



HAL
open science

Étude des ARN des vésicules extracellulaires chez *Cryptococcus neoformans*

Adam Taheraly

► **To cite this version:**

Adam Taheraly. Étude des ARN des vésicules extracellulaires chez *Cryptococcus neoformans*. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2024. Français. NNT : 2024UNIP5004 . tel-04927092

HAL Id: tel-04927092

<https://theses.hal.science/tel-04927092v1>

Submitted on 3 Feb 2025

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.

Université Paris Cité

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED 562)

Institut Pasteur

Unité Biologie des ARN des Pathogènes Fongiques

Étude des ARN des vésicules extracellulaires chez *Cryptococcus neoformans*

Par **Adam TAHERALY**

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Dr Guilhem JANBON

Présentée et soutenue publiquement

Le 12/02/2024

Devant un jury composé de :

Richard O'CONNELL	DR	Université Paris-Saclay	Rapporteur
Claire TORCHET	MCU	Sorbonne Université	Rapporteuse
Benoit PALANCADE	DR	Université Paris Cité	Examineur
Odil PORRUA FUERTE	DR	Université Paris Cité	Examinatrice
Olivier GADAL	DR	Université de Toulouse	Examineur
Guilhem JANBON	DR	Université Paris Cité	Dir. de Thèse

Résumé

Étude des ARN des vésicules extracellulaires chez *Cryptococcus neoformans*

Il existe un vaste corpus de littérature décrivant les interactions des cellules microbiennes au sein d'une population, régulant la croissance ou le développement sexuel par exemple. Ces interactions peuvent être directes lorsque les cellules sont en contact les unes avec les autres, mais les cellules peuvent également communiquer sur de grandes distances. La communication cellulaire à courte distance repose souvent sur des signaux peptidiques ou chimiques sécrétés par les cellules émettrices et libérés dans l'espace extracellulaire. Cependant, ce système de communication est généralement moins efficace lorsque les cellules sont éloignées les unes des autres, car les molécules de signalisation se diffusent, se diluent et peuvent être dégradées. Pour contourner ce problème, les cellules peuvent produire une grande quantité de molécules signal, soit elles peuvent inclure ces molécules dans des organelles extracellulaires spécifiques appelées Vésicules Extracellulaires (VE). Les VE sont des nanoparticules à bicouche lipidique sécrétées par les cellules dans l'espace extracellulaire. Chez les mammifères, les VE participent à la communication cellulaire régulant notamment le développement, mais aussi la physiologie normale de l'organisme. Elles peuvent également jouer un rôle positif ou négatif dans des situations pathologiques telles que le cancer, le diabète, etc. Dans la plupart des cas, les ARN ont été identifiés comme les molécules actives porteuses de messages transportés par les VE. Chez les pathogènes fongiques humains, les VE jouent un rôle dans l'intercommunication cellulaire, impactant la résistance aux antifongiques, la formation de biofilm, la transition levure-filament, ainsi que la réplication fongique au sein des macrophages et la virulence. Cependant, les bases physiques des messages échangés et leurs mécanismes d'actions restent largement

inconnus même si, par analogie avec d'autres systèmes, on peut anticiper que certaines molécules d'ARN pourraient jouer un rôle essentiel. Mon projet de thèse était d'étudier les mécanismes de communication intercellulaire médiés par les ARN associés aux VE chez *C. neoformans*. Dans un premier temps, j'ai étudié la structure et la spécificité du transcriptome vésiculaire de *C. neoformans* par rapport au transcriptome cellulaire. J'ai utilisé de nouvelles stratégies de purification des VE pour confirmer que certaines molécules d'ARN leur étaient associées. J'ai ensuite utilisé diverses stratégies de séquençage pour les caractériser. J'ai ainsi démontré la présence de siARN et de tRF dont certains sont enrichis dans les vésicules suggérant un adressage actif de ces molécules vers ces organelles. J'ai aussi mis en évidence la présence de nombreux snoARN. Dans un deuxième temps, j'ai utilisé ces informations pour essayer de mettre au point des essais de communication intercellulaires. Ma première approche consistait à construire une souche émettrice produisant des VE contenant des siARN spécifiques d'un gène rapporteur exprimé par une souche réceptrice. La deuxième stratégie était d'identifier des phénotypes associés à la délétion de snoARN chez *C. neoformans* et de compléter ces phénotypes par l'intermédiaire des VE produites par une souche sauvage. Pour la troisième stratégie, l'idée était de construire des souches émettrices exprimant un ARN guide ciblant un allèle déficient associé à un phénotype dans le génome des cellules réceptrices. La coupure double brin engendrée pourrait alors réparer cet allèle et compléter le phénotype. La plupart des outils nécessaires ont été construits, mais malheureusement, aucune de ces trois stratégies n'a donné de résultats concluants à ce jour. Il reste néanmoins de nombreuses pistes d'amélioration et il est probable que les souches que j'ai construites seront bientôt utiles pour comprendre les mécanismes de communication intercellulaire médiés par les VE ainsi que leur impact sur la biologie et la virulence chez les pathogènes fongiques.

Mots clefs : *Cryptococcus*, Vésicules extracellulaires, ARN, Communication, Transcriptome, Champignon

Abstract

Study of extracellular vesicle RNAs of *Cryptococcus neoformans*

There is a vast body of literature describing the interactions of microbial cells within a population, regulating growth or sexual development for example. These interactions can be direct when cells are in contact with each other, but cells can also communicate over long distances. Short-distance cellular communication often relies on peptide or chemical signals secreted by the transmitting cells and released into the extracellular space. However, this communication system is generally less effective when cells are far apart, as signaling molecules diffuse, dilute, and can be degraded. To get around this problem, cells can produce large quantities of signal molecules, or they can include these molecules in specific extracellular organelles called Extracellular Vesicles (EVs). EVs are lipid bilayer nanoparticles secreted by cells into the extracellular space. In mammals, EVs are involved in cellular communication, regulating both development and normal physiology. They can also play a positive or negative role in pathological situations such as cancer, diabetes, etc. In most cases, RNAs have been identified as the active molecules carrying messages transported by EVs. In human fungal pathogens, EVs play a role in cellular intercommunication, impacting antifungal resistance, biofilm formation, yeast-filament transition, as well as fungal replication within macrophages and virulence. However, the physical basis of the messages exchanged, and their mechanisms of action remain largely unknown even if, by analogy with other systems, we can anticipate that certain RNA molecules could play an essential role. My thesis project was to study the mechanisms of intercellular communication mediated by EV-associated RNAs in *Cryptococcus neoformans*. First, I studied the structure and specificity of the *C. neoformans* vesicular transcriptome in relation to the cellular transcriptome. I used novel EV purification strategies to confirm that certain

RNA molecules were associated with them. I then used various sequencing strategies to characterise them. I demonstrated the presence of siRNAs and tRFs, some of which are enriched in the vesicles, suggesting active addressing of these molecules to these organelles. I also demonstrated the presence of numerous snoRNAs. In a second phase, I used this information to try and develop intercellular communication assays. My first approach was to construct a transmitter strain producing EVs containing siRNAs specific to a reporter gene expressed by a recipient strain. The second strategy was to identify phenotypes associated with the deletion of snoRNAs in *C. neoformans* and complement these phenotypes with EVs produced by a wild-type strain. For the third strategy, the idea was to construct transmitter strains expressing a guide RNA targeting a deficient allele associated with a phenotype in the genome of recipient cells. The resulting double-strand break could then repair this allele and complement the phenotype. Most of the necessary tools have been developed, but unfortunately none of these three strategies has yet produced conclusive results. Nevertheless, there are still many avenues for improvement, and it is likely that the strains I have constructed will soon be useful for understanding EV-mediated intercellular communication mechanisms and their impact on the biology and virulence of fungal pathogens.

Keywords : *Cryptococcus*, Extracellular vesicles, RNA, Communication, Transcriptome, Fungi

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de cette thèse. Je suis particulièrement reconnaissant envers les membres de mon jury, Richard O'Connell et Claire Torchet, mes rapporteurs qui ont gracieusement consacré leur temps à l'évaluation de ce travail, ainsi qu'à Benoit Palancade, Odil Porrua Fuerte et Olivier Gadal, mes examinateurs.

Mes remerciements s'adressent également aux membres bienveillants du comité de suivi de thèse, de nouveau Benoit Palancade, Hilde de Reuse, et à ma tutrice, Laura Gomez Valero, pour leurs conseils avisés.

Je suis infiniment reconnaissant envers mon directeur de thèse, dont l'immense support et les conseils éclairés ont été d'une importance cruciale tout au long de mon parcours au sein du laboratoire. Mes remerciements vont également à Jessie Colin pour sa relecture attentive de ce travail. Je tiens à exprimer ma gratitude envers Jean-Yves Coppée pour son assistance précieuse lors de la construction des librairies. Je remercie également Corinne Maufrais pour son aide lors l'analyse des données de séquençage et plus largement pour son enseignement en bio-informatique. Je souhaite tout particulièrement remercier Frédérique Moyrand pour le généreux partage de ses réactifs et pour avoir orienté mes premiers pas au sein du laboratoire. Plus largement, je remercie tous les membres, passés et présents, de mon laboratoire. Je suis également reconnaissant envers les membres du laboratoire d'Eugène Gladyshev pour leur soutien précieux dans la réalisation de mes expériences. Ce travail n'aurait pas pu être accompli sans le soutien généreux de l'Université Paris Cité et de l'Institut Pasteur, pour lequel je suis très reconnaissant.

Je souhaite exprimer ma gratitude à mes amis pour leur soutien tout au long de ma thèse. Je tiens particulièrement à remercier Sebastian Castro Ramirez d'avoir partagé avec moi cette expérience depuis notre arrivé à

l'Institut Pasteur et pour nos week-ends passés ensemble à travailler sur nos manuscrits respectifs. De même, un merci spécial à mon ami Alexandre Devaux, pour les nombreuses discussions que ce soit de science ou d'autres sujets, pour les voyages passés et à venir, et plus largement pour son soutien et sa loyauté constante.

Je tiens également à remercier les Dr Benoit Brethon et Dr Bertrand Soto pour leurs efforts exceptionnels, sans lesquels cette thèse n'aurait jamais eu lieu.

Enfin, je n'oublie pas de remercier chaleureusement ma mère et mon frère pour leur soutien indéfectible tout au long de ces trois dernières années, et bien au-delà.

Liste des principales abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNInc	ARN long non codant
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
GRASP	Protéine d'empilement et de réassemblage du Golgi
Nt	Nucléotide
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
Pb	Paires de bases
RISC	Complexe de silençage induit par l'ARN
siARN	Petit ARN interférent
snARN	Petit ARN nucléaire
snoARN	Petit ARN nucléolaire
SNORA	snoARN à boîte H/ACA
SNORD	snoARN à boîte C/D
tRF	Fragment d'ARNt
Urea-PAGE	Gel d'électrophorèse polyacrylamide dénaturant à l'urée
VE	Vésicules extracellulaires

Table des matières

RESUME	2
ABSTRACT	4
TABLE DES MATIERES	9
INTRODUCTION	13
LES CHAMPIGNONS	13
EXPLOITATION DES CHAMPIGNONS PAR L'HOMME	13
LE PERIL FONGIQUE	14
LES CHAMPIGNONS PATHOGENES DE L'HOMME	15
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS ET LA CRYPTOCOCCOSE	17
EPIDEMIOLOGIE DE LA CRYPTOCOCCOSE	18
PHYLOGENIE DU GENRE <i>CRYPTOCOCCUS</i>	19
CYCLE DE VIE	21
MECANISME D'INFECTION ET DE DISSEMINATION	24
LES FACTEURS DE VIRULENCE	25
ORGANISATION DU GENOME ET DU TRANSCRIPTOME DE <i>C. NEOFORMANS</i>	29
ADAPTATION DU TRANSCRIPTOME A L'INFECTION	32
LES ARN DANS LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE	33
LE TRANSCRIPTOME EXTRACELLULAIRE	33
LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE	36
ROLES DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE	36
MECANISME D'ECHANGE D'ARN EXTRACELLULAIRE	37
LES VESICULES EXTRACELLULAIRES	38

BIOGENESE DES VESICULES EXTRACELLULAIRES	38
LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE MEDIEE PAR LES VESICULES EXTRACELLULAIRES	39
ROLES PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DES VESICULES EXTRACELLULAIRES	40
LES VESICULES EXTRACELLULAIRES DANS LES INTERACTIONS HOTE-PATHOGENE	41
LES ARN VESICULAIRES	42
LES VESICULES EXTRACELLULAIRES CHEZ LES CHAMPIGNONS PATHOGENES DE L'HOMME	44
ROLES DES VESICULES EXTRACELLULAIRES FONGIQUES	45
LES ARN VESICULAIRES FONGIQUES	48
LE TRANSCRIPTOME VESICULAIRE FONGIQUE	49
OBJECTIFS DE LA THESE	51
RESULTATS.....	54
PARTIE I : LE TRANSCRIPTOME VESICULAIRE CHEZ <i>CRYPTOCOCCUS</i>	54
INTRODUCTION.....	54
I. DES MOLECULES D'ARN SONT ASSOCIEES AUX VE CHEZ <i>C. NEOFORMANS</i>	60
II. ANALYSE DES PETITS ARN ASSOCIES AUX VE DE <i>CRYPTOCOCCUS</i>	64
III. DES SNOARN ET D'AUTRES ARN DE TAILLES MOYENNES SONT ASSOCIES AUX VE.....	70
IV. LES ARN POLYA ASSOCIES AUX VE.....	73
DISCUSSION	74
PARTIE 2 : MISE AU POINT D'ESSAIS DE COMMUNICATION CELLULE-CELLULE CHEZ <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>...	79
INTRODUCTION.....	79
I. DES SIARN COMME VECTEURS DE COMMUNICATION INTERCELLULAIRE	81
II. LES SNOARN COMME VECTEURS DE COMMUNICATION INTERCELLULAIRE.	93
III. UN ESSAI DE COMMUNICATION ARTIFICIEL UTILISANT DES ARN GUIDES.....	99
DISCUSSION	111

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	113
MATERIEL ET METHODES.....	125
GENERAL.....	125
SOUCHES.....	125
MILIEU DE CULTURE	125
PREPARATION DES ECHANTILLONS DE VESICULES EXTRACELLULAIRES	126
QUANTIFICATION DES VE	127
RT-qPCR.....	128
BIO-INFORMATIQUE	129
DESCRIPTION DU TRANSCRIPTOME ET PROTEOME DES VE	129
EXTRACTION D'ARN.....	129
ÉLECTROPHORESE UREA-PAGE.....	130
SEQUENÇAGE D'ARN (< 100 NT)	130
SEQUENÇAGE D'ARN 18-30 NT	130
SEQUENÇAGE D'ARN POLYA.....	132
ALIGNEMENTS ET COMPTAGES DES READS	132
IDENTIFICATION DES ARN.....	133
CONSERVATION DES GENES.....	133
ANALYSE PROTEOMIQUE	134
MISE AU POINT D'ESSAIS DE COMMUNICATION	134
TRANSFORMATION DE <i>C. NEOFORMANS</i>	134
CONSTRUCTION DE SOUCHES	135
MICROSCOPIE A FLUORESCENCE	137
CYTOMETRIE EN FLUX	138
ESSAIS PHENOTYPIQUES	138

TEST DE REVERSION PAR ELECTROPORATION	138
ESSAI DE COMMUNICATION	139
<u>REFERENCES.....</u>	140
<u>TABLE DES FIGURES</u>	166
<u>TABLE DES TABLEUX.....</u>	168
<u>ANNEXES.....</u>	169
COMPARAISON DU TRANSCRIPTOME DE <i>C. NEOFORMANS</i> , <i>C. DENEFORMANS</i> ET <i>C. DEUTEROGATTII</i>	169
LISTE DES SOUCHES	172
LISTE DES OLIGONUCLEOTIDES.....	174
CARTES DES PLASMIDES.....	189
TABLEAU S1 : ABONDANCE DES PROTEINES (IBAQ) EN FONCTION DES FRACTIONS D'UN GRADIENT DE IODIXANOL.	195
TABLEAU S2 : GENES CIBLES PAR DES SIARN DE VE CHEZ <i>C. NEOFORMANS</i>	266
TABLEAU S3 : ANALYSE D'EXPRESSION DIFFERENTIELLE ENTRE LE TRANSCRIPTOME DES PETITS ARN DES VE ET DES CELLULES	271
TABLEAU S4 : MISE A JOUR DE L'ANNOTATION DU GENOME DE <i>C. NEOFORMANS</i> H99 (WALLACE ET AL., 2020)..	276
PUBLICATIONS	295

Introduction

Les champignons

Le règne fongique est d'une diversité considérable, comprenant entre 2,2 et 3,8 millions d'espèces selon les estimations (Hawksworth and Lücking, 2017). Ces champignons participent à l'équilibre de la plupart si ce n'est tous les écosystèmes (Hawksworth and Lücking, 2017). Certains champignons restent microscopiques alors que d'autres forment des structures visibles à l'œil nu. Ainsi, les levures font généralement quelques micromètres de diamètre (Zakhartsev and Reuss, 2018) alors que certaines structures fongiques sont très grandes, voire immenses, comme pour *Armillaria ostoyae* qui forme une structure qui peut s'étendre sur plusieurs hectares (Ferguson et al., 2003). Leurs interactions avec l'environnement en font des acteurs majeurs de leurs écosystèmes. Ils peuvent ainsi être saprophytes, mutualistes ou encore agir comme des parasites (Bahram and Netherway, 2022). Dans l'environnement, les saprophytes jouent un rôle prépondérant dans le renouvellement des matières organiques. Les mutualistes participent à la formation de complexes symbiotiques comme les lichens. Les parasites, quant à eux, jouent un rôle dans la régulation de la population de leurs hôtes (Bahram and Netherway, 2022).

Exploitation des champignons par l'homme

Les champignons ont un impact positif sur nos sociétés modernes (Janbon et al., 2019). Ils font évidemment partie de notre alimentation et participent fortement à l'élaboration d'autres aliments grâce au processus de fermentation qui permet de produire de l'alcool ou de l'acide lactique à partir de sucre (Dashko et al., 2014). Ils sont ainsi utilisés pour travailler et produire divers produits dérivés du lait, de l'alcool, du pain, ou encore des

condiments (Banjara et al., 2015; Sicard, 2022). Ils sont également la source de nombreux composés métaboliques (polysaccharides, pigments) et enzymatiques (amylase, protéinase, lipase, etc.) qui servent dans l'industrie pharmaceutique, la médecine traditionnelle (Chang, 2002) ou pour la production de produits cosmétiques (Sajid, 2018). Ils sont aussi des outils essentiels à de nombreux processus biotechnologiques (Chi et al., 2009).

Le péril fongique

Mais les champignons peuvent également avoir un impact très négatif. Les champignons phytopathogènes ont été de tout temps et restent encore aujourd'hui une menace importante pour notre sécurité alimentaire. Par exemple, au 19^{ème} siècle, le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*) a dévasté les récoltes en Irlande, provoquant une famine catastrophique qui a tué un million de personnes (Yuen, 2021). Aujourd'hui, les champignons détruisent chaque année une grande partie des récoltes dans le monde. Par exemple, *Magnaporthe oryzae* qui provoque la maladie de la pyriculariose du riz est responsable d'environ 30% des pertes de production de riz à l'échelle mondiale (Nalley et al., 2016). *Fusarium oxysporum* pourrait quant à lui détruire l'ensemble de l'industrie bananière dans le monde dans les années à venir (Dita et al., 2018). Le changement climatique et les échanges étendus de faune et flore entre les continents causés par l'activité humaine déclenchent des changements soudains dans l'écologie fongique, parfois associés à un déclin spectaculaire de certaines espèces animales. Ainsi, *Batrachochytrium dendrobatidis* et *B. salamandrivorans* sont responsables du déclin impressionnant d'espèces de grenouilles et de salamandres dans différentes parties du monde, y compris en Europe (Crawshaw et al., 2022). *Pseudogymnoascus destructans* provoque le « White-Nose Syndrome », qui a causé la mort de millions de chauves-souris aux États-Unis et au Canada en 2018 (Drees et al., 2017).

Les champignons pathogènes de l'homme

L'être humain interagit également directement avec de nombreux champignons. Ainsi, environ 600 champignons (*One Health*, 2019) sont associés au microbiome de l'homme. Ce dernier comprend de nombreuses espèces, dont *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.* et *Malassezia spp.* (Caetano et al., 2023). Parmi eux, une centaine de champignons seulement ont acquis les 4 critères qui leur permettent d'être pathogènes pour l'homme. Ces critères sont la capacité de croissance à 37°C, le contournement ou la traversée des barrières biologiques, la lyse et l'absorption des tissus, et la résistance aux systèmes immunitaires (Köhler et al., 2017). Ces pathogènes ordinairement opportunistes peuvent ainsi causer des infections superficielles pouvant devenir chroniques, mais aussi des infections invasives principalement dues à *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* et *Cryptococcus spp.* Il est estimé que près d'un milliard d'infections et près d'1,6 million de morts chaque année sont dues à un champignon (Bongomin et al., 2017). En effet, ces maladies sont particulièrement difficiles à combattre. Il n'existe à ce jour aucun vaccin préventif contre les mycoses (Caballero Van Dyke and Wormley, 2018; Fisher and Denning, 2023). Par ailleurs, la diversité des molécules antifongiques utilisables pour combattre ces maladies chez l'homme est restreinte. Les azoles, les polyènes, les pyrimidines et les échinocandines constituent les seules classes d'antifongiques utilisables comme traitement lors d'une infection (Houšť et al., 2020). De plus, ces antifongiques ont une efficacité limitée et leur utilisation est associée avec l'émergence de souches ou d'espèces résistantes (Ben-Ami and Kontoyiannis, 2021). Ils sont aussi pour certains toxiques et la mortalité des patients affectés par une infection fongique systémique reste très élevée même parmi ceux qui bénéficient des meilleurs traitements. Enfin, ces médicaments ne sont pas toujours disponibles dans les pays pauvres où le besoin est important. On note aussi ces dernières années l'apparition de nouvelles espèces pathogènes. Ainsi, *Candida auris*

est un nouvel agent pathogène fongique hautement résistant aux médicaments qui est apparu en 2009 au Japon et qui s'est répandu dans le monde entier depuis lors (Du et al., 2020). Depuis leur premier diagnostic au Japon, les infections à *C. auris* ont été signalées dans plus de 40 pays et ont entraîné des épidémies difficiles à contrôler chez les patients hospitalisés et dans les établissements de santé, avec un taux de mortalité estimé entre 30 et 60 %. La raison de la récente propagation de *C. auris* dans les hôpitaux et les établissements de soins du monde entier reste inconnue. Certains rapports suggèrent un lien potentiel avec le réchauffement climatique en raison de la plus grande tolérance à la chaleur de cette espèce par rapport à d'autres levures. Les infections fongiques ont pourtant longtemps été négligées, à la fois en termes de financement pour la recherche et d'attention politique et du grand public par rapport à d'autres maladies/pathogènes. Néanmoins, les choses sont peut-être en train de changer. En 2022, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié pour la première fois une liste de priorité (Figure 1) concernant les champignons pathogènes à étudier et combattre (Fisher and Denning, 2023; WHO FFPL, 2022). Nous pouvons espérer que la reconnaissance de certaines espèces pathogènes fongiques d'importance critique ou élevée va changer la perception du grand public, des politiques et des agences de financement vis-à-vis de ces maladies dans le futur.




















Critique	Elevée	Moyenne
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Eumycetoma causative agents	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorales	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffei</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Figure 1 : Liste de priorité des champignons pathogènes publiée par l'OMS en octobre 2022 (traduite depuis WHO FPPL, 2022)

***Cryptococcus neoformans* et la cryptococcose**

Parmi les espèces pathogènes fongiques dont l'étude est considérée comme « critique » par l'OMS en 2022, *C. neoformans* arrive en tête de liste (Fisher and Denning, 2023). Historiquement, *C. neoformans* a été isolé pour la première fois d'une biopsie d'une infection osseuse du tibia, puis en 1895 dans du jus de pêche par Francesco Sanfelice (Rathore et al., 2022). Depuis, sept espèces de *Cryptococcus* pathogènes ont été décrites. *C. neoformans* et *C. deneoformans* affectent principalement les personnes immunodéprimées, tandis que les souches du complexe d'espèces *gattii*

peuvent également toucher les individus immunocompétents (Mitchell et al., 1995).

Epidémiologie de la cryptococcose

Alors que la cryptococcose a longtemps été considérée comme une maladie rare, une augmentation spectaculaire des cas d'infection par *Cryptococcus* a été observée au début des années 80. Cette épidémie est concomitante avec celle du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). L'épidémie de cryptococcose associée au SIDA a atteint son pic en 1992, avant l'introduction de la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) en 1995. Cette diminution des cas a probablement aussi été favorisée par la commercialisation à la même époque d'un nouvel agent antifongique azolé, le fluconazole (Fries and Cox, 2010). Malgré ce déclin, près de 179 000 cas de cryptococcose ont été diagnostiqués en 2020. Parmi ces cas, 152 000 patients avaient développé une cryptococcoméningite entraînant le décès de 112 000 d'entre eux. Globalement, le taux de létalité de la cryptococcose est estimé entre 41 et 61%, et la méningite à *Cryptococcus* est fatale dans 100% des cas en l'absence de traitement. L'épidémiologie de cette maladie est toujours principalement liée à celle du SIDA. Les foyers les plus importants se situent principalement en Afrique subsaharienne, suivie de l'Asie et du Pacifique. La cryptococcose est ainsi responsable de 19% des décès liés au SIDA (Rajasingham et al., 2022; Zhao et al., 2023). En 2022, l'OMS a publié une recommandation de traitement incluant une unique forte dose d'amphotéricine B sous forme liposomale, suivie d'une consolidation de 14 jours avec de la flucytosine et du fluconazole (*Guidelines for Diagnosing, Preventing and Managing Cryptococcal Disease Among Adults, Adolescents and Children Living with HIV*, 2022). Il est important de noter que ce type de traitement, notamment la flucytosine et l'amphotéricine B, n'est pas toujours accessible dans de nombreux pays, principalement en raison d'un coût élevé. Le seul traitement alors disponible est l'utilisation de

fluconazole, qui est souvent peu efficace quand il est utilisé en monothérapie et entraîne souvent le développement de résistances et de tolérances. Par ailleurs, comme pour les autres infections fongiques, ces traitements, même quand ils sont accessibles, restent peu efficaces, expliquant le taux de létalité important associé à cette infection (*Guidelines for Diagnosing, Preventing and Managing Cryptococcal Disease Among Adults, Adolescents and Children Living with HIV, 2022*).

Phylogénie du genre *Cryptococcus*

Les levures du genre *Cryptococcus* sont des basidiomycètes de la sous-division Agaricomycotina et de l'ordre des Tremellales (Figure 2).

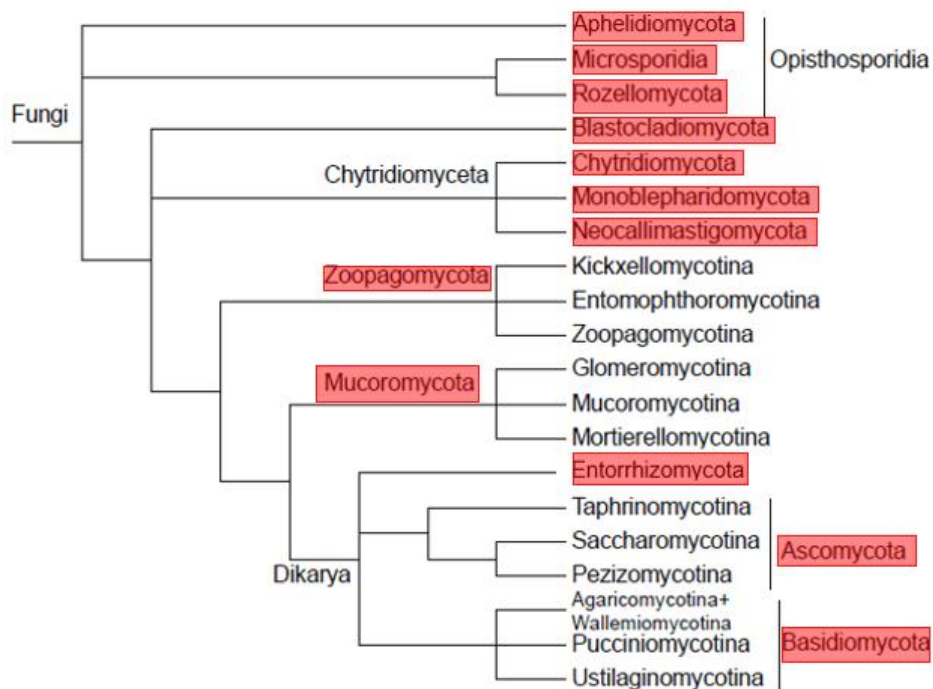


Figure 2 : Arbre phylogénique des champignons (d'après Li et al., 2021)

Les champignons sont regroupés au sein de 12 divisions (en rouge) appartenant à 6 groupes comportant les Dikarya (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, et *Entorrhizomycota*), les Chytridiomycota (*Chytridiomycota*, *Monoblepharidomycota*, et *Neocallimastigomycota*), les Mucoromycota, les Zoopagomycota, les Blastocladiomycota, et les Opisthosporidia (*Aphelidiomycota*, *Cryptomycota/Rozellomycota*, et *Microsporidia*).

Il existe au total 30 espèces de *Cryptococcus* dont, comme dit plus haut, sept sont pathogènes pour l'homme (Gupta et al., 2020). La taxonomie de ces dernières a évolué de nombreuses fois au cours des dernières décennies. Cela est dû à des variations dans les méthodes de dénomination, mais aussi à l'évolution des techniques de référence pour l'identification des espèces. Ainsi, dans un premier temps, les isolats cliniques ont été classés en fonction des propriétés immunogéniques de leur capsule polysaccharidique (sérotypes A, B, C, D). Les souches associées à ces sérotypes ont par la suite été subdivisées et catégorisées en fonction de polymorphismes de l'ADN en utilisant différentes techniques de génotypage (AFLP, RFLP et MLST). En 2015, une taxonomie décrivant 7 espèces a été proposée, sur la base de l'analyse génotypique de 11 loci (Hagen et al., 2015). Elle comprend 2 complexes d'espèces : « neoformans » et « gattii » (Tableau 1). Enfin, une espèce qui n'a pas encore de nom et qui appartient au complexe « gattii » a été décrite en 2019 (Farrer et al., 2019).

Ancienne nomenclature	Clade MLST	Génotype AFLP	Génotype RFLP	Nouvelle nomenclature
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	F	AFLP1	VNI	<i>C. neoformans</i>
	G	AFLP1A	VNB	
	H	AFLP1B	VNII	
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	I	AFLP2	VNIV	<i>C. deneoformans</i>
<i>C. gattii</i>	D	AFLP4	VGI	<i>C. gatti</i>
	C	AFLP5	VGIII	<i>C. bacillisporus</i>
	A	AFLP6	VGII	<i>C. deutero-gattii</i>
	E	AFLP7	VGIV	<i>C. tetra-gattii</i>
	B	AFLP10	VGIV/VGIIIc	<i>C. deca-gattii</i>
	-	-	VGIV	-

<i>C. neoformans</i> intervariété hybride	-	AFLP3	VNIII	<i>C. neoformans</i> ×
				<i>C. deneoformans</i> hybride
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>				<i>C. deneoformans</i>
×	-	AFLP8	-	×
<i>C. gattii</i> AFLP4/VGI hybride				<i>C. gattii</i> hybride
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>				<i>C. neoformans</i>
×	-	AFLP9	-	×
<i>C. gattii</i> AFLP4/VGI hybride				<i>C. gattii</i> hybride
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>				<i>C. neoformans</i>
×	-	AFLP11	-	×
<i>C. gattii</i> AFLP6/VGII hybride				<i>C. deuterogattii</i> hybride

Tableau 1 : Nomenclature des *Cryptococcus spp.* (Hagen et al., 2015 ; Farrer et al., 2019)

La nouvelle classification passe de 3 à 8 espèces. La classification des espèces était anciennement due à la détection de sérotype de la capsule. Aujourd'hui, l'analyse des polymorphismes de l'ADN est la méthode de référence. Cette dernière repose sur trois techniques : MLST (Typage de séquences multilocus), AFLP (Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés), RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction).

Cycle de vie

Les levures du genre *Cryptococcus* sont des champignons vivant dans l'environnement. Elles peuvent être isolées de fientes d'oiseaux, d'échantillons de sols ou bien de débris de bois (Nielsen et al., 2007). Ce

sont des levures hétérothalliques dont la taille varie de 3 à 10 μm (Zaragoza et al., 2010). Ces levures se multiplient principalement par bourgeonnement, mais elles possèdent aussi un cycle sexuel. En effet, il existe deux types sexuels chez *Cryptococcus* caractérisés au niveau génomique par un locus *MAT_a* ou *MAT_α*. Ce locus dont la séquence est spécifique de chaque type sexuel s'étend sur plus de 100 kb et comprend les gènes codant les phéromones, les récepteurs impliqués dans leur reconnaissance, des gènes codant des facteurs de transcription à homéodomaine qui régulent le processus de reproduction, ainsi que des gènes codant des kinases impliquées dans les voies de transduction régulant la reproduction sexuée. Certaines conditions de stress telles qu'une faible concentration en azote associée avec une faible hydratation peuvent initier le processus de reproduction sexuée (Kwon-Chung, 1975). Cette reproduction sexuée contribue à la diversification des espèces et conduit, après méiose, à la production de basidiospores qui peuvent être soit *MAT_a* soit *MAT_α* (Figure 3). De façon étonnante, *C. neoformans* est aussi capable de produire des basidiospores en l'absence d'un partenaire sexuel (Figure 3). Cette reproduction unisexuée nécessite aussi une méiose et est induite par les mêmes conditions que la reproduction sexuée classique (Feretzaki and Heitman, 2013). Les spores issues de ces deux types de reproduction peuvent permettre une propagation aérienne de l'espèce. La taille de ces basidiospores (1-2 μm de diamètre) ainsi que leur forme faciliteraient l'infection et notamment la pénétration dans les alvéoles pulmonaires des patients (Velagapudi et al., 2009). Il est important de noter que les études de génomique des populations de *C. neoformans* au niveau mondial suggèrent un mode de reproduction principalement clonal. Il existe en fait très peu d'isolats de mating type **a** dans la nature, leur présence étant restreinte à certaines régions d'Afrique (Litvintseva et al., 2003).

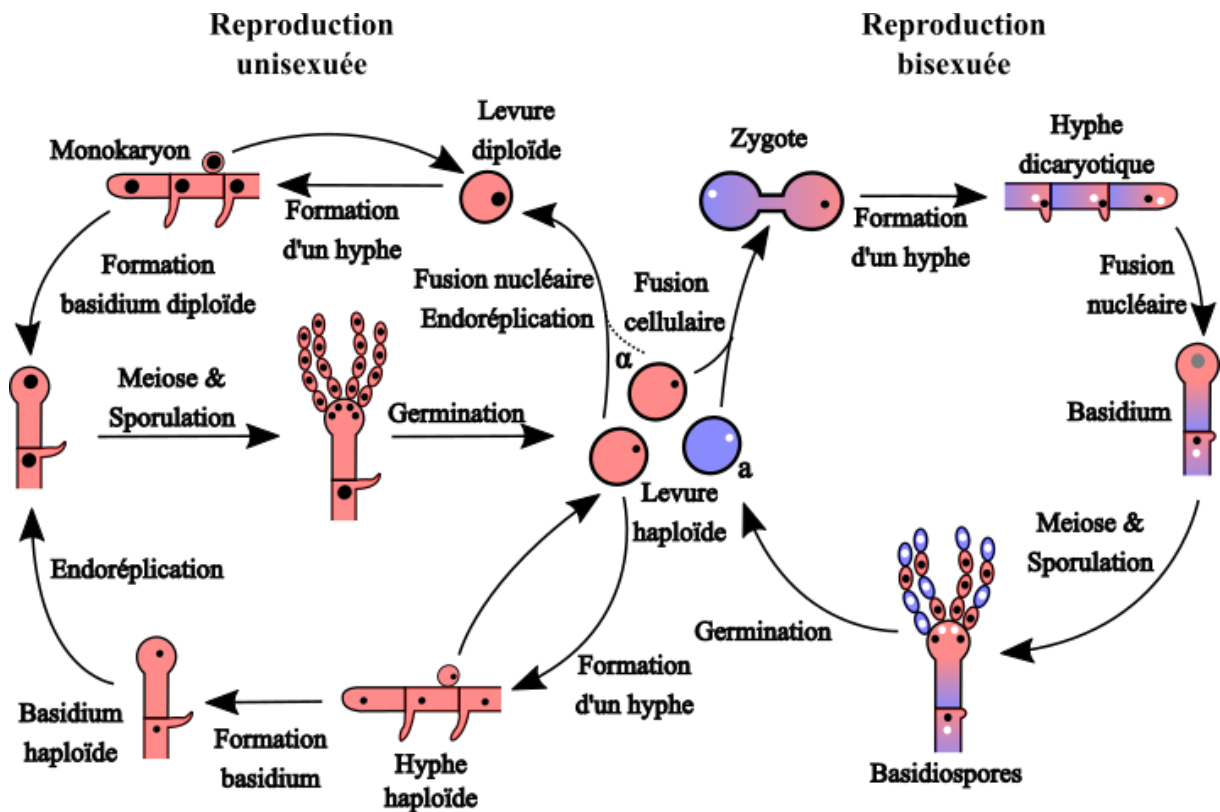


Figure 3 : Cycle simplifié de reproduction unisexuée et bisexuée chez *Cryptococcus neoformans* (adaptée de Zhao et al., 2019)

Durant la reproduction bisexuée, et sous l'action des phéromones, une levure MAT α va produire un shmoo conduisant à une fusion cellulaire avec une levure MAT α . Le zygote ainsi formé présente les deux noyaux des levures parentales. Des mitoses successives des deux noyaux associés à la formation de connexions en clamp permettent la formation d'un hyphe dicaryotique. Une fusion nucléaire au niveau de son septum le plus extrême conduit à la formation d'un basidium diploïde. Le noyau entre alors dans des phases successives de méiose puis de mitose associée à la sporulation. Ce processus conduit à la formation d'un nombre égal de basidiospores haploïdes de type MAT α et MAT α . De façon similaire, la reproduction unisexuée peut, soit par endoréplication d'une levure soit par fusion cellulaire et nucléaire de deux levures du même type sexuel, conduire à la formation d'une levure diploïde. Cette levure diploïde peut changer de morphologie pour donner un hyphe monokaryotique diploïde à clamp non fermé qui donnera un basidium. D'une autre façon, une levure peut d'abord former un hyphe haploïde à clamp non fermé, puis un basidium qui, par endoréplication, devient diploïde. Ce basidium entre en méiose pour produire des noyaux haploïdes qui entrent en mitose. La sporulation produit des basidiospores d'un unique type sexuel qui par germination peuvent former une levure. De plus, des spores peuvent également se former au cours de la formation des hyphe.

Mécanisme d'infection et de dissémination

Le modèle accepté aujourd'hui veut que l'infection par *Cryptococcus* débute par l'inhalation de cellules desséchées ou de basidiospores (1-2 μm) qui peuvent pénétrer profondément dans les poumons. Comme *Cryptococcus* est un champignon très commun dans l'environnement, une grande proportion des enfants sont infectés très tôt dans leur vie comme le montre une étude menée sur de jeunes New-Yorkais (Goldman et al., 2001). Le même modèle suggère que lorsque les cellules de *Cryptococcus* entrent en contact avec les cellules dendritiques ou les macrophages alvéolaires, elles sont généralement éliminées. Néanmoins, elles peuvent parfois provoquer une infection bénigne chez l'enfant avant d'entrer dans un état de dormance (Bicanic and Harrison, 2004). L'existence d'une forme dormante de l'infection est soutenue par des observations histologiques et épidémiologiques. En effet, une étude de 1999 a démontré que des souches de patients nés en Afrique, mais ayant développé une cryptococcose en France sans être retournés dans leur pays d'origine depuis parfois plusieurs années avaient un type génomique « Africain » suggérant une acquisition de la souche infectieuse ancienne (Garcia-Hermoso et al., 1999). Par ailleurs, dans de rares cas, des biopsies pulmonaires ont révélé la présence de *Cryptococcus* chez des patients n'étant pas atteints de cryptococcose. L'hypothèse la plus admise à ce jour est que les levures dormantes se cachent à l'intérieur de macrophages. En effet, des expériences in vitro ont montré que les cellules de *Cryptococcus* sont capables de survivre dans le phagolysosome après la phagocytose, échappant ainsi aux défenses immunitaires de l'organisme (Feldmesser et al., 2000). En cas d'immunodépression, les levures peuvent se multiplier et provoquer d'abord une pneumopathie. Elles se disséminent ensuite dans tout le corps par voie sanguine et affectent d'autres organes, y compris le système nerveux central (Figure 4). Trois mécanismes de traversée de la barrière hématoencéphalique par les cellules de *Cryptococcus* ont été observés : la

paracytose, la transcytose et la stratégie du "cheval de Troie". Dans ce dernier cas, les monocytes servent de moyen de transport pour le pathogène (Charlier et al., 2009). Cette infection du système nerveux central entraîne une méningite ou une méningoencéphalite qui est souvent fatale (Chang et al., 2004).

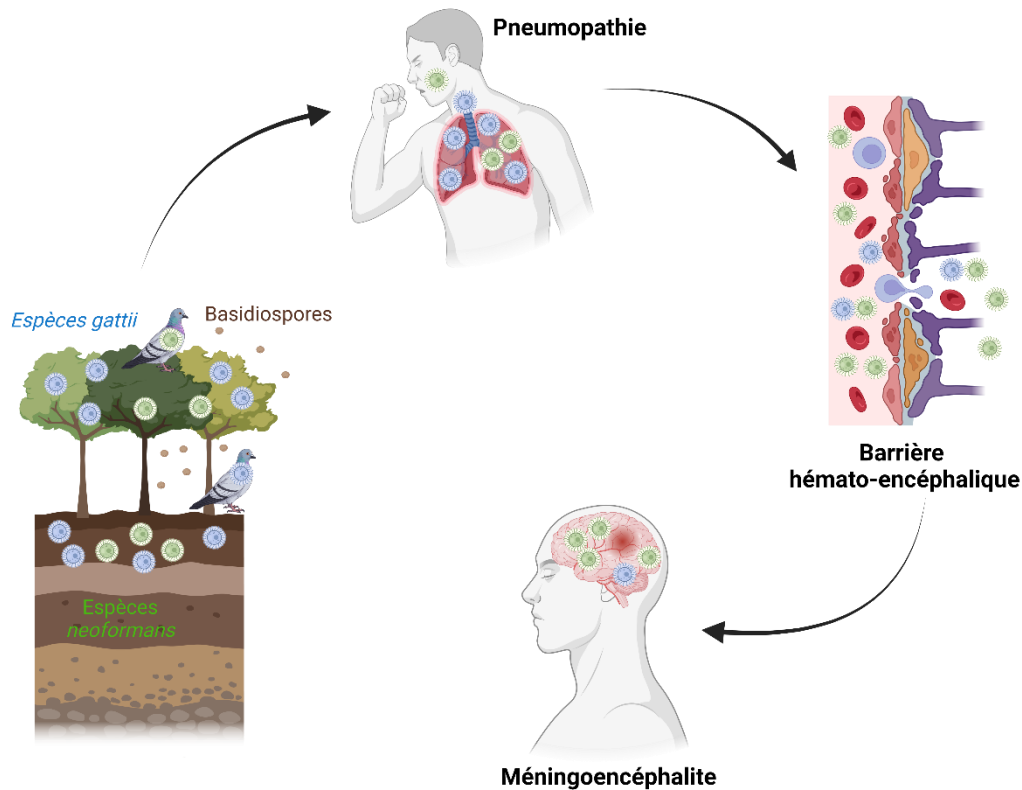


Figure 4 : Processus d'infection par les levures des espèces du complexe neoformans (vert) et gattii (bleue)

L'inhalation de cellules desséchées ou de basidiospores conduit à la prolifération du champignon dans les poumons des personnes immunodéprimées pour les espèces du complexe « neoformans » et des personnes immunocompétentes pour celles du complexe « gattii ». L'infection des poumons conduit à une pneumopathie. Les levures du complexe « neoformans » peuvent aussi infecter le reste de l'organisme en passant par le sang. Elles ont cependant un fort tropisme pour le cerveau qu'elles peuvent infecter après traversée de la barrière hématoencéphalique. Les levures provoquent alors une méningoencéphalite qui est très souvent fatale.

Les facteurs de virulence

La virulence de *Cryptococcus* est médiée par différents facteurs. Le facteur de virulence principal est sa capsule polysaccharidique. Elle entoure la paroi

cellulaire et protège le champignon contre la phagocytose. Elle est aussi nécessaire à la survie intracellulaire de *Cryptococcus*. Les souches mutantes acapsulaires sont avirulentes dans un modèle murin de cryptococcose. La capsule peut être révélée par coloration négative à l'encre de Chine (Figure 5). Elle est composée principalement par un très grand polysaccharide (1 MDa) nommé glucuronoxylomannane (GXM), dont le squelette repose sur une chaîne d' α -1-3 mannose branché de résidus xylose, acide glucuronique et O-acétyl. C'est la structure de ce polysaccharide et la diversité de ses branchements qui est à l'origine de l'antigénicité des souches de *Cryptococcus* et donc de leur classement par sérotypes (Janbon, 2004). Un deuxième polysaccharide plus petit et moins abondant est aussi présent. Il est formé d'une chaîne de galactose branché de résidus xylose et acide glucuronique. Il est nommé glucuronoxylomannogalactane (GXMGal). La production de la capsule est induite par le sérum, le manque de fer et un changement de concentration en CO₂ (Janbon, 2004). Elle protège également contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Kozel and Gotschlich, 1982; Zaragoza et al., 2008). De plus, la capsule régule la sécrétion de cytokines, l'apoptose des macrophages, ainsi que l'activation et la maturation des cellules dendritiques (Li et al., 2018; Retini et al., 1996; Villena et al., 2008). La synthèse de mélanine est le deuxième facteur de virulence de *Cryptococcus*. Ce pigment brun et hydrophobe est synthétisé à partir de précurseurs exogènes de catécholamines et peut être visualisé dans un milieu en contenant (Figure 5) (Pukkila-Worley et al., 2005). Sa synthèse dépend de l'activité de deux laccases Lac1 et Lac2. Les isolats produisant moins de mélanine présentent une virulence réduite et sont plus sensibles aux antifongiques (Ikeda et al., 2003; Kwon-Chung et al., 1982). La mélanine est généralement considérée comme un antioxydant et son effet protecteur s'explique par sa capacité à antagoniser les radicaux libres produits par le système immunitaire (Rathore et al., 2022). Elle contre ainsi la réponse immunitaire de l'hôte. Elle favorise la croissance fongique dans les poumons et la dissémination dans le cerveau. En plus de ces deux

facteurs de virulence majeurs, *Cryptococcus* produit un certain nombre d'enzymes qui lui permettent de se multiplier et/ou de résister dans l'environnement qu'est le corps humain. Ainsi, diverses phospholipases et protéases ont été identifiées comme ayant un impact sur la virulence de *Cryptococcus* (Cox et al., 2001; Xu et al., 2014). Par ailleurs, les levures du genre *Cryptococcus* produisent des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), des catalases et la glutathione peroxydase (GPX) (*Guidelines for Diagnosing, Preventing and Managing Cryptococcal Disease Among Adults, Adolescents and Children Living with HIV*, 2022; Kim et al., 2021; Missall et al., 2005; Peng et al., 2018). L'uréase produite par *Cryptococcus* semble elle aussi avoir un rôle antioxydant (Singh et al., 2013).

