicans*.....99
Figure 26 : Mesure des constantes cinétiques des hexoses kinases chez *C. albicans*.....104
Figure 27 : Analyse transcriptionnelle de l'expression des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* en réponse à la source carbonée.....106
Figure 28 : Analyse de l'expression relative des gènes CaHXK2 et CaGLK1/4 dans les souches sauvages et mutantes de *C. albicans*.....107
Figure 29 : Analyse de l'expression des protéines *Ca*Glk1 et *Ca*Hxk2. 108
Figure 30 : Analyse de la localisation cellulaire de l'hexokinase 2 et de la glucokinase 1.....109
Figure 31 : Analyse du rôle de l'hexokinase 2 et des glucokinases dans le processus de répression glucose 110
Figure 32 : Analyse de l'expression des perméases de forte affinité en réponse au glucose. 111
Figure 33 : Analyse de la croissance des souches sauvages, mutantes et complémentées de *C. albicans* en présence de sources carbonées variées.....114
Figure 34 : Analyse macro et microscopique de la filamentation des différentes souches de *C. albicans*. 116
Figure 35 : Expression relative des gènes *CaHXK2* et *CaGLK1/4* au cours des étapes précoces de la transition morphologique. 117

Figure 36 : L'hexokinase 2 est requise pour faire face aux stress environnementaux.....119
Figure 37 : Croissance des souches sauvages et mutantes de *C. albicans* en condition normoxique et hypoxique.....120
Figure 38 : Rôle de l'hexokinase 2 et des glucokinases dans la réponse à la limitation en dioxygène. 121
Figure 39 : Mesure relative de l'adhésion des mutants glycolytiques. 122
Figure 40 : Mesure relative de l'évolution de la biomasse du biofilm formé par les souches sauvages, mutantes et complémentées de *C. albicans*. 123
Figure 41 : Analyse de la virulence des souches sauvages et mutantes de *C. albicans* en modèle insecte *Galleria mellonella* 125
Figure 42 : Analyse de la virulence des souches sauvage et mutantes de *C. albicans* en modèle macrophage de souris (J774) 126
Figure 43 : L'hexokinase 2 est requise pour le dimorphisme de *C. albicans* à l'intérieur des macrophages 128
Figure 44 : Alignement des séquences protéiques de l'hexokinase 2 de *S. cerevisiae* et de *C. albicans* 78
Figure 45 : Mesure de l'activité glucose kinase dans les différents mutants ponctuels de l'hexokinase 2 80
Figure 46 : Évolution de la concentration en glucose extracellulaire dans un milieu ensemencé avec la souche sauvage ou les mutants ponctuels de l'hexokinase 2. 81
Figure 47 : Plan expérimental ayant permis d'étudier la dynamique de la répression glucose chez la souche sauvage et les mutants ponctuels de l'hexokinase 2. 82
Figure 48 : Analyse du mécanisme de la répression glucose chez la souche sauvage et chez les mutants de l'hexokinase 2.....174
Figure 49 : Analyse de l'expression de la perméase de forte affinité *CaHGT12* en réponse au glucose chez la souche sauvage et les mutants de l'hexokinase 2. 175
Figure 50 : Expression du gène *CaICL1* chez la souche sauvage et délétée du gène *CaMIG1* 177
Figure 51 : Analyse macroscopique de la filamentation des différentes souches de *C. albicans* 178
Figure 52 : Analyse de la virulence des souches sauvages et mutantes de *C. albicans* en modèle insecte *Galleria mellonella* 179
Figure 53 : Analyse de la virulence des souches sauvages et mutantes de *C. albicans* en modèle macrophage de souris (J774). 181
Figure 54 : Expression relative des gènes impliqués dans la détection et le transport du glucose par *C. albicans* après 30 minutes de phagocytose 196
Figure 55 : Expression relative des gènes impliqués dans la métabolisation du glucose après 30 minutes de phagocytose par des macrophages.....197
Figure 56 : Expression relative des gènes impliqués dans l'assimilation des sources carbonées alternatives après 30 minutes de phagocytose 199
Figure 57 : Expression relative des gènes *CaALS3* et *CaHWP1* après 30 minutes de la phagocytose par des macrophages 199
Figure 58 : Vue d'ensemble des reprogrammations métaboliques induites chez la levure *C. albicans* après 30 minutes de phagocytose par les macrophages de souris (J774) 200
Figure 59 : Représentation schématique du module SAT1-flipper 221
Figure 60 : Vue d'ensemble des techniques de « Long Fragment Homology » (LFH) et « Short Fragment Homology » utilisées pour construire des mutants chez *C. albicans* 222
Figure 61 : Représentation schématique du processus de mutagenèse dirigée.....225
Figure 62 : Vérification de l'intégrité des ARNs totaux 228
Figure 63 : Profil général d'une courbe d'amplification obtenu à l'issu de la réaction de qPCR. 230