Enfin, *Cryptococcus* peut présenter différentes morphologies qui sont adaptées à diverses étapes de sa pathogénèse. Comme indiqué précédemment, les basidiospores sont aéroportées et ont un fort pouvoir de dissémination. De plus, leur petite taille permet au pathogène de pénétrer profondément dans les poumons. Une fois à l'intérieur de l'hôte, la forme levure est privilégiée. Il existe également une forme filamenteuse aidant à la survie contre les prédateurs tels que les amibes et favorisant l'accès aux nutriments dans l'environnement, mais elle n'est pas aussi cruciale pour l'infection (Lin, 2009). Lors de l'infection pulmonaire, *Cryptococcus* est capable de produire des cellules de très grandes cellules (10- 100 µm) appelées cellules Titans (Dambuza et al., 2018). Ces cellules multiploïdes sont résistantes à la phagocytose par les macrophages. Plus récemment, il a été démontré que *Cryptococcus* pouvait dans certaines conditions produire de toutes petites cellules appelées « seed » ou « tiny » selon les publications. Ces cellules semblent être propices à la dissémination extrapulmonaire en raison de leur petite taille et d'une présentation accrue de mannose à leur surface qui pourrait accroître les interactions avec le système immunitaire (Denham et al., 2022; Y. Zhao et al., 2019).

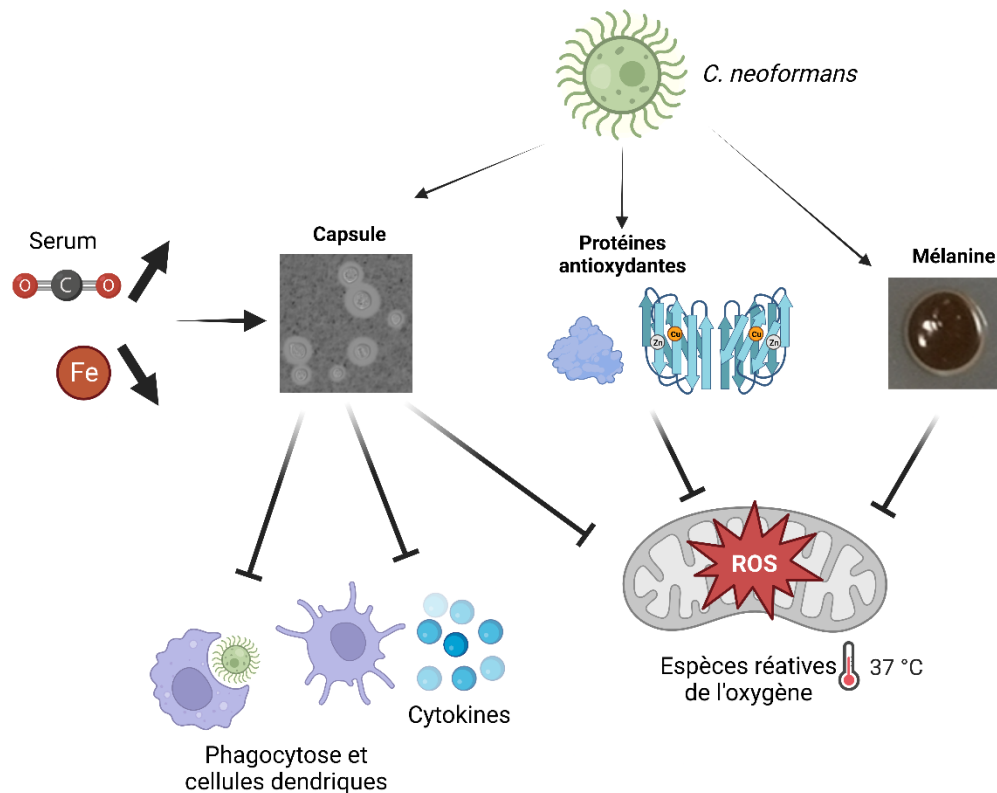


Figure 5 : Réponse aux stress environnementaux lors de l'infection et expression de facteurs de virulence

La production d'une capsule (observation par microscopie après coloration à l'encre de chine), induite par de faibles concentrations en fer, le sérum et de fortes concentrations en CO₂, inhibe la phagocytose, accroît la survie à l'intérieur des macrophages et altère la production de cytokines. De plus, la température corporelle stimulerait chez *C. neoformans* la production d'espèces réactives de l'oxygène susceptibles d'endommager l'ADN. *C. neoformans* produit donc des protéines antioxydantes (SOD, catalase, peroxydase) et de la mélanine qui jouent un rôle antioxydant.

Une approche utilisée ces dernières années pour mieux comprendre le rôle de ces facteurs de virulence sur la pathogénicité de *Cryptococcus* a été de produire des souches mutantes et d'étudier leur virulence et leurs interactions avec l'hôte. Pour permettre de produire des collections de souches mutantes, un préalable était de connaître la structure du génome de *Cryptococcus*. Un grand travail de séquençage et d'annotation a ainsi été entrepris ces dernières années et les principaux résultats obtenus sont résumés dans les paragraphes suivants.

Organisation du génome et du transcriptome de *C. neoformans*

Le génome de *C. neoformans* se compose de 14 chromosomes, représentant une taille totale de 18,9 Mb (Janbon et al., 2014). L'organisation des génomes des autres espèces de *Cryptococcus* pathogènes est très similaire. Par exemple, *C. neoformans* et *C. deneoformans* partagent 89% d'identité de séquence avec *C. deuterogattii* même si plusieurs réarrangements chromosomiques ont remodelé l'organisation de ces chromosomes au cours de l'évolution (Janbon et al., 2014). Plusieurs régions remarquables sont communes à toutes les espèces de *Cryptococcus*. Nous avons parlé du locus mating type qui s'étend sur plus de 100 kb. On peut aussi citer les répétitions d'ADNr que l'on retrouve sur le chromosome 2 de *C. neoformans*. En 2018, un séquençage à longue lecture a permis un assemblage précis des régions centromériques (Yadav et al., 2018). Ces dernières ont une taille comprise entre 31.416 pb (chromosome 12) et 64.835 pb (chromosome 11). Les centromères de *C. neoformans* sont principalement composés de transposons ou bien de fragments de ces derniers. Ils sont plus étendus chez *C. neoformans* (44 kb) et *C. deneoformans* (62 kb) que chez *C. deuterogattii* (14 kb). Cette réduction chez *C. deuterogattii* est associée à la perte de certains composants de l'ARNi, également observée dans d'autres espèces du genre *Ustilago* (Lax et al., 2020). La production d'ARN interférents est considérée comme le mécanisme principal d'inhibition de l'expression des transposons chez *C. neoformans* et *C. deneoformans*. La perte de cette voie est donc associée, soit à la perte de transposons actifs, soit a pu conduire à l'expression de transposons au niveau des centromères, entraînant des recombinaisons qui raccourcissent les centromères et altèrent l'intégrité de ces transposons, les rendant inactifs (Yadav et al., 2018). Ces assemblages des génomes de *Cryptococcus* dits « telomere to telomere » ont permis

aussi de mieux caractériser les régions subtélomériques qui sont des régions fortement enrichies en gènes impliqués dans le métabolisme primaire et des régions d'échange d'ADN particulièrement actives (Gröhs Ferrareze et al., 2021). Le génome de *C. neoformans* est très compact. 6795 gènes codants et 1414 long ARN non codants (ARNlnc) y ont été annotés. Des résultats similaires ont été obtenus chez *C. deneoformans* et *C. deuterogattii* (Gonzalez-Hilarion et al., 2016; Gröhs Ferrareze et al., 2021; Janbon et al., 2014; Wallace et al., 2020). Ces ARN non codants incluent les ARN ribosomiques (ARNr) et 159 ARN de transfert (ARNt) (Wallace et al., 2020). Les autres ARN non codants sont moins bien annotés, mais un grand nombre d'entre eux semblent être antisens de gènes codants (Kalem and Panepinto, 2022).

Le développement des techniques de séquençage à haut débit a permis de multiplier les données RNA-Seq et d'améliorer ainsi l'annotation des génomes de référence (Figure 6). Ainsi diverses stratégies de construction des « bibliothèques » utilisées pour le séquençage (RNA-Seq, 3'UTR-Seq, TSS-Seq, Long reads) ainsi que l'utilisation d'ARN extraits de cellules dans diverses conditions de culture, ont permis d'établir une annotation détaillée des génomes de *C. neoformans*, *C. deneoformans* et *C. deuterogattii* (Gonzalez-Hilarion et al., 2016; Gröhs Ferrareze et al., 2021; Janbon et al., 2014; Wallace et al., 2020) .

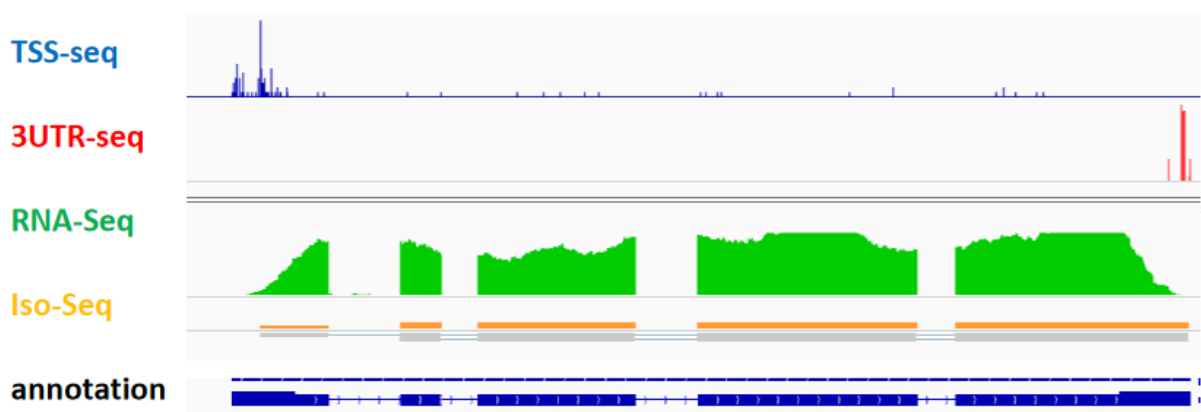


Figure 6 : Diverses stratégies de séquençage ont été utilisées pour annoter le génome de *Cryptococcus*

Exemple de données obtenues au locus d'un gène codant de Cryptococcus. Les données sont visualisées avec IGV (Robinson et al., 2011). L'annotation déduite de ces données de séquençage est donnée.

Ceci a permis de produire une représentation schématique de ce qu'est un gène codant typique chez *Cryptococcus* (Figure 7). En moyenne, les gènes ont une taille d'environ 2305 pb (avec une médiane de 2008 pb) et possèdent des régions non traduites (UTR) 5'UTR et 3'UTR d'une longueur médiane de 105 pb et 127 pb respectivement (Wallace et al., 2020). Les gènes de *Cryptococcus* sont surtout caractérisés par leur richesse en introns. En moyenne, on trouve 5,7 introns par gène et 3,35 introns par kilobase de séquence codante (Janbon et al., 2014). Ces chiffres diffèrent considérablement de ceux de *S. cerevisiae*, où seulement 10% des gènes possèdent un intron. Dans le règne fongique, la proportion de gènes présentant des introns varie en fonction des espèces, allant de 2,5% chez *C. glabrata* à 99% chez *C. neoformans*. Cette réduction généralisée d'introns chez les Saccharomycotina s'accompagne d'une faible conservation de plusieurs facteurs du spliceosome (Sales-Lee et al., 2021). Chez *C. neoformans*, les introns sont très courts, avec une longueur moyenne de 65 nucléotides (Figure 7). On trouve aussi des introns dans les UTR des gènes codants ; 887 5'UTR et 429 3'UTR contiennent au moins un intron chez cette levure. Ces derniers sont en moyenne plus longs que ceux présents dans la région codante (118,3 nucléotides). De même, 60% des ARNnc contiennent au moins un intron (Kalem and Panepinto, 2022). Ces introns et leur épissage sont une source de plasticité pour le transcriptome cellulaire comme nous allons le voir, mais c'est aussi un moyen de contrôle de l'intégrité du génome (Bonnet et al., 2017). Ainsi, Bonnet et collègues ont montré que la présence d'introns dans les gènes de levures et en particulier chez *C. neoformans* était un moyen de contrôler la formation de R-loop et donc de limiter l'apparition de mutations. Par ailleurs, l'équipe de Hiten Madhani aux Etats-Unis a montré qu'un épissage lent notamment au niveau des ARN codant des transposons entraîne la dégradation de ces derniers par un complexe nucléaire nommé SCANR qui contient les

protéines de la voie des ARNi Ago1 et Rpd1, empêchant ainsi la dissémination de ces éléments génétiques dans le génome (Dumesic et al., 2013).

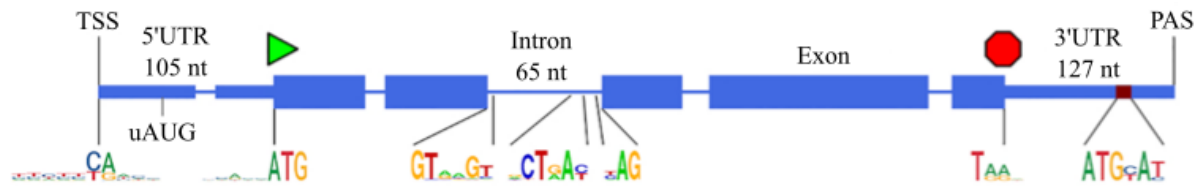


Figure 7 : Représentation consensuelle d'un gène de *C. neoformans* H99 (adapté de Wallace et al., 2020)

Les motifs consensuels des sites d'initiation de la transcription (TSS), du codon start, des motifs d'épissage, du codon stop et du site de polyadénylation (PAS) sont présents sous forme de logos. La taille médiane des régions 5'UTR, introniques et 3'UTR sont également indiquées.

En plus de permettre d'annoter le plus précisément possible les génomes des *Cryptococcus*, ces données de séquençage d'ARN ont permis de mieux appréhender la dynamique structurale et la plasticité du transcriptome.

Adaptation du transcriptome à l'infection

Au cours de l'infection, la levure est soumise à un environnement hostile auquel elle doit s'adapter. En effet, la température augmente, de même que le CO₂, la quantité de nutriments est restreinte et la levure est soumise à des agressions par le système immunitaire. Quelques études transcriptomiques sur des modèles ex vivo, mais aussi in vivo dans des modèles d'infection chez le lapin ou la souris, ont été réalisées (Chen et al., 2014; Fan et al., 2005; Freitas et al., 2022; Hu et al., 2008). De manière générale, que ce soit en présence de macrophages murins ou dans les poumons, les cellules tendent à surexprimer des gènes de résistance au stress, ceux nécessaires à la prolifération cellulaire et à l'adaptation morphologique, et bien sûr ceux associés aux facteurs de virulence (Fan et al., 2005; Freitas et al., 2022; Hu et al., 2008). Par exemple, une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des glucides, la résistance au stress oxydant et la synthèse de la capsule est

observée chez les levures provenant des poumons de souris après 10 jours d'infection par rapport aux levures après 6 heures (Freitas et al., 2022). Un profil différent est retrouvé chez les levures isolées du liquide cébrospinal de patients infectés (Chen et al., 2014). Ainsi, le transcriptome et sa régulation sont des éléments permettant une adaptation du pathogène à son environnement et au contexte pathogénique. Pourtant alors que l'étude du transcriptome cellulaire de *Cryptococcus* a été détaillée y compris grâce à de nombreuses études développées au sein de mon laboratoire (Dang et al., 2023; Gröhs Ferrareze et al., 2021; Janbon et al., 2014; Wallace et al., 2020), l'étude des molécules d'ARN sécrétées par les cellules dans différentes conditions, y compris au cours de l'infection, reste encore très préliminaire et la structure du transcriptome extracellulaire de *Cryptococcus* est très mal connue.

Les ARN dans la communication intercellulaire

Le transcriptome extracellulaire

L'étude de la structure des transcriptomes extracellulaires, de leur plasticité et de leur rôle chez les organismes vivants est un sujet d'étude en pleine expansion y compris chez l'humain (Hulstaert et al., 2020). Pendant longtemps, il a été estimé que les ARN ne pouvaient exister qu'au niveau intracellulaire. En effet, ces derniers sont particulièrement instables en raison de la présence d'ARNases dans l'environnement (Tosar et al., 2021). Pourtant, la présence d'ARN extracellulaires (ARNex) avait été mise en évidence depuis plusieurs décennies. Ainsi, en 1972, des ARN présents dans le milieu de culture de fibroblastes 3T3 avaient été identifiés (Kolodny, 1972), même si les modalités de libération de ces ARNex n'avaient pas été décrites. Plus récemment, de nombreuses publications ont décrit la

présence d'ARN dans le milieu extracellulaire (Chai et al., 2023). Parmi les ARNex, on retrouve l'ensemble des familles de transcrit connues. Ces derniers incluent des ARNm, mais aussi des ARN non codants (ARNnc), dont des ARN de transfert (ARNt) et leurs fragments (tRFs), des petits ARN interférents (siARN, miARN), des petits ARN nucléolaires (snoARN) et nucléaires (snARN), des ARN ribosomiques (ARNr) et leurs fragments (rRF). La présence d'ARN dans le milieu extracellulaire suggère l'existence de mécanismes de stabilisation et de protection de ces molécules contre les ARNases. Trois grandes voies de stabilisation non mutuellement exclusives ont été identifiées (Figure 8). Les ARN peuvent être associés en complexe avec d'autres molécules souvent des protéines (ribonucléoprotéines). Ainsi, l'association des petits ARN interférents (siARN et miARN) avec la protéine argonaute AGO2 permet de protéger ces ARN chez l'homme (Arroyo et al., 2011; Wang et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré que le nématode *Heligmosomoides bakeri* sécrète dans des vésicules extracellulaires des siARN secondaires (produits par une ARN polymérase dépendante de l'ARN) associés à la protéine argonaute exWAGO (Chow et al., 2019). Les ARN peuvent aussi être localisés sur la face externe de la membrane plasmique. Dans ce dernier cas, les ARN peuvent être nus (ARNmax) ou en complexe avec des glycanes (glycoARN) (Chai et al., 2023). Des miARN ou des ARNt peuvent aussi être associés à des lipoprotéines humaines de basse et haute densité (Vickers et al., 2011). De façon similaire des familles d'ARN peuvent également être associées à des particules non membranaires appelées exomères (Q. Zhang et al., 2021). La structure secondaire des ARN peut également être impliquée dans leur stabilisation. Les fragments d'ARNt en sont un bon exemple. En effet, l'ARNase I a été identifiée comme un vecteur de maturation des ARNt (Nechooshtan et al., 2020). Avec l'angiogénine (ARNase sécrétée), elle peut conduire à la formation de tRF, dont les plus abondants dans le milieu extracellulaire sont les moitiés d'ARNt glycine et glutamate. Ces derniers sont, en effet, capables de former des dimères qui les protègent de l'action des ARNases à simple brin (Tosar et al., 2018).

Enfin, ces ARN extracellulaires peuvent être protégés des nucléases lorsqu'ils sont associés à des vésicules extracellulaires (VE). Ces VE sont ici des vecteurs de communication intercellulaire comme nous allons le découvrir dans le chapitre suivant.

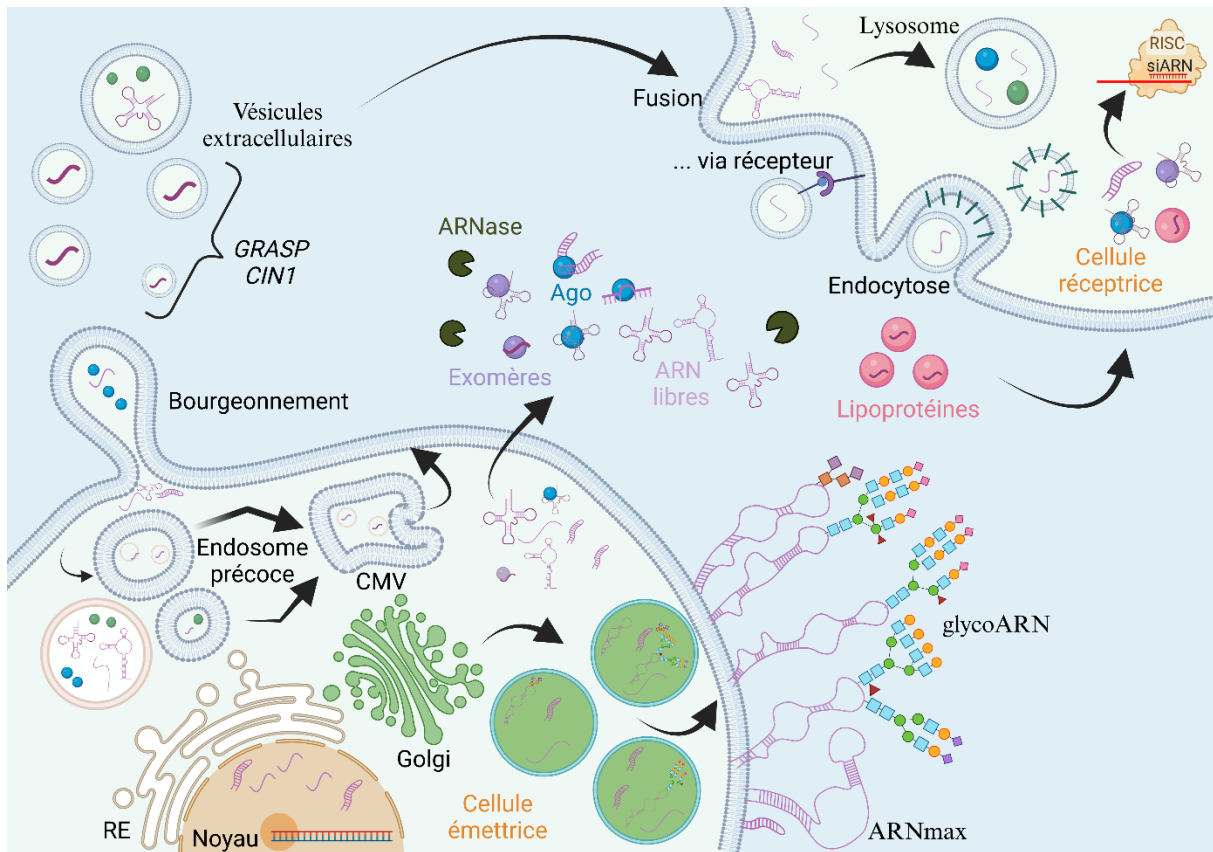


Figure 8 : Voies de production des ARNex (adapté de Chai et al., 2023)

La libération d'ARN vers le milieu extérieur via les vésicules extracellulaires est fortement liée à la biosynthèse de ces dernières. Les microvésicules sont produites par bourgeonnement de la membrane plasmique tandis que les exosomes sont issus de la voie endosomale et sont transportés vers l'extérieur par des corps multivésiculaires (CMV). La fusion du CMV avec la membrane plasmique conduit à la libération des exosomes dans le milieu extracellulaire. Si des ARN peuvent être inclus de façon aspécifique dans les VE, d'autres leur sont associés activement. Ces vésicules peuvent être absorbées par une cellule cible par fusion avec la membrane plasmique, par endocytose clathrine-dépendante ou par la reconnaissance d'une molécule à la surface des vésicules par un récepteur membranaire. Deuxièmement, des ARN peuvent diffuser vers le milieu extracellulaire en étant associés ou non à des protéines, des lipoprotéines et des particules non-membranaires comme les exomères. La stabilité intrinsèque des ARN ainsi que celle permise par l'interaction avec leurs partenaires permet une sélection des ARN. Ces ARNex peuvent alors être absorbés par une autre cellule via des mécanismes encore non identifiés. Enfin, des vésicules formées par

l'appareil de Golgi peuvent contenir des ARN nus (ARNmax) ou associés à des sucres (glycoARN) qui peuvent être adressés vers la membrane plasmique.

La communication intercellulaire

La communication intercellulaire désigne l'ensemble des mécanismes permettant à une cellule, un tissu ou un organisme de recevoir, d'interpréter et de répondre aux signaux émis par d'autres cellules dans leur environnement. Cette interaction entre les cellules existe aussi bien chez les organismes unicellulaires que chez les pluricellulaires. Dans ces derniers, l'intercommunication peut être directe lorsque les cellules sont en contact les unes avec les autres et repose alors sur un transfert de molécules par des pores membranaires tels que les jonctions communicantes (Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012). Ces jonctions sont formées par un hexamère de connexines qui permet le passage de molécules ou d'ions d'une taille inférieure à 12 kDa (Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012).

Rôles de la communication intercellulaire

L'échange de signaux à courte distance repose souvent sur des signaux peptidiques ou chimiques sécrétés par les cellules émettrices et libérés dans l'espace extracellulaire. Les cellules réceptrices peuvent alors "lire" le message envoyé en utilisant des récepteurs/senseurs spécifiques ou généraux à la surface ou à l'intérieur des cellules. C'est le cas par exemple des morphogènes sécrétés dans l'espace extracellulaire et dont le gradient permet la mise en place des axes dans le développement des métazoaires (Balasubramanian and Zhang, 2016). Des signaux peuvent également agir à longue distance, c'est notamment le mode d'action utilisée par les hormones (Petersen and Shulman, 2018). Des signaux entre des cellules d'espèces différentes peuvent également être observés, comme par exemple au sein d'un biofilm (Wang et al., 2022) ou entre un symbiote et son hôte (Chekanov et al., 2017).

Il existe également de vastes ensembles de données concernant les interactions entre les cellules microbiennes au sein d'une population, régulant la croissance ou le développement sexuel par exemple. Diverses petites molécules sont associées à ces mécanismes de communication, y compris des oxydes de nitrogène, de l'éthylène, des nucléotides, des acides aminés, ainsi que des macromolécules telles que des peptides et des protéines, des lipides, et d'autres molécules (Combarous and Nguyen, 2020). Par exemple, les molécules du Quorum Sensing sont utilisées pour coordonner la croissance des bactéries au sein d'une population. Le Quorum Sensing n'est cependant pas limité aux seuls procaryotes. Comme chez les bactéries, le Quorum Sensing est également présent et permet de réguler de nombreux processus tels que la morphogenèse, la reproduction sexuée, ou encore la pathogénicité chez les champignons (Tian et al., 2021) . De même, les phéromones sont utilisées pour initier ou réguler la reproduction sexuée, tant chez les micro-organismes que chez les organismes pluricellulaires (Zhang et al., 2023; Y. Zhao et al., 2019).

Pendant longtemps, il a été pensé que la communication cellulaire reposait sur de petites molécules organiques (métabolites ou hormones) ou sur le transfert de protéines entre cellules. Ce n'est que plus récemment qu'il a été montré que des molécules d'ARN pouvaient transiter entre les cellules.

Mécanisme d'échange d'ARN extracellulaire

Dès 2010, il a été montré que des petits ARN pouvaient transiter entre les parties souterraines et aériennes d'*A. thaliana* (Molnar et al., 2010). Il a plus tard été déterminé que dans la plante, les ARN peuvent transiter notamment par les plasmodesmes pour des mouvements à courte distance, ou via le phloème pour la mobilité à grande distance (Liu and Chen, 2018). Les petits ARN jouant un rôle important dans la réponse antivirale de la plante, la mobilité des petits ARNs au sein de l'organisme permet une

réponse systémique indépendamment du point d'entrée du virus. Cette réponse systémique permise par la mobilité de molécules d'ARN a par la suite été montrée chez les animaux (Ressel et al., 2019).

Cependant, la communication par la libération de molécules dans le milieu extracellulaire est généralement moins efficace lorsque les cellules sont éloignées les unes des autres, car les molécules de signalisation se diffusent, se diluent et peuvent être dégradées. Pour contourner ce problème, les cellules peuvent soit produire une grande quantité de molécules de signalisation, soit empaqueter ces molécules dans des organites extracellulaires spécifiques tels que les VE.

Les vésicules extracellulaires

Les VE sont des nanoparticules à bicouche lipidique (Tkach and Théry, 2016). Ces VE protègent de nombreuses molécules dans leur lumière ou au niveau membranaire. On y retrouve des protéines, des acides nucléiques, des prions, des sucres, des lipides ou encore des phytotoxines. L'existence des VE a été suggérée en 1946 dans une étude sur le plasma humain (Chargaff and West, 1946). Elles ont finalement été identifiées en 1967, mais ont longtemps été considérées comme de simples sous-produits des plaquettes (Wolf, 1967). Il a fallu attendre le début de ce siècle pour que le domaine de recherche sur les VE se développe. En fait les VE sont retrouvées chez tous les organismes chez lesquels elles ont été cherchées, incluant des archées, des eucaryotes et des procaryotes (Bazzan et al., 2021).

Biogénèse des vésicules extracellulaires

Chez les mammifères, où les VE sont les plus étudiées, elles sont divisées en 3 grandes catégories basées sur leurs modes de biogénèse (van Niel et al., 2018). Les deux principaux groupes sont les exosomes (30–150 nm),

qui sont sécrétés après la fusion d'un corps multivésiculaire avec la membrane plasmique, et les microvésicules (100–1000 nm) qui sont issues d'un bourgeonnement de cette dernière (Figure 8). Le troisième groupe est composé de la famille des corps apoptotiques (> 1000 nm) qui proviennent de cellules en apoptose à un stade avancé (Kerviel et al., 2021; van Niel et al., 2018).

La communication intercellulaire médiée par les vésicules extracellulaires

Le transport de molécules entre les cellules via les VE a été davantage caractérisé chez les mammifères. Le transfert d'information d'une cellule à l'autre via les VE peut se trouver sous forme de protéine de surface. C'est le cas par exemple des VE provenant de cellules dendritiques et présentant des peptides du complexe d'histocompatibilité à leur surface. Ces différentes sous-populations de VE peuvent activer les récepteurs des lymphocytes T et induire des réponses différentes (sécrétion par les cellules T de cytokines différentes) en fonction des protéines exposées (Tkach et al., 2017). Cependant, le principal mécanisme de transfert d'information entre des cellules par le biais de VE repose sur le transfert dans le cytoplasme des cellules réceptrices du contenu vésiculaire (Mathieu et al., 2019). Ceci se fait en 3 principales étapes. La première est la reconnaissance de la cellule réceptrice. En effet, différentes populations de VE peuvent avoir des cellules cibles préférentielles. On ne connaît pas vraiment les mécanismes régulant ces préférences et donc le ciblage des cellules réceptrices même s'ils peuvent être très stringents (Ginini et al., 2022). Par exemple, des exosomes provenant de neurones corticaux ne peuvent être capturés que par d'autres neurones, tandis que ceux provenant de neuroblastomes peuvent se lier à des neurones et des cellules gliales (Chivet et al., 2014). La seconde étape est l'internalisation des VE. Cette absorption peut se faire par un processus de macropinocytose

(particule > 0.2 μm) ou de micropinocytose (endocytose clathrine- ou cavéoline-dépendante, via raft lipidique, ou clathrine/cavéoline-indépendante). Il pourrait aussi faire suite à une reconnaissance par un récepteur (Mulcahy et al., 2014). Pourtant, bien que différents récepteurs aient été supposés jouer un rôle dans l'absorption des VE (intégrine, lectines, protéoglycane, immunoglobuline, Tim4), il n'existe à ce jour aucun consensus concernant leur nécessité pour leur internalisation (Mathieu et al., 2019). Enfin, la libération du contenu des VE pourrait se faire par une internalisation de la VE suivie de sa dégradation ou par une fusion de la membrane de la VE avec celle de la cellule. Ces deux stratégies de transfert pourraient coexister. En effet, la taille des microvésicules rend leur internalisation peu probable (Kanada et al., 2015). En revanche, il a été montré que des exosomes provenant de cellules infectées par le virus Epstein-Barr sont internalisés par un mécanisme dépendant de la cavéoline. Les différentes molécules candidates pour participer à l'un ou l'autre de ces deux mécanismes sont résumées par Mathieu et collègues (Mathieu et al., 2019).

Rôles physiologiques et pathologiques des vésicules extracellulaires

Les molécules associées aux VE et provenant de la cellule émettrice servent de message et peuvent modifier le comportement de la cellule réceptrice. Ils peuvent avoir des rôles tant physiologiques que pathologiques. Par exemple, des VE favorisent le renouvellement osseux dans un modèle murin (Hu et al., 2021). De plus, un traitement à base de VE provenant de cellules microgliales a permis d'inhiber la prolifération des astrocytes, qui a un rôle négatif sur la régénération des axones après un accident vasculaire cérébral (Li et al., 2021). Un dernier exemple est constitué par la régulation de l'induction de la sénescence par de l'interféron IFITM3 présent dans des exosomes de souris (Borghesan et al., 2019). Les VE peuvent également

jouer un rôle positif ou négatif dans des situations pathologiques telles que le cancer (Pourali et al., 2023) ou encore le diabète (Chen et al., 2022). Par exemple, les exosomes de cellules cancéreuses CD90+ favorisent la formation de tubes ainsi que les interactions cellule-cellule de cellules endothéliales, et jouent ainsi un rôle dans l'angiogenèse (Conigliaro et al., 2015).

Les vésicules extracellulaires dans les interactions hôte-pathogène

Les VE peuvent également être impliquées pour médier des interactions hôte-pathogène. Ainsi, des VE ont une action antivirale au sein du placenta lors de la gestation (Ouyang et al., 2021). Les VE de la bactérie *Bacillus anthracis* contiennent des toxines qui peuvent être délivrées à des macrophages (Rivera et al., 2010). De même, deux petits ARN de *Legionella pneumophila*, RsmY et l'ARNt-Phe, sont associés à des VE et peuvent réprimer l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée chez l'hôte (Sahr et al., 2022). Les VE du ver parasite *Heligmosomoides polygyrus* peuvent inhiber la réponse immunitaire et allergique des souris (Buck et al., 2014).

Les interactions plantes-champignons représentent également une importante source d'exemples de communication, principalement associée à un contexte pathogénique. Dans ces cas-là, les communications peuvent être bidirectionnelles. Par exemple, les VE produites par le tournesol (*Helianthus annuus* L.) peuvent inhiber la croissance du champignon pathogène *Sclerotinia sclerotiorum* (Regente et al., 2017). *Arabidopsis thaliana* échange des VE avec le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*, ce qui inhibe la virulence de ce dernier et les VE de *A. thaliana* sont aussi impliquées dans la résistance de cette plante modèle contre le mildiou (*Phytophthora*) (Cai et al., 2018; Hou et al., 2019). Réciproquement, *B. cinerea* produit des VE qui sont internalisées par les cellules de la plante (A.

thaliana ou *Solanum lycopersicum* (tomate)) via un mécanisme dépendant de la clathrine. Cette internalisation des vésicules du pathogène permet l'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte (He et al., 2023; Wang et al., 2017; Weiberg et al., 2013). De même, les VE de *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* et de *Penicillium digitatum* peuvent induire une réponse phytotoxique du plant de coton et du citronnier (*Citrus sinensis*), respectivement (Bleackley et al., 2020; Costa et al., 2021). Les VE de champignons peuvent aussi interagir avec d'autres champignons. Par exemple, les VE de *A. pullulans* ont un effet antagoniste sur la croissance des phytopathogènes *Colletotrichum acutatum* et *Penicillium expansum* (Černoša et al., 2022).

Les ARN vésiculaires

De façon générale, bien que toutes les molécules associées aux VE soient susceptibles de jouer un rôle dans la communication intercellulaire, il a été montré que différents types d'ARN peuvent être trouvés dans des VE. Ces ARN vésiculaires constituent un support moléculaire de choix pour ces échanges d'informations (O'Brien et al., 2020). Par exemple, dans l'exemple susmentionné d'inhibition de la prolifération des astrocytes par des VE issues de la microglie, le support du transfert d'information est le miARN miR-124 qui réprime l'expression des gènes *notch1* et *sox2* (Li et al., 2021). Par ailleurs, les microvésicules des graines de la plante médicinale *Moringa oleifera* peuvent réduire la viabilité et accroître l'apoptose de cellules cancéreuses (Potestà et al., 2020). Le mécanisme est, ici aussi, dépendant de la présence de miARN dans les vésicules qui sont capables d'inhiber l'expression du gène *bcl-2* (Potestà et al., 2020). Comme cité précédemment, tant les VE de plantes que celles de champignons peuvent être impliquées dans des interactions hôte-pathogène. Dans ces VE, les miARN et les siARN jouent un rôle particulier car ce sont les supports moléculaires permettant l'inhibition des facteurs de virulence du

champignon (Cai et al., 2018; Hou et al., 2019) ou de la réponse immunitaire de la plante (He et al., 2023; Wang et al., 2017; Weiberg et al., 2013). Plusieurs protéines de liaison à l'ARN sont par ailleurs impliquées dans le transfert de ces petits ARN au sein des VE d'*A. thaliana*. C'est le cas de la protéine argonaute AGO1 et des ARN hélicases RH11 et RH37 qui lient spécifiquement les petits ARN (He et al., 2021). Par ailleurs, l'inhibition de la réponse immunitaire et allergique des souris dans un exemple précédemment cité pourrait être due à l'action de miARN présents dans les VE du ver parasite *Heligmosomoides polygyrus*. Les vésicules et leurs ARN sont ici internalisés par des cellules épithéliales de la souris. Ces miARN qui sont donc protégés des ARNases sont capables d'inhiber l'expression de la MAPK *Dusp1* (Buck et al., 2014). Chez *Beauveria bassiana*, le pathogène de l'anophèle, quatre miARN ont été identifiés. Parmi eux, la synthèse de *bba-miR1* nécessite *Dicer*, tandis que la production des trois autres est indépendante de *Dicer1* et *Dicer2*. *bba-miR1* est importé par les cellules du moustique de façon dépendante des vésicules du moustique et peut détourner la protéine Ago1 de l'hôte pour former un complexe RISC et inhiber la réponse immunitaire Toll1-dépendante pendant la traversée de la cuticule par le champignon. La surexpression du miARN est inhibée après avoir atteint l'hémolymphe du moustique afin de réduire la réponse immunitaire dépendante de la mélanine chez l'hôte. Cet exemple représente donc une élégante démonstration du rôle régulé d'un ARNex impliqué dans la pathogénicité d'un champignon. Cependant, le mécanisme de relargage des miARN n'a pas encore été identifié chez ce champignon (Cai et al., 2021). Enfin, des miARN ont également été identifiés chez la levure noire polyextremotolérante *A. pullulans* (Černoša et al., 2022). De même, des tRF et miARN de *B. hordei* ont été identifiés dans des extraits vésiculaires provenant d'une plante infectée (Kusch et al., 2023). De nombreux ARNm sont différentiellement enrichis dans les VE de cellules planctoniques et d'hyphes de *U. maydis* indiquant un changement dans l'expression ou l'adressage des ARN vers les VE entre les différents morphotypes (Kwon et

al., 2021). Des petits ARN ressemblant à des miARN ont donc été identifiés chez divers microorganismes dont quelques fongiques ce qui suggère un profil général. Néanmoins, et alors que la littérature concernant les interactions plantes-pathogènes impliquant les VE et notamment les ARN qui leur sont associés s'est considérablement développées ces dernières années, les connaissances que nous en avons chez les espèces fongiques pathogènes de l'homme restent extrêmement limitées. Et ce bien que les VE soient largement décrites chez ces organismes.

Les vésicules extracellulaires chez les champignons pathogènes de l'homme

C'est en 2007 que des VE ont été identifiées pour la première fois chez *C. neoformans* (Rodrigues et al., 2007). Depuis, les VE ont été décrites chez la plupart des pathogènes fongiques primaires, opportunistes et émergents, comprenant des espèces des genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Aspergillus*, *Sporothrix*, *Paracoccidioides*, *Malassezia*, *Rhizopus*, *Exophiala*, *Pichia*, *Trichophyton* et *Talaromyces* (Albuquerque et al., 2008; Bitencourt et al., 2018; Brauer et al., 2020; Gehrman et al., 2011; Gil-Bona et al., 2015; Karkowska-Kuleta et al., 2020; Leone et al., 2018; Liu et al., 2018a; Peres da Silva et al., 2019, 2015; Rizzo et al., 2020; Souza et al., 2019). Des VE ont également été décrites chez de nombreux phytopathogènes tels qu'*Alternaria infectoria* (Silva et al., 2014), *Trichoderma reesei* (de Paula et al., 2019), *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* (Bleackley et al., 2020), *Zymoseptoria tritici* (Hill and Solomon, 2020) et *Penicillium digitatum* (Costa et al., 2021). Elles ont également été décrites dans de nombreuses espèces non pathogènes telles que *Saccharomyces cerevisiae* (Albuquerque et al., 2008) ou différentes espèces de levures utilisées en œnologie, notamment *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida sake* et *Metschnikowia pulcherrima* (Mencher et al., 2020). Les VE des champignons peuvent être isolées à

partir de cellules cultivées en milieu liquide ou solide. Les cellules sont alors séparées des VE par des étapes de centrifugation et de filtration (généralement 0.45 μm). Parfois, des colonnes de séparation par la taille sont également utilisées. Les VE sont concentrées par ultracentrifugation et généralement resuspendues dans du PBS. Chez les champignons, les mécanismes de production des VE restent encore à décrire. Les protéines du système ESCRT, la protéine GRASP citée précédemment et plus récemment la protéine Sur7 ont récemment été identifiées comme pouvant participer à la biosynthèse de VE (McKenna et al., 2023). Cependant, l'absence de marqueur identifié chez les VE des différents champignons pathogènes de l'homme rend l'étude d'éventuelles sous-populations vésiculaires difficile. Récemment, chez les phytopathogènes fongiques, plusieurs marqueurs potentiels ont été identifiés, mais restent à exploiter (He et al., 2023; Rutter et al., 2022). Le nombre de publications décrivant la communication intra-espèce fongique reste également encore restreint. Chez les pathogènes de l'homme, l'identification des rôles des vésicules dans les interactions hôte-pathogène en est à un stade préliminaire (Figure 9). Néanmoins, les quelques exemples publiés et l'analogie avec d'autres systèmes suggèrent que leur rôle est vraisemblablement largement sous-évalué.

Rôles des vésicules extracellulaires fongiques

Ainsi, chez *C. albicans* les VE provenant du biofilm sont capables de corriger un défaut de formation de biofilm chez les mutants du complexe ESCRT (Zarnowski et al., 2018). En revanche, les VE provenant des cellules planctoniques de cette même levure inhibent la formation de biofilms et la transition de la forme levure vers la forme hyphes, potentiellement à cause de la présence de terpènes associés à ces VE (Honorato et al., 2022). Une autre étude suggère que les VE inhibent la prolifération cellulaire et la formation de pseudohyphes chez cette même espèce (Bitencourt et al.,

2022). Les VE semblent aussi réguler l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress chez *C. albicans*, *P. brasiliensis* et *A. fumigatus* (Figure 9).

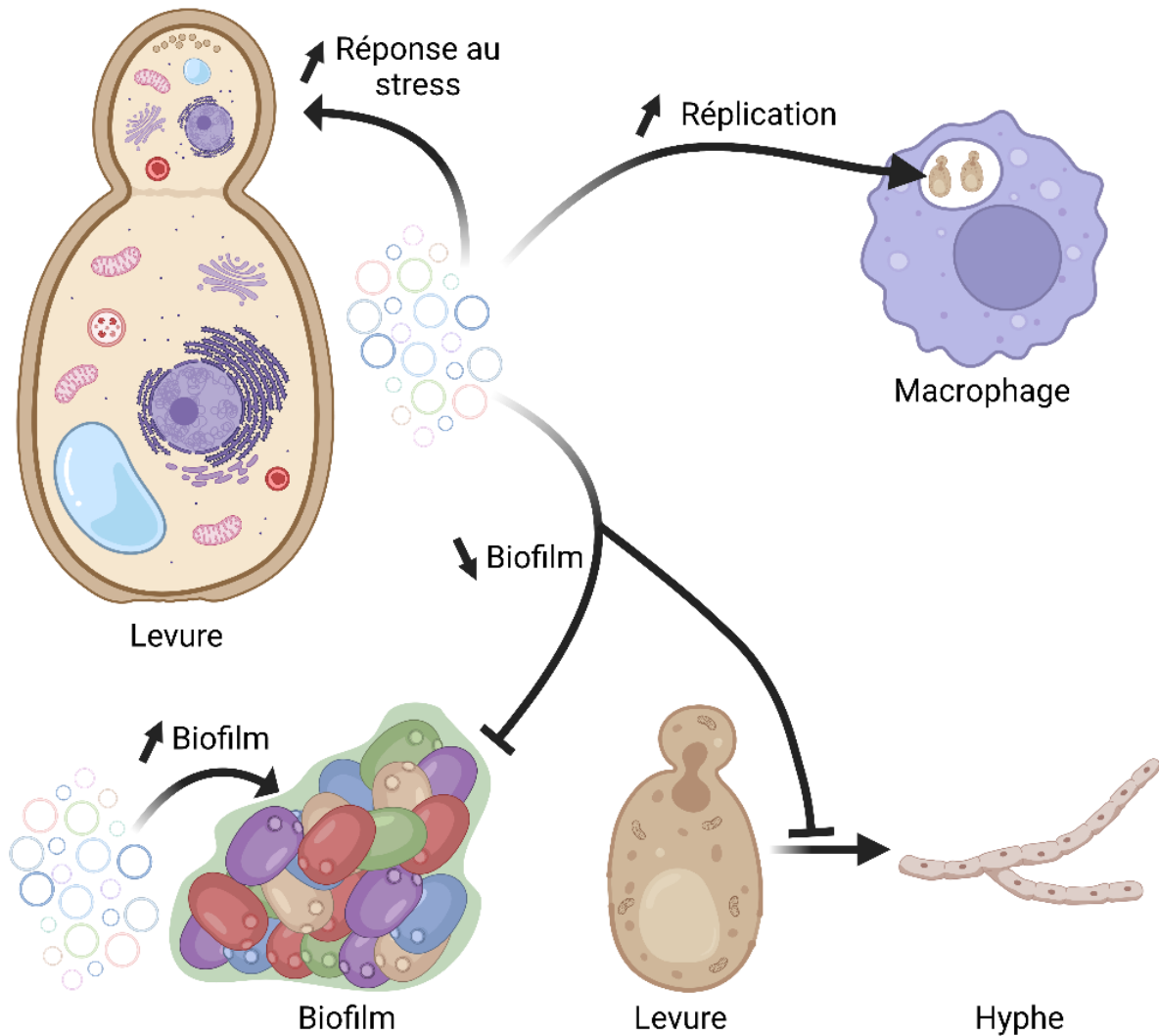


Figure 9 : Rôles intra-espèce des vésicules extracellulaires des pathogènes fongiques humains

Brièvement, chez *C. albicans* les VE produites par les levures peuvent inhiber la formation de biofilm et la transition vers la forme hyphe. A contrario, les VE produites par des cellules au sein d'un biofilm peuvent en promouvoir sa formation. Les VE sont aussi impliquées dans la réponse au stress. Enfin, chez *C. neoformans*, les vésicules peuvent stimuler la réplication des levures à l'intérieur d'un macrophage.

De plus, les VE produites par *A. fumigatus* semblent promouvoir la phagocytose des conidies par les macrophages et induisent la production

de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α et le CCL2 (Souza et al., 2019). Un effet similaire a été rapporté avec les neutrophiles dérivés de la moelle osseuse stimulés par les VE d'*A. fumigatus* (Souza et al., 2019) ou encore avec des cellules dendritiques stimulées par des VE de *S. brasiliensis* (Ikeda et al., 2018). Par ailleurs, les VE de *Malassesia sympodialis* sont activement internalisées par les kératinocytes humains, induisant une surexpression de l'ICAM-1 alors que celles produites par *Trichoderma interdigitale* induisent la production de NO, de TNF- α , d'IL-6, d'IL-1 β et d'IL-8 par les cellules de la lignée cellulaire de kératinocytes humains HaCaT (Johansson et al., 2018; Vallhov et al., 2020) (Figure 10). Chez *C. deuterogattii*, les VE produites par des levures situées à l'extérieur des macrophages peuvent augmenter la réplication d'autres levures à l'intérieur de macrophages avec un mode d'action longue distance (Bielska et al., 2018) (Figure 10). Enfin, chez *C. neoformans*, les VE produites par une souche hypervirulente semblent capables d'augmenter la virulence d'une souche moins virulente dans un modèle d'infection à *Galleria mellonella* (Hai et al., 2020). Ici, les résultats présentés suggèrent que des protéines et des petits peptides comme Qsp1, associés aux vésicules, seraient responsables du phénotype observé. Ce phénotype n'est d'ailleurs pas inhibé en présence d'ARNase.

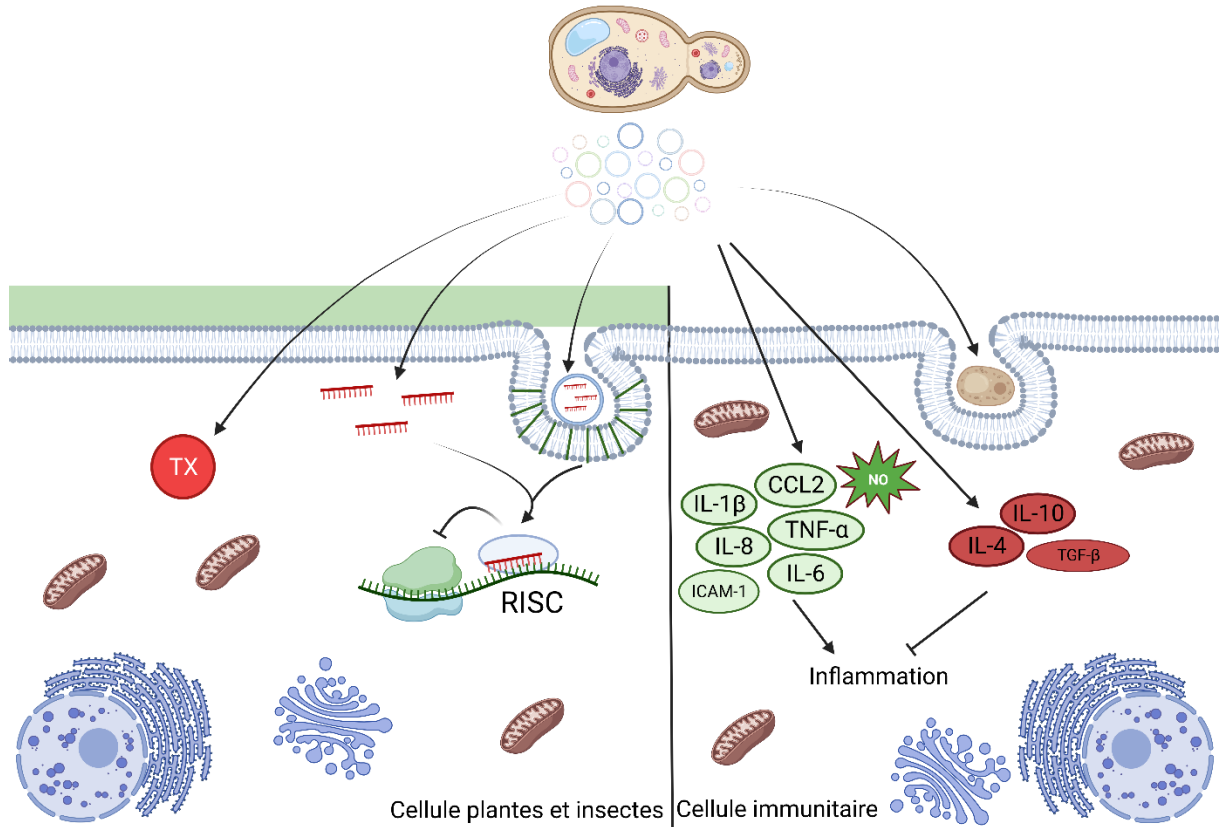


Figure 10 : Rôles des vésicules extracellulaires fongiques dans la communication inter-espèce

Chez le macrophage, les VE fongiques peuvent promouvoir la phagocytose. Elles peuvent aussi selon leur origine induire une réaction pro- et anti-inflammatoire des cellules dendritiques.

Les ARN vésiculaires fongiques

Par analogie avec les données publiées chez d'autres organismes, on peut anticiper que certains de ces effets induits par les VE chez les cellules de l'hôte ou chez les champignons eux-mêmes sont dépendants de certaines molécules d'ARN. Par exemple, l'effet stimulateur de la réplication intramacrophagique des VE produites par *C. deuterogattii* est perdu lorsque ces VE sont traitées avec de la ARNase (Bielska et al., 2018). Pourtant la connaissance que nous avons du transcriptome vésiculaire des champignons, en particulier pathogènes de l'homme, est très parcellaire.

Alors que des ARN ont été purifiés à partir d'extraits vésiculaires chez de nombreuses espèces (Tableau 2), peu d'expériences ont été menées pour réellement tester la présence d'ARN à l'intérieur des vésicules. Néanmoins, plusieurs essais de traitement des VE à l'ARNase ont été réalisés chez *P. brasiliensis*, *C. neoformans* et *U. maydis* confirmant que les ARN isolés étaient probablement à l'intérieur des VE (Kwon et al., 2021; Peres da Silva et al., 2018, 2015).

Le transcriptome vésiculaire fongique

Par ailleurs, les ARN associés à ces vésicules ont été séquencés chez de nombreuses espèces (Tableau 2) et il semble que la structure générale du transcriptome vésiculaire soit globalement conservée d'une espèce à une autre. Cependant, les stratégies utilisées pour obtenir ces résultats sont très disparates et les analyses bio-informatiques mises en place sont rarement validées. Par exemple, la plupart des « librairies » construites sont des « librairies » pour petits ARN et les analyses associées ont parfois aussi permis de détecter un nombre important de « reads » associés à des ARNm ou à des ARNinc sans que l'on sache l'orientation de ces « reads » par rapport au gène ni la couverture associée (Liu et al., 2018a; Zamith-Miranda et al., 2021). Bien que les auteurs considèrent que ces données suggèrent la présence d'ARNm dans les vésicules, on ne peut pas savoir s'il ne s'agit pas de fragments de molécules d'ARNm obtenus lors de l'extraction des ARN ou de la préparation des « librairies » de séquençage. Des ARNm entiers et des ARNinc ont cependant bien été identifiés chez les *Paracoccidioides* et *C. deneoformans* après sélection. Cependant, ils correspondent principalement aux ARN les plus abondants dans la cellule et ne sont pas enrichis (Liu et al., 2020; Peres da Silva et al., 2018). De façon surprenante, des ARN de très petite taille (17 nt en moyenne) ont aussi été identifiés dans des extraits vésiculaires de *M. sympodialys*, même si la machinerie protéique nécessaire à la production de siARN est absente chez

cette espèce (Rayner et al., 2017). Les auteurs suggèrent ici l'existence d'un autre mécanisme de production de petits ARN interférents (Rayner et al., 2017). Dans l'ensemble, bien que la présence de petits ARN soit confirmée, les arguments supportant l'existence de miARN chez les pathogènes fongiques de l'homme sont assez faibles. Chez certaines espèces, d'autres ARNnc (snoARN, snARN, ARNr, ARNt, tRF, ARNlnc) ont aussi été identifiés dans les extraits vésiculaires (Alves et al., 2019; Liu et al., 2020; Peres da Silva et al., 2019, 2018, 2015; Zamith-Miranda et al., 2021).

Organisme(s)	ARN	Purification	Référence
<i>C. neoformans</i>	ARNnc		
<i>C. albicans</i>	ARNm	Ultracentrifugation	(Peres da Silva et al., 2015)
<i>P. brasiliensis</i> *	miARN		
<i>S. cerevisiae</i>	tRF		
<i>M. sympodialis</i>	miARN	Ultracentrifugation	(Rayner et al., 2017)
<i>R. delemar</i>	miARN Produit de dégradation d'ARNm et ARNnc	Ultracentrifugation	(Liu et al., 2018a)
<i>C. neoformans</i> *	ARNm ARNnc tRF	Ultracentrifugation	(Peres da Silva et al., 2018)
<i>P. brasiliensis</i> <i>P. lutzii</i>	ARNm ARNnc	Ultracentrifugation	(Peres da Silva et al., 2019)
<i>H. capsulatum</i>	ARNm ARNnc	Ultracentrifugation	(Alves et al., 2019)

	milARN		
	ARNr		
	ARNm		
<i>C. deneoformans</i>	ARNnc	Ultracentrifugation	(Liu et al., 2020)
	Petit ARNi		
<i>C. albicans</i>	ARNm ?		
<i>C. auris</i>	ARNnc	Ultracentrifugation	(Zamith-Miranda et al., 2021)
	tRF		
<i>U. maydis</i> *	ARNm	Ultracentrifugation	
	ARNnc	Colonne (exclusion par taille)	(Kwon et al., 2021)
<i>A. pullulans</i>	milARN	Colonne (exclusion par taille) Ultracentrifugation	(Černoša et al., 2022)

Tableau 2 : Liste des publications associées à la description du transcriptome des VE chez les champignons

Les champignons pour lesquels un test à l'ARNase a été réalisé sont marqués par une étoile.

Objectifs de la thèse

Toutes ces données publiées restent encore mal exploitées et une bonne connaissance du transcriptome extracellulaire des champignons pathogènes de l'homme nécessite une étude approfondie afin d'obtenir des données fiables. En effet, il est essentiel de confirmer quelles familles d'ARN sont réellement associées aux vésicules extracellulaires. Aucun des séquençages précédemment cités n'a permis d'éliminer les potentiels contaminants issus d'une copréciptation lors de la purification des VE. Les bibliothèques construites ne sont, par ailleurs, pas toujours adaptées aux analyses sous-jacentes.

Ces analyses conduisent ainsi à des généralisations abusives (les fragments sont considérés comme des ARN entiers, absence d'orientation conduisant à une mauvaise attribution des reads à un gène, etc.). De plus, l'identification des ARN d'intérêt nécessite de définir les spécificités du transcriptome vésiculaire par rapport à celui de la cellule. Cette hypothèse repose sur l'idée que des ARN spécifiquement enrichis dans les VE peuvent nécessiter un mécanisme d'adressage potentiellement actif. Pour qu'un tel mécanisme soit conservé, il faut supposer que les ARN qui en sont la cible jouent un rôle potentiel. À ce jour, aucune comparaison du transcriptome extracellulaire avec celui de la cellule n'a été réalisée et la production des données de transcriptomique et leur analyse est souvent confuse. Mon groupe de recherche se concentre sur l'étude des VE de *C. neoformans*. Précédemment, nous avons réalisé une description détaillée de la structure et de la composition de ces VE (Rizzo et al., 2021b). Toutefois, le contenu en ARN n'a pas encore été abordé. Une meilleure compréhension du transcriptome extracellulaire chez cette levure pathogène ouvrira la voie à une étude approfondie du rôle des ARN dans les VE des champignons et notamment dans la communication intercellulaire. Plus précisément, l'identification des ARN vésiculaires impliqués dans la communication permettra, à terme, de mieux comprendre les mécanismes qui régulent la pathogénicité des espèces fongiques dans des contextes infectieux. Ces ARN vésiculaires pourront alors être exploités comme cible thérapeutique. Mon projet de thèse vise donc à comprendre les mécanismes de communication intercellulaire chez *C. neoformans* médiée par les ARN associés aux VE. Plus précisément, notre objectif est d'identifier et de caractériser la structure du transcriptome des VE afin de développer des essais de communication intercellulaire pour ce pathogène.

La première étape de mon projet de thèse consiste donc à étudier la structure et la spécificité du transcriptome vésiculaire de *C. neoformans* par rapport au transcriptome cellulaire. Il vise à identifier les familles d'ARN

présentent dans les vésicules et à définir l'existence d'espèces enrichies dans les vésicules par rapport aux cellules. L'existence d'ARN enrichies pouvant alors suggérer la présence de mécanisme d'adressage spécifiques de ces ARN vers les VE. Ensuite, la deuxième partie du projet consiste à utiliser ces connaissances pour mettre au point des essais de communication intercellulaire chez ce pathogène. Ces essais visent à identifier si un ARN peut être transféré d'une cellule à une autre via les VE et à obtenir un protocole expérimental permettant de détecter des événements de communication.

Résultats

Partie I : Le transcriptome vésiculaire chez *Cryptococcus*

Introduction

Depuis la première étude décrivant la présence de vésicules extracellulaires chez *C. neoformans* (Rodrigues et al., 2007), la production de VE a été décrite chez un grand nombre de champignons pathogènes ou non pathogènes (Albuquerque et al., 2008; Bitencourt et al., 2018; Brauer et al., 2020; Gehrmann et al., 2011; Gil-Bona et al., 2015; Karkowska-Kuleta et al., 2020; Lavrin et al., 2020; Leone et al., 2018; Liu et al., 2018b; Peres da Silva et al., 2019, 2015; Rizzo et al., 2020; Souza et al., 2019; Yang et al., 2021). La plupart de ces analyses visaient soit à étudier la composition ou la structure de ces vésicules par des approches globales « -omics » ou microscopiques, soit à étudier l'impact des VE fongiques sur la réponse immunitaire de l'hôte, principalement en utilisant des modèles cellulaires ou via des études in vivo (He et al., 2021; Kusch et al., 2023; Wang et al., 2016; Weiberg et al., 2013). Chez *Cryptococcus*, ces études ont longtemps été limitées par des difficultés techniques notamment pour obtenir des VE en quantité suffisante. Ainsi, les premiers protocoles publiés utilisaient des cultures de cellules de durée prolongée (2 à 3 jours) en milieu complet (YPD) liquide. Les cellules étaient alors éliminées par centrifugation et filtration à 0,45 µm. Les vésicules étaient finalement récupérées par ultracentrifugation (Rodrigues et al., 2007). Ce protocole n'était pas très efficace et il fallait parfois plusieurs litres de culture pour avoir la quantité d'extrait vésiculaire nécessaire à une seule expérience. Ces durées de culture prolongées pouvaient aussi laisser penser que les vésicules

obtenues provenaient de cellules mortes et n'avaient aucun rôle physiologique. Un nouveau protocole publié en 2019 par Reis et collaborateurs (Reis et al., 2019) a permis de résoudre ce problème et de répondre en partie à ces critiques (Figure 11). Cette étude démontre en effet que la production de vésicules est beaucoup plus importante lorsque les cellules sont cultivées sur milieu solide et qu'il ne faut que 24h pour en obtenir une grande quantité (Reis et al 2019). Par la suite, le laboratoire de Guilhem Janbon a démontré que la production de vésicules dépendait aussi des conditions de culture et a déterminé que le milieu minimal solide (SD, synthetic dextrose) et une température d'incubation de 30°C constituaient des paramètres optimaux à la production de VE chez *Cryptococcus* (Rizzo et al., 2023, 2021b). Par ailleurs, cette dernière étude a aussi permis de démontrer que chez *C. neoformans*, la production de VE était restreinte à une fenêtre de temps correspondant à la transition entre phase exponentielle et phase stationnaire (Rizzo et al 2023).

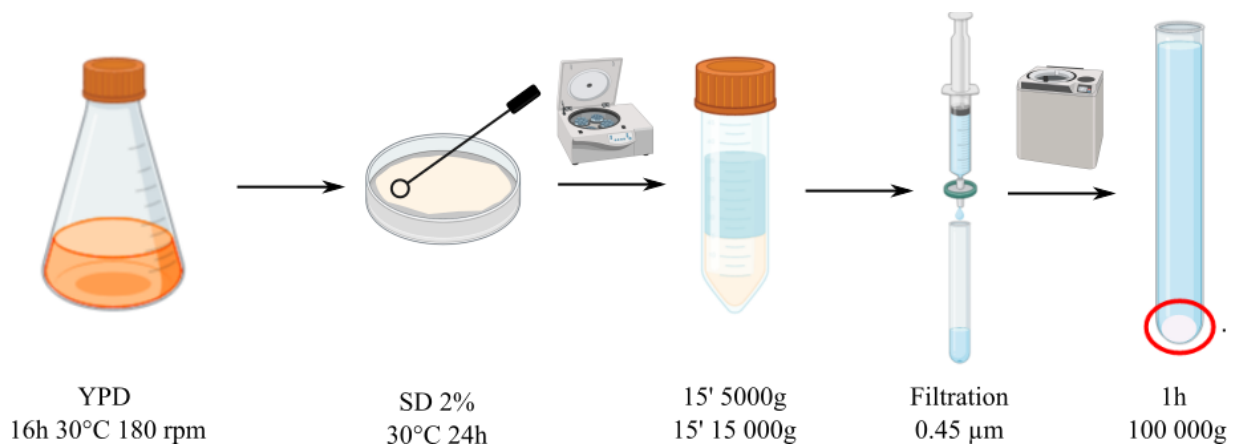


Figure 11 : Purification des vésicules extracellulaires par ultracentrifugation

Après une préculture dans du milieu complet YPD liquide (16 heures, 30°C, sous agitation) à partir d'une masse de cellules, des boîtes contenant un milieu synthétique enrichi en glucose (2%) sont inoculées et incubées (30°C) pendant 24 heures. Les cellules sont alors récupérées à l'aide d'une anse et resuspendues par pipetage dans du PBS 1X préalablement filtré à 0,02 µm. Le surnageant est alors séparé du culot contenant cellules et débris cellulaires éventuels par deux centrifugations successives (15 minutes à 5.000 g puis 15.000 g) suivies d'une filtration à 0,45 µm. Les vésicules extracellulaires sont alors récupérées par ultracentrifugation (1 heure à 100 000 g) et reprises dans du PBS 1X.

Ce protocole de préparation d'extraits vésiculaires a permis de nombreuses avancées dans nos connaissances de la structure des VE de *Cryptococcus*. En 2021, Rizzo et collègues ont utilisé le microscope Titan Krios™ de l'Institut Pasteur pour produire des données de CryoEM (cryomicroscopie électronique) et CryoTM (cryotomographie électronique) révélant une grande diversité de tailles, de formes et de structures des VE fongiques (Rizzo et al., 2021b). L'analyse de ces données a ainsi permis de démontrer que les vésicules produites par *Cryptococcus* ont une taille médiane de 67 nm de diamètre même si certaines vésicules peuvent atteindre 500 nm de diamètre alors que les plus petites ne font que 10 nm. Les vésicules ont aussi une grande diversité de formes. Certaines sont bien rondes alors que d'autres sont ovoïdes voire allongées. Certaines vésicules contenant des vésicules plus petites ont été identifiées. Néanmoins, on ne sait pas si cette diversité de formes est naturelle ou si elle résulte du processus de préparation de VE et notamment de l'étape de filtration. Par ailleurs, l'analyse de ces images a révélé que quasiment 90% des vésicules étaient décorées par des structures fibrillaires (Figure 12). Des expériences de nanocytométrie en flux couplées à des analyses génétiques et protéomiques ont permis de démontrer que ces structures fibrillaires étaient probablement faites de mannoprotéines. En fait, l'analyse du protéome a permis aux auteurs de cette étude de proposer un modèle structurel des VE produites par *C. neoformans* dans lequel les VE sont décorées par des mannoprotéines et autres protéines membranaires. Mp88 et Vep1 sont toutes deux des protéines à ancre GPI et composent à elles seules presque un quart du protéome vésiculaire (Rizzo et al., 2021b) (Figure 12). De façon intéressante, les vésicules produites par deux autres espèces de *Cryptococcus* (*C. deneoformans* et *C. deuterogattii*) sont très similaires tant en taille qu'en structure et composition protéique. Des expériences de nanocytométrie très similaires dans lesquelles les vésicules de *Candida glabrata* sont reconnues par la lectine Concanavalline A marquée à la fluoresceine suggèrent la présence de décorations similaires chez cette

levure (Karkowska-Kuleta et al., 2020). En fait, il est probable que la présence de mannoprotéines à la surface soit une caractéristique commune à de nombreuses VE fongiques comme le suggèrent des analyses protéomiques menées dans d'autres espèces (Bleackley et al., 2019; Cleare et al., 2020; Escobar-Niño et al., 2023; Karkowska-Kuleta et al., 2020; Zarnowski et al., 2022).

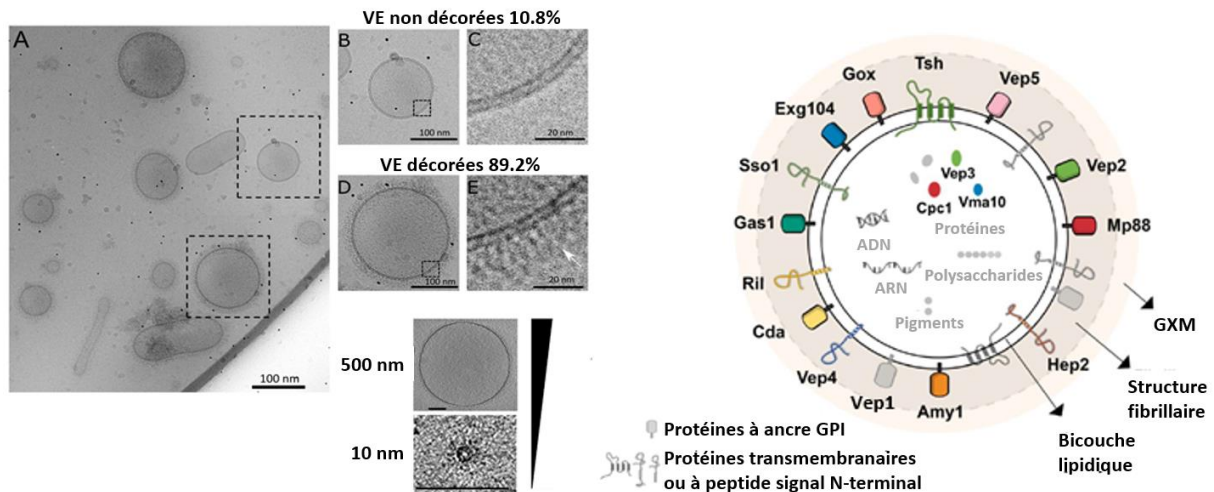


Figure 12 : Structure des VE produites par *C. neoformans*

Panneau de gauche : Photos de VE obtenues par CryoEM révélant leur grande diversité de tailles, de formes et de structure. Panneau de droite : Modèle structural des VE produites par C. neoformans (Traduit de Rizzo et al 2021).

Alors que ces analyses ont grandement amélioré nos connaissances sur la structure et le contenu protéique des VE produites par *Cryptococcus*, les autres molécules associées à ces vésicules et notamment leur transcriptome restent décrits de façon superficielle. En fait, malgré quelques études (Alves et al., 2019; Černoša et al., 2022; Kusch et al., 2023; Kwon et al., 2021; Liu et al., 2018b, 2020; Peres da Silva et al., 2019, 2018, 2015; Rayner et al., 2017; Zamith-Miranda et al., 2021), il n'existe pas vraiment de consensus sur la structure du transcriptome vésiculaire fongique. Comme expliqué dans l'introduction générale, ceci est dû en partie au manque de consensus sur les protocoles à utiliser pour préparer les extraits vésiculaires, mais aussi à la diversité des stratégies de séquençage et d'analyse de séquences utilisées. Chez *Cryptococcus*, il existe trois

publications décrivant des résultats de séquençage d'ARN extraits de VE. La première date de 2015 et confirme pour la première fois la présence d'ARN associés aux VE chez *C. neoformans* (Peres da Silva et al., 2015). Les auteurs décrivent les résultats du séquençage d'une librairie « petits ARN » construite à partir d'ARN extrait à partir de vésicules extracellulaires. Ces ARN ont été préalablement purifiés par un kit RNeasy MinElute Cleanup pour obtenir une fraction enrichie en petits ARNs. Ils reportent la présence de nombreux « reads » associés aux introns des gènes codants (90% des « reads »), mais aussi des ARNr, ainsi qu'une centaine d'autres ARN non codants incluant quelques snoARNs et 6 ARNt. Cette même publication décrit aussi la présence de miARNs associés aux vésicules de *C. neoformans*. Ces résultats ouvrent clairement le champ des possibles en décrivant pour la première fois des ARN associés aux VE fongiques, la description des analyses bio-informatiques utilisées dans cette étude reste cependant très succincte et certains aspects de cette analyse peuvent poser question. Par exemple, identifier des miARNs chez une espèce fongique en alignant des séquences sur des miARNs de mammifères reste une stratégie très discutable et les résultats obtenus demandent confirmation (Johnson et al., 2022; Kozomara et al., 2019). La deuxième publication provient du même groupe (Peres da Silva et al., 2018) et décrit les modifications du transcriptome de *C. neoformans* associées aux mutations des gènes *GRASP* et *ATG7*. *GRASP* (Golgi reassemble and stacking protein) est une protéine régulatrice des processus de sécrétions et est impliqué dans la formation des saccules et du ruban golgiens (Barr et al., 1997; Shorter et al., 1999). Chez *C. neoformans*, *GRASP* est impliqué dans l'export de polysaccharide vers le milieu extracellulaire et un mutant présente une virulence atténuée chez la souris (Kmetzsch et al., 2011). *ATG7* est un régulateur de l'autophagie membre de la famille des enzymes ubiquitine-activatrice (E1) (Nakatogawa et al., 2009). Chez *C. neoformans*, un mutant présente un défaut des mécanismes d'autophagie, et une augmentation de la pigmentation et de la taille cellulaire, ainsi qu'un défaut de survie chez la

souris (Oliveira et al., 2016). Chez *Dictyostelium discoideum*, la sécrétion dépendante de *GRASP* est médiée par les autophagosomes (Bruns et al., 2011; Duran et al., 2010) suggérant un lien entre *GRASP* et *ATG7*. Les résultats de NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) de cette publication suggèrent d'abord que la mutation de chacun de ces deux gènes impacte la taille des VE sans en modifier clairement la quantité. Les auteurs utilisent ensuite la même stratégie de séquençage des petits ARN que celle utilisée en 2015, mais de façon étrange, leur analyse s'intéresse principalement aux « reads » s'alignant sur les gènes codants. Ils suggèrent que des ARN spécifiques de gènes associés à des organelles comme le réticulum endoplasmique seraient plus abondants dans les VE extraites du mutant *graspΔ* par rapport à celles extraites de la souche sauvage. De façon plus intéressante, ils identifient aussi de nombreux « reads » correspondant à des fragments d'ARNt et aux ARN ribosomiaux. Cette étude est intéressante car elle suggère que des mutations de gènes impliqués dans la biosynthèse des VE peuvent altérer le transcriptome vésiculaire, mais elle reste superficielle notamment parce que la stratégie bio-informatique utilisée pour traiter les « reads » et effectuer les alignements n'est pas décrite. La troisième publication date de 2020 (Liu et al., 2020) et décrit les modifications du transcriptome vésiculaire de *C. deneoformans* associées à la délétion du gène *CIN1* qui code une protéine impliquée dans la voie de l'endocytose et la virulence chez cette levure (Shen et al., 2010). Cette étude décrit les résultats obtenus après séquençage de petits ARN (18-30 nt) vésiculaires purifiés sur gel, mais aussi après séquençage des ARNm purifiés des mêmes vésicules. Dans cette étude, plus de 90% des « reads » issus du séquençage des petits ARN s'alignent sur des régions intergéniques de *C. deneoformans*. Certaines de ces séquences semblent être des siARN, mais les auteurs comme dans l'étude de Peres Da Silva et collègues de 2015, identifient certaines de ces séquences comme des miARNs en les alignant sur miRbase (Kozomara et al., 2019; Liu et al., 2020). Ici encore, cette analyse pose question car aucune autre expérience ne vient valider

ces identifications. En fait, la réanalyse par une autre équipe des miARNs et miRNA-like identifiés chez les champignons en général a permis de démontrer qu'aucun de ces miARNs identifiés par Liu et collègues ne passe les différents cribles de critères de qualité suggérant que ce ne sont pas de véritables miARNs (Johnson et al., 2022). Au final, même si les analyses publiées sont intéressantes pour de nombreux aspects, il semblait évident que des analyses supplémentaires pourraient permettre une compréhension plus profonde de la structure et des spécificités du transcriptome des VE fongiques.

I. Des molécules d'ARN sont associées aux VE chez *C. neoformans*

Il s'agissait dans un premier temps de confirmer que des molécules d'ARN étaient présentes dans les extraits vésiculaires obtenus à partir de cellules ayant poussé sur des boîtes de milieu minimum (SD) après 24h d'incubation à 30°C (Reis et al., 2019; Rizzo et al., 2021b). Nos premiers essais de purification d'ARN total à partir de vésicules suggéraient que très peu d'ARN était présent dans nos extraits. Nous avons donc choisi de multiplier le nombre de boîtes utilisées et donc la quantité de cellules passant de 6 boîtes utilisées par exemple pour des analyses en protéomique à 24 boîtes (diamètre = 90 mm). La quantité totale de VE obtenue était estimée à $1,7 \times 10^{12} \pm 0,27 \times 10^{12}$ particules par analyse NanoFCM™. Malgré cette grande quantité de VE, nous avons obtenu une très faible quantité d'ARN. La quantité des ARNs extraits était en effet trop faible pour être détectée/mesurée par spectrophotométrie (Biodrop™) ou à l'aide d'un kit plus sensible utilisant une sonde fluorescente (Qubit™). L'extrait d'ARN a cependant été ensuite déposé sur gel d'électrophorèse polyacrylamide dénaturant à l'urée (Urea-PAGE). Pour comparaison, nous avons extrait les ARN des cellules ayant produit les VE et déposé 20 µg de cet extrait sur un gel similaire (Figure 13A). Comme prévu, une coloration au SYBR Gold a

confirmé la présence d'ARN dans les deux fractions, indiquant que certaines molécules d'ARN sont associées aux extraits de VE chez *C. neoformans*. Le profil électrophorétique obtenu avec les ARN vésiculaires suggère la présence d'ARNr 28S et 18S ainsi que d'ARN de tailles intermédiaires pouvant être des ARNt, des snoARN ou encore des snARN. Pourtant, même si ces ARN étaient présents dans l'extrait vésiculaire obtenu, nous ne pouvons être certains qu'ils étaient associés aux VE. En effet, lors de la dernière étape d'ultracentrifugation du protocole de purification que nous avons utilisé, de petits débris cellulaires non vésiculaires auraient pu être purifiés en même temps que les vésicules. Pour valider davantage la présence d'ARN associés aux VE, nous avons rajouté une étape de purification sur un gradient de densité d'iodixanol (Ford et al., 1994). La purification des VE par gradient d'iodixanol est une stratégie parfois utilisée pour séparer les différents types de vésicules chez les mammifères (Kowal et al., 2016) et a plus récemment été adaptée à l'étude des vésicules de champignons (Bleackley et al., 2020; Reis et al., 2021; Rutter et al., 2022). Cette stratégie a aussi déjà été utilisée chez *C. neoformans*. Dans cette étude, la présence d'ARN a été recherchée par Bioanalyzer (Agilent) dans chacune des 12 fractions récoltées à l'issue de la séparation et a été détectée principalement dans la fraction 8 (Reis et al., 2021). Même si le profil obtenu suggère que des molécules d'ARN pourraient être associées aux vésicules, les concentrations obtenues étaient tellement faibles qu'il est difficile de conclure.

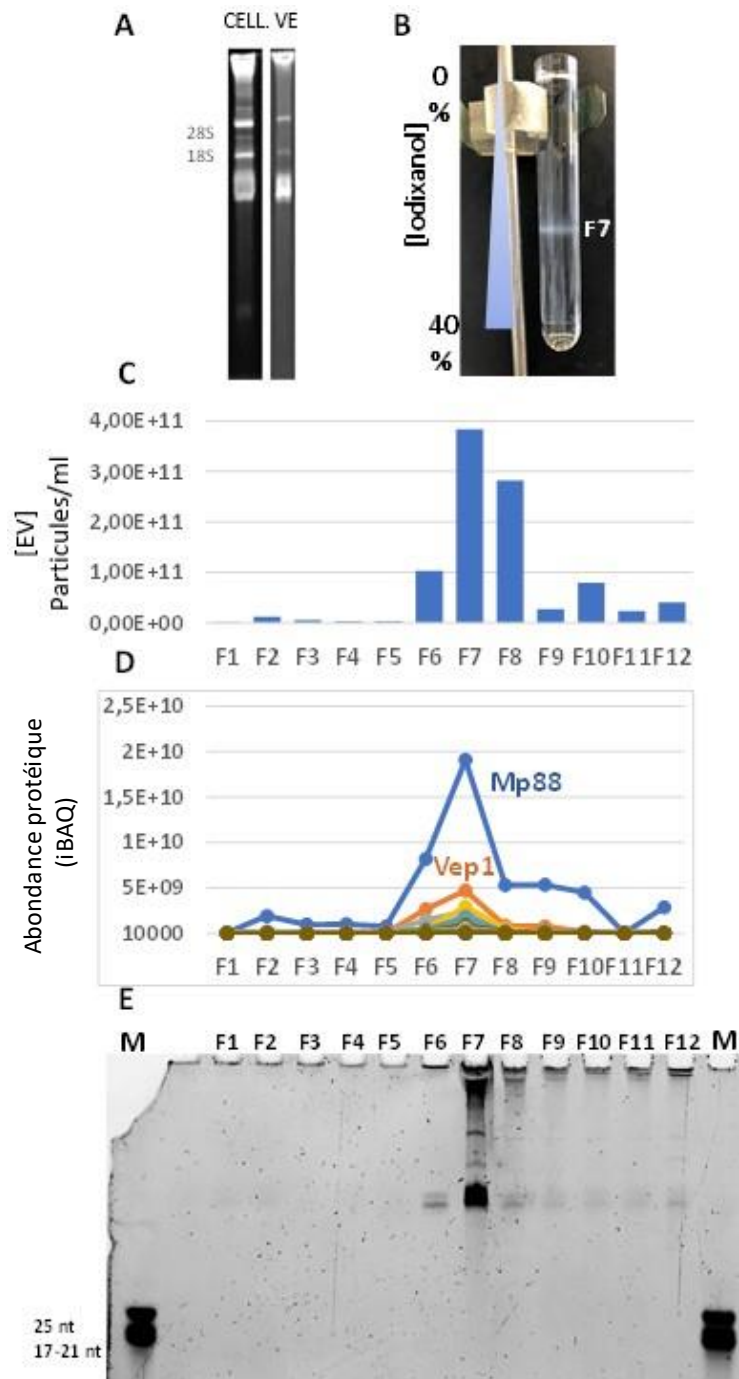


Figure 13 : Certaines molécules d'ARN sont associées aux VE

(A) Analyse Urea-PAGE des extraits d'ARN des cellules (CELL) et des VE. (B) Photographie d'un tube de gradient d'iodixanol révélant un anneau blanchâtre contenant des VE autour de la fraction 7. (C) Concentration des VE dans chaque fraction évaluée par NanoFCM™. (D) Analyse protéomique de la fraction du gradient d'iodixanol confirmant la prévalence de Mp88 et Vep1 dans les VE de *C. neoformans*. (E) Analyse Urea-PAGE de l'ARN purifié à partir de chaque fraction du gradient d'iodixanol. Il est important de noter que tandis que l'évaluation de la concentration en VE et les analyses protéomiques ont été réalisées sur le même gradient, les ARN ont été extraits d'une expérience indépendante.

Après 18 heures d'ultracentrifugation à 100.000 *g* de notre gradient d'iodixanol, nous avons observé un unique anneau blanchâtre situé au centre du gradient, qui était par ailleurs transparent (Figure 13B). L'examen de douze fractions du gradient par cytométrie en flux avec un appareil NanoFCM™ (Rizzo et al., 2021b) a révélé que la majorité des VE étaient associées aux fractions 6, 7 et 8 (Figure 13C). La septième fraction, qui correspond à la position de l'anneau blanchâtre, présentait notamment la plus forte association avec les VE suggérant que cet anneau en serait constitué. Nous avons ensuite analysé les douze fractions de ce gradient par protéomique. Un total de 952 protéines a ainsi été identifié dans ces 12 fractions. De façon intéressante, la majorité de ces protéines (60%) comme estimée par l'« Intensity Based Absolute Quantification » (IBAQ) (Schwanhäusser et al., 2011) étaient associées aux fractions 7 et 8 que nous avons identifiées comme étant les plus riches en VE (Figure 13D) (Tableau S1). Comme attendu, les protéines Mp88 et Vep1, précédemment décrites comme les plus abondantes dans les VE de *C. neoformans*, représentent ici 58% du total des protéines présentes dans les fractions 7 et 8, confirmant notre observation précédente (Rizzo et al., 2021b). Ces observations confirmaient donc que le protocole de préparation des VE permettait d'obtenir des extraits dans lesquels très peu de contaminants étaient présents. Elles confirmaient aussi le modèle de composition vésiculaire proposé par Rizzo et collègues en 2021. Afin de déterminer si les ARN identifiés dans l'extrait vésiculaire initial étaient aussi associés aux fractions du gradient contenant les vésicules, nous avons purifié les ARN de chacune des 12 fractions du gradient et les avons analysées par électrophorèse dénaturante (Urea-PAGE). Comme espéré, une coloration au SYBR Gold a révélé qu'une partie significative de l'ARN était liée aux fractions 6, 7 et 8, qui contenaient des VE et des protéines vésiculaires (Figure 13E). Dans l'ensemble, ces analyses suggèrent fortement que les ARN purifiés à partir de notre extrait initial de VE sont effectivement associés aux VE.

II. Analyse des petits ARN associés aux VE de *Cryptococcus*

Comme indiqué plus haut, les données publiées suggéraient que les VE de *C. neoformans* contenaient une grande diversité de molécules d'ARN (Peres da Silva et al., 2018, 2015). Nous avons donc utilisé différentes stratégies de séquençage pour tenter d'avoir une vision globale du transcriptome vésiculaire de *Cryptococcus*. Ainsi, nous avons d'abord construit une librairie de séquençage en utilisant un kit dédié aux petits ARN sur de l'ARN total extrait des VE et préalablement traité par une acide pyrophosphatase Cap-Clip afin de retirer la coiffe (Wallace et al., 2020). Afin d'essayer de ne pas biaiser notre analyse nous avons choisi d'omettre l'étape de sélection par la taille normalement utilisée dans le protocole. Cette approche devrait nous fournir une vue complète du transcriptome des VE de *Cryptococcus*, car elle nous permet de générer à partir des mêmes échantillons des « reads » de petits ARN, mais aussi, bien que dans une moindre mesure, des « reads » dont la taille peut monter jusqu'à 100 nucléotides correspondant à des ARNm ou des ARNInc. Nous avons cartographiés/alignés un total de 1,4 million de « reads » sur le génome de référence de *C. neoformans* H99 (Janbon et al., 2014). Nous avons aligné une partie substantielle de ces reads (38 %) sur les loci de l'ADN ribosomique ou sur le génome mitochondrial. Les « reads » restants, d'une taille médiane de 26 nucléotides, étaient majoritairement alignés (98,3 %) en sens des régions annotées du génome nucléaire, soit en antisens. 81,7 % de ces « reads » étaient alignés dans le sens de régions annotées comme des ARNt. Une première visualisation des profils d'alignement par IGV (Robinson et al., 2011) dans ces régions nous a permis de voir que les coordonnées de certains de ces ARNt n'étaient pas correctes et suggérait aussi que certains ARNt n'étaient pas du tout annotés dans la version de l'annotation publiée en 2020 (Wallace et al., 2020). Nous avons corrigé

cette annotation (Tableau S4) en utilisant le logiciel tRNAscan (Chan et al., 2021) ce qui nous a permis de rajouter 8 ARNt à l'annotation et de corriger les coordonnées de 3 autres. Les « reads » à ces loci avaient une taille médiane de 27 nucléotides et étaient alignés sur les régions 3' et 5' de ces ARNt (Figure 14A, C).

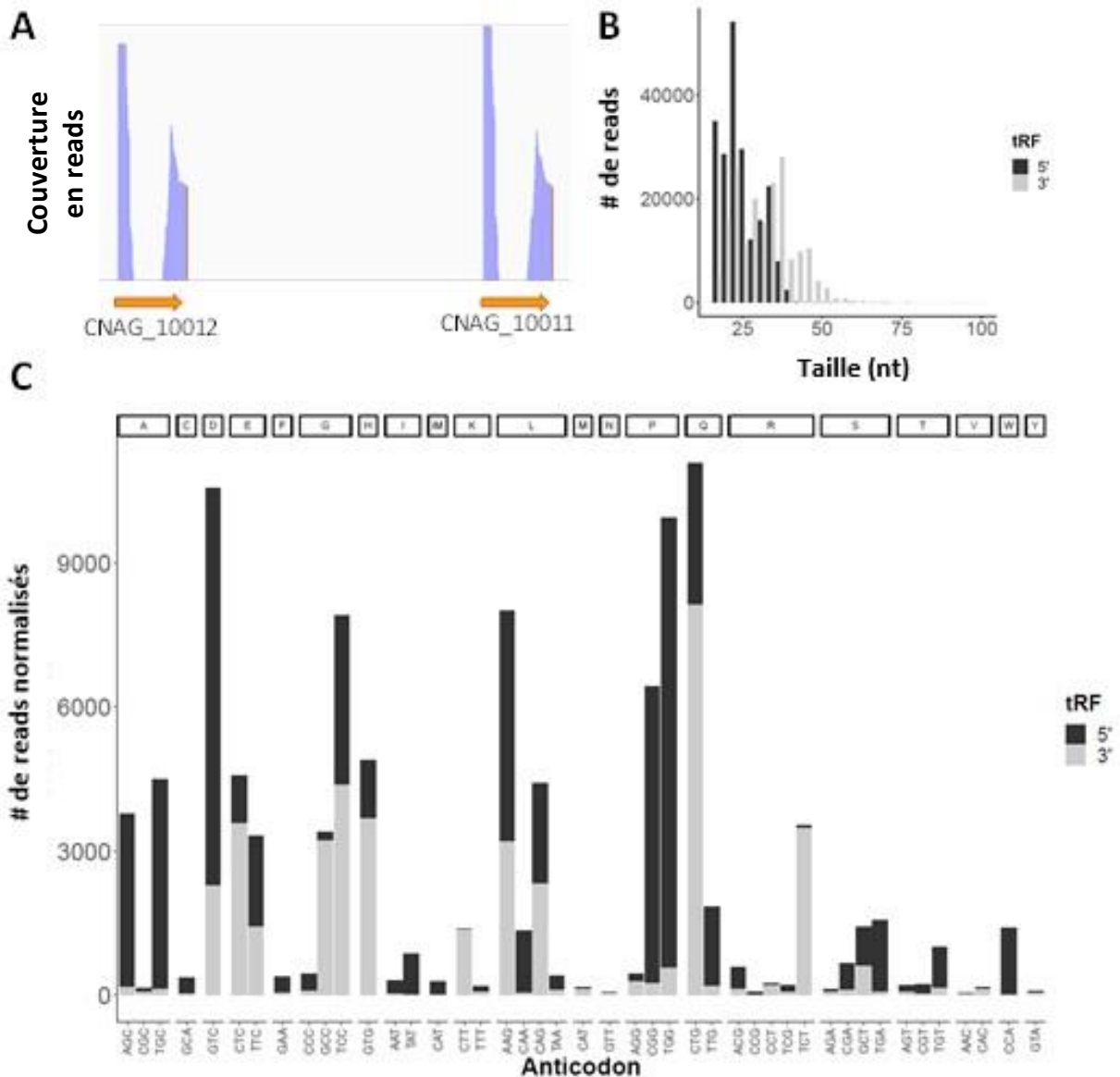


Figure 14 : les tRFs sont associés aux VE chez *Cryptococcus*

(A) Exemples de profil RNA-seq visualisés par IGV au niveau des loci d'ARNt CNAG_10012 et CNAG_10011. (B) Nombre et taille des « reads » alignés sur les loci d'ARNt en fonction de leur position. (C) Nombre de « reads » alignés sur chaque ARNt de *C. neoformans*.

Ces tRFs ont été précédemment identifiés comme étant associés aux VE chez différents organismes (Artuyants et al., 2020; Chiou et al., 2018; Gámbaro et al., 2020; Lambertz et al., 2015). Chez les mammifères, les tRFs semblent être des biomarqueurs prometteurs (Pandey et al., 2021). Ils semblent aussi jouer un rôle régulateur dans différents types de cancers, certaines maladies neurodégénératives et en réponse à certaines infections (Pandey et al., 2021). Certains tRFs semblent être associés avec la protéine Argonaute (Ago) chez différents organismes, et plusieurs études ont rapporté le rôle des tRFs dans la voie de l'interférence à l'ARN (Maute et al., 2013; Ren et al., 2019; Sharma et al., 2023). Comme indiqué plus haut, ces ARN ont également été rapportés comme étant associés aux VE produites par certains pathogènes fongiques humains (Munhoz da Rocha et al., 2021; Peres da Silva et al., 2015). Cependant, leurs fonctions dans ces organismes restent à démontrer (Jöchel et al., 2008). De même, bien que notre analyse ait révélé qu'un sous-ensemble de ces ARNt sont surreprésentés (Pro-ARNt (CGG et UGG), Leu-ARNt (AAG), Gly-ARNt (UCC), Gln-ARNt (CUG) et Asp-ARNt (GUC)) (Figure 14C), les mécanismes associés à cet enrichissement demeurent inconnus. Enfin, nous avons réalisé le même type d'expériences chez *C. deneoformans* et *C. deuterogattii* et observé un schéma similaire suggérant que la présence de tRFs associés aux VE est un phénomène général chez *Cryptococcus* (Figure supplémentaire 1).

L'examen des « reads » correspondant à l'orientation antisens (Figure 15A-haut) de régions du génome annotées montre un enrichissement significatif des « reads » d'une longueur de 20 à 25 nucléotides, commençant par une uridine (Figure 15B). Cette caractéristique est bien connue pour les petits ARN interférents de type siARN (Dumesic et al., 2013). Comme attendu, ces séquences sont antisens de transposons ou de séquences similaires à des transposons (Dumesic et al., 2013; Janbon et al., 2010) (Tableau S2). En effet, les siARN participent à l'inhibition de l'expression des transposons

pour maintenir l'intégrité du génome (Dumesic et al., 2013; Janbon et al., 2010). En outre, nous avons observé un nombre important de « reads » de type siARN s'alignant sur les régions centromériques, ce qui est cohérent avec la richesse en transposons et fragment de transposons associée à ces régions chez *Cryptococcus* (Yadav et al., 2018). L'analyse des résultats obtenus à partir d'ARN extrait de VE produites par *C. deneoformans* a donné des résultats très similaires. En revanche, comme on s'y attendait, chez *C. deuterogattii*, qui est une espèce chez laquelle la voie de l'ARN interférence a été perdue au cours de l'évolution (D'Souza et al., 2011), aucun « read » de type siARN n'a été identifié (Figure supplémentaire 2).