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux antifongiques utilisés contre les levures et champignons pathogènes de l'Homme. 30
Tableau 2 : Domaine consensus cœur de fixation des hexoses 55
Tableau 3 : Activité hexose kinase mesurées chez les mutants hexokinase de *C. albicans* 103
Tableau 4 : Liste des gènes ciblés dans l'étude de ddPCR et leur fonction dans la cellule. 195
Tableau 5 : Mélange réactionnel et programme PCR utilisés en fonction de l'ADN polymérase choisie. 227
Tableau 6 : Liste des souches utilisées et construites au cours de ce travail. 238
Tableau 7 : Liste des primers utilisés pour construire les souches mutantes ou complémentées de *C. albicans* 240
Tableau 8 : Liste des plasmides utilisés dans cette étude. 240
Tableau 9 : Liste des primers utilisés dans les analyses de qPCR. 241
Tableau 10 : Liste des primers utilisés dans l'étude de transcriptomique ciblée de ddPCR. 242
Tableau 11 : Liste des valeurs obtenues au cours de l'étude de transcriptomique ciblée par ddPCR. 281

Liste des équations

Équation 1 : Formule mathématique caractérisant la droite étalon d'une réaction de qPCR. 230
Équation 2 : Formule mathématique permettant de déterminer l'activité hexose kinase. 232
Équation 3 : Formule mathématique permettant de calculer la concentration en glucose dans un échantillon 233

Gene	Replicates	Yeasts (YP 0.2% glycerol) copies/well	Yeasts + macrophages (RPMI 0.2% glycerol) copies/well	Ratio : Yeasts + macrophages /Yeasts	Mean
CaHGT3	1	11439	12636	1.1	-
	2	ND	ND	-	
CaHGT4	1	1375.31	1597.34	1.16	1.52 (±0.46)
	2	2650.69	1403.44	1.88	
CaHGT9	1	66.45	41.78	0.628	0.80 (±0.24)
	2	59.37	58.2	0.980	
CaHXT10	1	82	456	5.56	5.65 (±0.13)
	2	62	357	5.75	
CaHGT12	1	5.33	230.30	40.06	41.4 (±1.95)
	2	9.4	402.6	42.829	
CaHGT17	1	541	2150	3.97	4.47 (±0.70)
	2	847	4217	4.97	
CaHGT19	1	178.24	218.52	1.22	1.23 (± 0.02)
	2	248	310.21	1.25	
CaHXK2	1	799.20	282.78	0.353	0.54 (± 0.26)
	2	649.50	474.06	0.729	
CaGLK1	1	572.96	759.6	1.32	1.24 (± 0.10)
	2	645.87	759.5	1.17	
CaPFK1	1	3355	4048	1.20	1.25 (±0.07)
	2	3590.26	4720.41	1.31	
CaPDC12	1	308.06	534.01	1.73	1.65 (± 0.11)
	2	387	609.21	1.57	
CaPDX1	1	598.35	948.52	1.903	1.65 (± 0.35)
	2	731.02	1027.31	1.405	
CaCTF1	1	537.50	793.30	1.47	1.42 (± 0.07)
	2	602.49	830.29	1.37	
CaFAT1	1	1818.40	6634.80	3.64	-
	2	ND	ND	-	
CaPXA1	1	806.88	1518.44	1.88	1.86 (± 0.02)
	2	784.62	1446.12	1.84	
CaPXA2	1	1139.91	1541.58	1.35	1.31 (± 0.05)
	2	1348.21	1728.72	1.28	
CaACB1	1	4.62	12.60	2.72	-
	2	ND	ND	-	
CaFAA2-1	1	374.21	571.12	1.52	1.66 (± 0.20)
	2	326.20	593.64	1.81	
CaFAA2-2	1	881.39	1387.30	1.57	1.63 (± 0.09)
	2	710.48	1214.10	1.70	
CaFAA2-3	1	739.76	2426	3.27	2.77 (± 0.70)
	2	850.35	1945.19	2.28	
CaFAA4	1	2389.3	5037.50	2.10	2.06 (± 0.05)
	2	2380.59	4815.78	2.02	

CaFOX3	1	1305.60	2195	1.68	1.42 (± 0.36)
	2	1977.49	2297.07	1.16	
CaICL1	1	2379.83	7970.65	3.34	3.20 (± 0.19)
	2	3004.28	9241.20	3.07	
CaPCK1	1	4914.2	5190.0	1.05	-
	2	ND	ND	-	
CaALS3	1	30874.97	153626.94	4.97	4.49 (± 0.67)
	2	50436.00	202180.50	4.01	
CaHWP1	1	67507.20	158904.42	2.35	-
	2	ND	ND	-	

Tableau 11 : Liste des valeurs obtenues au cours de l'étude de transcriptomique ciblée par ddPCR. Le nom des gènes et le réplicat biologique considéré sont respectivement indiqués dans la première et la seconde colonne. Dans la troisième colonne, figure la quantité de transcrit (en nombre de copies/µl) détectée chez la levure seule cultivée en présence de glycérol 2%. La quatrième colonne indique la quantité de transcrit du gène (en nombre de copie/ µl) détectée chez la levure phagocytée par les macrophages dans un milieu cRPMI contenant 0,2% de glycérol. La dernière colonne, indique le ratio de la quantité de transcrit détectée chez les levures phagocytées par rapport au levure seule et permet de définir le niveau d'induction ou de répression d'un gène.