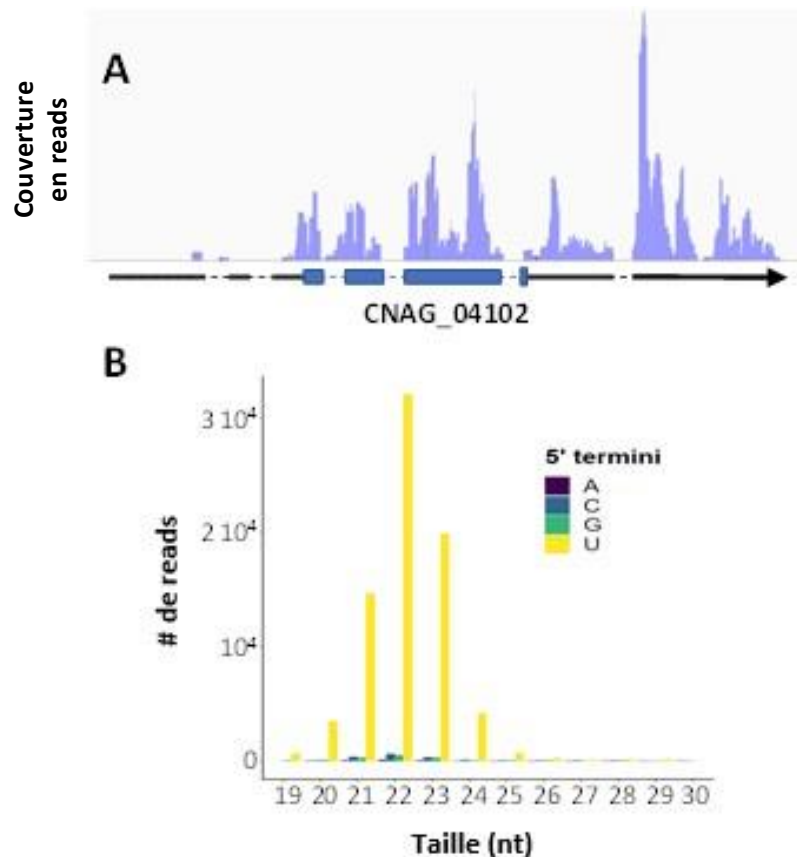


Figure 15 : Des siARN sont associés aux VE produites par *C. neoformans*

(A) Profil IGV d'alignement de « reads » au niveau d'un transposon. Il est important de noter que toutes ces séquences sont ici antisens du gène. (B) Diagramme représentant le nombre de « reads » antisens de régions annotées en fonction de leur taille et de la nature de leur premier nucléotide.

Afin d'évaluer les différences potentielles entre le transcriptome des petits ARN des VE et celui des cellules, nous avons construit des bibliothèques de

séquençage à partir d'ARN de 20-30 nt purifiés sur gel et provenant pour une part de VE et d'autre part de cellules produisant ces VE. Ces expériences ont été effectuées en collaboration avec l'équipe d'Eugène Gladishev (Unité Epigénétique et Génétique Moléculaire, Institut Pasteur). Cette expérience a été réalisée en triplicat. Entre 3,8 et 5,6 millions de « reads » pour les ARN issus des VE et entre 8 et 9,9 millions de « reads » pour les cellules ont été cartographiés sur le génome. Une fois encore, la plupart des « reads » (98 % pour les VE et 98,6 % pour les cellules) étaient soit des tRFs, soit des siARN. Afin de comparer les données obtenues pour les cellules avec celles des vésicules, nous avons arbitrairement défini 37838 régions de 500 pb représentant tout le génome de *C. neoformans* et nous avons compté le nombre de « reads » s'alignant sur chacune de ces régions. Nous avons ainsi identifié 86 régions du génome sur lesquelles plus de 100 « reads » étaient alignés et qui semblaient plus « enrichies » dans les échantillons « VE » par rapport aux échantillons « cellules » (Tableau S3). Pour 3 de ces régions, la couverture était due à un seul microsatellite répété de type GAU enrichi jusqu'à 514 fois dans les VE par rapport aux cellules. Cependant, la présence dans les données de séquençage de « reads » présentant la même répétition GAU, mais en plus grand nombre, et qui n'étaient pas alignés sur le génome du fait d'un nombre de répétitions trop important suggère que ces séquences pourraient être des artefacts de séquençage n'ayant aucune base biologique. Néanmoins, sur la région la plus enrichie, nous avons identifié une séquence presque exclusive des échantillons de VE avec un enrichissement de 897 fois par rapport aux échantillons issus de cellules. Ces séquences de 21 nt de long (5' AAAGTGGGAAGCGACGATGGC 3') s'alignent en sens sur le gène codant la protéine ribosomale Rrp36 (CNAG_03284) (Tableau S3). Par ailleurs, 66 de ces régions enrichies dans les échantillons VE correspondent à des tRFs (Tableau S3). De façon intéressante, nous avons identifié 36 ARNt pour lesquels le ratio du nombre de « reads » associés à l'une des moitiés de l'ARNt par rapport à l'autre est statistiquement différent entre l'échantillon

« cellule » et l'échantillon « VE ». Par exemple, au locus CNAG_10094, le tRF 5' est 9,4 fois plus abondant dans les VE que dans les cellules alors que l'abondance du tRF 3' est à peine modifiée (0,8 fois) (Figure 16). Un schéma similaire, mais inversé, a été observé au locus CNAG_10061. Dans l'ensemble, cette analyse a révélé la présence de siARN et de tRF associés aux VE chez *C. neoformans*. L'enrichissement spécifique d'un sous-ensemble de petits ARN dans les VE suggère un mécanisme spécifique d'adressage. En accord avec ce modèle, les analyses de protéomique ont permis de montrer que l'unique protéine argonaute de *C. neoformans* Ago1 (CNAG_04609) était présente dans notre extrait vésiculaire (Tableau S1).

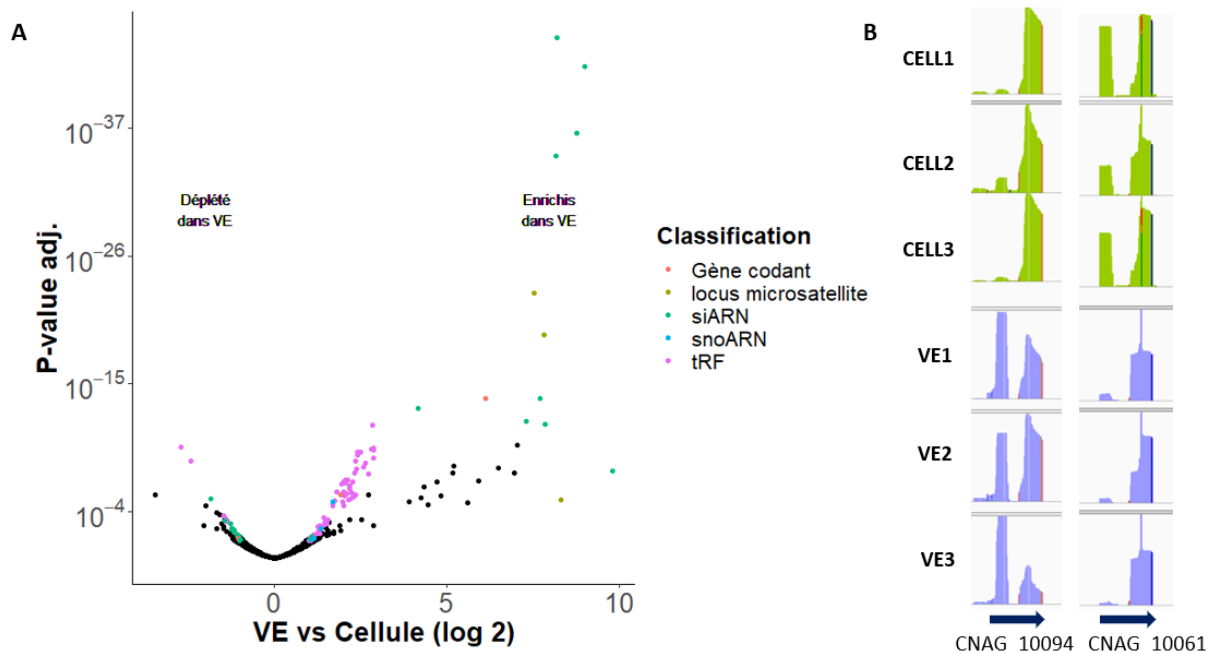


Figure 16 : Des siARN et des tRF sont spécifiquement adressés vers les VE

(A) Diagramme de type « volcano plot » illustrant l'enrichissement de certains petits ARN dans les VE. Seuls les loci présentant au moins 100 « reads » dans les échantillons des VE ont été considérés. (B) Couverture des reads associés aux tRFs des ARNt CNAG_10094 et CNAG_10061 dans les échantillons provenant des cellules (CELL) ou des VE.

III. Des snoARN et d'autres ARN de tailles moyennes sont associés aux VE

L'analyse des séquences obtenues à partir de bibliothèques « petits ARNs » construites en omettant une sélection par la taille (voir plus haut) a également permis d'identifier des « reads » plus longs (>70 nt) représentant 2 % (n = 11928 séquences) des séquences alignées sur le génome de *C. neoformans*. Ces séquences s'alignent sur 105 régions génomiques très précisément délimitées. La plupart d'entre elles (n= 101) correspondent à des régions annotées (ARNInc ou gènes codants) et, de manière surprenante, une grande proportion d'entre elles (n=61) étaient positionnées dans des introns (Figure 17A). Bien que ces régions ne partagent aucune identité avec des séquences de fonction connue dans les bases de données, des analyses par BLAST itératifs et des études structurales utilisant la base de données RFAM (Kalvari et al., 2018) ont suggéré qu'un certain nombre de ces séquences étaient des snoARN. En fait, des analyses plus poussées des séquences ont permis d'identifier 67 snoARN avec des boîtes C/D, présentant une structure classique de type tige-boucle-tige et caractérisée par deux séquences consensus principales (boîte C (RUGAUGA) et boîte D (CTGA)). L'un d'entre eux se trouvait dans une région intergénique entre le CNAG_00306 et le CNAG_00307. Nous l'avons donc annoté comme CNAG_13212 (Tableau S4). Il est intéressant de noter que si l'on ne considère que les champignons étroitement apparentés à *Cryptococcus spp.*, seules les parties des introns contenant les snoARN sont conservées (Figure 17B). Ceci est particulièrement remarquable pour les snoARN portés par les ARNInc. Comme le montre la Figure 17B, les seules parties de l'ARNnc CNAG_12489 conservées chez les proches parents de *Cryptococcus* sont les parties centrales des introns portant les snoARN. Les parties exoniques de cet ARNInc peuvent être identifiées par l'analyse des données RNA-seq obtenues à partir des ARN

polyA+ cellulaires générées par Rizzo et collègues en 2023 (Rizzo et al., 2023). Cependant, leur faible conservation de séquence suggère que le rôle de cet ARNinc pourrait être limité à la production de snoARN. En fait, cette localisation préférentiellement intronique diverge de celle connue chez la levure *S. cerevisiae* chez qui seulement 7 snoARN (Vincenti et al., 2007) sont portés par des introns et se rapproche plus de celle présente chez l'homme (Kufel and Grzechnik, 2019)

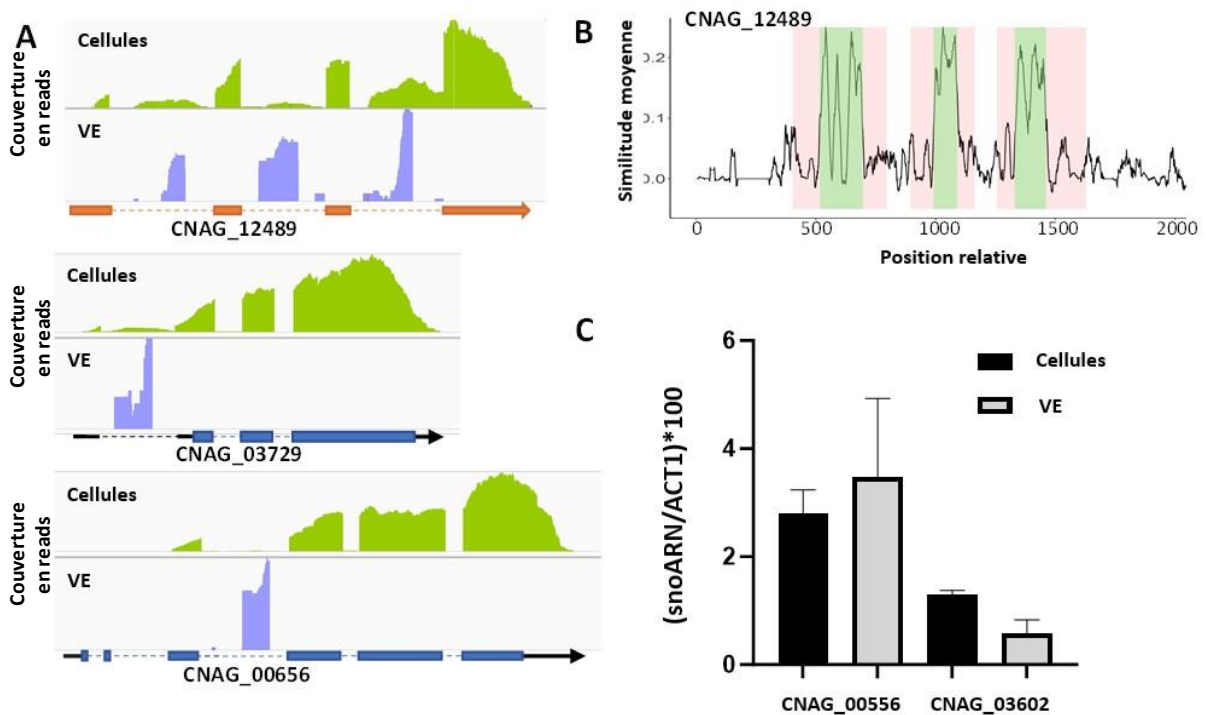


Figure 17 : Des snoARN sont associés aux VE chez *Cryptococcus*

(A) Exemples de profils de couverture des séquences obtenues à partir d'échantillons d'ARN de cellules (vert, séquençage polyA+) ou de vésicules (violet) au niveau des gènes codants CNAG_03729 et CNAG_00656 et de l'ARNinc CNAG_12489. L'ARNinc CNAG_12489 contient trois snoARN introniques. Les gènes codants CNAG_03729 et CNAG_00659 contiennent respectivement un snoARN dans leur région 5'UTR et dans un intron de leur CDS. (B) Pour CNAG_01289, l'alignement des séquences des espèces apparentées à *C. neoformans* (*C. deneoformans*, *C. deuterogattii*, *Kwoniella heveanensis*, *Kwoniella bestiolae* et *Kwoniella dejecticola*) a révélé que la conservation se limite à la partie correspondant aux snoARN (vert) à l'intérieur des introns (rose). (C) Les snoARN ne sont pas enrichis dans les VE comme l'a révélé la RT-qPCR. Des échantillons d'ARN extraits de cellules produisant des VE ont été utilisés comme témoins. Les expériences ont été réalisées en triplicat.

Nous avons également identifié 29 snoARN avec des boîtes H/ACA. Cependant, alors que 83,6 % des snoARN avec des boîtes C/D se trouvent dans des introns, la plupart des snoARN à boîtes H/ACA (55,2 %, n=16) sont situées dans des ARNInc. Néanmoins quelques-uns se trouvent dans les 5' UTR (n=2) ou 3'UTR (n=4) de gènes codants ou encore dans des introns de gènes codants (n=4). Un snoARN chevauchait le CDS et le 3'UTR de CNAG_03007 (*CPC1*), ce qui suggère un problème d'annotation, mais nous n'avons pas modifié l'annotation à ce locus car notre solution ne nous semblait pas optimale. Le snoARN H/ACA restant était lui situé dans une région intergénique entre les loci CNAG_06094 et CNAG_06095. Nous l'avons annoté comme CNAG_13211 (Tableau S4). Dans ces cas également, la conservation de la séquence dans d'autres champignons en dehors des proches parents se limite aux boîtes de consensus. L'analyse visuelle à l'aide d'IGV de données RNA-seq obtenues à partir d'ARN extrait de cellules produisant des VE (Rizzo et al., 2023) (Figure 17A) suggérait que les snoARN pourraient être enrichis dans les échantillons vésiculaires. Cependant, les expériences menées en triplicata à partir d'ARN total extrait de VE et de cellules produisant des VE n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse, soulignant la nécessité d'une confirmation expérimentale dans ce type d'analyse (Figure 17C). L'analyse des données de séquençage des VE de *C. deneoformans* et *C. deuterogattii* a révélé un profil similaire et une très grande conservation de ces séquences dans les gènes homologues des trois espèces de *Cryptococcus* (Figure supplémentaire 3).

Dans le transcriptome des VE, nous avons également trouvé des « reads » associés à des ARNInc sans fonction annotée (Tableau S4). Nous avons récupéré manuellement les séquences correspondantes et effectué une analyse RFAM pour identifier leur fonction putative. Nous avons ainsi identifié les cinq principaux composants du spliceosome. U1 (CNAG_12993) et U2 (CNAG_12573) étaient structurellement bien annotés, mais n'avaient pas de fonction assignée. L'annotation de U4 (CNAG_13128) a été modifiée

pour correspondre au profil d'alignement des « reads ». U6 (locus nouvellement annoté CNAG_13208), situé dans la région entre CNAG_05444 et CNAG_05445, n'était pas annoté. U5 était présent dans la région 5'UTR du gène codant CNAG_01093, mais le profil d'alignement des VE et des « reads » de RNA-seq des cellules suggère que la transcription de U5 et de CNAG_01093 pourrait être indépendante. Cette hypothèse est étayée par la présence d'une zone de répétitions polyT à l'extrémité 3' du locus U5 putatif, qui est une caractéristique de la terminaison de la transcription de l'ARN polymérase III. Nous avons donc réannoté ce locus comme CNAG_13209. Nous avons également identifié les loci CNAG_12266 et CNAG_12660 comme les composantes ARN des RNases P et MRP, respectivement. Enfin, nous avons annoté l'ARN 7SL au nouveau locus CNAG_13210.

IV. Les ARN polyA associés aux VE

Nous avons également préparé des bibliothèques de séquençage d'ARN polyA+ à partir d'échantillons d'ARN extraits des VE en trois exemplaires. Cependant, le premier réplica a produit un très faible nombre de « reads » et a donc été exclu des analyses ultérieures. Nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux obtenus à partir d'ARN extrait de cellules produisant des VE (Rizzo et al., 2023). Le nombre de « reads » alignés sur le génome, hors ADNr et génome mitochondrial, allait de, respectivement, 3 à 6,8 millions et 5,1 à 8,7 millions de « reads » pour les VE et les cellules. Après comptage du nombre de « reads » alignés sur chaque région annotée, notre analyse n'a pas permis d'identifier de région annotée particulièrement surreprésentée dans les VE par rapport aux cellules (Figure 18). Parmi les gènes ayant au moins 100 « reads » dans tous les échantillons VE et cellules, l'ARNm le plus enrichi (CNAG_07756, enrichi 5,06 fois) dans les VE code Cdc20, l'enzyme activatrice de l'ubiquitine ligase APC/C de *C. neoformans*. Malgré cela, nos données ne nous permettent pas

à ce jour de tirer des conclusions définitives concernant un enrichissement particulier de certains ARNm ou ARNnc dans les ARN extraits des VE.

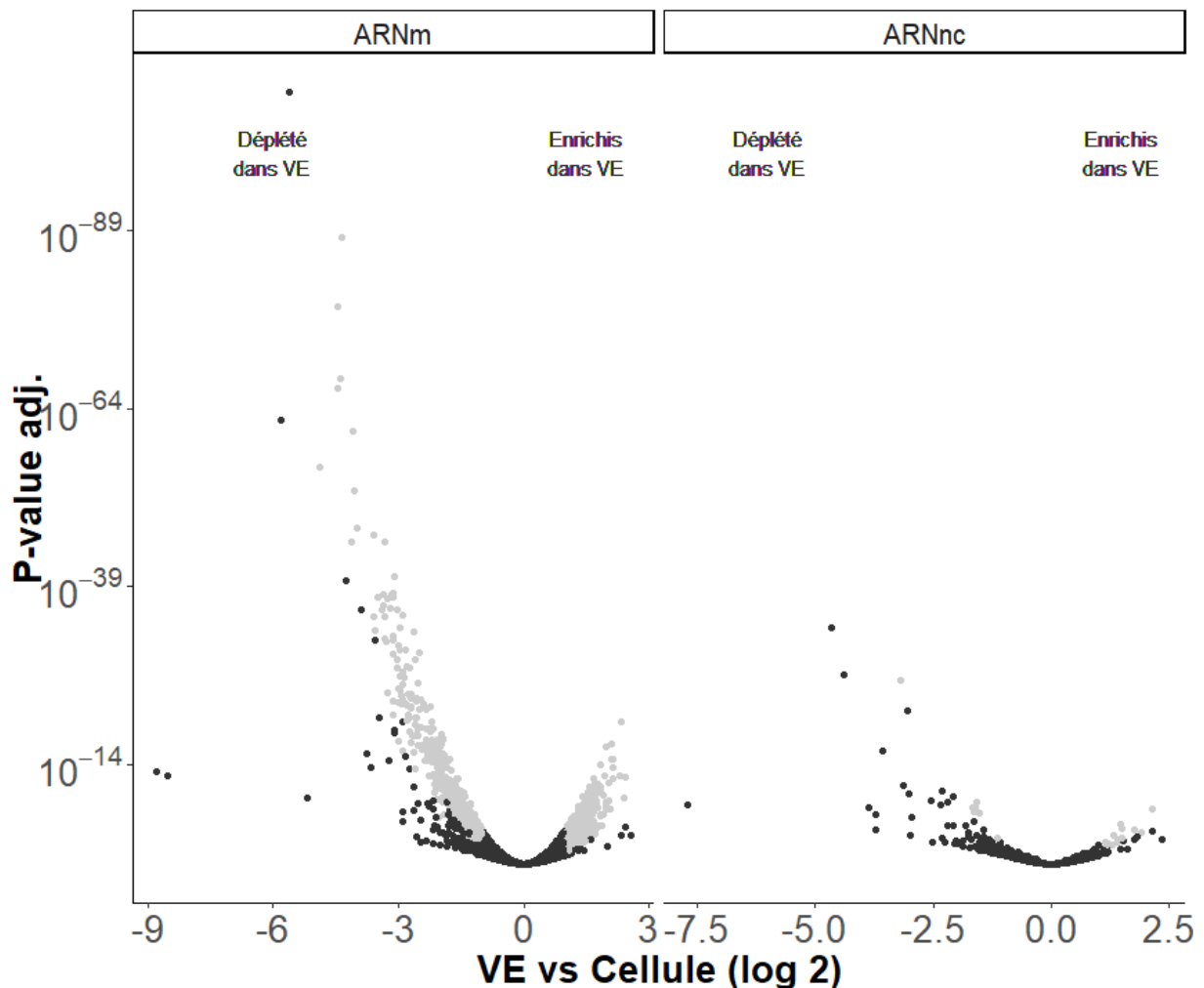


Figure 18 : Diagramme « Volcano plot » illustrant les différences entre les transcriptomes cellulaire et vésiculaire chez *C. neoformans* après séquençage des ARN polyadénylés

Discussion

Au cours de ces dernières années, notre laboratoire ainsi que d'autres, ont produit une grande quantité de données décrivant la structure et la dynamique du transcriptome cellulaire de *Cryptococcus* (Gonzalez-Hilarion et al., 2016; Gröhs Ferrareze et al., 2021; Janbon et al., 2014; Kalem and Panepinto, 2022). Cependant, la diversité des molécules d'ARN sécrétées par ces levures reste peu décrite. Ceci est d'autant plus surprenant que

l'étude du transcriptome extracellulaire est devenue récemment un thème de recherche important chez de nombreux organismes, y compris certains microbes (Gruner and McManus, 2021; Hulstaert et al., 2020; Pita et al., 2020). Chez les champignons, le transcriptome extracellulaire a été principalement étudié par l'analyse des molécules d'ARN associées aux VE (Bitencourt et al., 2022). Ainsi, plusieurs articles ont rapporté la présence de petits ARN ainsi que de certains ARN polyadénylés associés aux extraits de VE fongiques (Alves et al., 2019; Bitencourt et al., 2022; Černoša et al., 2022; He et al., 2021; Kusch et al., 2023; Kwon et al., 2021; Liu et al., 2018b, 2020; Peres da Silva et al., 2019, 2018, 2015; Rayner et al., 2017; Wang et al., 2016; Weiberg et al., 2013; Zamith-Miranda et al., 2021). Pourtant, notre vision globale du transcriptome vésiculaire reste floue du fait notamment de l'hétérogénéité des protocoles utilisés pour préparer ces extraits, de la diversité des stratégies utilisées pour préparer les bibliothèques de séquençage et pour analyser les données ainsi que de l'absence générale de validation expérimentale. Dans l'étude présentée dans ce chapitre, nous avons utilisé un protocole standardisé et validé pour préparer des extraits de vésicules de trois espèces de *Cryptococcus*. Nous avons démontré que les VE et les ARN co-sédimentent dans un gradient de densité d'iodixanol. Nous avons purifié et séquencé ces ARN en parallèle avec des ARN extraits des cellules produisant ces VE. Enfin, nous avons analysé ces données en utilisant une annotation des génomes de *Cryptococcus* que nous avons améliorée sur le plan structurel et fonctionnel. Il est important de souligner qu'aucune des données que nous avons produites ici n'est entièrement nouvelle. Néanmoins, elles ont pour la plupart renforcé et amélioré des résultats antérieurs obtenus par d'autres équipes. Par exemple, comme publié précédemment par Peres Da Silva et collègues (Peres da Silva et al., 2015), nous avons identifié un grand nombre de « reads » correspondant à des tRF dans le transcriptome vésiculaire, mais nous avons utilisé ici une version améliorée de l'annotation des ARNt chez *C. neoformans* pour mieux les quantifier. Notre analyse a aussi révélé, et ceci pour la première fois,

que la proportion de 5'tRFs et de 3'tRFs pouvait ne pas être la même dans les VE et les cellules au niveau de certains ARNt, suggérant des mécanismes d'adressage spécifiques. A ce jour, l'origine des tRFs chez *Cryptococcus* est inconnue car aucun homologue de l'angiogénine (Kumar et al., 2014) n'a pu être identifié chez cette espèce. Il est néanmoins intéressant de noter que *C. deuterogattii* qui est une espèce qui a perdu la plupart des gènes impliqués dans la voie de l'ARN interférence a néanmoins conservé dans son génome un gène codant un homologue de Dicer (D'Souza et al., 2011). Il est tentant de penser que cette protéine pourrait être impliquée dans la maturation des tRFs comme il a été montré dans d'autres organismes (Kazimierczyk et al., 2022). Ceci reste évidemment à démontrer expérimentalement. De même, la présence de « reads » spécifiques de snoARN associés à des VE fongiques avait été précédemment rapportée (Peres da Silva et al., 2015). Nous avons ici étendu ces informations en omettant notamment l'étape de sélection de la taille dans un protocole de construction de bibliothèques de séquençage de petits ARN. Les résultats présentés dans ce chapitre permettent notamment de compléter la caractérisation du snoRNAome de *Cryptococcus* (Canzler et al., 2018; Kalem and Panepinto, 2022). Nos expériences suggèrent qu'il n'y pas d'enrichissement des snoARNs dans les VE par rapport aux cellules. Cela ne veut pas dire que ces ARN ne sont que des contaminants sans fonction aucune. Par exemple, la protéine argonaute WAGO, qui joue un rôle majeur dans la biologie des VE chez le ver parasite *H. bakeri*, n'est pas particulièrement enrichie dans les VE par rapport aux cellules (Chow et al., 2019). Des données similaires ont été publiées chez les mammifères, où la communication intercellulaire associée aux VE est supposée reposer principalement sur l'échange de miARN (Weaver and Patton, 2020). En fait, la présence de la sous-unité 3 du complexe ribonucléoprotéique H/ACA, Nop10 (CNAG_01049) dans le protéome vésiculaire est en accord avec un adressage actif de certains snoARN vers les VE. Nos résultats ont également confirmé la très faible conservation de la séquence des snoARN chez les

champignons. Pour l'immense majorité des snoARN identifiés, une analyse par BLAST classique ne révèle aucune similarité de séquence entre un snoARN de *Cryptococcus* et ceux de *S. cerevisiae*. Nos données suggèrent aussi que la fonction unique de certains ARNinc est de porter des snoARN dans leurs introns. Enfin, nous avons confirmé la présence de siARN associés aux VE de *C. neoformans*. La présence de siARN vésiculaires avait déjà été signalée chez *C. neoformans* et *C. deneoformans* (Liu et al., 2020; Peres da Silva et al., 2015) en accord avec de nombreuses études menées chez de nombreux organismes en dehors des champignons (He et al., 2021; O'Brien et al., 2020). La structure de ces « reads » et le fait que nous ne puissions pas les identifier chez *C. deuterogattii* suggèrent fortement qu'il s'agit de véritables siARN. De plus, en accord avec la littérature sur *Cryptococcus*, les « reads » de siARN étaient spécifiques des transposons ou de séquences de type transposon (Dumesic et al., 2013; Janbon et al., 2010). Ici aussi, l'analyse de nos données protéomiques a révélé que l'unique protéine argonaute de *C. neoformans* est associée aux VE, ce qui suggère encore une fois un adressage actif des siARN. La présence de siARN associés aux VE n'est pas propre à *C. neoformans* (Peres da Silva et al., 2015) et semble être un schéma général chez les champignons (Alves et al., 2019; Černoša et al., 2022; He et al., 2021; Kusch et al., 2023; Liu et al., 2018b, 2020; Peres da Silva et al., 2015; Rayner et al., 2017). Dans la littérature récente, certains de ces siARN ont été considérés comme étant des miARN (Alves et al., 2019; Černoša et al., 2022; Kusch et al., 2023; Liu et al., 2018b; Peres da Silva et al., 2015; Rayner et al., 2017). Cependant, l'identification des miARN d'une espèce fongique par l'alignement de séquences sur des miARN de mammifères est à notre sens une stratégie très discutable et qui nécessite pour le moins quelques analyses et validations supplémentaires. En fait, la réanalyse de certains de ces miARN et des molécules de type miARN identifiés chez les champignons a démontré qu'aucun d'entre eux ne satisfaisait aux divers critères de qualité susceptibles de confirmer leur fonction (Johnson et al., 2022). À ce

stade, un rôle de type miARN de certains de ces siARN ne peut être exclu, mais cela nécessite une confirmation expérimentale.

Les fonctions de ces molécules d'ARN associées aux VE de *Cryptococcus* restent inconnues, mais la littérature regorge d'exemples de mécanismes de communication intercellulaire basée sur des échanges de molécules d'ARN au sein d'une même espèce, mais aussi entre espèces, y compris dans les interactions hôte-pathogène (Cai et al., 2021; Tsatsaronis et al., 2018). Bien que les VE de *C. neoformans* aient été étudiées dans le détail en ce qui concerne leur structure et leur composition, leurs rôles éventuels dans la communication entre les cellules, mais aussi lors de l'interaction avec l'hôte restent encore à découvrir. Des exemples d'échanges de siARN/miARN, mais aussi de tRFs et de snoARN d'une cellule à l'autre via les VE induisant une réponse spécifique dans un contexte pathogénique ou non pathogénique sont de plus en plus nombreux dans la littérature (Buck et al., 2014; Ren et al., 2019; Rimer et al., 2018; Sahr et al., 2022; Weiberg et al., 2013). Ces résultats suggèrent que ce type d'échanges pourrait également exister chez *Cryptococcus* mais la démonstration de leur existence reste encore à faire et la caractérisation des mécanismes qui leur seraient associés est un véritable défi.

Partie 2 : Mise au point d'essais de communication cellule-cellule chez *Cryptococcus neoformans*

Introduction

Comme décrit dans l'introduction générale de ce manuscrit, les VE sont des vecteurs de choix pour la communication intercellulaire. Chez les mammifères, elles participent à l'équilibre physiologique de l'organisme, mais elles jouent aussi un rôle dans des situations pathogéniques incluant différents cancers, le diabète ou certaines maladies neurodégénératives (Chen and Rechavi, 2022; Chivet et al., 2014; Pourali et al., 2023) . Il est maintenant aussi évident qu'elles participent aux interactions hôtes/pathogènes dans de nombreux cas. Ces dix dernières années, des données spectaculaires ont été publiées révélant le rôle des VE produites par des pathogènes sur l'organisme infecté, mais aussi celui des VE de l'hôte sur le pathogène. Ces interactions médiées par les VE peuvent exister quel que soit le type de pathogène et d'hôte comme le montrent des publications sur des interactions bactéries/mammifères (Bomberger et al., 2009), bactéries/plantes (Ionescu et al., 2014), parasites/mammifères (Buck et al., 2014), et champignons/plantes (He et al., 2023). Dans certains modèles, les mécanismes de ces interactions dépendantes des VE ont été étudiés dans le détail. On peut évidemment citer ici les travaux du laboratoire de Hainling Jin qui ont permis ces dernières années de comprendre comment des échanges bidirectionnels de VE entre la plante modèle *A. thaliana* et le champignon pathogène *B. cinerea* régulent l'évolution de l'infection chez la plante (Cai et al., 2018; He et al., 2023; Wang et al., 2017; Weiberg et al., 2013). Plus récemment, l'étude des VE produites par la bactérie pathogène *Legionella pneumophila* a permis de

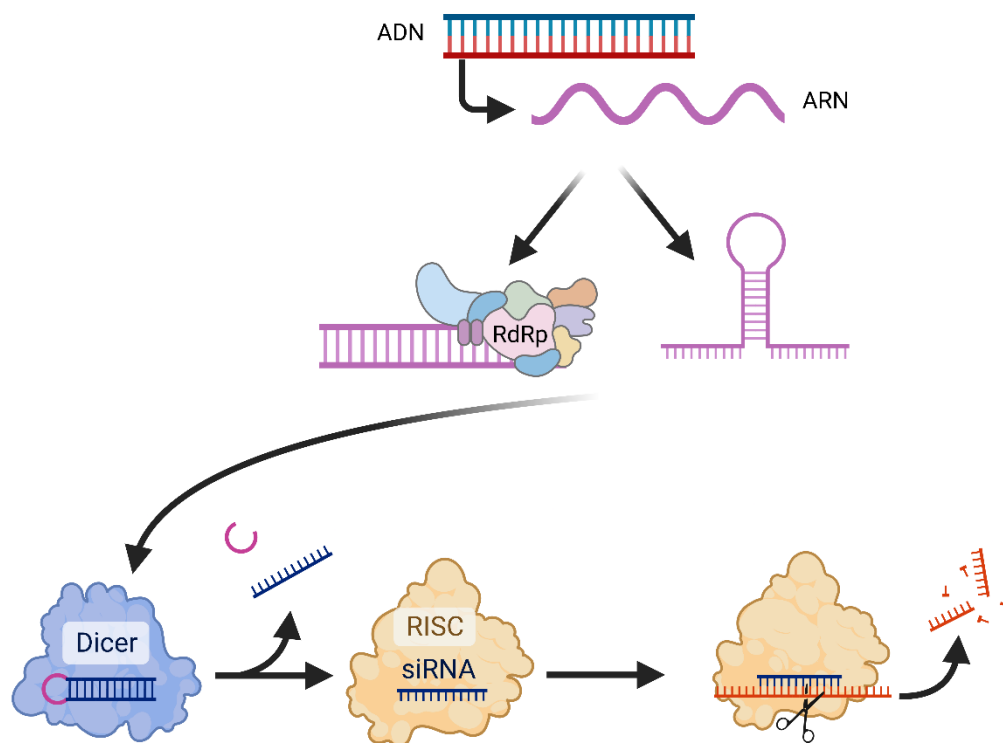
comprendre comme celle-ci régule la réponse des cellules de l'hôte (Sahr et al., 2022). Néanmoins, dans la plupart des cas, le détail des mécanismes mis en jeu dans ces interactions médiées par les VE reste mal connu. Chez les champignons notamment, les mécanismes sous-tendant la production et l'éventuelle internalisation des VE restent largement méconnus (Rizzo et al., 2021a) bien que les conséquences de cette internalisation sont parfois bien décrites (Regente et al., 2017).

La première partie de cette thèse a permis d'obtenir une description détaillée des différents ARN associés aux VE de *C. neoformans*. Plusieurs familles d'ARN vésiculaires ont été ainsi identifiées incluant des ARNr, ARNInc, snARN, snoARN, ARNt, tRF, siARN et des ARNm. La seconde partie de ma thèse consiste à exploiter ces nouvelles connaissances pour étudier la communication intercellulaire chez cette levure pathogène. En effet, et comme décrit dans l'introduction, le support physique du message médié par les VE est souvent une molécule d'ARN et diverses familles d'ARN jouant un rôle dans ce processus ont été précédemment décrites chez plusieurs organismes (Chen and Rechavi, 2022; Heeney and Frank, 2023; L. Zhang et al., 2022). De plus et comme décrit précédemment, diverses publications ont mis en évidence les conséquences de ces échanges chez les champignons qu'ils soient pathogènes ou pas (Ahadi et al., 2016; Bielska et al., 2018; Bitencourt et al., 2022; Bleackley et al., 2020; Hai et al., 2020; He et al., 2023; Honorato et al., 2022; Ikeda et al., 2018; Johansson et al., 2018; Souza et al., 2019; Vallhov et al., 2020; Zarnowski et al., 2018; K. Zhao et al., 2019). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces échanges restent mal compris. Notre idée était donc ici de non seulement confirmer le rôle des ARN contenus dans les VE dans la communication intercellulaire, mais aussi de mettre au point des essais utilisables pour réaliser un crible génétique visant à comprendre comment des VE et les informations qu'elles contiennent peuvent être échangées d'une cellule à une autre chez les champignons.

I. Des siARN comme vecteurs de communication intercellulaire

Notre première idée était d'exploiter la présence de siARN dans les extraits vésiculaires. Comme évoqué précédemment, des siARN (Boîte 1) et des miARN ont été identifiés dans les VE produites par de nombreux organismes, tels que des plantes, des mammifères, des parasites ou encore des champignons (Buck et al., 2014; Cai et al., 2019; Ruf et al., 2022; Valadi et al., 2007). Plusieurs exemples de communication impliquant ces ARN ont été décrits dans la littérature (Cai et al., 2018). Par exemple, chez la souris, le miARN miR-124a qui est associé aux exosomes neuronaux induit la surexpression de la protéine GLUT1 et module ainsi l'activation synaptique (Morel et al., 2013). De même, des miARN associés aux VE sont des facteurs de régulation de l'ostéoporose (Zhang et al., 2022). Comme indiqué précédemment, le transfert bidirectionnel de miARN vésiculaires entre la plante *A. thaliana* et le champignon *B. cinerea* permet d'une part de réprimer l'expression de facteurs de virulence du champignon et d'autre part de limiter la réponse immunitaire de la plante (He et al., 2023; Wang et al., 2017; Weiberg et al., 2013). Enfin, les VE du ver parasite *H. polygyrus* peuvent inhiber la réponse immunitaire et allergique de l'hôte de manière miARN-dépendante (Buck et al., 2014). Par analogie, nous avons émis l'hypothèse que des siARN pourraient être échangés entre cellules par l'intermédiaire de VE. Il s'agissait ici de modifier artificiellement le contenu en siARN des VE pour pouvoir évaluer leur effet sur une cellule réceptrice. Plus précisément, il s'agissait de construire une souche de *C. neoformans* émettrice de VE contenant des siARN spécifiques d'un ARN exprimé dans une souche réceptrice et de mesurer l'effet d'une éventuelle régulation transcellulaire.

Boîte 1 : Mécanisme de dégradation des ARN par ARNi



Les siARN sont impliqués dans des mécanismes d'ARN interférence (ARNi) (Sioud, 2021). Identifié pour la première fois en 1998 chez *C. elegans* (Fire et al., 1998), le mécanisme d'ARNi a depuis été identifié chez de nombreux eucaryotes (Shabalina and Koonin, 2008). La production de petits ARN interférents est initiée par la formation d'un ARN double brin (ARNdb). Un tel ARN peut résulter de l'appariement de deux ARN dont les séquences sont complémentaires, du repliement d'un ARN dont la structure secondaire est en épingle à cheveux ou de la synthèse d'un brin complémentaire par une ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRP). L'ARNdb est alors clivé par la protéine Dicer (Dcr) pour produire un duplex de 20-25 pb. Ce duplex est chargé dans une protéine Argonaute (Ago), et l'un des brins dit brin passager est éliminé à cette étape. Le complexe composé de la protéine Ago et du siARN simple brin restant est appelé complexe RISC (RNA-induced silencing complex). À l'intérieur de ce complexe, le siARN sert de guide en raison de sa séquence complémentaire de celle de l'ARN cible. L'activité catalytique du complexe RISC est portée par la protéine Argonaute qui possède une activité endonucléase permettant d'initier la dégradation de l'ARN cible. Ce mécanisme de répression appelé PTGS (post-transcriptional gene silencing) est principalement utilisé pour lutter contre l'invasion du génome par des transposons et contre des virus (Ghildiyal and Zamore, 2009). Par ailleurs, le mécanisme d'ARNi peut également jouer un rôle répressif au niveau transcriptionnel (TGS, transcriptional gene silencing). Dans ce cas, le complexe portant le petit ARN est recruté à proximité d'une région génomique à réprimer par appariement avec un ARN en cours de synthèse et initie la formation d'hétérochromatine ou encore la méthylation de l'ADN (Holoch and Moazed, 2015).

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier qu'il était possible de modifier artificiellement le contenu en siARN des extraits vésiculaires. En 2002, le laboratoire de Tamara Doering aux Etats-Unis avait montré qu'il était possible d'induire la répression de l'expression d'un gène de *C. neoformans* en exprimant un ARN en épingle à cheveux spécifique de ce gène (Liu et al., 2002). Dans cette étude, les auteurs avaient utilisé des constructions spécifiques des gènes *ADE2* et *CAP59* pour induire respectivement un phénotype d'auxotrophie vis-à-vis de l'adénine et acapsulaire (Liu et al., 2002). Ces deux phénotypes sont aisément visualisables directement sur boîtes de Petri. Notamment, comme chez *S. cerevisiae*, la mutation ou la répression du gène *ADE2* induit chez *C. neoformans* l'accumulation d'un intermédiaire métabolique coloré (5-phosphoribosyl-aminoimidazole) donnant une coloration rouge/rosé aux colonies (Dorfman, 1969). Quelques années plus tard, le laboratoire de Guilhem Janbon a utilisé une construction similaire ciblant le gène *ADE2* pour identifier des gènes impliqués dans le processus d'ARN interférence chez *C. deneoformans* (Janbon et al., 2010). Dans cette étude, la couleur des colonies obtenues (Figure 19A) avec une souche produisant un ARN en épingle à cheveux spécifique d'*ADE2* a été utilisée comme révélateur de l'implication des gènes *AGO1*, *AGO2*, *DCR1*, *DCR2* ou *RDP1* dans le processus d'ARN interférence. Même si aucune de ces deux études n'a démontré formellement la production de siARN dirigés contre *ADE2*, il est plus que vraisemblable que le mode d'action de cette épingle à cheveux repose sur un mécanisme d'ARNi. Nous avons donc choisi d'utiliser cette épingle à cheveux pour modifier artificiellement le pool de siARN d'une souche de *C. deneoformans* en espérant que ces siARN seraient chargés dans des vésicules extracellulaires. Nous avons donc extrait les vésicules de cette souche en la faisant pousser sur milieu complet, purifié les ARN associés, et construit une « librairie » de séquençage en utilisant un kit dédié au séquençage des petits ARN (QIAseq miRNA Library Kit, Qiagen). Cette « librairie » a été réalisée sur des ARN totaux vésiculaires traités par

une acide pyrophosphatase Cap-Clip afin d'éliminer la coiffe (Wallace et al., 2020). Nous avons comparé les résultats obtenus avec cette souche avec ceux obtenus avec la souche de référence de *C. deneoformans* JEC21 (voir Partie 1). La profondeur de séquençage était similaire pour les deux souches avec 1,91 M reads s'alignant sur le génome de JEC21 pour la souche porteuse de l'épingle à cheveux contre 1,31 M reads pour la souche sauvage. Le transcriptome vésiculaire de la souche mutante produisant l'épingle à cheveux se démarquait par la présence de 1066 séquences de type siARN complémentaires du gène *ADE2* (locus CNE02500) alors qu'aucune séquence de ce type n'était détectée dans le transcriptome issu de la souche sauvage (Figure 19B). En fait dans la souche exprimant cet ARN en épingle à cheveux, le gène *ADE2* est le troisième gène présentant le plus de « reads » antisens dans le génome. Comme attendu, ces siARN se concentrent au niveau des 500 premiers nucléotides du gène *ADE2*, région utilisée pour la construction de l'épingle à cheveux (Figure 19B). Finalement, cette expérience préliminaire nous a permis de confirmer que l'expression d'un ARN en épingle à cheveux chez *C. deneoformans* est associée à la production de siARN spécifiques et que ces siARN sont retrouvés dans les extraits vésiculaires. Il est donc possible par cette stratégie de modifier artificiellement le transcriptome des VE de *Cryptococcus*.

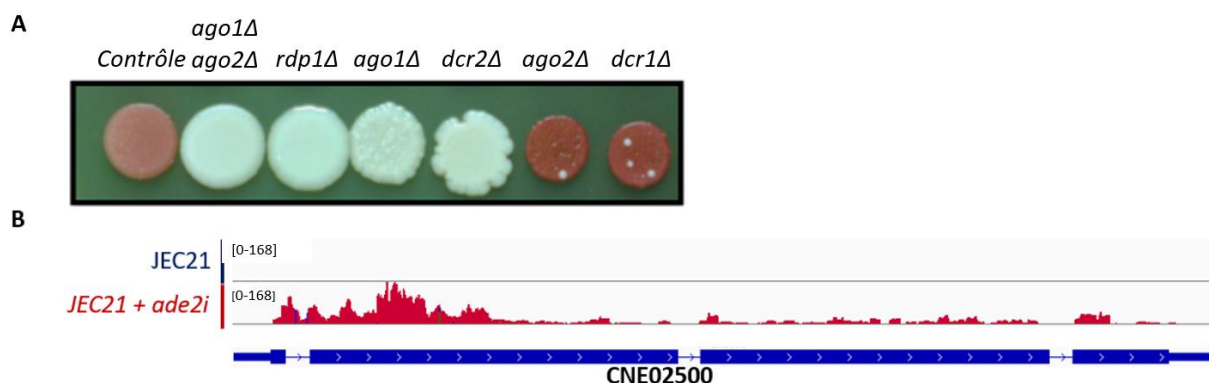


Figure 19 : L'expression d'un ARN en épingle à cheveux est associée avec la présence de siARN spécifiques dans les VE chez *C. deneoformans*

(A) Phénotype de souches mutantes de divers acteurs de la voie de l'ARN interférence lorsqu'elles expriment un ARN en épingle à cheveux spécifique du gène *ADE2*. (B) Visualisation par IGV de la couverture en reads au niveau du gène *ADE2* du transcriptome vésiculaire de souches de *C. deneoformans* exprimant un ARN en épingle à cheveux spécifique du gène *ADE2* (*JEC21 + ade2i*) ou non (*JEC21*). L'annotation du gène *ADE2* est indiquée avec des rectangles pleins représentant les exons et les lignes représentant les introns. Le CDS est représenté par des rectangles plus large.

Il nous est rapidement apparu qu'il n'était pas possible d'utiliser une souche exprimant un ARN en épingle à cheveux spécifique du gène *ADE2* pour mettre au point des essais de communication. En effet, la répression de l'expression du gène *ADE2* est associée avec un fort ralentissement de la croissance sur milieu YPD qui rendrait la détection de la réception du message plus difficile. Nous avons donc choisi d'utiliser un système artificiel où la souche réceptrice exprimerait un gène codant pour une protéine fluorescente et la souche émettrice un ARN en épingle à cheveux spécifique (Figure 20). Dans un premier temps, nous avons construit une souche (pGDP1-mNeon) exprimant le gène codant la protéine fluorescente *mNeonGreen* qui montre une fluorescence plus forte que la GFP chez *C. neoformans* (Spencer et al., 2020). Nous avons choisi de placer le gène *mNeonGreen* sous le contrôle du promoteur fort du gène *GDP1* qui code la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase chez *C. neoformans* (Varma and Kwon-Chung, 1999). Chez *C. neoformans*, les loci SH1 (Safe Haven 1) et SH2 (Safe Haven 2) sont des régions intergéniques couramment utilisées pour intégrer des transgènes. En effet, l'intégration d'un transgène à l'un de ces loci ne semble pas affecter la virulence ou la croissance (Arras et al., 2015; Upadhyya et al., 2017). J'ai donc choisi d'intégrer la construction permettant l'expression de *mNeonGreen* sous contrôle du promoteur *GDP1* au locus *SH2* à l'aide du système CRISPR/Cas9. Pour cela, j'ai intégré cette construction dans un plasmide portant un gène de résistance à la généticine. L'adressage du transgène a été réalisé par la co-transformation avec deux fragments d'ADN : le premier permettait la production de l'enzyme Cas9 et l'autre la production d'un ARN guide ciblant le locus SH2 (Fan and Lin, 2018)

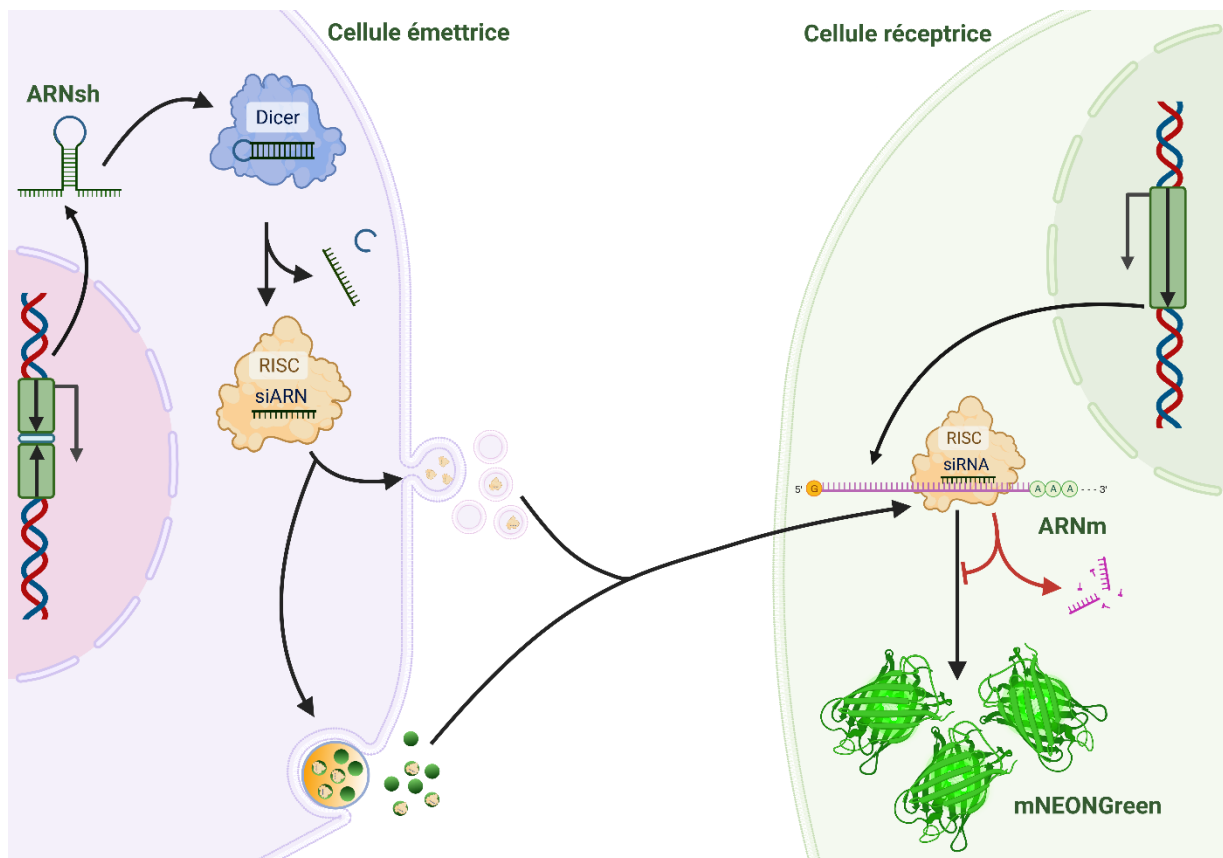


Figure 20 : Représentation schématique de la stratégie de communication par siARN

Une cellule émettrice produit un ARN en épingle à cheveux construit à partir de la séquence de l'ARNm du mNEONGreen. Après maturation par Dicer et formation d'un complexe RISC, les siARN sont envoyés dans le milieu extracellulaire par le biais de vésicules extracellulaires. L'intégration des vésicules par une cellule réceptrice, exprimant un ARNm mNEONGreen codant une protéine fluorescente éponyme, conduit à la répression de ce gène.

J'ai parallèlement construit un transgène permettant de produire un ARN en épingle à cheveux (ARNsh) spécifique de l'ARNm *mNeonGreen* sous le contrôle du même promoteur *GDP1* (Varma and Kwon-Chung, 1999). Cet ARN présente une structure double brin construite à partir des 500 premiers nucléotides du CDS de *mNEONGreen*. Cette construction a été insérée dans un plasmide portant un gène de résistance à la nourséothricine et permettant, en présence de Cas9 et d'un ARN guide spécifique, une intégration au locus SH1 (Arras et al., 2015). Afin de vérifier la fonctionnalité de cette souche (pGDP1-ARNsh), j'ai aussi construit une

souche contrôle (pGDP1-mNeon+pGDP1-ARNsh portant à la fois le transgène permettant l'expression de *mNEONGreen* au locus SH2 et présentant au locus SH1 la construction permettant de produire l'ARN en épingle à cheveux.

Ces trois souches (pGDP1-mNeon, pGDP1-ARNsh, pGDP1-mNeon+pGDP1-ARNsh) ont été cultivées en milieu complet jusqu'à atteindre une phase stationnaire et la fluorescence des cellules a été analysée par microscopie à épifluorescence et comparée à celle de la souche sauvage (Figure 21). Comme attendu, la souche sauvage et la souche pGDP1-ARNsh ne présentent pas de fluorescence. Au contraire, les cellules de la souche pGDP1-mNeon présentent une forte fluorescence cytoplasmique. En revanche, la fluorescence du double mutant pGDP1-mNeon+pGDP1-ARNsh est fortement réduite. Cela suggère que dans ces cellules, des siARN issus de l'ARN en épingle à cheveux permettent la répression de l'expression du gène *mNEONGreen*.

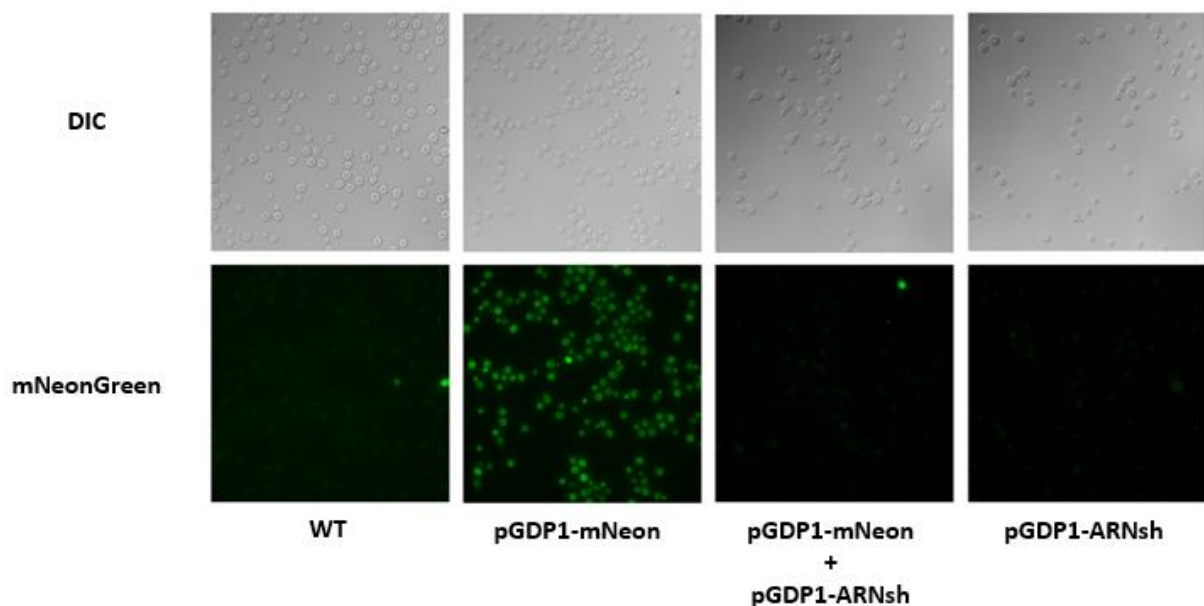


Figure 21 : Photographies de cellules de *C. neoformans* cultivées en milieu complet liquide pendant 16h à 30°C et observées par microscopie en lumière blanche (DIC) ou à épifluorescence (mNeonGreen)

La souche sauvage (WT) est comparée ici avec une souche exprimant soit le gène mNEONGreen (pGDP1-mNeon), soit un ARN en épingle à cheveux spécifique de

l'ARNm mNEONGreen (pGDP1-ARNsh soit les deux constructions pGDP1-mNeon+pGDP1-ARNsh).

L'idée de notre essai de communication était de réaliser des co-cultures de la souche pGDP1-mNeon avec la souche pGDP1-ARNsh dans des conditions propices à la production de VE. Ce contexte devrait permettre d'observer si les petits ARNs produits par une souche peuvent agir dans l'autre. Nous avons donc répété cette expérience en changeant les conditions de culture. En effet, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de cette thèse et comme démontré par le laboratoire de Guilhem Janbon, la production de VE par *C. neoformans* n'est pas constante. Cette production est maximale au moment du passage de la phase exponentielle à la phase stationnaire lorsque les cellules sont cultivées sur un milieu minimum solide à 30°C (Rizzo et al., 2023). Dans les conditions d'ensemencement et de préculture utilisées en routine au laboratoire, cela correspond à 18-24h après l'étalement des cellules. Nous avons donc voulu vérifier que les observations réalisées avec nos trois souches cultivées en milieu complet liquide pouvaient être reproduites en utilisant un milieu minimal solide.

Comme attendu, la souche sauvage et la souche pGDP1-ARNsh ne sont pas fluorescentes contrairement à la souche pGDP1-mNeon (Figure 22). Cependant, et contrairement à ce qui avait été observé en milieu liquide complet, la souche pGDP1-mNeon+pGDP1-ARNsh ne semblait pas moins fluorescente.

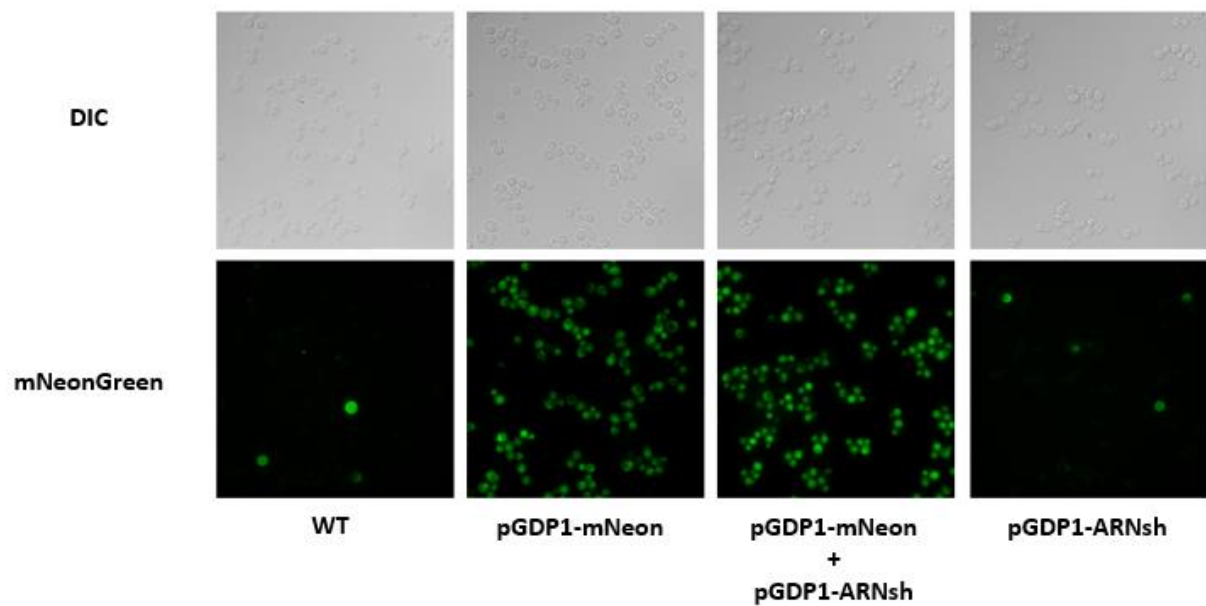


Figure 22 : Photographies de cellules de *C. neoformans* cultivées sur milieu minimum solide pendant 24h à 30°C et observées par microscopie en lumière blanche (DIC) ou à épifluorescence (mNEONGreen)

La souche sauvage (WT) est comparée ici avec une souche exprimant soit mNEONGreen (pGDP1-mNeon), soit un ARN en épingle à cheveux spécifique de l'ARNm mNEONGreen (pGDP1-ARNsh), soit les deux constructions (pGDP1-mNeon+pGDP1-ARNsh).

Pour les deux souches exprimant mNeonGreen, il existait une grande hétérogénéité parmi les cellules, certaines cellules étant très fortement fluorescentes alors que d'autres paraissaient complètement négatives. Bien que nous n'ayons pas pu détecter une extinction massive de la fluorescence en présence de l'ARN en épingle à cheveux, nous nous sommes demandé si une extinction plus subtile pourrait être détectable, comme par exemple un nombre de cellules non fluorescentes plus important dans la souche pGDP1-mNeon+pGDP1-ARNsh. Nous avons donc évalué la proportion de cellules fluorescentes ou non dans chacune des populations par cytométrie en flux. Cette analyse a révélé une quasi-superposition des profils entre les populations cellulaires exprimant mNEONGreen en présence ou absence de l'ARN en épingle à cheveux (Figure 23). Ce résultat confirme donc l'absence d'effet de l'ARN en épingle à cheveux sur l'expression de mNEONGreen lorsque les cellules sont cultivées dans des conditions optimales pour la production de vésicules.

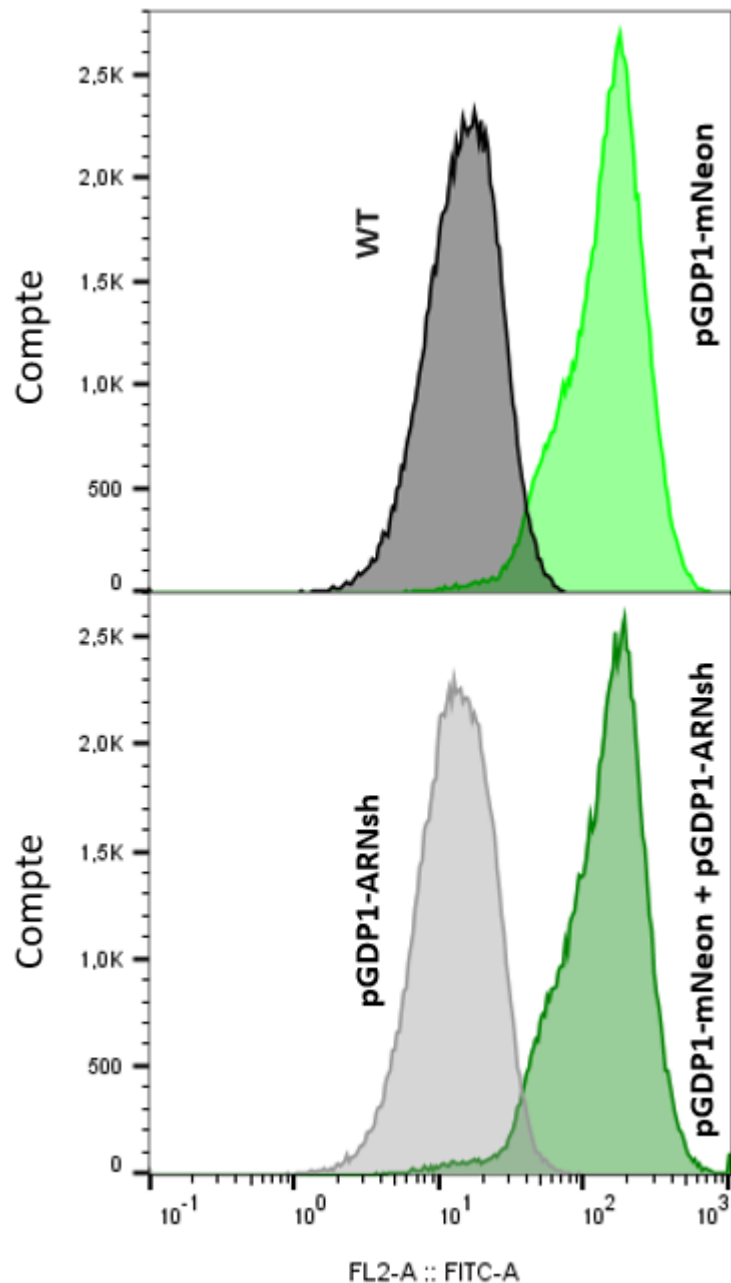


Figure 23 : Mesure de la fluorescence des cellules par cytométrie en flux

Quantification du nombre de cellules en fonction de l'intensité de leur fluorescence (filtre FL2-A ::FITC-A). En haut, souches contrôles non fluorescente (WT) et pGDP1-mNeon. En bas, souches pGDP1-ARNsh et pGDP1-mNeon+pGDP1-ARNsh.

Ce résultat était inattendu. Une des hypothèses envisageables est que le promoteur *GDP1* soit moins actif dans ces conditions de culture. Dans ce cas, si la demi-vie de la protéine mNEONGreen est significativement plus longue que celle de l'ARN en épingle à cheveux, il se pourrait que la régulation ne soit plus visible dans ces conditions et que l'on observe

uniquement de la fluorescence issue de protéines mNEONGreen produites antérieurement. Nous avons donc voulu déterminer si la répression par l'épingle à cheveux était encore détectable au niveau des ARN. Nous avons recherché cet effet en mesurant l'abondance des transcrits *mNEONGreen* par RT-qPCR dans chacune des souches cultivées sur milieu minimum solide pendant 24h ou 30h, c'est-à-dire au moment où les VE sont produites (Figure 24). A 24h de culture, il ne semble pas y avoir de différence notable de la quantité de l'ARNm *mNEONGreen* en présence ou en absence de l'ARN en épingle à cheveux. En revanche, après 30h de culture, la quantité de l'ARNm *mNEONGreen* semble diminuée d'un facteur 4 dans la souche pGDP1-mNeon+pGDP1-ARNsh. Ces résultats restent préliminaires et méritent dans un premier temps d'être reproduits. Néanmoins, ce résultat ainsi que les observations réalisées en milieu liquide complet sont encourageants et suggèrent que ce système peut être fonctionnel dans certaines conditions.

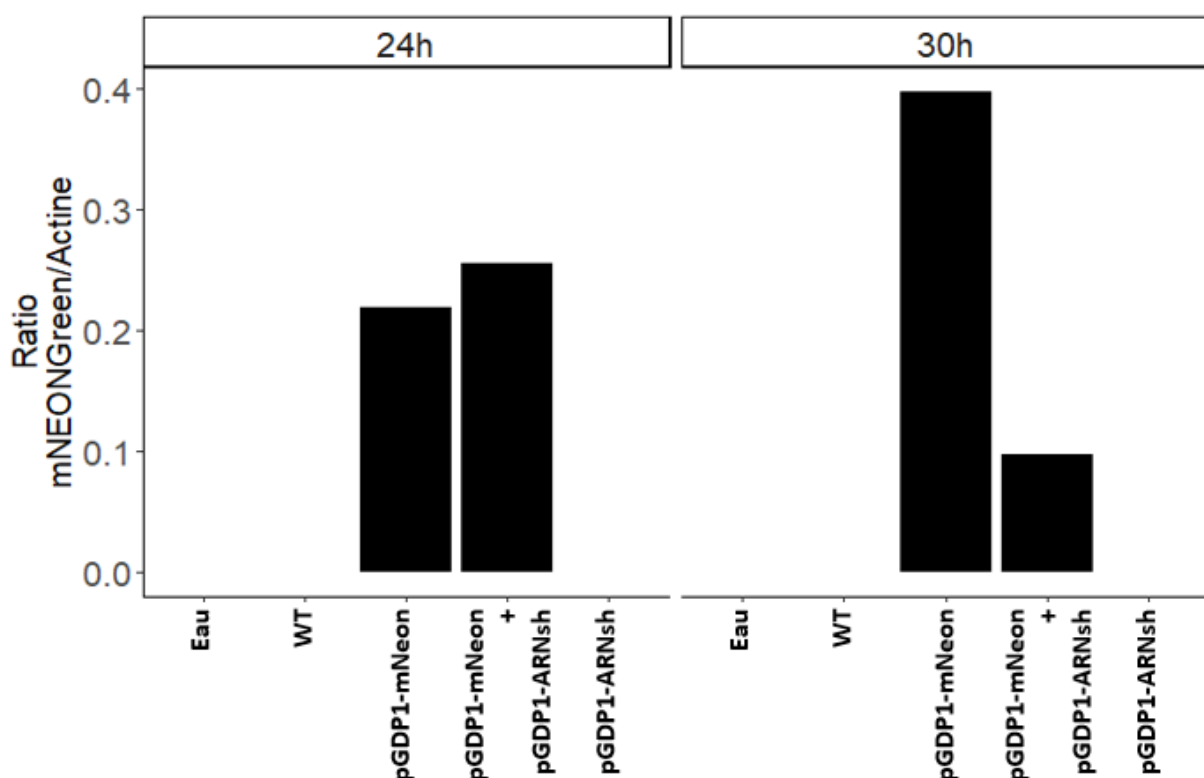


Figure 24 : Quantification de l'ARNm mNEONGreen par RT-qPCR

Ratio mNEONGreen/Actine quantifié par RT-qPCR après 24h ou 30h de culture dans les conditions de production des VE.

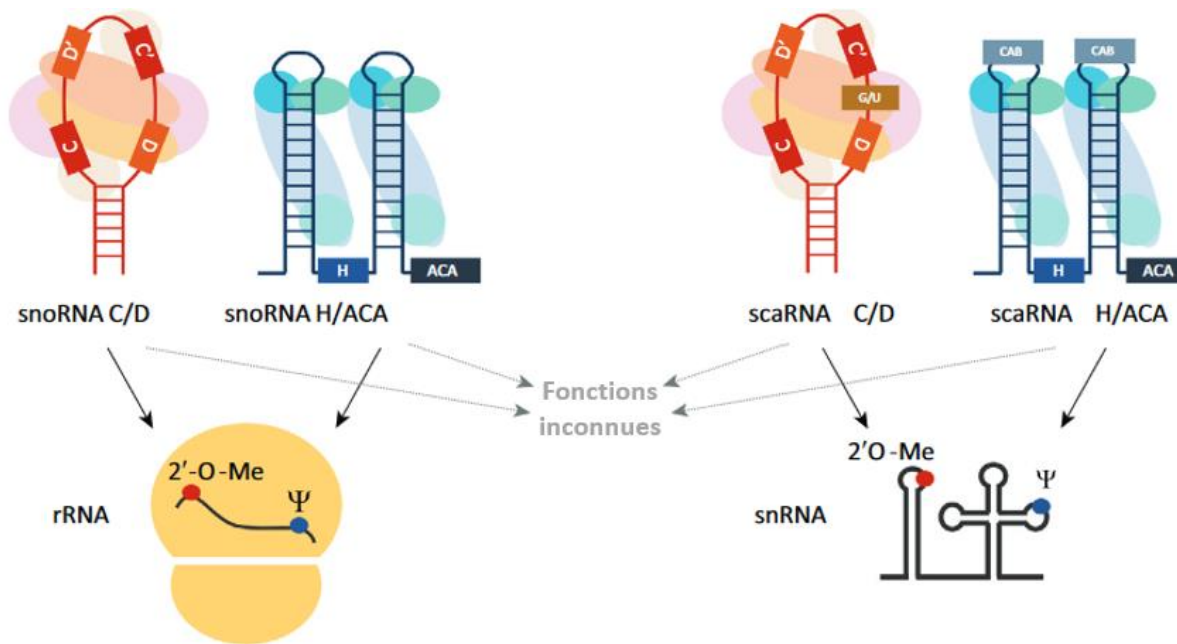
Des étapes d'optimisation concernant le choix du promoteur à utiliser, les conditions de culture ou la technique à utiliser pour évaluer la répression, restent à réaliser avant de pouvoir réellement utiliser cet outil pour des tests de communication intercellulaire. Notamment, il est possible qu'il soit nécessaire de marquer doublement la souche réceptrice avec, par exemple, une autre protéine fluorescente d'une autre couleur afin d'avoir un témoin interne. Dans l'avenir, il est aussi possible d'envisager un essai plus direct où des vésicules de la souche émettrice soient purifiées et directement incubées avec des cellules réceptrices. Les mêmes tests de fonctionnalité et d'efficacité du transfert d'information (RT-qPCR, microscopie et cytométrie en flux) pourront être utilisés à cette fin.

Il est important ici de noter que la mise au point d'un tel essai donnerait beaucoup de perspectives pour des expériences visant à étudier les voies de communication intercellulaires chez les champignons. La mise au point de cet essai permettrait aussi de comprendre le rôle des siARN associés aux VE de *C. neoformans*. Comme nous l'avons vu, chez cette levure, les siARN sont principalement connus pour réprimer l'expression des transposons. Ils sont donc considérés comme un moyen de stabiliser l'intégrité du génome en empêchant leur transposition (Dumesic et al., 2013; Janbon et al., 2010). Il est néanmoins possible que les siARN des VE servent à contrôler les mouvements des transposons à l'échelle de la colonie. Ainsi, les siARN produits par certaines cellules au sein d'une colonie seraient transférés à d'autres cellules produisant moins de siARN par l'intermédiaire des VE participant au contrôle de l'expression des transposons et donc dans le maintien de l'intégrité du génome chez d'autres cellules de la colonie.

II. Les snoARN comme vecteurs de communication intercellulaire.

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ma thèse, une des familles d'ARN les plus représentées dans les extraits vésiculaires est celle des snoARN (Boîte 2). Nous avons donc envisagé une seconde stratégie utilisant ces ARN pour mettre au point des essais de communication intercellulaire. La présence de snoARN associés aux VE produites par plusieurs espèces de *Cryptococcus* suggère une fonction biologique pour les snoARN vésiculaires. On pourrait par exemple imaginer que ces snoARN associés aux VE permettent de maintenir une homogénéité des modifications post-transcriptionnelles entre les cellules d'une même colonie. Chez d'autres organismes, des snoARN ont été identifiés comme des vecteurs de communication intercellulaire (Puppo et al., 2022). Ils sont aussi susceptibles d'être maturés en siARN ou miARN et d'avoir ainsi d'autres fonctions (Scott and Ono, 2011). Des miARN provenant de la maturation de snoARN ont été identifiés chez les parasites *Giardia intestinalis* et *Trypanosoma cruzi* ainsi que chez la souris et l'homme. Chez *G. intestinalis*, ces miARN peuvent réguler l'expression de gènes codant des protéines de surface. Chez *T. cruzi*, ces miARN sont retrouvés au sein des VE (Fernandez-Calero et al., 2015).

Boîte 2 : Fonction des snoARN (traduit à partir de Kufel et al., 2019)



Les snoARN sont des ARNnc principalement transcrits par l'ARN polymérase II. Chez les eucaryotes unicellulaires tels que *S. cerevisiae*, chaque snoARN possède généralement sa propre unité de transcription. Dans des métazoaires relativement simples tels que la drosophile, on trouve des unités de transcription dédiées qui présentent plusieurs snoARN disposés en tandem au sein d'un polycistron. Enfin, chez les métazoaires complexes comme l'être humain, ils ne possèdent pas d'unités de transcription dédiées et sont produits par la maturation d'introns d'ARNm ou d'ARNInc. Ils ont une taille intermédiaire allant de 60 à 300 nt. Deux grandes familles de snoARN ont été décrites dans la littérature (Monziani and Ulitsky, 2023). Ces deux familles se distinguent par la structure, la séquence des ARN et leurs fonctions. Les SNORD sont caractérisés par la présence de deux motifs conservés au niveau de leur séquence : la boîte C (RUGAUGA) et la boîte D (CUGA). Des motifs C' et D' supplémentaires présentant une moindre conservation peuvent également être retrouvés. Enfin à proximité de ces régions, on retrouve des régions complémentaires formant une structure en tige-boucle. Les snoARN à boîte H/ACA (SNORA) sont composés de deux larges structures en épingle à cheveux séparées par un pont contenant une boîte H (ANANNA) et suivi d'une courte queue contenant une boîte ACA. Les snoARN sont des constituants de complexe ribonucléoprotéiques où ils servent de guides par complémentarité de séquence avec d'autres ARN. Ces complexes ribonucléoprotéiques induisent différentes modifications post-transcriptionnelles sur les ARN cibles. Les snoARN à boîtes C/D (SNORD) sont impliqués dans la 2-O-méthylation des ARN (Falaleeva et al., 2017). Les SNORA sont impliqués dans la pseudouridylation des ARN (Kufel and Grzechnik, 2019). De façon générale, les principales cibles des snoARN sont les ARNr et snARN.

Afin d'identifier le rôle de ces snoARN vésiculaires chez *C. neoformans* et de mettre au point un essai de communication, il s'agissait donc dans un

premier temps d'identifier un phénotype associé à leur délétion. Notre idée étant d'essayer de compléter ce phénotype soit en co-cultivant la souche mutante avec une souche sauvage, soit en incubant la souche mutante avec des VE isolées de la souche sauvage (Figure 25).

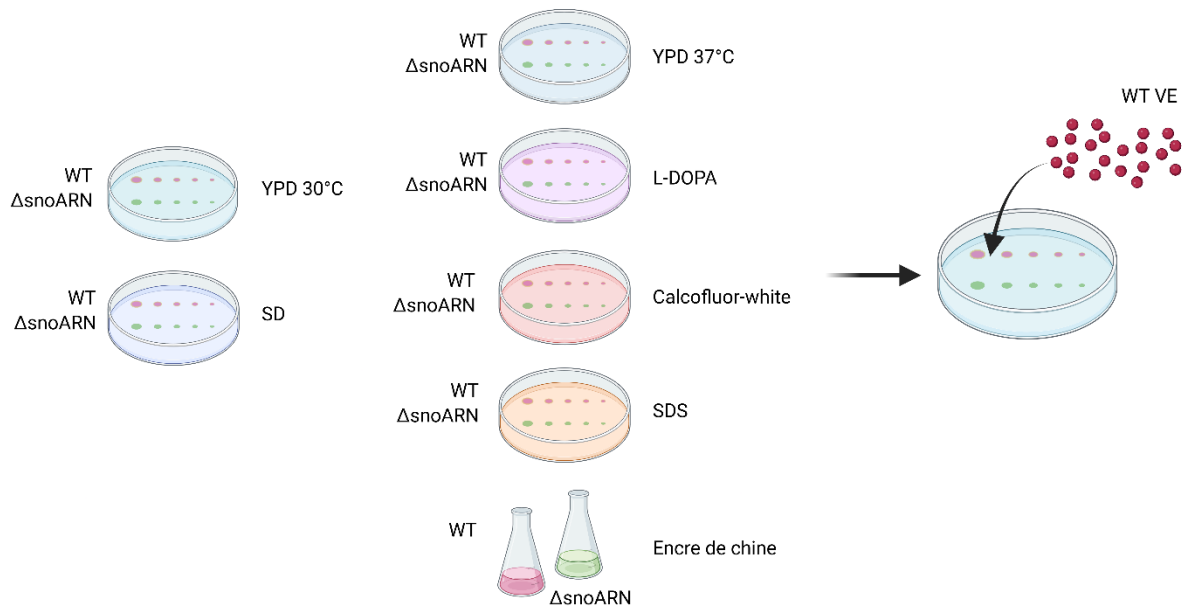


Figure 25 : Stratégie de complémentation de phénotype en présence de VE

Des snoARN sont délétés puis une analyse phénotypique est réalisée (tests en goutte, visualisation de la capsule, etc.). L'essai de communication consistera à tenter de supprimer le phénotype identifié par une complémentation réalisée en présence de VE provenant d'une souche sauvage.

La première étape dans la mise au point de cet essai était donc de déléter les snoARN identifiés dans les vésicules. Comme nous l'avons vu dans la première partie de ma thèse, une grande proportion des snoARN à boîtes C/D sont issus de séquences introniques, mais certains de ces introns se situent dans des gènes codants. Afin de s'assurer que le phénotype étudié était bien lié à l'absence du snoARN et non à l'altération du gène codant dont il est originaire, ce dernier type de snoARN a été exclu de mon étude. En effet, déléter l'ensemble du gène ou introduire un marqueur de sélection de grande taille dans un intron altérerait à coup sûr l'expression du gène codant. Ce n'était pas le cas lorsque j'ai réalisé ces expériences, mais nous sommes désormais capables au laboratoire de réaliser des mutations de

façon plus « chirurgicales » en ne modifiant que ce qui nous intéresse (mutation ponctuelle, délétion courte) au locus d'intérêt et en plaçant le marqueur de sélection dans une autre région du génome. Il serait donc maintenant possible de déléter spécifiquement ces introns sans altérer la séquence codante de ces gènes. Néanmoins, cela ne garantit pas l'innocuité de la procédure puisque les introns sont connus pour réguler l'expression des gènes chez *C. neoformans* (Goebels et al., 2013; Janbon, 2018). Ainsi, même la délétion spécifique d'un intron aurait pu altérer l'expression du gène en question. Il aurait été alors difficile de savoir si le défaut de croissance ou la modification de l'expression d'un facteur de virulence éventuellement observés était dû à l'absence du snoARN ou bien à la modification de l'expression du gène codant. Nous avons donc choisi de déléter les snoARN portés par des ARNInc. En effet, les analyses de conservation de séquence de ces ARNInc montrent que seules les parties correspondant aux snoARN sont conservées suggérant que ces long ARN non codants pourraient n'être en fait que des précurseurs pour produire des snoARN (Figure 17). Il était donc vraisemblable que les phénotypes observés soient dans ce cas dus à la délétion du snoARN plutôt qu'à une altération de la fonction de l'ARNInc.

Au total, 23 snoARN portés par 15 ARNInc de fonction inconnue ont été choisis pour être délétés (Tableau 3). Toutes ces délétions ont été faites en utilisant une stratégie CRISPR/Cas9 adaptée à *C. neoformans* (Fan and Lin, 2018). Néanmoins, les premières délétions ont été faites en co-transformant la souche de référence KN99 α (NE241) (Nielsen et al., 2003) avec la cassette de délétion de l'ARNInc et deux autres fragments d'ADN permettant respectivement la production de l'enzyme Cas9 et celle d'un ARN guide spécifique (voir matériel et méthodes). Les délétions suivantes ont été réalisées dans une souche de même fond génétique, mais exprimant constitutivement Cas9 (Huang et al., 2022).

Locus	Famille	Nombre de transcrits
CNAG_05651	CD	3
CNAG_12022	CD	1
CNAG_12093	CD	1
CNAG_12216	CD	1
CNAG_12256	CD	2
CNAG_12258	CD	1
CNAG_12265	CD	3
CNAG_12274	CD	1
CNAG_12486	CD	1
CNAG_12489	CD	3
CNAG_12831	CD	1
CNAG_13018	CD	2
CNAG_13104	CD	1
CNAG_13174	CD	1
CNAG_13212	CD	1

Tableau 3 : Liste des gènes candidats pour une délétion

Une première analyse phénotypique a pu être réalisée pour cinq de ces souches mutantes. Nous avons cherché à identifier des phénotypes faciles à étudier. Nous avons fait des tests en goutte pour comparer la croissance à 30°C et 37°C des souches mutées avec celle de la souche originelle. La même stratégie a été utilisée pour tester la sensibilité de ces souches au SDS (facteur de stress de la membrane plasmique), au calcofluor white (facteur de stress de la paroi) et au fluconazole. Nous avons aussi regardé l'expression de deux facteurs de virulence chez ces souches mutantes. Ainsi, la taille de la capsule polysaccharidique a été mesurée par

microscopie après culture dans un milieu inducteur de la synthèse de la capsule (Janbon et al., 2001) et coloration négative à l'encre de chine. Nous avons aussi fait des essais en goutte sur milieu L-DOPA pour évaluer la production de mélanine de ces souches mutantes. Comme on peut le voir sur la Figure 26, ces essais phénotypiques n'ont pour l'instant rien donné et aucune différence n'a pu être observée entre ces souches mutantes et la souche sauvage.

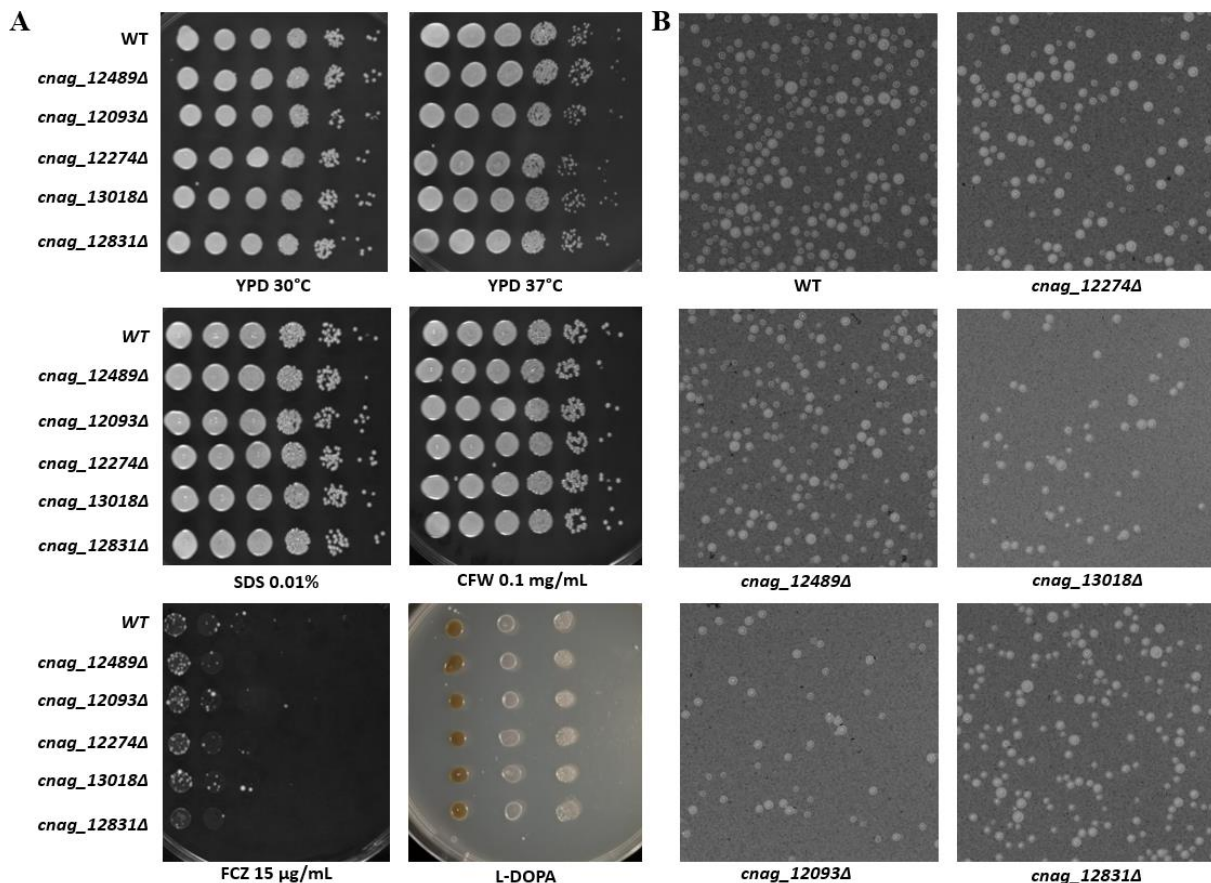


Figure 26 : Recherche de phénotypes de mutants de de snoARN

(A) Comparaison de la croissance par dépôt en gouttes sur différents milieux. Les milieux contenant du SDS et du calcofluor white (CFW) permettent de tester l'intégrité de la paroi cellulaire. Le fluconazole (FCZ) est un antifongique couramment utilisé. Le milieu L-DOPA permet d'évaluer la capacité de mélanisation (facteur de virulence). (B) Comparaison de la taille de la capsule après croissance sur un milieu inducteur et contre-coloration à l'encre de Chine.

Bien sûr, il reste de nombreux phénotypes à tester ainsi que la plupart des souches mutantes que j'ai construites à étudier. Etant donné le rôle des snoARN dans la modification des ARNr, il est aussi possible d'imaginer

identifier un phénotype de croissance en présence de drogue affectant la traduction comme le BMH-21 ou la paromomycine (Badis et al., 2003; Bryant et al., 2022). Malgré cela, il est possible que nous ne trouvions pas de phénotype. En effet, chez *S. cerevisiae*, la plupart des snoARN peuvent être délétés sans induire de phénotype. Par exemple, aucune des 22 souches mutées construites par Torchet et collègues ne présentait de phénotype de croissance sur milieu complet à 30°C (Torchet et al., 2005). Toutefois, l'absence de *snR191*, un snoARN à boîte H/ACA, n'induit pas de phénotype de croissance sauf dans le cadre d'une co-culture (Badis et al., 2003). Dans cette expérience, une souche mutante *snR191Δ* et une souche sauvage de *S. cerevisiae* ont été mis en co-culture avec un ratio 1/1. Après des étapes de croissance et de dilution successives jusqu'à obtenir 70 générations, la proportion de cellules de la souche sauvage atteint 94% de l'ensemble des cellules. Ce résultat montre donc que la présence de snR191 apporte un avantage pour la croissance dans un contexte compétitif. Cependant, l'obtention d'un phénotype reste difficile. Les snoARN sont nombreux et leur redondance est susceptible de compliquer la détection de défauts. Ainsi, il sera peut-être nécessaire de produire des mutants multiples afin d'identifier un phénotype.

III. Un essai de communication artificiel utilisant des ARN guides

La mise au point d'un essai de communication intercellulaire chez *C. neoformans* devait, dans un premier temps, nous permettre d'associer une fonction aux différents ARN présents dans les extraits vésiculaires. C'est pour cette raison que nous avons d'abord concentré nos efforts sur la mise au point des deux premiers essais utilisant respectivement les siARN et les snoARN vésiculaires. Sur le plus long terme, la mise au point d'un tel essai devait aussi nous permettre de décrypter les mécanismes nécessaires à l'envoi et à la réception du message, et de comprendre le rôle de ces

mécanismes sur la biologie et la virulence de cette levure. Il s'agit donc de mettre au point un essai qui puisse être utilisé à grande échelle pour la réalisation de cribles génétiques.

Comme nous l'avons dit dans l'introduction de cette thèse, les connaissances sur la biogenèse des VE chez les mammifères sont beaucoup plus avancées que chez les autres organismes et de nombreuses stratégies ont été utilisées pour modifier artificiellement le contenu des VE à des fins thérapeutiques (Rädler et al., 2023). Dans les autres espèces, notamment celles dont les cellules disposent d'une paroi et plus particulièrement les champignons, ces approches n'en sont qu'à leurs balbutiements. Le troisième essai de communication intercellulaire que nous avons essayé de mettre au point chez *C. neoformans* s'inspire d'un essai nommé CRISPR Operated Stoplight System for Functional Intercellular RNA Exchange (CROSS-FIRE) qui utilise un ARN guide comme message échangé entre des cellules humaines de différentes lignées (de Jong et al., 2020). Ici un ARN guide produit par des cellules donneuses est transféré vers des cellules réceptrices exprimant constitutivement la protéine Cas9 et un allèle muté d'une protéine fluorescente. Le guide est choisi pour reconnaître spécifiquement cet allèle muté qui, après coupure par Cas9, peut être réparé avec potentiellement un changement de cadre de lecture capable de produire la protéine fluorescente. L'efficacité de la communication est donc évaluée en comptant les cellules réceptrices fluorescentes (de Jong et al., 2020).

Notre idée était de mettre au point un essai similaire chez *C. neoformans* (Figure 27). Nous avons choisi comme gène cible *URA5*. *URA5* chez *C. neoformans* est nécessaire à la croissance en l'absence d'uracile dans le milieu et a été historiquement utilisé comme marqueur de sélection (Edman and Kwon-Chung, 1990). Par ailleurs, c'est un marqueur qui, comme chez *S. cerevisiae*, peut être contre-sélectionné en utilisant de l'acide 5-fluoro-orotique (5-FOA) (Boeke et al., 1984; Kwon-Chung et al., 1992). En

choisissant un ARN guide spécifique d'un allèle sauvage ou muté de *URA5* produit par les cellules donneuses, il était théoriquement possible d'évaluer l'efficacité de la communication en étalant les cellules réceptrices sur un milieu sélectif (dépourvu d'uracile ou contenant du 5-FOA) et en comptant les colonies. L'avantage d'un tel essai est qu'il est théoriquement possible de l'appliquer à un crible à grande échelle en utilisant des plaques 96 puits, échelle compatible avec le test des 4700 souches mutantes de *C. neoformans* de la collection générées par le laboratoire d'H. Madhani (Chun and Madhani, 2010).

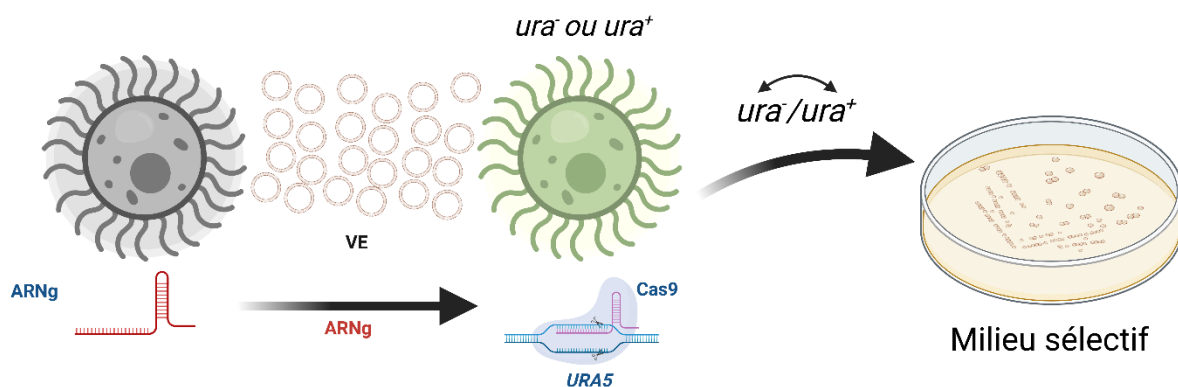


Figure 27 : Stratégie de communication basée sur le système CRISPR/Cas9

Un ARN guide spécifique d'un gène URA5 sauvage ou muté est transféré via les VE vers une souche exprimant constitutivement la protéine Cas9 et présentant ou non un gène URA5 muté. L'induction d'une cassure double brin par le système CRISPR/Cas9 conduit à sa réparation avec potentiellement l'introduction d'erreur. D'un gène URA5 muté, il est donc possible de revenir vers un gène sauvage et vice-versa. Le nombre de réversions/mutations est alors quantifié par comptage des colonies viables sur un milieu sélectif.

Nous avons initialement cherché à expérimenter le changement de phénotype d'une souche [Ura⁺] vers une souche [Ura⁻]. Ce changement semblait prometteur en raison de la grande variabilité potentielle des mutations du gène *URA5*. Nous avons planifié la mise en co-culture d'une souche sauvage exprimant en permanence la protéine Cas9 avec une souche produisant des VE contenant des ARN guides ciblant *URA5*. Le transfert de l'ARN guide devait entraîner une cassure double brin, réparée par le système de réparation de l'ADN cellulaire. Cependant, les erreurs

potentielles pendant cette réparation pourraient générer un allèle non fonctionnel *ura5*. Avant d'entamer des essais de communication, nous avons voulu confirmer l'efficacité de notre stratégie. Pour ce faire, nous avons électroporé un fragment d'ADN exprimant un ARN guide spécifique ou non du gène *URA5* dans une souche sauvage exprimant Cas9 en permanence. Ensuite, les cellules ont été réparties sur deux boîtes SD2% contenant 5 mg/mL d'uracile et 1 mg/mL de 5-FOA. Après 5 jours, nous avons comparé le nombre de colonies entre les différentes conditions. Globalement, nous avons observé 19, 28, 36 et 28 colonies respectivement pour les cellules électroporées avec de l'eau, un guide aspécifique (BAPF1987), un premier guide spécifique d'*URA5* (BAPF2871) et un second guide spécifique (BAPF2873). Aucune différence spectaculaire n'a été constatée en présence d'un guide spécifique par rapport aux témoins. De plus, la quantité d'ARN guide transférée lors de la communication serait moindre que celle exprimée dans les cellules transformées avec un fragment d'ADN. Nous anticipons donc des difficultés plus importantes pour obtenir des "transformants" dans un essai de communication. Étant donné le faible nombre de colonies ici, nous concluons que la sensibilité de notre méthode est insuffisante pour la transition d'une souche [*Ura*⁺] à [*Ura*⁻].

Dans un second temps, nous avons voulu tester le passage d'une souche [*Ura*⁻] vers [*Ura*⁺]. Nous avons donc construit diverses souches réceptrices de *C. neoformans* exprimant divers allèles mutés *ura5* (insertion, duplication de 8 pb ou 24 pb). L'idée était ici d'avoir différents niveaux de sensibilité de notre essai. Nous anticipons ici qu'une insertion serait moins facilement révertée qu'un allèle contenant des séquences répétées. Nous anticipons aussi que la longueur de ces répétitions influencerait sur l'efficacité de la réversion vers un allèle sauvage (Villarreal et al., 2012). Nous avons également pensé à inclure dans nos constructions une délétion du gène *KU80* dont le produit est essentiel au système de réparation de l'ADN par jonction simple des extrémité (NHEJ, non-homologous end-joining)

(Critchlow and Jackson, 1998). Cette délétion, en altérant la réparation par le mécanisme de NHEJ favorise ainsi la réparation par l'autre mécanisme de réparation restant actif : la recombinaison homologue (Goins et al., 2006). Toutefois, nous n'avons eu le temps que d'obtenir une souche présentant une délétion du gène *KU80*. L'intégration des répétitions restent donc à réaliser dans cette souche. Pour construire les différentes souches présentant une mutation du gène *URA5*, nous avons utilisé une stratégie de co-transformation permettant de modifier l'allèle sauvage au locus en introduisant un gène de résistance au locus *SH1* (Ianiri et al., 2020). Dans cette stratégie, les cellules sont co-transformées avec deux ARN guides et deux fragments d'ADN destinés à s'intégrer dans le génome dans des loci distincts. Le marqueur de sélection, ici le gène de résistance à la généticine (Hua et al., 2000), est adressé au locus *SH1* par un ARN guide dédié tandis qu'un fragment d'ADN portant un allèle *ura5* est ciblé au locus *URA5* par un autre ARN guide, spécifique de ce locus. Les différents allèles construits ainsi que leur fond génétique sont décrits dans le Tableau 4. Toutes ces souches réceptrices ont été construites dans une souche exprimant constitutivement Cas9 (Huang et al., 2022).

Nom	Type	Fond génétique	Marqueur	Transgène
<i>Cas9 ku80Δ</i>	Récepteur	NE1538	NEO	Mutant <i>ku80Δ</i>
E-insert	Emetteur	NE241	NAT	ARN guide BAPF2872 ciblant <i>ura5</i> avec une insertion (ATCC)
E-Cas9-insert	Emetteur	NE1538	NAT	ARN guide BAPF2872 ciblant <i>ura5</i> avec une insertion (ATCC)
R-ura5-insert	Récepteur	NE1538	NEO	<i>ura5</i> avec une insertion (ATCC)
E-dup8pb	Emetteur	NE241	NAT	ARN guide BAPF2978 ciblant <i>ura5</i> avec une duplication (8 pb)

E-Cas9- dup8pb	Emetteur	NE1538	NAT	ARN guide BAPF2978 ciblant <i>ura5</i> avec une duplication (8 pb)
R- <i>ura5</i> - dup8pb	Récepteur	NE1538	NEO	<i>ura5</i> avec une duplication (8 pb)
E-dup24pb	Emetteur	NE241	NAT	ARN guide BAPF2887 ciblant <i>ura5</i> avec une duplication (24 pb)
E-Cas9- dup24pb	Emetteur	NE1538	NAT	ARN guide BAPF2887 ciblant <i>ura5</i> avec une duplication (24 pb)
R- <i>ura5</i> - dup24pb	Récepteur	NE1538	NEO	<i>ura5</i> avec une duplication (24 pb)

Tableau 4 : Liste des souches construites pour réaliser les essais de communication basés sur le système CRISPR/Cas9

Afin de tester la « révertabilité » des différents allèles construits, nous avons de nouveau transformé directement les différentes souches avec un ARN guide spécifique de chacune des mutants récepteurs (Tableau 4). Diverses expériences de construction de souches mutantes utilisant la stratégie CRISPR/Cas9 menées au laboratoire avaient montré qu'il était important de choisir un ARN guide qui ne puisse pas recouper l'ADN « réparé ». Chacune des 3 souches *ura5* construites a donc été transformée par électroporation avec un fragment d'ADN permettant la production d'un ARN guide spécifique (Fan and Lin, 2018). Les cellules ont ensuite été étalées sur milieu minimum (SD) qui ne contient pas d'uracile. Après 3 jours d'incubation à 30°C, les colonies poussant sur les boîtes ont été comptées et leur nombre a permis d'évaluer l'efficacité de la réversion de l'allèle muté. Une transformation témoin a été utilisée pour chaque essai. Dans ce cas, les cellules étaient électroporées avec un fragment d'ADN à l'origine d'un ARN guide aspécifique. Nous avons utilisé ici un ARN guide spécifique du locus SH1 (BAPF 1987).

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 28. Dans un contexte *ura5* présentant une insertion ou duplication de 8 pb, on observe que, seules les cellules ayant été transformées avec un ARN guide spécifique de

l'allèle muté sont capables de produire des colonies [Ura⁺] tandis que la transformation avec le guide aspécifique ne permet l'obtention d'aucune colonie après 3 jours d'incubation sur milieu minimal. Afin de vérifier que le phénotype [Ura⁺] était bien dû à une réversion de l'allèle muté, nous avons récupéré 4 colonies issues de la première transformation de la souche R-ura5-insert et extrait leur ADN génomique. L'ADN spécifique du locus *URA5* a été amplifié par PCR et séquencé. Les résultats indiquent non pas une réversion vers un allèle sauvage comme attendu, mais la transformation de l'allèle muté *ura5-insert* en un autre allèle muté mais fonctionnel. En effet, l'insertion ATCC dans le gène *URA5* conduit à l'insertion d'une sérine suivi d'un décalage du cadre de lecture. La présence de l'ARN guide induit une cassure entre le T et le C au niveau de l'insertion ATCC (AT|CC). Le séquençage montre une délétion du nucléotide C au niveau du site de cassure. Cette perte conduit à un allèle présentant toujours l'insertion d'un codon codant pour une sérine, mais dont le cadre de lecture est de retour vers une version sauvage. La protéine présentant ainsi seulement une sérine en plus, mais cette dernière n'inhibe pas la fonction de la protéine URA5. Il est important de noter que l'on perd le même unique nucléotide dans l'ensemble des mutants. Il semble en effet qu'il s'agit là de la seule mutation fonctionnelle. La perte du nucléotide T du côté opposé conduirait également au rétablissement du cadre de lecture, mais induirait aussi l'insertion d'une proline plutôt qu'une sérine. La présence d'une proline conduit à la formation d'un coude au niveau de la structure tertiaire de la protéine, il est ainsi fort probable qu'elle conduise à une perte de l'intégrité structurale de cette dernière et donc de sa fonction. Les mutants présentant une perte du nucléotide T ne seraient alors pas viables sur un milieu ne contenant pas d'uracile. Par ailleurs la perte de deux ou trois nucléotides d'un côté ou autour de la coupure, conduirait également toujours à un décalage du cadre de lecture. En ce qui concerne la duplication de 24 pb, on observe qu'il semble exister déjà un niveau basal de réversion assez important. En effet, de nombreuses colonies sont détectables sans le guide

aspécifique ce qui n'était pas le cas avec les allèles porteurs de la duplication de 8pb. L'augmentation de la taille de la duplication induit donc une augmentation de l'instabilité de l'allèle. Néanmoins, l'ajout du guide spécifique accroît considérablement le nombre de colonies obtenues témoignant d'une efficacité de notre stratégie expérimentale dans des souches présentant une duplication longue. Finalement, nous avons construit un jeu de souches réceptrices présentant des capacités de réversion spécifique et aspécifique variables.

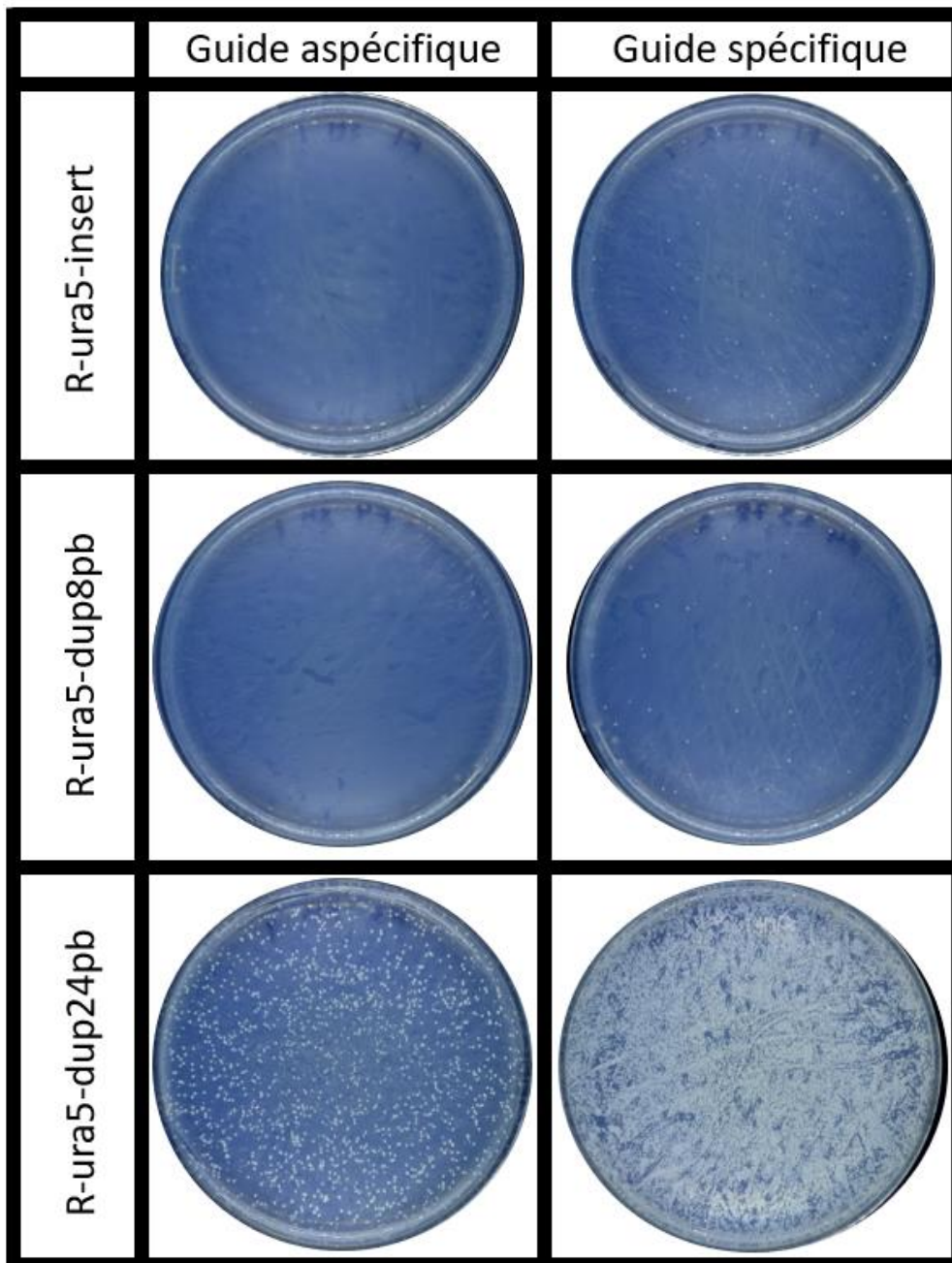


Figure 28 : Analyse du taux de réversion de différents allèles du gène URA5 en présence d'ARN guides spécifiques ou non

Les réactions de transformation avec les ARN guides ont été étalées sur 2 boîtes SD ne contenant pas d'uracile. Les photographies ont été prises après 3 jours d'incubation à 30°C. Les conditions R-ura5-insert, R-ura5-dup8pb et R-ura5-dup24 pb présentent un total de 0, 0, 3160 colonies en présence d'un guide SH1asp et 125, 149 colonies et des tapis cellulaires en présence d'un guide spécifique du gène ura5 muté, respectivement.

Il s'agissait dans un deuxième temps de construire des souches émettrices. Nous avons pour cela intégré les constructions produisant les ARN guides

dans un plasmide permettant leur insertion au locus SH1. Il est vraisemblable que dans notre montage expérimental, il soit plus adapté d'apporter l'enzyme Cas9 par les cellules émettrices également. En effet, la co-expression de l'ARN guide et de Cas9 dans les mêmes cellules pourrait permettre un assemblage plus efficace et une stabilité du complexe accrue, comme c'est le cas pour les si/miARN et leurs hôtes les protéines Argonaute. Dans ce cas il faut imaginer que les ARN guides transitent dans les VE sous une forme associée à l'enzyme Cas9. Nous avons donc généré 4 souches émettrices produisant les ARN guides spécifique et aspécifique dans un contexte cellulaire où l'enzyme Cas9 est constitutivement produite ou est au contraire absente (Tableau 4). Les ARN guides exprimés dans ces souches ciblent soit l'allèle *ura5* présentant une insertion soit celui avec une duplication.

Nous disposions donc d'un jeu de souches émettrices et d'un jeu de souches réceptrices utilisables pour des essais de communication. Notre première idée était de co-cultiver les souches dans des conditions pendant lesquelles nous savions que des VE étaient produites, à savoir sur milieu minimal solide à 30°C. Néanmoins, ces conditions de culture n'étaient pas envisageables dans la mesure où les souches réceptrices sont toutes [*Ura*⁻]. Nous avons donc opté pour un milieu minimal supplémenté en uracile et sur lequel les souches [*Ura*⁺] et [*Ura*⁻] se développent de façon équivalente. Après 24h, nous avons récupéré les cellules et les avons étalés sur un milieu minimal contenant de la généticine. Sur ce milieu, seules les souches réceptrices de phénotype [*Ura*⁺] peuvent pousser, par conséquent, théoriquement uniquement les révertants. Malheureusement, nos premiers essais n'ont pas été concluants puisque nous n'avons obtenu des colonies sur aucune boîte (Figure 29). Il est important de noter que par manque de temps, toutes les constructions n'ont pas été testées et qu'il reste possible que certaines constructions puissent donner de meilleurs résultats. La souche présentant une duplication de 24 pb semble présenter une forte

sensibilité à la présence de l'ARN guide, et pourrait donc avoir un certain potentiel pour détecter des événements de communication. Notamment, répéter ces expériences dans un contexte *ku80Δ* pourrait, en augmentant la fréquence des événements de recombinaison homologue, améliorer l'étape de réparation par homologie et ainsi favoriser la détection des événements de coupure induits par l'ARN guide. Par ailleurs, il apparaît que le fait d'exprimer la protéine Cas9 dans la cellule émettrice ne modifie pas significativement le résultat obtenu, au moins dans les conditions où nous avons réalisé nos tests.

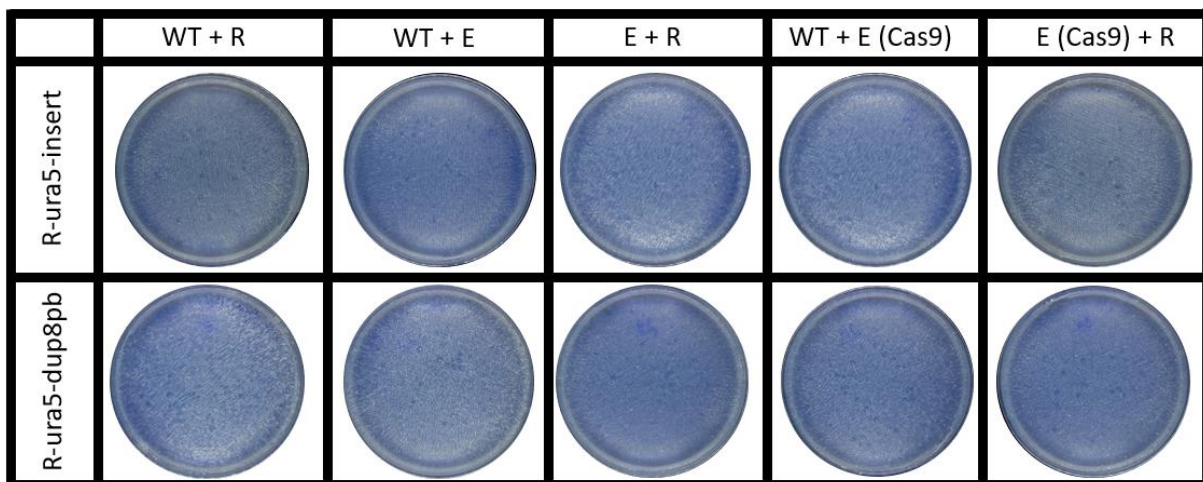


Figure 29 : Essais de communication entre des souches émettrices (E) d'un ARN guide spécifique avec ou sans Cas9 et des souches réceptrices (R)

Les photographies ont été prise après 4 jours d'incubation à 30°C.

Même si les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent sont décevants, nous pensons que ce système reste potentiellement utilisable pour des essais de communication. Bien sûr, les conditions de co-culture peuvent être modifiées et il est possible que certains couples de souches donnent de bons résultats dans certaines conditions. Il est néanmoins probable qu'il faille prendre les choses les unes après les autres. Nous pourrions par exemple essayer d'incuber des cellules réceptrices directement avec des vésicules produites par des cellules émettrices avant de les étaler sur un milieu sélectif. Nous pourrions aussi vérifier la présence des ARN guide dans les vésicules. Ceci a été fait dans la publication qui nous

a inspirés et les auteurs ont bien confirmé que leur ARN guide était dans la lumière des VE produites par leurs cellules émettrices (de Jong et al., 2020). Dans le cas des souches émettrices produisant l'enzyme Cas9, il est aussi possible que la protéine ne soit pas ciblée vers les VE chez *C. neoformans*. Le signal d'adressage au noyau nécessaire au bon fonctionnement de Cas9 est fort (Ryan et al., 2014) et il est possible que l'ARN guide soit nu et non protégé dans les VE même si Cas9 est produit par la souche émettrice. Il est aussi possible que les VE soient échangées entre cellules réceptrices et cellules émettrices, mais que les ARN contenus dans les VE ne trouvent pas leur cible. Par ailleurs, la question se pose de la quantité d'ARN guide transmis par des VE. En effet, on peut supposer facilement que même si des ARN guides sont associés aux VE, leurs quantités restent très largement inférieures à celles exprimées dans les cellules transformées par une quantité importante d'ADN précurseur. La faible quantité d'ARN guide pourrait ainsi être le facteur limitant la sensibilité de notre essai.

Des versions étiquetées de vésicules sont en train d'être produites au laboratoire. Ces souches qui sont en train d'être construites produisent ou produiront des vésicules extracellulaires marquées soit avec des épitopes utilisables en western blot soit avec des protéines fluorescentes utilisables en microscopie à épifluorescence. Ces souches vont représenter des outils de choix pour vérifier que des VE sont bien échangées entre les cellules dans les conditions que nous avons testées. Les marqueurs protéiques des vésicules pourront également être fusionnés à la protéine Cas9 via une séquence en acide aminé clivable par une protéase. Ceci permettrait d'augmenter l'adressage des ARN guides associés à la protéine Cas9 vers les VE. Le complexe serait alors libéré des VE en présence d'une protéase exprimée par la souche réceptrice. Il est enfin possible que l'efficacité de la communication intercellulaire soit souche dépendante et que la souche de référence que nous utilisons soit peu communicante. Il pourrait être intéressant de tester la communication cellulaire avec des souches de clades

différents (Desjardins et al., 2017). Dans ce cas-là, nous pourrions de nouveau tenter d'utiliser un système où nous chercherions à obtenir des souches [Ura⁻] à partir de souches sauvages en les co-cultivant avec une souche émettrice d'un ARN guide spécifique du gène *URA5* sauvage.

Discussion

Nous avons ici présenté trois stratégies pour mettre au point un essai de communication intercellulaire chez *C. neoformans*. Nos expériences n'ont pour l'instant pas abouti, mais comme nous l'avons décrit il reste beaucoup de place pour améliorer ces essais et faire communiquer des cellules entre elles par l'intermédiaire des VE. Nous savons malgré tout que cette communication est possible chez d'autres espèces même si aucun essai exploitable pour un crible génétique n'a été publié. Ainsi comme nous l'avons dit, chez *C. deuterogattii*, un échange d'information qui peut être à longue distance et qui semble dépendant de la production de VE permet une division du travail entre cellules dans le macrophage, permettant notamment à certaines cellules de résister au stress oxydant et à d'autres de se multiplier (Bielska et al., 2018; Voelz et al., 2014). Chez *C. albicans*, des VE peuvent induire une résistance au fluconazole et d'autres sont capables de réguler la filamentation (Honorato et al., 2022; Zarnowski et al., 2018). Ces résultats suggèrent très fortement que les VE d'une cellule sont capables de transmettre un message à une autre cellule. Il s'agit d'identifier les bonnes conditions de communication et le bon essai pour l'évaluer. Comme dit plus haut, ce type d'essai est nécessaire pour essayer de comprendre comment un message porté par les VE peut être reçu par les cellules. Une publication récente montre que les vésicules produites par un champignon pathogène des plantes pénètrent les cellules de l'hôte par un mécanisme dépendant de la clathrine (He et al., 2023). De façon intéressante, un criblage génétique récemment mené au laboratoire visant à identifier des mutants accumulant plus ou moins de VE dans le

compartiment extracellulaire a révélé qu'une souche mutante du gène codant la clathrine de *C. neoformans* accumule plus de VE que la souche sauvage suggérant peut-être que le mécanisme d'intégration des VE chez les champignons est similaire (Piffer, Coppée et Janbon, données non publiées). Malgré l'échec relatif des expériences présentées dans cette partie, nous pensons que les stratégies que nous avons imaginées et les souches que nous avons construites possèdent un très grand potentiel et permettront dans un avenir que nous espérons proche de comprendre comment des cellules de champignons communiquent entre elles et quelles sont les conséquences de cette communication intercellulaire sur la biologie et la virulence chez ces organismes.

Conclusion et Perspectives

Pendant ma thèse, j'ai effectué plusieurs expériences visant à caractériser le transcriptome des VE de *C. neoformans*. Ces travaux m'ont permis d'identifier diverses familles d'ARN associés aux VE. Comme nous l'avons déjà dit, les ARN extracellulaires ici identifiés ne sont pas nouveaux. Plusieurs descriptions du transcriptome des VE de *C. neoformans* avaient déjà été réalisées avant mon travail de thèse et nos résultats sont en partie une confirmation des résultats publiés par d'autres équipes (Liu et al., 2020; Peres da Silva et al., 2018, 2015). Néanmoins, et comme je l'ai déjà expliqué, l'utilisation d'un protocole plus efficace pour la purification des VE (Reis et al., 2019), associé avec plusieurs stratégies de séquençage comparant VE et cellules produisant les VE ainsi que des analyses bio-informatiques adaptées nous ont permis d'obtenir une première description fiable du transcriptome vésiculaire. Cependant, de nombreuses questions persistent concernant le transcriptome vésiculaire de *C. neoformans*, ainsi que plus généralement celui des champignons. Des essais de traitement des VE à l'ARNase suggèrent que des ARN sont bel et bien présents dans les vésicules des champignons dont *C. neoformans* (Cai et al., 2018; Driedonks et al., 2020; Peres da Silva et al., 2015). Néanmoins, tous les séquençages de transcriptomes vésiculaires publiés à ce jour, y compris ceux décrits dans cette thèse (Alves et al., 2019; Černoša et al., 2022; Kwon et al., 2021; Liu et al., 2018b, 2020; O'Neil et al., 2013; Peres da Silva et al., 2019, 2018, 2015; Rayner et al., 2017; Zamith-Miranda et al., 2021), ont été réalisés sur des échantillons non traités à l'ARNase, et parfois avec des durées de culture prolongées (Prado Barragán et al., 2016). Nous ne savons toujours pas comment les VE des champignons sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et il est possible que certaines VE soient issues d'évènements de mort cellulaire programmée ou non. Dans la plupart des exemples publiés, les ARN vésiculaires séquencés ont été obtenus à partir

de VE isolées à partir de cultures prolongées, ce qui est connu pour être associé à de la mortalité cellulaire (Fischer and Deindl, 2021). Ceci suggère qu'au moins une part des VE pourraient être effectivement issues d'évènements de mort cellulaire. Par ailleurs, les ARNr représentant 80 à 90% du transcriptome cellulaire (O'Neil et al., 2013; Tosar et al., 2021), ils constituent des contaminants classiques de ce type d'analyse et contribuent à réduire la profondeur de séquençage des ARN d'intérêt (Thompson et al., 2020). Si les ARN sont empaquetés de façon aspécifique dans les VE, ces ARN devraient représenter les mêmes proportions dans les transcriptomes vésiculaire et cellulaire. D'ailleurs, une telle comparaison a été faite pour des VE produites par des cellules épithéliales du sein et supporte ce modèle de manière générale (Tosar et al., 2015). Pourtant, nous avons identifié ici des transcrits présentant un enrichissement différentiel entre VE et cellules, et cela a également été observé dans des études réalisées chez des métazoaires. Par conséquent, il est vraisemblable que des mécanismes d'empaquetage spécifique et aspécifique des ARN coexistent dans la cellule (Tosar et al., 2015).

Ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur le rôle des VE dans l'export vers l'espace extracellulaire des ARN et cinq voies ont d'ores et déjà été identifiées. Premièrement, différentes protéines de liaison à l'ARN, dites RBP (RNA-Binding Protein) (hnRNPA2B1, ANXA2, YBX1, AGO2, ...), ont été identifiées comme permettant l'export d'ARN vers les VE. Parfois, ces protéines ont besoin d'être modifiées pour être actives. Ainsi, la SUMOylation de la protéine hnRNPA1 (Villarroya-Beltri et al., 2013) ou encore la conjugaison LC3 des protéines hnRNPK et SAFB aident au chargement des petits ARN non codants dans les VE chez l'homme (Leidal et al., 2020; Rädler et al., 2023). Les différentes analyses de protéomes qui ont été faites à partir d'extraits vésiculaires ont aussi identifié des RBP dans les VE fongiques (Dallastella et al., 2023). Certaines de ces protéines sont importantes pour le ciblage de certains ARN vers les VE chez les

mammifères. Par exemple, la protéine ANXA2 fait partie des annexines dont des homologues ont été retrouvés chez *C. neoformans* (Maryam et al., 2019). De même, des RBP tels qu'AGO2 et NOP10 pouvant s'associer aux siARN et snoARN ont été retrouvées dans les protéomes vésiculaires que nous avons analysés dans ce travail. La séquence des ARN eux-mêmes peut aussi conduire à leur transfert préférentiel vers les VE. Par exemple, chez l'homme, les miARN contenant le motif GGAG sont préférentiellement associés à la hnRNPA2B1 SUMOylée qui aide à leur ciblage vers les VE (Villarroya-Beltri et al., 2013). Encore chez l'homme, les 3'UTR des ARNm présentant des éléments régulateurs avec des motifs spécifiques notamment de liaison au miARN-1289. Les ARNm présentant ces régions sont enrichis dans les VE suggérant qu'ils servent de mécanisme d'adressage spécifique pour les miARN (Bolukbasi et al., 2012). Un enrichissement de miARN portant un motif EXO (CGGGAG) a été aussi observé dans des VE produites par différents types cellulaires incluant des adipocytes, des cellules endothéliales, des cellules hépatiques et musculaires (Garcia-Martin et al., 2022) ou encore de cellules de cancer de la prostate (Ahadi et al., 2016). La séquence des ARN est donc également un facteur d'adressage vers les VE. Toutefois, un tel type d'analyse n'a jamais été mené sur les ARN vésiculaires fongiques, mais il est probable que ce type de motif existe. Des modifications post-transcriptionnelles peuvent également réguler le ciblage de certains ARN vers les VE. Encore une fois, ce type d'analyse n'a été menée que chez les métazoaires où l'uridylation ou l'acétylation en 3' de certains miARN ou encore la phosphorylation d'autres ARN permettent leur transfert différentiel vers les VE (Baglio et al., 2016; Koppers-Lalic et al., 2014). Enfin, les ARN présentent des propriétés électrostatiques et différentes affinités pour certains lipides comme ceux enrichis dans les rafts (Janas et al., 2006). Ces nombreux mécanismes d'adressage sélectif des ARN vers les VE peuvent à eux seuls expliquer l'existence de spécificité du transcriptome extracellulaire par rapport à celui de la cellule. Encore une fois, il reste à

déterminer quelle est la part de chacun des mécanismes précédemment cités dans la structuration et la spécificité du transcriptome vésiculaire.

Comme nous venons de le voir, l'état de l'art concernant les mécanismes de libération d'ARN vers l'espace extracellulaire est principalement issu d'études menées chez les mammifères. Par analogie, on peut supposer que ces mécanismes existent également chez les champignons. Néanmoins, le ciblage différencié de certaines molécules d'ARN dans les VE chez les champignons reste à élucider, car peu d'études se sont penchées sur cette question (Alves et al., 2019; Kwon et al., 2021; Liu et al., 2020; Peres da Silva et al., 2018). Les auteurs d'une étude sur un mutant *grasp* Δ (Golgi Reassembly And Stacking Protein) chez *C. neoformans* suggèrent que cette protéine pourrait réguler l'adressage des ARN vers les VE, même si la complémentation de la souche mutante par le gène sauvage ne semble pas supporter cette hypothèse (Peres da Silva et al., 2018). De plus, bien que les bibliothèques aient été construites principalement pour identifier des petits ARN, les auteurs de cette étude ne font pas mention de siARN et d'autres ARNnc en dehors de tRF. De façon surprenante, 85 à 90 % des « reads » s'alignent sur des introns. Les auteurs suggèrent ici un lien entre l'épissage et l'adressage des ARN vers les VE, mais aucune hypothèse concernant les mécanismes potentiellement impliqués n'est décrite (Peres da Silva et al., 2018). De même, l'analyse comparative du transcriptome des VE de *C. deformeformans* chez un mutant d'endocytose *cin1* suggérerait un rôle de cette protéine dans l'adressage de certains petits et longs ARN vers les VE même si encore une fois aucun mécanisme n'est décrit dans cette publication (Liu et al., 2020). Par ailleurs, l'impact suggéré de cette protéine sur le transcriptome vésiculaire semble très global alors que dans le même temps, le nombre de gènes étudiés est très restreint. Les résultats de cette étude doivent donc être relativisés et gagneraient à être reproduits (Liu et al., 2020). Comme indiqué plus haut, chez d'autres champignons, des protéines comportant des motifs de liaison à l'ARN ont aussi été identifiées

dans les extraits vésiculaires. Ainsi, chez *H. capsulatum* plusieurs protéines connues pour être impliquées dans la voie de l'ARN interférence ont été identifiées dans le protéome vésiculaire : la protéine Argonaute QDE2, son partenaire QIP (QDE2-Interacting Protein), deux protéines similaires à Dicer et une ARN polymérase ARN dépendante, QDE1 (Alves et al., 2019). Ces protéines pourraient former des complexes avec les siARN permettant leur adressage vers les VE. Enfin, les ARNm des VE d'*U. maydis* présentent un enrichissement en tétramères d'adénine, suggérant un motif d'adressage vers les VE ou le milieu extracellulaire (Kwon et al., 2021). De façon générale, bien que plusieurs molécules potentiellement impliquées dans l'adressage des vésicules aient été identifiées chez les champignons, il est encore nécessaire de confirmer leurs rôles et modes d'action.

Nos données de séquençage comme celles précédemment publiées chez les champignons ont été réalisées sur des échantillons de VE totales. Cependant, nous savons que les VE ne constituent pas une population homogène que ce soit chez les métazoaires ou chez les champignons (Rizzo et al., 2021a). Outre leurs mécanismes de biosynthèse, les VE peuvent se différencier également en fonction de leur taille, leur densité, ou encore de leur composition. Comme mentionné dans l'introduction, des sous-populations de VE ont été identifiées chez les mammifères (microvésicules, exosomes et corps apoptotiques) (Phillips et al., 2021). Chez les plantes, ils existent des sous-populations de VE qui se différencient les unes des autres principalement par leur composition (Cai et al., 2023). De même, chez les bactéries et les archées, plusieurs publications ont décrit une diversité de VE (Liu et al., 2021; Toyofuku et al., 2023). Comme décrit dans l'introduction, la caractérisation des VE de *C. neoformans* révèle une diversité de formes, de tailles et de compositions (Rizzo et al., 2021b). Chez les mammifères, l'identification de marqueurs protéiques à la surface des VE a permis d'isoler différents sous-types (par centrifugation différentielle et immunocapture) (Kowal et al., 2016; Skoczylas et al., 2023) et de décrire

la répartition différenciée des ARN à l'intérieur de ces sous-types (Chen et al., 2016; Ji et al., 2014). Chez les plantes, des marqueurs ont aussi été identifiés pour différents sous-types de VE (Cai et al., 2023, 2018). Ici les deux principaux marqueurs sont la protéine tetraspanine TET-8 et la syntaxine PEN1 (Cai et al., 2018; Rutter and Innes, 2017) et des travaux récents ont permis de séparer des VE porteuses ou non du marqueur TET-8 (He et al., 2021; Huang et al., 2021). Cependant, la caractérisation du transcriptome de ces sous-types vésiculaires n'a pas encore été réalisée. Chez les champignons, trois marqueurs de VE ont récemment été identifiés chez *C. higginsianum* (Rutter et al., 2022), et plusieurs candidats marqueurs de VE dont une tetraspanine ont été décrits chez *C. albicans* (Dawson et al., 2020; McKenna et al., 2023). Chez *C. higginsianum*, deux populations de VE de faible et forte densités, ont été purifiées à partir de protoplastes de ce phytopathogène après séparation sur un gradient d'idodixanol (Rutter et al., 2022). Une analyse protéomique a permis d'identifier trois potentiels marqueurs communs à ces deux populations. Parmi eux, v-SNARE ChSnc1 et t-SNARE ChSso2 sont des protéines membranaires appartenant au complexe SNARE, impliqué à divers niveaux du trafic membranaire, notamment dans l'association et la fusion des VE avec la membrane plasmique. La troisième protéine, ChBmh1, fait partie de la famille 14-3-3, impliquée dans les interactions protéine-protéine (Rutter et al., 2022). Pour d'autres champignons pathogènes, malgré les efforts déployés pour identifier des marqueurs des VE (Bleackley et al., 2020, 2019; Dawson et al., 2020; Hill and Solomon, 2020), aucun marqueur validé et exploitable n'a encore été identifié. Ainsi, chez les champignons, les approches utilisées chez les mammifères et les plantes pour caractériser les sous-populations vésiculaires, notamment en ce qui concerne leurs ARN, ne sont pas encore applicables.

Non seulement nous évaluons mal la diversité des VE chez les champignons ainsi que l'hétérogénéité de leur contenu en ARN, mais nous avons par

ailleurs très peu de connaissances concernant la régulation de leur composition. L'avènement des approches -omics a permis une description plus exhaustive de la composition cellulaire (Subramanian et al., 2020), mais ces nouvelles technologies ont également révélé la plasticité des cellules en réponse aux variations environnementales (Jamla et al., 2021). Les cellules évoluent dans des milieux aux compositions et caractéristiques physiques variées (Maier and Pepper, 2015; McKee and Komarova, 2017) et cette adaptation implique des modifications de l'expression des gènes, modifiant ainsi le transcriptome et le protéome cellulaires (Horinouchi and Furusawa, 2020). Ces dernières années, le laboratoire de Guilhem Janbon a étudié les variations du transcriptome cellulaire de *C. neoformans* en réponse à des modifications des conditions de culture (Dang et al., 2023; Janbon et al., 2014; Wallace et al., 2020). Il est fort probable que le contenu des vésicules soit aussi dépendant des variations des conditions de culture même si ceci reste mal étudié chez les champignons. Chez l'homme, ces modifications de la composition des VE en réponse à des conditions de culture ont été rapportées d'abord au niveau du protéome. Ainsi, la composition du protéome des vésicules produites par des cellules épithéliales amniotiques varie en fonction des conditions de culture (Zhu et al., 2021). En particulier, des variations d'expression d'épitopes à la surface des VE ont été observées. De même pour des modifications du protéome, mais aussi du lipidome et du métabolome des vésicules extracellulaires produites par les macrophages après phagocytose de différents pathogènes, dont *C. neoformans* (L. Zhang et al., 2021). Par ailleurs, chez les mammifères encore une fois, des modifications du transcriptome des vésicules ont été observées en réponse à des changements de conditions de culture. Par exemple, des altérations du contenu en miARN ont été observées en fonction des milieux de culture dans les VE produites par des cellules stromales de la moelle osseuse (Scheiber et al., 2022). Dans cette étude, une comparaison a été effectuée entre le contenu en miARN des vésicules dans un milieu de production de VE à haute performance par

rapport à un milieu conventionnel. Bien que l'abondance générale en ARN soit inférieure dans le premier milieu, un enrichissement de 88 miARN et une déplétion de 46 miARN ont été observés (Scheiber et al., 2022). Le transcriptome des vésicules extracellulaires peut aussi présenter des variations dans des contextes pathologiques tels que le cancer (Leung et al., 2021). Par exemple, le profil en miARN des exosomes isolés de patients atteints d'un cancer de la bouche est significativement différent de celui de patients en bonne santé (He et al., 2020). Alors que les exemples foisonnent chez les métazoaires, nos connaissances sont bien plus limitées chez les microorganismes. Chez *Staphylococcus aureus*, l'analyse de la structure du transcriptome vésiculaire révèle une forte variabilité en fonction des conditions de culture (Luz et al., 2021). Cette variation du transcriptome vésiculaire n'est ici pas associée à une variation du transcriptome cellulaire, suggérant une régulation des mécanismes d'adressage plutôt qu'un remodelage du transcriptome proprement dit (Luz et al., 2021). Chez les champignons très peu de publications s'intéressent à cette question. Néanmoins une publication de Cleare et collègues rapporte que le contenu moléculaire des vésicules extracellulaires dépend du milieu de culture chez *H. capsulatum* (Cleare et al., 2020). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a exploré la plasticité du transcriptome des vésicules extracellulaires fongiques selon les conditions de culture. Chez *C. neoformans*, la production de vésicules extracellulaires est altérée par les conditions de culture, notamment par la présence d'antifongiques (Reis et al., 2021; Rizzo et al., 2023). Par exemple, *C. neoformans* produit environ 3 fois moins de vésicules à 37°C par rapport à 30°C sur un milieu minimal solide. Par ailleurs, en présence de fluconazole (antifongique couramment utilisé), on constate une diminution de la production de vésicules extracellulaires de plus de deux fois (Rizzo et al., 2023). La composition moléculaire des VE dans ces conditions n'a pourtant pas été caractérisée chez *C. neoformans*. En accord avec les observations faites chez d'autres espèces, il est cependant très probable que la diversité et la composition du

transcriptome des VE soient affectées. Une caractérisation de ces modifications revêt un fort intérêt à la fois pour comprendre la structure du transcriptome vésiculaire fongique et pour identifier les facteurs externes à l'origine de ce remaniement y compris pendant l'infection.

La caractérisation du transcriptome des vésicules extracellulaires de *C. neoformans* au cours de l'infection de son hôte pourrait ainsi être utilisée pour identifier des biomarqueurs à des fins diagnostiques. Ce type d'étude n'a à ce jour jamais été menée, probablement du fait de la difficulté d'isoler spécifiquement les vésicules extracellulaires du pathogène en quantité suffisante dans ce contexte d'infection. Une meilleure compréhension du transcriptome vésiculaire infectieux permettrait d'avancer dans la compréhension des mécanismes mis en jeu par le pathogène dans le cadre de l'infection et/ou, inversement, identifier des mécanismes de la réponse de l'hôte. Cette étude pourrait également d'identifier des marqueurs pour le diagnostic et des cibles thérapeutiques potentielles.

L'exploitation du transcriptome vésiculaire à des fins thérapeutiques et académiques repose sur une compréhension approfondie des mécanismes fondamentaux régulant sa composition. Malheureusement, à ce jour l'obtention d'une description plus fiable des spécificités du transcriptome vésiculaire et de leur diversité, ainsi que la compréhension des mécanismes et des facteurs environnementaux régulant l'adressage des ARN vers les VE, est entravée par des difficultés techniques. Par exemple, une description plus fiable du transcriptome vésiculaire nécessite une purification plus efficace des ARN vésiculaires ce qui implique de limiter la co-purification des contaminants abondants ou résultant par exemple de la mortalité cellulaire. Par ailleurs, et comme nous l'avons vu dans cette thèse, la construction de bibliothèques de séquençage complémentaires est nécessaire pour obtenir une vision globale des ARN présents. En effet, les protocoles de construction des bibliothèques sont généralement adaptés à une sous-population spécifique d'ARN. Ceci demande des quantités d'ARN

importantes et des analyses bio-informatiques laborieuses. Enfin, et comme nous l'avons vu plus haut, il s'agira de séparer les VE en sous-populations et cela passera nécessairement par l'identification de marqueurs présents à la surface des VE associée avec l'optimisation de protocoles permettant leur séparation. De telles approches permettront de caractériser le rôle des VE et des ARN qu'elles contiennent dans des interactions hôte-pathogène.

La seconde partie de ma thèse a été consacrée à la mise au point d'outils pour réaliser des essais de communication intercellulaire utilisant les VE chez *C. neoformans*. Même si ces essais ne sont pas encore au point, cette approche a malgré tout jeté les bases qui permettront le développement d'outils de communication plus élaborés dans le futur, offrant ainsi la possibilité d'obtenir des essais de communication fonctionnels. Ceci permettra d'étudier de manière approfondie les mécanismes de communication intercellulaire. Comme indiqué dans mon introduction, bien que les VE fongiques aient été décrites dans la littérature comme jouant des rôles dans la communication intra- et inter-espèces, les mécanismes moléculaires et les supports de l'information impliqués restent à identifier. L'obtention d'un essai de communication fonctionnel, dont les conditions sont contrôlées et où le support moléculaire de l'information est identifié, permettra d'étudier plus facilement les mécanismes de la communication. Après le transfert des ARN dans les VE, celles-ci doivent atteindre la cellule cible, interagir avec la surface de sa membrane plasmique, être importées dans le cytoplasme et libérer leur contenu (Tosar et al., 2021; van Niel et al., 2022).

Nous avons déjà discuté des différentes voies de production de vésicules chez les métazoaires. Nous avons aussi discuté du fait que les voies de biosynthèse des VE chez les champignons sont pour l'instant globalement inconnues même si certaines souches mutantes produisant plus ou moins de vésicules ont été identifiées dans quelques espèces (Rizzo et al., 2023; Zarnowski et al., 2018). Une fois dans le milieu extracellulaire, les VE et les

ARN qu'elles contiennent doivent parcourir une distance plus ou moins grande avant d'atteindre leur cible. Chez les plantes, les ARN peuvent se déplacer localement ou sur de grande distance (Wang and Dean, 2020). Le transport de ces molécules peut se faire entre cellule adjacente via les pores entre les membranes plasmique mais aussi en passant par le milieu extracellulaire proche. Les petits ARN peuvent également se déplacer sur de plus longues distances via le système circulatoire des plantes (Wang and Dean, 2020). Le rôle des VE dans ces échanges n'est malgré tout pas toujours clair. Nos connaissances concernant la stabilisation des ARN et la présence d'ARNase dans le milieu extracellulaire proviennent encore une fois principalement d'études réalisées in vitro ou à partir d'échantillons humains. Ainsi, on retrouve des VE contenant des ARN dans des prélèvements de plasma (Hulstaert et al., 2020). Une étude a montré qu'un ARN exogène est complètement dégradé en moins de 15 secondes dans du sang humain qui contient de nombreuses ARNases (Tsui et al., 2002). Les VE permettent donc la stabilisation des ARN. Des VE de bactéries commensales et pathogènes ont aussi été identifiées dans le sang humain (Alberro et al., 2021; Schaack et al., 2022). Ce travail reste néanmoins à faire pour les champignons. En fait, la production de VE par les champignons pathogènes de l'homme lors de l'infection n'a jamais été formellement démontrée même si quelques publications exploitant des modèles cellulaires suggèrent que ce soit le cas (Bielska et al., 2018). Cette publication du groupe de Robin May suggère qu'une communication longue distance est possible par l'intermédiaire des VE et qu'elle est dépendante des ARN qui leur sont associés (Bielska et al., 2018). Ici, les VE sont supposées traverser les différentes barrières que sont les membranes plasmiques des macrophages et des levures, mais aussi la paroi de ces dernières. La paroi est parfois vue comme une structure rigide et imperméable qui empêcherait le transfert de VE et cette vision a parfois nourri le scepticisme de certains vis-à-vis des VE d'origine fongique ou végétale. Il est vrai qu'à ce jour, nous ne savons pas du tout comment les

VE traversent la paroi dans un sens ou dans l'autre. La présence de VE dans la paroi a néanmoins été mise en évidence par microscopie électronique (Rodrigues et al., 2007). Par ailleurs, des images de liposomes contenant de l'amphotéricine B marquée traversant la paroi (Walker et al., 2018) suggèrent que les propriétés viscoélastiques de la paroi sont suffisantes pour laisser passer des VE. Enfin, bien que les compositions des parois végétales diffèrent de celle des parois fongiques, il a été montré que des VE fongiques peuvent traverser la paroi végétale lors d'une infection et être internalisées par un mécanisme dépendant de la clathrine (He et al., 2023). Il n'en reste pas moins que les mécanismes associés à l'import des VE restent à identifier chez les champignons.

Le transcriptome extracellulaire, notamment celui des VE, suscite un intérêt croissant. Néanmoins, il reste à ce jour très mal décrit, notamment du fait de nombreuses limitations techniques qui restent à dépasser. Au cours de ma thèse, j'ai entrepris une exploration du transcriptome vésiculaire du pathogène fongique *C. neoformans* et développé des outils exploitant les ARN vésiculaires pour investiguer la communication intercellulaire via les VE. La première partie de mon travail a permis d'établir la première description du transcriptome vésiculaire dans des conditions de production des VE optimales. Dans l'ensemble, cette phase de ma recherche a jeté les bases pour une description plus approfondie, notamment au niveau des sous-populations vésiculaires. La seconde partie de ma thèse visait à développer des essais de communication intercellulaire pour étudier les mécanismes impliquant les ARN. Bien que les résultats obtenus n'aient pas répondu aux attentes, les outils initiaux créés et les essais réalisés fournissent des pistes pour optimiser les conditions en vue d'obtenir un essai de communication fonctionnel dans un avenir proche.

Matériel et méthodes

Général

Souches

Les souches utilisées dans cette étude sont *C. neoformans* KN99 (Nielsen et al., 2003), *C. deneoformans* JEC21 (Loftus et al., 2005) et *C. deuterogattii* R265 (Ma et al., 2009). Conservées à -80°C dans du glycérol, ces souches ont été striées sur un milieu YPD agar et incubées à 30°C pendant une période de 3 jours avant utilisation. Une liste des souches construites est disponible en annexe.

Milieu de culture

Le milieu YPD (Extrait de levure Bacto (Difco) 10 g, Bacto peptone (Difco) 20 g, Dextrose (Prolabo) 20 g, Bacto agar (Difco) 20 g, eau QSP 1 L) est couramment utilisé pour travailler avec les levures. Ce milieu a été complété avec 0,01 % de SDS, 0.1 mg/mL de CalcoFluor White et 15 µg/mL de fluconazole pour observer un phénotype résultant de la déstabilisation de la membrane, de la paroi ou d'une sensibilité ou résistance à cet antifongique, respectivement. Un milieu L-DOPA (KH₂PO₄ 29,4 mM, MgSO₄·7H₂O 10 mM, Glycine 13 mM, Glucose 30 mM, Thiamine-HCl 3 µM, L-DOPA 100 µM, Agar 1,5 %) a été utilisé pour estimer qualitativement la production de mélanine. La sélection de souches présentant un défaut de croissance en l'absence d'uracile a été testée de manière négative sur un milieu SD2% (Dextrose (Prolabo) 20 g, YNB sans acides aminés (Difco) 6,7 g, Bacto agar (Difco) 20 g, eau QSP 1 L) et positivement sur un milieu SD2%+URA+5-FOA (Dextrose (Prolabo) 20 g, YNB sans acides aminés

(Difco) 6,7 g, Uracile 50 mg, acide 5-fluoroorotique 1 g, Bacto agar (Difco) 20 g, eau QSP 1 L) supplémenté ou non avec du G418 100 µg/mL.

Préparation des échantillons de vésicules extracellulaires

Une masse cellulaire a été obtenue à partir de la préculture d'une colonie cultivée en milieu YPD liquide (16 heures, 30°C, 180 rpm). Ensuite, 300 µL d'une suspension aqueuse de ces cellules ($3,5 \times 10^7$ cellules/mL) lavées 2 fois à l'eau, ont été inoculés sur un milieu minimum SD 2% gélosé (0.67% YNB sans acides aminés (Difco), 2% glucose, 2% bacto-agar). Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 heures, sauf indication contraire. Les cellules sont alors collectées à l'aide d'une anse et remises en suspension dans 10 mL de PBS 1X froid (filtré à 0,02 µm). Le PBS 1X a été préparé par dilution d'une solution 10X (KH_2PO_4 1,3 g, K_2HPO_4 6,25 g, NaCl 43,55 g, eau QSP 500 ml). La suspension a été délicatement homogénéisée à l'aide d'une pipette de 10 ml. Pour séparer le surnageant du culot cellulaire, deux étapes de centrifugation successives ont été effectuées à 5000 g et 15000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot cellulaire résultant, de la première centrifugation, a été rapidement congelé en utilisant un mélange de carboglace et d'éthanol absolu, puis conservé à -80°C. Le surnageant a été filtré (0,45 µm) pour éliminer les éventuels débris cellulaires résiduels. Pour concentrer les vésicules extracellulaires, une ultracentrifugation a été effectuée à 100 000 g pendant 1 heure à 4°C en utilisant un rotor SW 40Ti. Le culot résultant a été remis en suspension dans 400 µL de PBS 0,01 M filtré. Si indiquée, une étape de purification optionnelle utilisant un gradient d'iodixanol (Sigma-Aldrich D1556-250ML) de 12 ml (40 %, 20 %, 10 %, 5 %) a été réalisée avec une ultracentrifugation durant 18 heures (Reis et al., 2021). Les fractions de 1 ml ont été collectées délicatement et lavées avec 9 ml de PBS 1X filtré. Après une nouvelle étape d'ultracentrifugation

pendant 1h à 4°C, le culot vésiculaire a été remis en suspension dans 100 µL de PBS 1X filtré.

Quantification des VE

La quantification des particules des VE par l'instrument NanoAnalyzer (NanoFCM™) équipé d'un laser de 488 nm à 50 mW et de détecteurs à avalanche de photodiodes à comptage de photons uniques (SPCM APDs) a été utilisée pour la détection des particules de VE. Des filtres passe-bande ont permis la collecte de la lumière dans des canaux spécifiques (488/10 nm). La diffusion de la lumière et la fluorescence des VE individuels ont été collectées sur des détecteurs à avalanche de photodiodes à comptage de photons uniques sur trois canaux : diffusion latérale (SSC) - 488/10 (canal de déclenchement). Le fluide d'échantillon a été focalisé à environ 1,4 µm à l'aide d'un filtre à eau de qualité HPLC et de dégazéification comme fluide de gain par gravité. Les données ont été générées à l'aide du logiciel Nanoanalyzer Professional Suite V 2.0 et du PBS filtré à 0,02 µm a été utilisé comme contrôle pour définir le bruit de fond. Les mesures ont été effectuées sur des périodes d'une minute à une pression d'échantillonnage d'environ 1,0 kPa, modulée et maintenue par un module de pression à base d'air. Les échantillons ont été dilués dans du PBS filtré à 0,02 µm selon les besoins pour permettre l'enregistrement de 3 000 à 13 000 comptages pendant ce laps de temps. Pendant l'acquisition de données, le flux d'échantillon est complètement éclairé dans la région centrale du faisceau laser focalisé, ce qui entraîne une efficacité de détection d'environ 100 %, et permet une mesure précise de la concentration des particules par énumération des particules uniques. L'alignement optique a été testé et calibré à l'aide de nanoparticules de silice fluorescente de 250 nm. Des mesures de calibration supplémentaires ont été prises avant l'analyse en utilisant des nanoparticules de silice d'une taille de 250 nm et de concentration connue (pour le calcul de la concentration de VE). La taille des échantillons de VE

isolés a été estimée grâce à une courbe de calibration générée par nanoFCM™ et basée sur une suspension contenant des populations de nanosphères de 68, 91, 113 et 155 nm de diamètre. La silice fournit un étalon stable et monodisperse avec un indice de réfraction d'environ 1,43 à 1,46, qui est proche de la plage d'indices de réfraction rapportée dans la littérature pour les VE ($n = 1,37$ à $1,42$). L'utilisation d'un étalon de calibration de ce type a permis des mesures de taille précises en cytométrie en flux, comme confirmé lors de la comparaison des résultats de cytométrie en flux avec la cryoTEM. Le laser était réglé à 10 mW et 10 % de décroissance de la SSC. Les données rapportées dans la figure ont été traitées dans le logiciel NanoFCM Professional Suite v2.0 pour analyser les particules de 40 à 155 nm. La quantification a également été réalisée indirectement par mesure de la quantité totale de stérols à l'aide du kit de dosage du cholestérol Amplex Red (Thermo Fisher Scientific, A12216), en suivant les instructions du fabricant.

RT-qPCR

Pour évaluer l'expression génique via la RT-qPCR, 5 µg d'ARN total ont été traités avec de la DNase I recombinante (Roche) afin de supprimer l'ADN génomique. Par la suite, 1 µg d'ARN a été employé pour synthétiser de l'ADNc en utilisant le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific). La réaction de PCR quantitative s'est déroulée dans des plaques 96 puits (Bio-Rad) avec du SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix et a été amplifiée à l'aide d'un système de PCR en temps réel CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad). Les valeurs de Ct ont été obtenues en triplicat et leur moyenne a été calculée. Pour quantifier les molécules, une gamme étalon a été établie à partir d'ADN génomique. Enfin, la normalisation s'est opérée en utilisant le gène de référence ACT1 (CNAG_00483). Les détails des amorces utilisées sont disponibles en annexe.

Bio-informatique

La préparation des données, l'analyse et la visualisation ont été réalisées en utilisant BASH 5.1.16 et R 4.3, sauf indication contraire.

Description du transcriptome et protéome des VE

Extraction d'ARN

L'ARN a été extrait à la fois à partir des vésicules extracellulaires et des cellules en utilisant le kit TRIzol (Ambion 15596026) sous des conditions exemptes d'ARNase et dans la glace. Pour l'extraction de l'ARN des cellules, celles-ci ont été déshydratées par lyophilisation pendant une nuit. Ensuite, le lyophilisat obtenu a été réduit en poudre en utilisant des billes de verre (Sigma G8772 500g), suivie d'une resuspension dans 3 mL de TRIzol et 800 μ L de phénol-chloroforme:alcool isoamylique (Amresco 0966-100ML). Après une centrifugation de 30 minutes à 21 000 g à 4 °C, la phase aqueuse a été collectée. Pour précipiter l'ARN, 2 volumes d'éthanol absolu ont été ajoutés, et le mélange a été incubé toute la nuit à -20°C. Après centrifugation et lavage avec de l'éthanol à 75 %, le culot d'ARN a été resuspendu dans 1 mL d'eau dépourvue d'ARNase. La dissolution a été réalisée en incubant les culots à 50°C pendant 10 minutes. L'extraction de l'ARN à partir des vésicules extracellulaires a suivi le même processus, à l'exception de l'étape de lyophilisation, des billes de verre, et en utilisant 1 mL de TRIzol et 200 μ L de phénol-chloroforme:alcool isoamylique. Les ARN ont finalement été repris dans un volume approprié d'eau exempte d'ARNase.

Électrophorèse Urea-PAGE

L'électrophorèse des gels de polyacrylamide (1.5 mm d'épaisseur) a été conduite en utilisant un gel TBE-Urea 8M préparé à partir de 4,8 g d'urée (Sigma-Aldrich U1250-1KG), 1 ml de tampon TBE 10X, 2 ml d'acrylamide/bis-acrylamide 19:1 à 40 % (Euromedex EU0061-B), 2.25 mL d'eau mq., 100 µL de solution d'APS à 10 % (Euromedex EU0009-B) et 10 µL de TEMED (IBI K425). Avant de charger les échantillons, une prémigration a été effectuée à 120V pendant 30 minutes dans du TBE 1X. Les échantillons dénaturés (composés de 10 µL d'urée 8M mélangée avec du bleu de bromophénol pour 40 µL d'échantillon d'ARN) à 90 °C pendant 3 minutes ont été chargés lentement sur le gel. La migration s'est déroulée pendant 70 minutes à 120V. Après avoir rincé abondamment le gel avec de l'eau, la révélation a été effectuée après coloration pendant 10 minutes sous agitation dans une solution de 15 mL de tampon TBE 1X contenant 1µL de SYBRGold (Invitrogen S11494).

Séquençage d'ARN (< 100 nt)

Les extraits d'ARN total de chaque souche de *Cryptococcus* ont été ou non traités avec l'Acide Pyrophosphatase CAP-CLIP (Cellscript) comme décrit précédemment (Wallace et al., 2020). Ensuite, des « bibliothèques » ont été construites en suivant le protocole du kit Illumina QIAseq® miRNA Library. Le séquençage de « reads » allant jusqu'à 100 nucléotides a été réalisé en utilisant un Illumina Iseq100.

Séquençage d'ARN 18-30 nt

Après avoir purifié les ARN de 18 à 30 nucléotides, à partir des échantillons de vésicules extracellulaires et de cellules, par électrophorèse Urea-PAGE, les morceaux de gel ont été fragmentés par centrifugation (20 000 g, 2 minutes) à travers un orifice au fond d'un tube Eppendorf de 0,5 mL. Les

résidus de gel ont ensuite été incubés dans 300 μ L de solution saline à 0,3 M à 25 °C avec agitation (850 rpm) pendant la nuit. Après séparation de l'ARN des résidus de gel à travers une colonne Corning (Fischer Corning 8161), l'ARN a été précipité en utilisant un tube à liaison faible de l'ADN (Eppendorf 22431021) et élué dans 16,5 μ L d'eau. Les triphosphates en 5' ont été éliminés en utilisant une polyphosphatase (Euromedex Lucigen RP8092H), et l'ARN a été purifié avec 3 volumes d'isopropanol absolu et 1,8 volume de billes Agencourt RNAClean XP (Beckman A63987). Le mélange a été homogénéisé par 15 refoulements, puis incubé pendant 20 minutes sur glace. Le surnageant a été éliminé à l'aide d'une séparation magnétique, et les billes ont été lavées avec 400 μ L d'éthanol 80 %. L'ARN a été élué avec 6 μ L d'eau. Après la ligature de l'adaptateur (5'rApp/NNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG/3'ddC/) en 3' (composée de 5 μ L d'ARN, 1 μ L d'adaptateur à 1 μ M, 2 μ L de tampon de ligature à 10X, 2 μ L de ligase d'ARN tronqué KQ à 200 000 U/mL, 10 μ L de PEG8000 à 50 %, à 25°C pendant la nuit), l'ARN a été de nouveau purifié. Après l'ajout d'une amorce de transcription inverse spécifique de l'adaptateur en 3', un adaptateur (5' GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUCNNNN 3') en 5' a été introduit (14 μ L d'ARN, 2 μ L d'adaptateur à 10 μ M, 2 μ L de tampon de ligature à 10X, 2 μ L d'ATP à 10 mM, 1 μ L de T4 ARN ligase (Ambion AM2141) à 30 000 U/mL, à 30°C pendant 2 heures). Ensuite, l'ARN a été purifié selon la méthode décrite précédemment. Les réactions de transcription inverse (RT) ont été réalisées en mélangeant 12 μ L d'ARN, 1 μ L de dNTP à 10 mM, 4 μ L de tampon SuperScript III (Invitrogen) à 5X, 1 μ L de DTT à 100 mM, 1 μ L de RNase OUT à 40 U/ μ L et 1 μ L de SuperScript III à 200 U/ μ L, puis incubées à 50°C pendant 45 minutes, suivies de 15 minutes à 70°C. Les bibliothèques ont été amplifiées à l'aide de PCR Phusion (14 cycles pour les VE contre 10 pour les cellules), et vérifiées sur TapeStation. Enfin, l'ADNc a été purifié sur UREE-PAGE et récupéré dans 10 μ L d'eau avant de procéder au séquençage de 100 pb par un Illumina HiSeq2500.

Séquençage d'ARN polyA

Les bibliothèques de séquençage d'ARN total des VE et des cellules ont été préparées en suivant le protocole TruSeq Stranded mRNA d'Illumina. Le séquençage a été réalisé en utilisant un Illumina NextSeq 500.

Alignements et comptages des reads

Les séquences des adaptateurs ont été retirées par Cutadapt 2.1 (Martin, 2011) en excluant les « reads » de taille inférieure à 18 nt, suivie d'un alignement sur le génome de *C. neoformans* H99 (Janbon et al., 2014), à l'aide de Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) et Tophat 2.1.1 (Kim et al., 2013). Les options suivantes ont été utilisées : `--mate-inner-dist 200 -mate-std-dev 40 --min-intron-length 30 --min-coverage-intron 30 --min-segment-intron 30 --max-intron-length 4000 --read-edit-dist 2 --read-mismatches 2 --read-gap-length 2`. La manipulation des fichiers BAM a été effectuée à l'aide de samtools 0.1.19 (Danecek et al., 2021). Les « reads » ont ensuite été comptées à l'aide de FeatureCount (subread 2.0.0) (Liao et al., 2019) avec les options `-M --primary --largestOverlap -d 20` sur l'annotation de *C. neoformans* (Wallace et al., 2020) ou une annotation du génome divisé en fenêtre de 500 pb. Lorsqu'une mauvaise annotation a été identifiée, la référence a été mise à jour avant de refaire le comptage. Notamment, la réannotation des ARNt a été réalisée avec tRNAscan 1.3.1 (Chan et al., 2021) avec les options `-E -I -max`. L'intersection entre les annotations du génome a été réalisée avec BedTools 2.29.2 (Quinlan and Hall, 2010). La visualisation des alignements a été réalisée à l'aide de IGV 2.15.2 (Robinson et al., 2011) avec les paramètres par défaut. La comparaison de l'expression des gènes entre les échantillons a été réalisée à l'aide de SARTOOL 1.8.1 (Varet et al., 2016).

Identification des ARN

L'identification des ARN a été effectuée en comparant leurs séquences et leurs structures secondaires avec la base de données RFAM (Kalvari et al., 2018) à l'aide de l'outil de comparaison en ligne ou en utilisant le programme Infernal 1.1.5 (Nawrocki and Eddy, 2013). Une comparaison manuelle de la structure a également été effectuée après génération par le programme RNAfold du ViennaRNA Package 2.0 (Lorenz et al., 2011). Pour l'identification des snoARN (petits ARN nucléolaires) à boîte C/D, nous avons recherché la présence des motifs de boîte C (CUGA) et boîte D (RUGAUGA) avec un écart maximal d'un nucléotide par rapport à la séquence consensus. De même, les snoARN à boîte H/ACA ont été identifiés en recherchant la présence de la boîte H (ANANNA) et la séquence ACA dans les 10 derniers nucléotides de la séquence. Pour confirmer l'identification et l'enrichissement des séquences consensus des boîtes par rapport à l'ensemble de la population de transcrits, nous avons utilisé la suite logicielle MEME 5.1.1 (Bailey et al., 2009).

Conservation des gènes

Les séquences géniques de *C. neoformans* H99 ont été extraites à partir de la base de données FungiDB, en récupérant également 1000 paires de bases en amont du codon d'initiation et en aval du codon stop, ou en les centrant autour de la séquence annotée du transcrit pour les ARNnc. Les séquences homologues provenant de *C. deneoformans* JEC21, *C. deuterogattii* R265, *Kwoniella mangroviensis* CBS 8507, *Kwoniella heveanensis* CBS 569, *Tremella mesenterica* DSM 1558 et *Kwoniella bestiolae* CBS 10118 ont été identifiées à l'aide de BLAST NCBI (Camacho et al., 2009) et récupérées de manière similaire. Les séquences ont ensuite été alignées à l'aide du logiciel MUSCLE 5.1 (Edgar, 2004), et leur visualisation a été réalisée en utilisant JalView 2.11.2.7 (Waterhouse et al., 2009). Pour évaluer la conservation

des séquences, le logiciel plotcon (EMBOSS 6.6) (Rice et al., 2000) a été utilisé avec une fenêtre de 20 nucléotides.

Analyse protéomique

L'analyse protéomique a été réalisée comme décrit précédemment (Rizzo et al., 2021b). Toutefois, pour éliminer le iodixanol restant dans les échantillons purifiés sur gradient, les protéines ont été précipitées par de l'acide trichloracétique avant d'être resuspendues dans du PBS et digérées à la trypsine. La caractérisation des protéines a été effectuée en utilisant la plus longue isoforme de chaque protéine (Wallace et al., 2020). Les prédictions de la localisation subcellulaire, des protéines transmembranaires et des protéines à encre GPI ont été réalisées à l'aide de DeepLoc 2.0 (Thumuluri et al., 2022), de DeepTMHMM 1.0.24 (Hallgren et al., 2022) et de NetGPI 1.1 (Gíslason et al., 2021), respectivement. Les protéines ribosomales ont été identifiées à l'aide d'outils internes de FungiDB pour rechercher les gènes avec "ribosomal protein" dans la description du produit.

Mise au point d'essais de communication

Transformation de *C. neoformans*

Les transformations ont été réalisées en utilisant la méthode TRACE (Lin et al., 2020), qui exploite le système CRISPR/Cas9 par électroporation. L'électroporation (600 Ohms, 125 μ F, 450 V, cuve 2 mm) a été réalisée avec 700 ng de fragment d'ADN encodant un ARN guide et 900 ng de fragment d'ADN encodant le gène de la Cas9 (sauf si la souche l'exprime constitutivement). Les amorces contenant les guides ont préalablement été

intégrées par Gibson Assembly (E2611) dans un plasmide pBlueScript-ccdB linéarisé par BbsI. Les plasmides et les amorces pour amplifier le fragment d'ADN permettant l'expression de la protéine Cas9 ((lin et al., 2020), BAPF2059/BAPF2060) et de l'ARNg (BAPF2057/BAPF2058) sont listés en annexe.

Construction de souches

La délétion des gènes encodant des snoARN a été réalisée par TRACE en présence d'une cassette de délétion. Pour la construction de cette dernière, une région de 1 kb en amont (amorces 5'5/5'3) et en aval (amorces 3'5/3'3) de la région annoté (Wallace et al., 2020) a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique. Le gène de résistance à la néomycine (Hua et al., 2000) a été amplifié (BAPF426/amorces MKRr) à partir d'un plasmide pZP-NEO (Walton et al., 2005). L'assemblage des trois parties a été réalisé dans un plasmide pRS426 par transformation d'une souche de *S. cerevisiae* FY834. Après extraction du plasmide à l'aide d'une solution de lithium acétate 200 mM/SDS 1%, et une précipitation à l'éthanol absolu, la cassette a été amplifiée par PCR Phusion (amorces 5'5/3'3). La transformation a été effectuée par électroporation, avec l'introduction de 2 µg de cassette de délétion. Après extraction de l'ADN génomique des transformants, la délétion a été vérifiée par PCR (amorces ex5/ex3).

La construction des souches exprimant un ARN en épingle à cheveux et/ou une protéine fluorescente a été réalisée en intégrant les gènes associés au niveau de deux régions génomiques appelées le SafeHaven (Arras et al., 2015; Upadhyaya et al., 2017) par TRACE. Pour la souche pGDP1-mNeon, le CDS et son terminateur ont été amplifiés (BAPF2506/BAPF2527) à partir du plasmide pBHM2404 (Huang et al., 2022) et assemblés avec le produit PCR du promoteur GDP1 (BAPF2772/BAPF2498) (Varma and Kwon-Chung, 1999) par PCR d'assemblage (BAPF2772/BAPF2527) à l'aide d'un kit PCR Advantage HF 2 (Takara). Après ligation par T/A clonning dans un pGEM-

Teasy, le gène a été intégré par ligation T4 entre les régions de restriction HindIII/NotI du plasmide pSDMA57 (Arras et al., 2015). Pour la souche pGDP1-ARNsh, le gène exprimant l'ARN en épingle à cheveux a été construit par amplification de 500 pb du CDS du mNEONGreen dans l'orientation inverse (mNeonGreenREV : BAPF2504/BAPF2922), ainsi que 234 pb provenant du pRS427 (Space : BAPF2924/BAPF2920), et du terminateur (BAPF2503/BAPF2923) de la télomérase (CNAG_07988) du plasmide pBHM2404. De même, le promoteur pGDP1 couplé aux 500 premières pb du mNeonGreen a été amplifié (pGDP1-mNeonGreenFWD : BAPF2920/BAPF2921) à partir de la construction précédente. Le fragment mNeonGreenREV et le terminateur ont été assemblés par PCR (BAPF2504/BAPF2923). Les différents produits PCR ont été clonés dans des pGEM-Teasy par T/A cloning. Un fragment XbaI contenant le spacer a alors été intégré au niveau du site XbaI du plasmide contenant le mNeonGreenREV-terminateur. Un fragment SpeI de cette nouvelle construction a alors été cloné au niveau d'un site XbaI du plasmide contenant le pGDP1-mNeonGreenFWD. Après libération du fragment PstI/ZraI, ce dernier a été intégré par ligation au niveau des site PstI/Eco53KI du plasmide pSDMA25. L'ensemble des plasmides contenant le gène de l'ARN en épingle à cheveux ont été construits à l'aide de transformation dans des bactéries *Escherichia coli* SURE non recombinantes tandis que les autres ont été effectués dans des bactéries *E. coli* XL1. Après linéarisation des plasmides pSDMA57-pGDP1-mNeon et pSDMA25-pGDP1-ARNsh par PacI, 2 µg de ces derniers ont été intégrés par TRACE au niveau des régions SH2 et SH1, respectivement.

La construction des souches *ura5* mutées a également été réalisée par co-transformation par la méthode TRACE (Ianiri et al., 2020). L'intégration par TRACE a été effectuée en insérant la cassette de mutation au niveau du locus *URA5* et en insérant un plasmide pSDMA57 contenant le gène de résistance NEO au niveau de SH1 dans les fonds génétiques de la souche

C. neoformans NE1538 exprimant nativement la protéine Cas9 (Huang et al., 2022). La cassette de délétion présentant une insertion a été construite par PCR d'assemblage (BAPF2863/BAPF2866) des fragments Phusion BAPF2863/BAPF2864 et BAPF2865/BAPF2866 (ADN génomique) pour insérer une séquence ATCC entre la position +98 et +99 par rapport au codon d'initiation ATG du gène *URA5* (CNAG_03196). Les gènes présentant une duplication de 8 pb ont été amplifiés en deux parties (BAPF2867/BAPF2976, BAPF2977/BAPF2876), clonés dans des plasmide pGEM-Teasy, puis assemblé au niveau d'un site de clivage NcoI. En effet, la cassette a été construite de façon à insérer une duplication de la région +452 à +460 par rapport à l'ATG avec l'insertion d'un site de restriction NcoI entre les deux duplications. La duplication de 24 pb a été réalisée au niveau de la région + 437 à +461. De même que pour la duplication 8 pb, deux fragments (BAPF2867/BAPF2880, BAPF2881/BAPF2882), ont été clonés dans un pGEM-Teasy et assemblé au niveau d'un site XmaI. Les fragments PCR amplifiés ont alors été transformés avec un fragment d'ADN contenant le guide (BAPF2871 ou BAPF2873), 2 µg plasmide pSDMA57 linéarisé et 2 µg de cassette de mutation. Pour les souches émettrices d'ARN guide, les gènes exprimant des ARN guides, isolés par restriction au niveau des sites SacI/ClaI de leur plasmide respectif, ont été intégrés par ligation dans un plasmide pSDMA25, puis 2 µg ont été intégrés, après linéarisation par PacI, par TRACE au niveau du SH1 de *C. neoformans*, que le gène Cas9 soit exprimé constitutivement ou non.

La liste des amorces, guides et plasmides est disponibles en annexe.

Microscopie à fluorescence

Un culot cellulaire a été récupéré à partir d'une culture en YPD pendant 16h ou d'une boîte SD2% (condition de production des VE). Les cellules ont été lavées deux fois à l'eau puis reprises dans un volume adéquat. La fluorescence des cellules a été observée à l'aide d'un microscope inversé à

fluorescence CellVivo® après une excitation pendant 100 ms à une longueur d'onde de 450-490 nm (mNEONGreen).

Cytométrie en flux

La comparaison du niveau de fluorescence entre les différentes souches a été réalisée en quantifiant le niveau de fluorescence par cellule à l'aide d'un cytomètre en flux MACSQuant® Analyzer. La longueur d'onde d'excitation était de 550 nm (canal B1). L'analyse des données a été réalisée sur FlowJo V10.8.1.

Essais phénotypiques

Après une préculture en YPD pendant 16 heures à 30°C sous agitation (180 rpm), 2 mL de culture ont été lavés deux fois à l'eau, puis resuspendues dans 1 mL. Une dilution à 10^7 cellules/mL a ensuite été préparée, et 3 μ L des dilutions en série (au dixième) ont été déposés sur différents milieux gélosés. Pour la comparaison de la taille de la capsule, les souches ont été cultivées sur milieu inducteur à 30°C puis colorées à l'encre de Chine avant observation microscopique. Le milieu inducteur est composé d'un mélange aqueux entre une solution A 10X (Bicarbonate (NaHCO_3) 1 g, MOPS 7.32 g, Asparagine 1.5 g, eau mq. QSP 100 mL) et une solution B 10X (Dextrose 20 g, YNB sans acides aminés et ammonium sulfate 1.7 g, eau mq. QSP 100 mL).

Test de réversion par électroporation

Afin de tester la réversion des allèles du gène *URA5*, les cellules sont préparées de façon à effectuer une transformation d'un fragment d'ADN codant pour un ARN guide (PCR Phusion BAPF2057/BAPF2058) par la méthode TRACE (Lin et al., 2020). Brièvement, après une préculture en YPD liquide (16h, 30°C, 180 rpm), 100 mL de YPD sont inoculés de façon à avoir

une DO=0.2. Les cultures sont incubées à 30°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO=0.6. Après centrifugation (4000 rpm, 5', 4°C), les culots sont lavés 2 fois à l'eau pyrolysés, puis repris dans 10 mL de Tampon d'électroporation (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, MgCl₂ 1 mM, Sucrose 270 mM) avec du DTT. Après 1 heure d'incubation dans la glace et une nouvelle centrifugation, les culots sont repris dans 200 µL de tampon EB puis transformés avec 700 ng de guide (600 Ohms, 125 µF, 450 V). Les transformants sont repris dans 1 mL de YPD puis étalés sur un milieu sélectif. Pour les souches [Ura⁻], les phénotypes sont observés après 3 jours d'incubation à 30°C tandis que les phénotypes des souches [Ura⁺] sont observés après 5 jours.

Essai de communication

L'essai de communication a été réalisé par co-culture entre des souches exprimant des ARN guides, avec ou sans expression constitutive de la protéine Cas9, et une souche exprimant constitutivement la protéine Cas9, avec ou sans une mutation au niveau du gène *URA5*. Après une culture pendant 16h dans un milieu YPD liquide à 4°C sous agitation, 2 mL de culture sont lavés 2 fois à l'eau et resuspendues dans de l'eau pour obtenir une concentration de 3.5×10^7 cellules/mL. La suspension des cellules émettrices est mélangée avec celle des souches réceptrices avec un ratio 50/50 et 300 µL sont étalés sur milieu SD2%. En présence de souches *ura5*, le milieu est supplémenté en uracile à 5 mg/m. Après 24h d'incubation à 30°C, les cellules sont récupérées à l'aide d'une anse dans 10 mL de PBS. 100 µL sont alors étalés sur des boîtes SD2% supplémenté en généticine lorsque les souches réceptrices sont [Ura⁻]. Les boîtes sont observées après incubation pendant 3 jours à 30°C. En présence de souches *URA5*, les co-culture sont effectuées sur milieu SD2% et la sélection est réalisé sur un milieu SD2% supplémenté en généticine, uracile 5 mg/mL et 1 mg/mL 5-FOA. Les boîtes sont alors observées après 5 jours.

Références

- Ahadi, A., Brennan, S., Kennedy, P.J., Hutvagner, G., Tran, N., 2016. Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes. *Sci. Rep.* 6, 24922. <https://doi.org/10.1038/srep24922>
- Alberro, A., Iparraguirre, L., Fernandes, A., Otaegui, D., 2021. Extracellular Vesicles in Blood: Sources, Effects, and Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8163. <https://doi.org/10.3390/ijms22158163>
- Albuquerque, P.C., Nakayasu, E.S., Rodrigues, M.L., Frases, S., Casadevall, A., Zancope-Oliveira, R.M., Almeida, I.C., Nosanchuk, J.D., 2008. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell. Microbiol.* 10, 1695–1710. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01160.x>
- Alves, L.R., Peres da Silva, R., Sanchez, D.A., Zamith-Miranda, D., Rodrigues, M.L., Goldenberg, S., Puccia, R., Nosanchuk, J.D., 2019. Extracellular Vesicle-Mediated RNA Release in *Histoplasma capsulatum*. *mSphere* 4, e00176-19, /msphere/4/2/mSphere176-19.atom. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00176-19>
- Arras, S.D.M., Chitty, J.L., Blake, K.L., Schulz, B.L., Fraser, J.A., 2015. A Genomic Safe Haven for Mutant Complementation in *Cryptococcus neoformans*. *PLOS ONE* 10, e0122916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122916>
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F., Tewari, M., 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5003–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019055108>
- Artuyants, A., Campos, T.L., Rai, A.K., Johnson, P.J., Dauros-Singorenko, P., Phillips, A., Simoes-Barbosa, A., 2020. Extracellular vesicles produced by the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* contain a preferential cargo of tRNA-derived small RNAs. *Int. J. Parasitol.* 50, 1145–1155. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.07.003>
- Badis, G., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., 2003. A snoRNA that guides the two most conserved pseudouridine modifications within rRNA confers a growth advantage in yeast. *RNA N. Y.* N 9, 771–779. <https://doi.org/10.1261/rna.5240503>
- Baglio, S.R., van Eijndhoven, M.A.J., Koppers-Lalic, D., Berenguer, J., Lougheed, S.M., Gibbs, S., Léveillé, N., Rinkel, R.N.P.M., Hopmans, E.S., Swaminathan, S., Verkuijlen, S.A.W.M., Scheffer, G.L., van Kuppeveld, F.J.M., de Gruijl, T.D., Bultink, I.E.M., Jordanova, E.S., Hackenberg, M., Piersma, S.R., Knol, J.C., Voskuyl, A.E., Wurdinger, T., Jiménez, C.R., Middeldorp, J.M., Pegtel, D.M., 2016. Sensing of latent EBV infection through exosomal transfer of 5'pppRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E587-596. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518130113>
- Bahram, M., Netherway, T., 2022. Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, fuab058. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab058>
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., Noble, W.S., 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37, W202–W208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>

- Balasubramanian, R., Zhang, X., 2016. Mechanisms of FGF gradient formation during embryogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol., Cytokinetic ring construction and constriction* 53, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.004>
- Banjara, N., Suhr, M.J., Hallen-Adams, H.E., 2015. Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. *Curr. Microbiol.* 70, 792–800. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0790-1>
- Barr, F.A., Puype, M., Vandekerckhove, J., Warren, G., 1997. GRASP65, a Protein Involved in the Stacking of Golgi Cisternae. *Cell* 91, 253–262. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80407-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80407-9)
- Bazzan, E., Tinè, M., Casara, A., Biondini, D., Semenzato, U., Cocconcelli, E., Balestro, E., Damin, M., Radu, C.M., Turato, G., Baraldo, S., Simioni, P., Spagnolo, P., Sietta, M., Cosio, M.G., 2021. Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6417. <https://doi.org/10.3390/ijms22126417>
- Ben-Ami, R., Kontoyiannis, D.P., 2021. Resistance to Antifungal Drugs. *Infect. Dis. Clin.* 35, 279–311. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.003>
- Bicanic, T., Harrison, T.S., 2004. Cryptococcal meningitis. *Br. Med. Bull.* 72, 99–118. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh043>
- Bielska, E., Sisquella, M.A., Aldeieg, M., Birch, C., O'Donoghue, E.J., May, R.C., 2018. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nat. Commun.* 9, 1556. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03991-6>
- Bitencourt, T.A., Hatanaka, O., Pessoni, A.M., Freitas, M.S., Trentin, G., Santos, P., Rossi, A., Martinez-Rossi, N.M., Alves, L.L., Casadevall, A., Rodrigues, M.L., Almeida, F., 2022. Fungal Extracellular Vesicles Are Involved in Intraspecies Intracellular Communication. *mBio* 13, e03272-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.03272-21>
- Bitencourt, T.A., Rezende, C.P., Quaresimin, N.R., Moreno, P., Hatanaka, O., Rossi, A., Martinez-Rossi, N.M., Almeida, F., 2018. Extracellular Vesicles From the Dermatophyte *Trichophyton interdigitale* Modulate Macrophage and Keratinocyte Functions. *Front. Immunol.* 9, 2343. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02343>
- Bleackley, M.R., Dawson, C.S., Anderson, M.A., 2019. Fungal Extracellular Vesicles with a Focus on Proteomic Analysis. *PROTEOMICS* 19, 1800232. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800232>
- Bleackley, M.R., Samuel, M., Garcia-Ceron, D., McKenna, J.A., Lowe, R.G.T., Pathan, M., Zhao, K., Ang, C.-S., Mathivanan, S., Anderson, M.A., 2020. Extracellular Vesicles From the Cotton Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* Induce a Phytotoxic Response in Plants. *Front. Plant Sci.* 10, 1610. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01610>
- Boeke, J.D., LaCroute, F., Fink, G.R., 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* MGG 197, 345–346. <https://doi.org/10.1007/BF00330984>
- Bolukbasi, M.F., Mizrak, A., Ozdener, G.B., Madlener, S., Ströbel, T., Erkan, E.P., Fan, J.-B., Breakefield, X.O., Saydam, O., 2012. miR-1289 and “Zipcode”-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e10. <https://doi.org/10.1038/mtna.2011.2>
- Bomberger, J.M., MacEachran, D.P., Coutermarsh, B.A., Ye, S., O'Toole, G.A., Stanton, B.A., 2009. Long-Distance Delivery of Bacterial Virulence Factors by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles. *PLOS Pathog.* 5, e1000382. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000382>

- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R., Denning, D., 2017. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J. Fungi* 3, 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
- Bonnet, A., Grosso, A.R., Elkaoutari, A., Coleno, E., Presle, A., Sridhara, S.C., Janbon, G., Géli, V., de Almeida, S.F., Palancade, B., 2017. Introns Protect Eukaryotic Genomes from Transcription-Associated Genetic Instability. *Mol. Cell* 67, 608-621.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.002>
- Borghesan, M., Fafián-Labora, J., Eleftheriadou, O., Carpintero-Fernández, P., Paez-Ribes, M., Vizcay-Barrena, G., Swisa, A., Kolodkin-Gal, D., Ximénez-Embún, P., Lowe, R., Martín-Martín, B., Peinado, H., Muñoz, J., Fleck, R.A., Dor, Y., Ben-Porath, I., Vossenkamper, A., Muñoz-Espin, D., O’Loughlen, A., 2019. Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3. *Cell Rep.* 27, 3956-3971.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.095>
- Brauer, V.S., Pessoni, A.M., Bitencourt, T.A., de Paula, R.G., de Oliveira Rocha, L., Goldman, G.H., Almeida, F., 2020. Extracellular Vesicles from *Aspergillus flavus* Induce M1 Polarization In Vitro. *mSphere* 5, e00190-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00190-20>
- Bruns, C., McCaffery, J.M., Curwin, A.J., Duran, J.M., Malhotra, V., 2011. Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion. *J. Cell Biol.* 195, 979–992. <https://doi.org/10.1083/jcb.201106098>
- Bryant, C.J., McCool, M.A., Abriola, L., Surovtseva, Y.V., Baserga, S.J., 2022. A high-throughput assay for directly monitoring nucleolar rRNA biogenesis. *Open Biol.* 12, 210305. <https://doi.org/10.1098/rsob.210305>
- Buck, A.H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H.J., Quintana, J.F., Le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M., Marcus, Y., Ceroni, A., Babayan, S.A., Blaxter, M., Ivens, A., Maizels, R.M., 2014. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat. Commun.* 5, 5488. <https://doi.org/10.1038/ncomms6488>
- Caballero Van Dyke, M.C., Wormley, F.L., 2018. A Call to Arms: Quest for a Cryptococcal Vaccine. *Trends Microbiol.* 26, 436–446. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.002>
- Caetano, C.F., Gaspar, C., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, A., Rolo, J., 2023. The Role of Yeasts in Human Health: A Review. *Life* 13, 924. <https://doi.org/10.3390/life13040924>
- Cai, Q., Halilovic, L., Shi, T., Chen, A., He, B., Wu, H., Jin, H., 2023. Extracellular vesicles: cross-organismal RNA trafficking in plants, microbes, and mammalian cells. *Extracell. Vesicles Circ. Nucleic Acids* 4, 262–282. <https://doi.org/10.20517/evcna.2023.10>
- Cai, Q., He, B., Weiberg, A., Buck, A.H., Jin, H., 2019. Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *PLOS Pathog.* 15, e1008090. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008090>
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F.-M., Palmquist, J., Huang, S.-D., Jin, H., 2018. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360, 1126–1129. <https://doi.org/10.1126/science.aar4142>
- Cai, Q., Tian, L., Xie, J.-T., Huang, Q.-Y., Feng, M.-G., Keyhani, N.O., 2021. A fungal sirtuin modulates development and virulence in the insect pathogen, *Beauveria bassiana*. *Environ. Microbiol.* 23, 5164–5183. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15497>

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Canzler, S., Stadler, P.F., Schor, J., 2018. The fungal snoRNAome. *RNA* 24, 342–360. <https://doi.org/10.1261/rna.062778.117>
- Černoša, A., Gostinčar, C., Lavrin, T., Kostanjšek, R., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N., 2022. Isolation and characterization of extracellular vesicles from biotechnologically important fungus *Aureobasidium pullulans*. *Fungal Biol. Biotechnol.* 9, 16. <https://doi.org/10.1186/s40694-022-00146-7>
- Chai, P., Lebedenko, C.G., Flynn, R.A., 2023. RNA Crossing Membranes: Systems and Mechanisms Contextualizing Extracellular RNA and Cell Surface GlycoRNAs. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 24, 85–107. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-101722-101224>
- Chan, P.P., Lin, B.Y., Mak, A.J., Lowe, T.M., 2021. tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 49, 9077–9096. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab688>
- Chang, R., 2002. Bioactive Polysaccharides from Traditional Chinese Medicine Herbs as Anticancer Adjuvants. *J. Altern. Complement. Med.* 8, 559–565. <https://doi.org/10.1089/107555302320825066>
- Chang, Y.C., Stins, M.F., McCaffery, M.J., Miller, G.F., Pare, D.R., Dam, T., Paul-Satyaseela, M., Kim, K.S., Kwon-Chung, K.J., 2004. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* 72, 4985–4995. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.4985-4995.2004>
- Chargaff, E., West, R., 1946. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* 166, 189–197.
- Charlier, C., Nielsen, K., Daou, S., Brigitte, M., Chretien, F., Dromer, F., 2009. Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77, 120–127. <https://doi.org/10.1128/iai.01065-08>
- Chekanov, K., Feoktistov, A., Lobakova, E., 2017. Spatial organization of the three-component lichen *Peltigera aphthosa* in functional terms. *Physiol. Plant.* 160, 328–338. <https://doi.org/10.1111/ppl.12552>
- Chen, M., Xu, R., Ji, H., Greening, D.W., Rai, A., Izumikawa, K., Ishikawa, H., Takahashi, N., Simpson, R.J., 2016. Transcriptome and long noncoding RNA sequencing of three extracellular vesicle subtypes released from the human colon cancer LIM1863 cell line. *Sci. Rep.* 6, 38397. <https://doi.org/10.1038/srep38397>
- Chen, T., Wang, F., Wei, J., Feng, L., 2022. Extracellular vesicles derived from different sources play various roles in diabetic retinopathy. *Front. Endocrinol.* 13, 1064415. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1064415>
- Chen, X., Rechavi, O., 2022. Plant and animal small RNA communications between cells and organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 185–203. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00425-y>
- Chen, Y., Toffaletti, D.L., Tenor, J.L., Litvintseva, A.P., Fang, C., Mitchell, T.G., McDonald, T.R., Nielsen, K., Boulware, D.R., Bicanic, T., Perfect, J.R., 2014. The *Cryptococcus neoformans* Transcriptome at the Site of Human Meningitis. *mBio* 5, 10.1128/mbio.01087-13. <https://doi.org/10.1128/mbio.01087-13>

- Chi, Zhenming, Chi, Zhe, Zhang, T., Liu, G., Li, J., Wang, X., 2009. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnol. Adv.* 27, 236–255. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.002>
- Chiou, N.-T., Kageyama, R., Ansel, K.M., 2018. Selective Export into Extracellular Vesicles and Function of tRNA Fragments during T Cell Activation. *Cell Rep.* 25, 3356–3370.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.073>
- Chivet, M., Javellet, C., Laulagnier, K., Blot, B., Hemming, F.J., Sadoul, R., 2014. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J. Extracell. Vesicles* 3, 24722. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24722>
- Chow, F.W.-N., Koutsovoulos, G., Ovando-Vázquez, C., Neophytou, K., Bermúdez-Barrientos, J.R., Laetsch, D.R., Robertson, E., Kumar, S., Claycomb, J.M., Blaxter, M., Abreu-Goodger, C., Buck, A.H., 2019. Secretion of an Argonaute protein by a parasitic nematode and the evolution of its siRNA guides. *Nucleic Acids Res.* 47, 3594–3606. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz142>
- Chun, C.D., Madhani, H.D., 2010. Applying genetics and molecular biology to the study of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Methods Enzymol.* 470, 797–831. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)70033-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)70033-1)
- Cleare, L.G., Zamith, D., Heyman, H.M., Couvillion, S.P., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Nosanchuk, J.D., 2020. Media matters! Alterations in the loading and release of *Histoplasma capsulatum* extracellular vesicles in response to different nutritional milieus. *Cell. Microbiol.* 22, e13217. <https://doi.org/10.1111/cmi.13217>
- Combarrous, Y., Nguyen, T.M.D., 2020. Cell Communications among Microorganisms, Plants, and Animals: Origin, Evolution, and Interplays. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8052. <https://doi.org/10.3390/ijms21218052>
- Conigliaro, A., Costa, V., Lo Dico, A., Saieva, L., Buccheri, S., Dieli, F., Manno, M., Raccosta, S., Mancone, C., Tripodi, M., De Leo, G., Alessandro, R., 2015. CD90+ liver cancer cells modulate endothelial cell phenotype through the release of exosomes containing H19 lncRNA. *Mol. Cancer* 14, 155. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0426-x>
- Costa, J.H., Bazioli, J.M., Barbosa, L.D., Dos Santos Júnior, P.L.T., Reis, F.C.G., Klimeck, T., Crnkovic, C.M., Berlinck, R.G.S., Sussulini, A., Rodrigues, M.L., Fill, T.P., 2021. Phytotoxic Tryptoquialanines Produced In Vivo by *Penicillium digitatum* Are Exported in Extracellular Vesicles. *mBio* 12, e03393-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03393-20>
- Cox, G.M., McDade, H.C., Chen, S.C.A., Tucker, S.C., Gottfredsson, M., Wright, L.C., Sorrell, T.C., Leidich, S.D., Casadevall, A., Ghannoum, M.A., Perfect, J.R., 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 39, 166–175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02236.x>
- Crawshaw, L., Buchanan, T., Shirose, L., Palahnuk, A., Cai, H.Y., Bennett, A.M., Jardine, C.M., Davy, C.M., 2022. Widespread occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Ontario, Canada, and predicted habitat suitability for the emerging *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Ecol. Evol.* 12, e8798. <https://doi.org/10.1002/ece3.8798>
- Critchlow, S.E., Jackson, S.P., 1998. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 23, 394–398. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01284-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01284-5)
- Dallastella, M., de Oliveira, W.K., Rodrigues, M.L., Goldenberg, S., Alves, L.R., 2023. The characterization of RNA-binding proteins and RNA metabolism-related proteins in fungal

- extracellular vesicles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1247329. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1247329>
- Dambuza, I.M., Drake, T., Chapuis, A., Zhou, X., Correia, J., Taylor-Smith, L., LeGrave, N., Rasmussen, T., Fisher, M.C., Bicanic, T., Harrison, T.S., Jaspars, M., May, R.C., Brown, G.D., Yucel, R., MacCallum, D.M., Ballou, E.R., 2018. The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. *PLOS Pathog.* 14, e1006978. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006978>
- Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M.O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S.A., Davies, R.M., Li, H., 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* 10, giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Dang, T.T.V., Maufrais, C., Colin, J., Moyrand, F., Mouyna, I., Coppee, J.-Y., Onyishi, C.U., Lipecka, J., Guerrero, I.C., May, R.C., Janbon, G., 2023. Tur1 regulates alternative TSS usage in *Cryptococcus*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.18.549460>
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., Piškur, J., 2014. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res.* 14, 826–832. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12161>
- Dawson, C.S., Garcia-Ceron, D., Rajapaksha, H., Faou, P., Bleackley, M.R., Anderson, M.A., 2020. Protein markers for *Candida albicans* EVs include claudin-like Sur7 family proteins. *J. Extracell. Vesicles* 9, 1750810. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1750810>
- de Jong, O.G., Murphy, D.E., Mäger, I., Willms, E., Garcia-Guerra, A., Gitz-Francois, J.J., Lefferts, J., Gupta, D., Steenbeek, S.C., van Rheenen, J., El Andaloussi, S., Schiffelers, R.M., Wood, M.J.A., Vader, P., 2020. A CRISPR-Cas9-based reporter system for single-cell detection of extracellular vesicle-mediated functional transfer of RNA. *Nat. Commun.* 11, 1113. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14977-8>
- de Paula, R.G., Antoniêto, A.C.C., Nogueira, K.M.V., Ribeiro, L.F.C., Rocha, M.C., Malavazi, I., Almeida, F., Silva, R.N., 2019. Extracellular vesicles carry cellulases in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Biofuels* 12, 146. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1487-7>
- Denham, S.T., Brammer, B., Chung, K.Y., Wambaugh, M.A., Bednarek, J.M., Guo, L., Moreau, C.T., Brown, J.C.S., 2022. A dissemination-prone morphotype enhances extrapulmonary organ entry by *Cryptococcus neoformans*. *Cell Host Microbe* 30, 1382-1400.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.08.017>
- Desjardins, C.A., Giamberardino, C., Sykes, S.M., Yu, C.-H., Tenor, J.L., Chen, Y., Yang, T., Jones, A.M., Sun, S., Haverkamp, M.R., Heitman, J., Litvintseva, A.P., Perfect, J.R., Cuomo, C.A., 2017. Population genomics and the evolution of virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res.* 27, 1207–1219. <https://doi.org/10.1101/gr.218727.116>
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E.S.G., Staver, C.P., 2018. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Front. Plant Sci.* 9, 1468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- Dorfman, B.Z., 1969. The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. *Genetics* 61, 377–389. <https://doi.org/10.1093/genetics/61.2.377>
- Drees, K.P., Lorch, J.M., Puechmaille, S.J., Parise, K.L., Wibbelt, G., Hoyt, J.R., Sun, K., Jargalsaikhan, A., Dalannast, M., Palmer, J.M., Lindner, D.L., Marm Kilpatrick, A., Pearson, T., Keim, P.S., Blehert, D.S., Foster, J.T., 2017. Phylogenetics of a Fungal Invasion: Origins and Widespread Dispersal of White-Nose Syndrome. *mBio* 8, e01941-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01941-17>

- Driedonks, T.A.P., Mol, S., de Bruin, S., Peters, A.-L., Zhang, X., Lindenbergh, M.F.S., Beuger, B.M., van Stalborch, A.-M.D., Spaan, T., de Jong, E.C., van der Vries, E., Margadant, C., van Bruggen, R., Vlaar, A.P.J., Groot Kormelink, T., Nolte-’T Hoen, E.N.M., 2020. Y-RNA subtype ratios in plasma extracellular vesicles are cell type- specific and are candidate biomarkers for inflammatory diseases. *J. Extracell. Vesicles* 9, 1764213. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1764213>
- D’Souza, C.A., Kronstad, J.W., Taylor, G., Warren, R., Yuen, M., Hu, G., Jung, W.H., Sham, A., Kidd, S.E., Tangen, K., Lee, N., Zeilmaker, T., Sawkins, J., McVicker, G., Shah, S., Gnerre, S., Griggs, A., Zeng, Q., Bartlett, K., Li, W., Wang, X., Heitman, J., Stajich, J.E., Fraser, J.A., Meyer, W., Carter, D., Schein, J., Krzywinski, M., Kwon-Chung, K.J., Varma, A., Wang, J., Brunham, R., Fyfe, M., Ouellette, B.F.F., Siddiqui, A., Marra, M., Jones, S., Holt, R., Birren, B.W., Galagan, J.E., Cuomo, C.A., 2011. Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *mBio* 2, e00342-00310. <https://doi.org/10.1128/mBio.00342-10>
- Du, H., Bing, J., Hu, T., Ennis, C.L., Nobile, C.J., Huang, G., 2020. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog.* 16, e1008921. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921>
- Dumesic, P.A., Natarajan, P., Chen, C., Drinnenberg, I.A., Schiller, B.J., Thompson, J., Moresco, J.J., Yates, J.R., Bartel, D.P., Madhani, H.D., 2013. Stalled Spliceosomes Are a Signal for RNAi-Mediated Genome Defense. *Cell* 152, 957–968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.046>
- Duran, J.M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W.F., Malhotra, V., 2010. Unconventional secretion of *Acb1* is mediated by autophagosomes. *J. Cell Biol.* 188, 527–536. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911154>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edman, J.C., Kwon-Chung, K.J., 1990. Isolation of the *URA5* gene from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and its use as a selective marker for transformation. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4538–4544. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.9.4538-4544.1990>
- Escobar-Niño, A., Harzen, A., Stolze, S.C., Nakagami, H., Fernández-Acero, F.J., 2023. The Adaptation of *Botrytis cinerea* Extracellular Vesicles Proteome to Surrounding Conditions: Revealing New Tools for Its Infection Process. *J. Fungi* 9, 872. <https://doi.org/10.3390/jof9090872>
- Falaleeva, M., Welden, J.R., Duncan, M.J., Stamm, S., 2017. C/D-box snoRNAs form methylating and non-methylating ribonucleoprotein complexes: Old dogs show new tricks. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 39. <https://doi.org/10.1002/bies.201600264>
- Fan, W., Kraus, P.R., Boily, M.-J., Heitman, J., 2005. *Cryptococcus neoformans* Gene Expression during Murine Macrophage Infection. *Eukaryot. Cell* 4, 1420–1433. <https://doi.org/10.1128/EC.4.8.1420-1433.2005>
- Fan, Y., Lin, X., 2018. Multiple Applications of a Transient CRISPR-Cas9 Coupled with Electroporation (TRACE) System in the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Genetics* 208, 1357–1372. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300656>
- Farrer, R.A., Chang, M., Davis, M.J., van Dorp, L., Yang, D.-H., Shea, T., Sewell, T.R., Meyer, W., Balloux, F., Edwards, H.M., Chanda, D., Kwenda, G., Vanhove, M., Chang, Y.C., Cuomo, C.A., Fisher, M.C., Kwon-Chung, K.J., 2019. A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambezian Miombo Woodlands. *mBio* 10, e02306-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02306-19>

- Feldmesser, M., Kress, Y., Novikoff, P., Casadevall, A., 2000. *Cryptococcus neoformans* Is a Facultative Intracellular Pathogen in Murine Pulmonary Infection. *Infect. Immun.* 68, 4225–4237. <https://doi.org/10.1128/iai.68.7.4225-4237.2000>
- Feretzi, M., Heitman, J., 2013. Genetic circuits that govern bisexual and unisexual reproduction in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Genet.* 9, e1003688. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003688>
- Ferguson, B.A., Dreisbach, T.A., Parks, C.G., Filip, G.M., Schmitt, C.L., 2003. Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon. *Can. J. For. Res.* 33, 612–623. <https://doi.org/10.1139/x03-065>
- Fernandez-Calero, T., Garcia-Silva, R., Pena, A., Robello, C., Persson, H., Rovira, C., Naya, H., Cayota, A., 2015. Profiling of small RNA cargo of extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* reveals a specific extracellular signature. *Mol. Biochem. Parasitol.* 199, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.03.003>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fischer, S., Deindl, E., 2021. Characterization of RNA in Extracellular Vesicles. *Appl. Sci.* 11, 7520. <https://doi.org/10.3390/app11167520>
- Fisher, M.C., Denning, D.W., 2023. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. *Nat. Rev. Microbiol.* 21, 211–212. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00861-x>
- Ford, T., Graham, J., Rickwood, D., 1994. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal. Biochem.* 220, 360–366. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1350>
- Freitas, G.J.C., Gouveia-Eufrasio, L., Emidio, E.C.P., Carneiro, H.C.S., de Matos Baltazar, L., Costa, M.C., Frases, S., de Sousa Araújo, G.R., Paixão, T.A., Sossai, B.G., Caza, M., Kronstad, J.W., Peres, N.T.A., Santos, D.A., 2022. The Dynamics of *Cryptococcus neoformans* Cell and Transcriptional Remodeling during Infection. *Cells* 11, 3896. <https://doi.org/10.3390/cells11233896>
- Fries, B.C., Cox, G.M., 2010. Cryptococcosis in AIDS, in: *Cryptococcus*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 515–525. <https://doi.org/10.1128/9781555816858.ch38>
- Gámbaro, F., Li Calzi, M., Fagúndez, P., Costa, B., Greif, G., Mallick, E., Lyons, S., Ivanov, P., Witwer, K., Cayota, A., Tosar, J.P., 2020. Stable tRNA halves can be sorted into extracellular vesicles and delivered to recipient cells in a concentration-dependent manner. *RNA Biol.* 17, 1168–1182. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1708548>
- García-Hermoso, D., Janbon, G., Dromer, F., 1999. Epidemiological Evidence for Dormant *Cryptococcus neoformans* Infection. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3204–3209.
- García-Martin, R., Wang, G., Brandão, B.B., Zanotto, T.M., Shah, S., Kumar Patel, S., Schilling, B., Kahn, C.R., 2022. MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature* 601, 446–451. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04234-3>
- Gehrmann, U., Qazi, K.R., Johansson, C., Hulténby, K., Karlsson, M., Lundeberg, L., Gabrielsson, S., Scheynius, A., 2011. Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and host exosomes induce cytokine responses—novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. *PLoS One* 6, e21480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021480>

- Ghildiyal, M., Zamore, P.D., 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10, 94–108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>
- Gil-Bona, A., Llama-Palacios, A., Parra, C.M., Vivanco, F., Nombela, C., Monteoliva, L., Gil, C., 2015. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J. Proteome Res.* 14, 142–153. <https://doi.org/10.1021/pr5007944>
- Ginini, L., Billan, S., Fridman, E., Gil, Z., 2022. Insight into Extracellular Vesicle-Cell Communication: From Cell Recognition to Intracellular Fate. *Cells* 11, 1375. <https://doi.org/10.3390/cells11091375>
- Gíslason, M.H., Nielsen, H., Almagro Armenteros, J.J., Johansen, A.R., 2021. Prediction of GPI-anchored proteins with pointer neural networks. *Curr. Res. Biotechnol.* 3, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.01.001>
- Goebels, C., Thonn, A., Gonzalez-Hilarion, S., Rolland, O., Moyrand, F., Beilharz, T.H., Janbon, G., 2013. Introns regulate gene expression in *Cryptococcus neoformans* in a Pab2p dependent pathway. *PLoS Genet.* 9, e1003686. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003686>
- Goins, C.L., Gerik, K.J., Lodge, J.K., 2006. Improvements to gene deletion in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: absence of Ku proteins increases homologous recombination, and co-transformation of independent DNA molecules allows rapid complementation of deletion phenotypes. *Fungal Genet. Biol.* 43, 531–544. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.02.007>
- Goldman, D.L., Khine, H., Abadi, J., Lindenberg, D.J., Pirofski, L., Niang, R., Casadevall, A., 2001. Serologic Evidence for *Cryptococcus neoformans* Infection in Early Childhood. *Pediatrics* 107, e66. <https://doi.org/10.1542/peds.107.5.e66>
- Gonzalez-Hilarion, S., Paulet, D., Lee, K.-T., Hon, C.-C., Lechat, P., Mogensen, E., Moyrand, F., Proux, C., Barboux, R., Bussotti, G., Hwang, J., Coppée, J.-Y., Bahn, Y.-S., Janbon, G., 2016. Intron retention-dependent gene regulation in *Cryptococcus neoformans*. *Sci. Rep.* 6, 32252. <https://doi.org/10.1038/srep32252>
- Gröhs Ferrareze, P.A., Maufrais, C., Silva Araujo Streit, R., Priest, S.J., Cuomo, C.A., Heitman, J., Staats, C.C., Janbon, G., 2021. Application of an optimized annotation pipeline to the *Cryptococcus deuterogattii* genome reveals dynamic primary metabolic gene clusters and genomic impact of RNAi loss. *G3 GenesGenomesGenetics* 11, jkaa070. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaa070>
- Gruner, H.N., McManus, M.T., 2021. Examining the evidence for extracellular RNA function in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 22, 448–458. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00346-8>
- Guidelines for Diagnosing, Preventing and Managing Cryptococcal Disease Among Adults, Adolescents and Children Living with HIV, 2022. , WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. World Health Organization, Geneva.
- Gupta, S., Paul, K., Kaur, S., 2020. Diverse species in the genus *Cryptococcus*: Pathogens and their non-pathogenic ancestors. *IUBMB Life* 72, 2303–2312. <https://doi.org/10.1002/iub.2377>
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., Falk, R., Parnmen, S., Lumbsch, H.T., Boekhout, T., 2015. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 78, 16–48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>
- Hai, T.P., Tuan, T.L., Anh, D.V., Mai, T.N., Huong, L.N.P., Thwaites, G.E., Johnson, E., Chau, N.V.V., Baker, S., Ashton, P.M., Day, J.N., 2020. The virulence of the *Cryptococcus neoformans* VN1a-

- 5 lineage is highly plastic and associated with isolate background.
<https://doi.org/10.1101/2020.02.24.962134>
- Hallgren, J., Tsirogos, K.D., Pedersen, M.D., Armenteros, J.J.A., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., Winther, O., 2022. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
- Hawksworth, D.L., Lücking, R., 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol. Spectr.* 5, 5.4.10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
- He, B., Cai, Q., Qiao, L., Huang, C.-Y., Wang, S., Miao, W., Ha, T., Wang, Y., Jin, H., 2021. RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nat. Plants* 7, 342–352. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00863-8>
- He, B., Wang, H., Liu, G., Chen, A., Calvo, A., Cai, Q., Jin, H., 2023. Fungal small RNAs ride in extracellular vesicles to enter plant cells through clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Commun.* 14, 4383. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40093-4>
- He, L., Ping, F., Fan, Z., Zhang, C., Deng, M., Cheng, B., Xia, J., 2020. Salivary exosomal miR-24-3p serves as a potential detective biomarker for oral squamous cell carcinoma screening. *Biomed. Pharmacother.* 121, 109553. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109553>
- Heeney, M., Frank, M.H., 2023. The mRNA mobileome: challenges and opportunities for deciphering signals from the noise. *Plant Cell* 35, 1817–1833. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad063>
- Hill, E.H., Solomon, P.S., 2020. Extracellular vesicles from the apoplastic fungal wheat pathogen *Zygomycetia tritici*. *Fungal Biol. Biotechnol.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40694-020-00103-2>
- Holoch, D., Moazed, D., 2015. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 16, 71–84. <https://doi.org/10.1038/nrg3863>
- Honorato, L., de Araujo, J.F.D., Ellis, C.C., Piffer, A.C., Pereira, Y., Frases, S., de Sousa Araújo, G.R., Pontes, B., Mendes, M.T., Pereira, M.D., Guimarães, A.J., da Silva, N.M., Vargas, G., Joffe, L., Del Poeta, M., Nosanchuk, J.D., Zamith-Miranda, D., Dos Reis, F.C.G., de Oliveira, H.C., Rodrigues, M.L., de Toledo Martins, S., Alves, L.R., Almeida, I.C., Nimrichter, L., 2022. Extracellular Vesicles Regulate Biofilm Formation and Yeast-to-Hypha Differentiation in *Candida albicans*. *mBio* 13, e0030122. <https://doi.org/10.1128/mbio.00301-22>
- Horinouchi, T., Furusawa, C., 2020. Understanding metabolic adaptation by using bacterial laboratory evolution and trans-omics analysis. *Biophys. Rev.* 12, 677–682. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00695-4>
- Hou, Y., Zhai, Y., Feng, L., Karimi, H.Z., Rutter, B.D., Zeng, L., Choi, D.S., Zhang, B., Gu, W., Chen, X., Ye, W., Innes, R.W., Zhai, J., Ma, W., 2019. A *Phytophthora* Effector Suppresses Trans-Kingdom RNAi to Promote Disease Susceptibility. *Cell Host Microbe* 25, 153-165.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.007>
- Houšť, J., Spížek, J., Havlíček, V., 2020. Antifungal Drugs. *Metabolites* 10, 106. <https://doi.org/10.3390/metabo10030106>
- Hu, G., Cheng, P.-Y., Sham, A., Perfect, J.R., Kronstad, J.W., 2008. Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. *Mol. Microbiol.* 69, 1456–1475. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06374.x>
- Hu, Y., Li, X., Zhang, Q., Gu, Z., Luo, Y., Guo, J., Wang, X., Jing, Y., Chen, X., Su, J., 2021. Exosome-guided bone targeted delivery of Antagomir-188 as an anabolic therapy for bone loss. *Bioact. Mater.* 6, 2905–2913. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.02.014>

- Hua, J., Meyer, J.D., Lodge, J.K., 2000. Development of positive selectable markers for the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 125–128. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.1.125-128.2000>
- Huang, M.Y., Joshi, M.B., Boucher, M.J., Lee, S., Loza, L.C., Gaylord, E.A., Doering, T.L., Madhani, H.D., 2022. Short homology-directed repair using optimized Cas9 in the pathogen *Cryptococcus neoformans* enables rapid gene deletion and tagging. *Genetics* 220, iyab180. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab180>
- Huang, Y., Wang, S., Cai, Q., Jin, H., 2021. Effective methods for isolation and purification of extracellular vesicles from plants. *J. Integr. Plant Biol.* 63, 2020–2030. <https://doi.org/10.1111/jipb.13181>
- Hulstaert, E., Morlion, A., Avila Cobos, F., Verniers, K., Nuytens, J., Vanden Eynde, E., Yigit, N., Anckaert, J., Geerts, A., Hindryckx, P., Jacques, P., Brusselle, G., Bracke, K.R., Maes, T., Malfait, T., Derveaux, T., Ninclaus, V., Van Cauwenbergh, C., Roelens, K., Roets, E., Hemelsoet, D., Tilleman, K., Brochez, L., Kuersten, S., Simon, L.M., Karg, S., Kautzky-Willers, A., Leutner, M., Nöhammer, C., Slaby, O., Prins, R.W., Koster, J., Lefever, S., Schroth, G.P., Vandesompele, J., Mestdagh, P., 2020. Charting Extracellular Transcriptomes in The Human Biofluid RNA Atlas. *Cell Rep.* 33, 108552. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108552>
- Ianiri, G., Fang, Y.F., Dahlmann, T.A., Clancey, S.A., Janbon, G., Kück, U., Heitman, J., 2020. Mating-Type-Specific Ribosomal Proteins Control Aspects of Sexual Reproduction in *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 214, 635–649. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302740>
- Ikeda, M.A.K., de Almeida, J.R.F., Jannuzzi, G.P., Cronemberger-Andrade, A., Torrecilhas, A.C.T., Moretti, N.S., da Cunha, J.P.C., de Almeida, S.R., Ferreira, K.S., 2018. Extracellular Vesicles From *Sporothrix brasiliensis* Are an Important Virulence Factor That Induce an Increase in Fungal Burden in Experimental Sporotrichosis. *Front. Microbiol.* 9, 2286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02286>
- Ikeda, R., Sugita, T., Jacobson, E.S., Shinoda, T., 2003. Effects of Melanin upon Susceptibility of *Cryptococcus* to Antifungals. *Microbiol. Immunol.* 47, 271–277. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03395.x>
- Ionescu, M., Zaini, P.A., Baccari, C., Tran, S., da Silva, A.M., Lindow, S.E., 2014. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E3910–3918. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414944111>
- Jamla, M., Khare, T., Joshi, S., Patil, S., Penna, S., Kumar, V., 2021. Omics approaches for understanding heavy metal responses and tolerance in plants. *Curr. Plant Biol.* 27, 100213. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100213>
- Janas, Tadeusz, Janas, Teresa, Yarus, M., 2006. Specific RNA binding to ordered phospholipid bilayers. *Nucleic Acids Res.* 34, 2128–2136. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl220>
- Janbon, G., 2018. Introns in *Cryptococcus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, e170519. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170519>
- Janbon, G., 2004. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Res.* 4, 765–771. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.04.003>
- Janbon, G., Himmelreich, U., Moyrand, F., Improvisi, L., Dromer, F., 2001. Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Mol. Microbiol.* 42, 453–467. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02651.x>

- Janbon, G., Maeng, S., Yang, D.-H., Ko, Y.-J., Jung, K.-W., Moyrand, F., Floyd, A., Heitman, J., Bahn, Y.-S., 2010. Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 1070–1080. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.10.005>
- Janbon, G., Ormerod, K.L., Paulet, D., Iii, E.J.B., Yadav, V., Chatterjee, G., Mullanpudi, N., Hon, C.-C., Billmyre, R.B., Brunel, F., Bahn, Y.-S., Chen, W., Chen, Y., Chow, E.W.L., Coppée, J.-Y., Floyd-Averette, A., Gaillardin, C., Gerik, K.J., Goldberg, J., Gonzalez-Hilarion, S., Gujja, S., Hamlin, J.L., Hsueh, Y.-P., Ianiri, G., Jones, S., Kodira, C.D., Kozubowski, L., Lam, W., Marra, M., Mesner, L.D., Mieczkowski, P.A., Moyrand, F., Nielsen, K., Proux, C., Rossignol, T., Schein, J.E., Sun, S., Wollschlaeger, C., Wood, I.A., Zeng, Q., Neuvéglise, C., Newlon, C.S., Perfect, J.R., Lodge, J.K., Idnurm, A., Stajich, J.E., Kronstad, J.W., Sanyal, K., Heitman, J., Fraser, J.A., Cuomo, C.A., Dietrich, F.S., 2014. Analysis of the Genome and Transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* Reveals Complex RNA Expression and Microevolution Leading to Virulence Attenuation. *PLOS Genet.* 10, e1004261. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004261>
- Janbon, G., Quintin, J., Lanternier, F., d'Enfert, C., 2019. Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. *Microbes Infect.* 21, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.06.011>
- Ji, H., Chen, M., Greening, D.W., He, W., Rai, A., Zhang, W., Simpson, R.J., 2014. Deep Sequencing of RNA from Three Different Extracellular Vesicle (EV) Subtypes Released from the Human LIM1863 Colon Cancer Cell Line Uncovers Distinct Mirna-Enrichment Signatures. *PLOS ONE* 9, e110314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110314>
- Jöchl, C., Rederstorff, M., Hertel, J., Stadler, P.F., Hofacker, I.L., Schrettl, M., Haas, H., Hüttenhofer, A., 2008. Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* 36, 2677–2689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn123>
- Johansson, H.J., Vallhov, H., Holm, T., Gehrman, U., Andersson, A., Johansson, C., Blom, H., Carroni, M., Lehtiö, J., Scheynius, A., 2018. Extracellular nanovesicles released from the commensal yeast *Malassezia sympodialis* are enriched in allergens and interact with cells in human skin. *Sci. Rep.* 8, 9182. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27451-9>
- Johnson, N.R., Larrondo, L.F., Álvarez, J.M., Vidal, E.A., 2022. Comprehensive re-analysis of hairpin small RNAs in fungi reveals loci with conserved links. *eLife* 11, e83691. <https://doi.org/10.7554/eLife.83691>
- Kalem, M.C., Panepinto, J.C., 2022. Long Non-Coding RNAs in *Cryptococcus neoformans*: Insights Into Fungal Pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12.
- Kalvari, I., Nawrocki, E.P., Argasinska, J., Quinones-Olvera, N., Finn, R.D., Bateman, A., Petrov, A.I., 2018. Non-Coding RNA Analysis Using the Rfam Database. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 62, e51. <https://doi.org/10.1002/cpbi.51>
- Kanada, M., Bachmann, M.H., Hardy, J.W., Frimannson, D.O., Bronsart, L., Wang, A., Sylvester, M.D., Schmidt, T.L., Kaspar, R.L., Butte, M.J., Matin, A.C., Contag, C.H., 2015. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1433-1442. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418401112>
- Karkowska-Kuleta, J., Kulig, K., Karnas, E., Zuba-Surma, E., Woznicka, O., Pyza, E., Kuleta, P., Osyczka, A., Rapala-Kozik, M., Kozik, A., 2020. Characteristics of Extracellular Vesicles Released by the Pathogenic Yeast-Like Fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. *Cells* 9, 1722. <https://doi.org/10.3390/cells9071722>

- Kazmierczyk, M., Wojnicka, M., Biała, E., Żydowicz-Machtel, P., Imiołczyk, B., Ostrowski, T., Kurzyńska-Kokorniak, A., Wrzesinski, J., 2022. Characteristics of Transfer RNA-Derived Fragments Expressed during Human Renal Cell Development: The Role of Dicer in tRF Biogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 3644. <https://doi.org/10.3390/ijms23073644>
- Kerviel, A., Zhang, M., Altan-Bonnet, N., 2021. A New Infectious Unit: Extracellular Vesicles Carrying Virus Populations. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 37, 171–197. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-040621-032416>
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L., 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14, 1–13. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
- Kim, D., Song, M., Do, E., Choi, Y., Kronstad, J.W., Jung, W.H., 2021. Oxidative Stress Causes Vacuolar Fragmentation in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J. Fungi* 7, 523. <https://doi.org/10.3390/jof7070523>
- Kmetzsch, L., Joffe, L.S., Staats, C.C., de Oliveira, D.L., Fonseca, F.L., Cordero, R.J.B., Casadevall, A., Nimrichter, L., Schrank, A., Vainstein, M.H., Rodrigues, M.L., 2011. Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. *Mol. Microbiol.* 81, 206–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07686.x>
- Köhler, J.R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A., Perfect, J.R., 2017. Fungi that Infect Humans. *Microbiol. Spectr.* 5, 5.3.08. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016>
- Kolodny, G.M., 1972. Cell to cell transfer of RNA into transformed cells. *J. Cell. Physiol.* 79, 147–150. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040790117>
- Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I.V., van Eijndhoven, M.A.J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J.M., Ylstra, B., de Menezes, R.X., Würdinger, T., Meijer, G.A., Pegtel, D.M., 2014. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 8, 1649–1658. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.027>
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., Théry, C., 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E968–E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Kozel, T.R., Gotschlich, E.C., 1982. The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. *J. Immunol.* 129, 1675–1680. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.129.4.1675>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S., 2019. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 47, D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Kufel, J., Grzechnik, P., 2019. Small Nucleolar RNAs Tell a Different Tale. *Trends Genet.* 35, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.11.005>
- Kumar, P., Anaya, J., Mudunuri, S.B., Dutta, A., 2014. Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Biol.* 12, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0078-0>
- Kusch, S., Singh, M., Thieron, H., Spanu, P.D., Panstruga, R., 2023. Site-specific analysis reveals candidate cross-kingdom small RNAs, tRNA and rRNA fragments, and signs of fungal RNA phasing in the barley–powdery mildew interaction. *Mol. Plant Pathol.* 24, 570–587. <https://doi.org/10.1111/mpp.13324>

- Kwon, S., Rupp, O., Brachmann, A., Blum, C.F., Kraege, A., Goesmann, A., Feldbrügge, M., 2021. mRNA Inventory of Extracellular Vesicles from *Ustilago maydis*. *J. Fungi Basel Switz.* 7, 562. <https://doi.org/10.3390/jof7070562>
- Kwon-Chung, K.J., 1975. A new genus, *filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 67, 1197–1200.
- Kwon-Chung, K.J., Polacheck, I., Popkin, T.J., 1982. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J. Bacteriol.* 150, 1414–1421. <https://doi.org/10.1128/jb.150.3.1414-1421.1982>
- Kwon-Chung, K.J., Varma, A., Edman, J.C., Bennett, J.E., 1992. Selection of *ura5* and *ura3* mutants from the two varieties of *Cryptococcus neoformans* on 5-fluoroorotic acid medium. *J. Med. Vet. Mycol. Bi-Mon. Publ. Int. Soc. Hum. Anim. Mycol.* 30, 61–69.
- Lambertz, U., Oviedo Ovando, M.E., Vasconcelos, E.J.R., Unrau, P.J., Myler, P.J., Reiner, N.E., 2015. Small RNAs derived from tRNAs and rRNAs are highly enriched in exosomes from both old and new world *Leishmania* providing evidence for conserved exosomal RNA Packaging. *BMC Genomics* 16, 151. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1260-7>
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lavrin, T., Konte, T., Kostanjšek, R., Sitar, S., Sepčič, K., Prpar Mihevc, S., Žagar, E., Župunski, V., Lenassi, M., Rogelj, B., Gunde Cimerman, N., 2020. The Neurotropic Black Yeast *Exophiala dermatitidis* Induces Neurocytotoxicity in Neuroblastoma Cells and Progressive Cell Death. *Cells* 9, 963. <https://doi.org/10.3390/cells9040963>
- Lax, C., Tahiri, G., Patiño-Medina, J.A., Cánovas-Márquez, J.T., Pérez-Ruiz, J.A., Osorio-Concepción, M., Navarro, E., Calo, S., 2020. The Evolutionary Significance of RNAi in the Fungal Kingdom. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9348. <https://doi.org/10.3390/ijms21249348>
- Leidal, A.M., Huang, H.H., Marsh, T., Solvik, T., Zhang, D., Ye, J., Kai, F., Goldsmith, J., Liu, J.Y., Huang, Y.-H., Monkkonen, T., Vlahakis, A., Huang, E.J., Goodarzi, H., Yu, L., Wiita, A.P., Debnath, J., 2020. The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles. *Nat. Cell Biol.* 22, 187–199. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0450-y>
- Leone, F., Bellani, L., Muccifora, S., Giorgetti, L., Bongioanni, P., Simili, M., Maserti, B., Del Carratore, R., 2018. Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. *J. Cell. Physiol.* 233, 2759–2767. <https://doi.org/10.1002/jcp.25885>
- Leung, L.L., Riaz, M.K., Qu, X., Chan, J., Meehan, K., 2021. Profiling of extracellular vesicles in oral cancer, from transcriptomics to proteomics. *Semin. Cancer Biol., Extracellular vesicles in cancer, from signaling mechanisms to therapeutic potentials* 74, 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2021.01.002>
- Li, S.S., Ogbomo, H., Mansour, M.K., Xiang, R.F., Szabo, L., Munro, F., Mukherjee, P., Mariuzza, R.A., Amrein, M., Vyas, J.M., Robbins, S.M., Mody, C.H., 2018. Identification of the fungal ligand triggering cytotoxic PRR-mediated NK cell killing of *Cryptococcus* and *Candida*. *Nat. Commun.* 9, 751. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03014-4>
- Li, Z., Song, Y., He, T., Wen, R., Li, Y., Chen, T., Huang, S., Wang, Y., Tang, Y., Shen, F., Tian, H.-L., Yang, G.-Y., Zhang, Z., 2021. M2 microglial small extracellular vesicles reduce glial scar formation via the miR-124/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice. *Theranostics* 11, 1232–1248. <https://doi.org/10.7150/thno.48761>

- Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2019. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res.* 47, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>
- Lin, J., Fan, Y., Lin, X., 2020. Transformation of *Cryptococcus neoformans* by electroporation using a transient CRISPR-Cas9 expression (TRACE) system. *Fungal Genet. Biol.* 138, 103364. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103364>
- Lin, X., 2009. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infect. Genet. Evol.* 9, 401–416. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.013>
- Litvintseva, A.P., Marra, R.E., Nielsen, K., Heitman, J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G., 2003. Evidence of Sexual Recombination among *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates in Sub-Saharan Africa. *Eukaryot. Cell* 2, 1162–1168. <https://doi.org/10.1128/ec.2.6.1162-1168.2003>
- Liu, Bruni, G.O., Taylor, C.M., Zhang, Z., Wang, P., 2018a. Comparative genome-wide analysis of extracellular small RNAs from the mucormycosis pathogen *Rhizopus delemar*. *Sci. Rep.* 8, 5243. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23611-z>
- Liu, H., Cottrell, T.R., Pierini, L.M., Goldman, W.E., Doering, T.L., 2002. RNA Interference in the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 160, 463–470. <https://doi.org/10.1093/genetics/160.2.463>
- Liu, J., Soler, N., Gorlas, A., Cvirkaite-Krupovic, V., Krupovic, M., Forterre, P., 2021. Extracellular membrane vesicles and nanotubes in Archaea. *microLife* 2, uqab007. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqab007>
- Liu, L., Chen, X., 2018. Intercellular and systemic trafficking of RNAs in plants. *Nat. Plants* 4, 869–878. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0288-5>
- Liu, M., Zhang, Z., Ding, C., Wang, T., Kelly, B., Wang, P., 2020. Transcriptomic Analysis of Extracellular RNA Governed by the Endocytic Adaptor Protein Cin1 of *Cryptococcus deoneformans*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10.
- Liu, Sun, Y., Zhang, Q., 2018b. Emerging Role of Extracellular Vesicles in Bone Remodeling. *J. Dent. Res.* 97, 859–868. <https://doi.org/10.1177/0022034518764411>
- Loftus, B.J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., Vamathevan, J., Miranda, M., Anderson, I.J., Fraser, J.A., Allen, J.E., Bosdet, I.E., Brent, M.R., Chiu, R., Doering, T.L., Donlin, M.J., D'Souza, C.A., Fox, D.S., Grinberg, V., Fu, J., Fukushima, M., Haas, B.J., Huang, J.C., Janbon, G., Jones, S.J.M., Koo, H.L., Krzywinski, M.I., Kwon-Chung, J.K., Lengeler, K.B., Maiti, R., Marra, M.A., Marra, R.E., Mathewson, C.A., Mitchell, T.G., Perlea, M., Riggs, F.R., Salzberg, S.L., Schein, J.E., Shvartsbeyn, A., Shin, H., Shumway, M., Specht, C.A., Suh, B.B., Tenney, A., Utterback, T.R., Wickes, B.L., Wortman, J.R., Wye, N.H., Kronstad, J.W., Lodge, J.K., Heitman, J., Davis, R.W., Fraser, C.M., Hyman, R.W., 2005. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307, 1321–1324. <https://doi.org/10.1126/science.1103773>
- Lorenz, R., Bernhart, S.H., Höner Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P.F., Hofacker, I.L., 2011. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* AMB 6, 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
- Luz, B.S.R.D., Nicolas, A., Chabelskaya, S., Rodovalho, V. de R., Le Loir, Y., Azevedo, V.A. de C., Felden, B., Guédon, E., 2021. Environmental Plasticity of the RNA Content of *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles. *Front. Microbiol.* 12.

- Ma, H., Hagen, F., Stekel, D.J., Johnston, S.A., Sionov, E., Falk, R., Polacheck, I., Boekhout, T., May, R.C., 2009. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12980–12985. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902963106>
- Maier, R.M., Pepper, I.L., 2015. Chapter 3 - Bacterial Growth, in: Pepper, I.L., Gerba, C.P., Gentry, T.J. (Eds.), *Environmental Microbiology (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 37–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Maryam, M., Fu, M.S., Alanio, A., Camacho, E., Goncalves, D.S., Faneuff, E.E., Grossman, N.T., Casadevall, A., Coelho, C., 2019. The enigmatic role of fungal annexins: the case of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 165, 852–862. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000815>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., Théry, C., 2019. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* 21, 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Maute, R.L., Schneider, C., Sumazin, P., Holmes, A., Califano, A., Basso, K., Dalla-Favera, R., 2013. tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1404–1409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206761110>
- McKee, T.J., Komarova, S.V., 2017. Is it time to reinvent basic cell culture medium? *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 312, C624–C626. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00336.2016>
- McKenna, J.A., Garcia-Ceron, D., Bleackley, M.R., Yu, L., Bulone, V., Anderson, M.A., 2023. SUR7 deletion in *Candida albicans* impacts extracellular vesicle features and delivery of virulence factors. *J. Extracell. Biol.* 2, e82. <https://doi.org/10.1002/jex2.82>
- Mencher, A., Morales, P., Valero, E., Tronchoni, J., Patil, K.R., Gonzalez, R., 2020. Proteomic characterization of extracellular vesicles produced by several wine yeast species. *Microb. Biotechnol.* 13, 1581–1596. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13614>
- Missall, T.A., Cherry-Harris, J.F., Lodge, J.K., 2005. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. *Microbiology* 151, 2573–2581. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28132-0>
- Mitchell, D.H., Sorrell, T.C., Allworth, A.M., Heath, C.H., McGregor, A.R., Papanoum, K., Richards, M.J., Gottlieb, T., 1995. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 20, 611–616. <https://doi.org/10.1093/clinids/20.3.611>
- Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F., 2012. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 328–335. <https://doi.org/10.1038/nrm3335>
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R., Baulcombe, D.C., 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328, 872–875. <https://doi.org/10.1126/science.1187959>
- Monziani, A., Ulitsky, I., 2023. Noncoding snoRNA host genes are a distinct subclass of long noncoding RNAs. *Trends Genet.* 0. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.09.001>

- Morel, L., Regan, M., Higashimori, H., Ng, S.K., Esau, C., Vidensky, S., Rothstein, J., Yang, Y., 2013. Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *J. Biol. Chem.* 288, 7105–7116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.410944>
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C., Carter, D.R.F., 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* 3, 10.3402/jev.v3.24641. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- Munhoz da Rocha, I.F., Martins, S.T., Amatuzzi, R.F., Zamith-Miranda, D., Nosanchuk, J.D., Rodrigues, M.L., Alves, L.R., 2021. Cellular and Extracellular Vesicle RNA Analysis in the Global Threat Fungus *Candida auris*. *Microbiol. Spectr.* 9, e0153821. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01538-21>
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y., 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 458–467. <https://doi.org/10.1038/nrm2708>
- Nalley, L., Tsiboe, F., Durand-Morat, A., Shew, A., Thoma, G., 2016. Economic and Environmental Impact of Rice Blast Pathogen (*Magnaporthe oryzae*) Alleviation in the United States. *PLOS ONE* 11, e0167295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167295>
- Nawrocki, E.P., Eddy, S.R., 2013. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics* 29, 2933–2935. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt509>
- Nechooshtan, G., Yunusov, D., Chang, K., Gingeras, T.R., 2020. Processing by RNase 1 forms tRNA halves and distinct Y RNA fragments in the extracellular environment. *Nucleic Acids Res.* 48, 8035–8049. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa526>
- Nielsen, K., Cox, G.M., Wang, P., Toffaletti, D.L., Perfect, J.R., Heitman, J., 2003. Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. *Infect. Immun.* 71, 4831–4841. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.4831-4841.2003>
- Nielsen, K., De Obaldia, A.L., Heitman, J., 2007. *Cryptococcus neoformans* Mates on Pigeon Guano: Implications for the Realized Ecological Niche and Globalization. *Eukaryot. Cell* 6, 949–959. <https://doi.org/10.1128/ec.00097-07>
- O’Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L.C., Breakefield, X.O., 2020. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 585–606. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y>
- Oliveira, D.L., Fonseca, F.L., Zamith-Miranda, D., Nimrichter, L., Rodrigues, J., Pereira, M.D., Reuwsaat, J.C., Schrank, A., Staats, C., Kmetzsch, L., Vainstein, M.H., Rodrigues, M.L., 2016. The putative autophagy regulator Atg7 affects the physiology and pathogenic mechanisms of *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol.* 11, 1405–1419. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0090>
- One Health: Fungal Pathogens of Humans, Animals, and Plants: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, on October 18, 2017, 2019. , American Academy of Microbiology Colloquia Reports. American Society for Microbiology, Washington (DC).
- O’Neil, D., Glowatz, H., Schlumpberger, M., 2013. Ribosomal RNA Depletion for Efficient Use of RNA-Seq Capacity. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 103, 4.19.1-4.19.8. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0419s103>
- Ouyang, Y., Mouillet, J.-F., Sorkin, A., Sadovsky, Y., 2021. Trophoblastic Extracellular Vesicles and Viruses: Friends or Foes? *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y.* N 1989 85, e13345. <https://doi.org/10.1111/aji.13345>

- Pandey, K.K., Madhry, D., Ravi Kumar, Y.S., Malvankar, S., Sapra, L., Srivastava, R.K., Bhattacharyya, S., Verma, B., 2021. Regulatory roles of tRNA-derived RNA fragments in human pathophysiology. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 26, 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.06.023>
- Peng, C.A., Gaertner, A.A.E., Henriquez, S.A., Fang, D., Colon-Reyes, R.J., Brumaghim, J.L., Kozubowski, L., 2018. Fluconazole induces ROS in *Cryptococcus neoformans* and contributes to DNA damage in vitro. *PLOS ONE* 13, e0208471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208471>
- Peres da Silva, R., Longo, L.G.V., Cunha, J.P.C. da, Sobreira, T.J.P., Rodrigues, M.L., Faoro, H., Goldenberg, S., Alves, L.R., Puccia, R., 2019. Comparison of the RNA Content of Extracellular Vesicles Derived from *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *Cells* 8, 765. <https://doi.org/10.3390/cells8070765>
- Peres da Silva, R., Martins, S. de T., Rizzo, J., dos Reis, F.C.G., Joffe, L.S., Vainstein, M., Kmetzsch, L., Oliveira, D.L., Puccia, R., Goldenberg, S., Rodrigues, M.L., Alves, L.R., 2018. Golgi Reassembly and Stacking Protein (GRASP) Participates in Vesicle-Mediated RNA Export in *Cryptococcus Neoformans*. *Genes* 9, 400. <https://doi.org/10.3390/genes9080400>
- Peres da Silva, R., Puccia, R., Rodrigues, M.L., Oliveira, D.L., Joffe, L.S., César, G.V., Nimrichter, L., Goldenberg, S., Alves, L.R., 2015. Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Sci. Rep.* 5, 7763. <https://doi.org/10.1038/srep07763>
- Petersen, M.C., Shulman, G.I., 2018. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* 98, 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Phillips, W., Willms, E., Hill, A.F., 2021. Understanding extracellular vesicle and nanoparticle heterogeneity: Novel methods and considerations. *PROTEOMICS* 21, 2000118. <https://doi.org/10.1002/pmic.202000118>
- Pita, T., Feliciano, J.R., Leitão, J.H., 2020. Extracellular RNAs in Bacterial Infections: From Emerging Key Players on Host-Pathogen Interactions to Exploitable Biomarkers and Therapeutic Targets. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9634. <https://doi.org/10.3390/ijms21249634>
- Potestà, M., Roglia, V., Fanelli, M., Pietrobono, E., Gismondi, A., Vumbaca, S., Nguedia Tsangueu, R.G., Canini, A., Colizzi, V., Grelli, S., Minutolo, A., Montesano, C., 2020. Effect of microvesicles from *Moringa oleifera* containing miRNA on proliferation and apoptosis in tumor cell lines. *Cell Death Discov.* 6, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0271-6>
- Pourali, G., Zafari, N., Fiuji, H., Batra, J., Nazari, E., Khazaei, M., Hassanian, S.M., Vahabi, M., Kiani, M., Ghayour-Mobarhan, M., Peters, G.J., Ferns, G.A., Lam, A.K., Giovannetti, E., Avan, A., 2023. Extracellular vesicles: Emerging mediators of cell communication in gastrointestinal cancers exhibiting metabolic abnormalities. *Cytokine Growth Factor Rev., Advances in extracellular vesicles as mediators of cell-to-cell communication in metabolism* 73, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2023.08.001>
- Prado Barragán, L.A., Figueroa, J.J.B., Rodríguez Durán, L.V., Aguilar González, C.N., Hennigs, C., 2016. Chapter 7 - Fermentative Production Methods, in: Poltronieri, P., D'Urso, O.F. (Eds.), *Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products*. Elsevier, pp. 189–217. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803622-8.00007-0>
- Pukkila-Worley, R., Gerrald, Q.D., Kraus, P.R., Boily, M.-J., Davis, M.J., Giles, S.S., Cox, G.M., Heitman, J., Alspaugh, J.A., 2005. Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the *Cryptococcus neoformans* Cyclic AMP Cascade. *Eukaryot. Cell* 4, 190–201. <https://doi.org/10.1128/ec.4.1.190-201.2005>

- Puppo, M., Jaafar, M., Diaz, J.-J., Marcel, V., Clézardin, P., 2022. MiRNAs and snoRNAs in Bone Metastasis: Functional Roles and Clinical Potential. *Cancers* 15, 242. <https://doi.org/10.3390/cancers15010242>
- Quinlan, A.R., Hall, I.M., 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Rädler, J., Gupta, D., Zickler, A., Andaloussi, S.E., 2023. Exploiting the biogenesis of extracellular vesicles for bioengineering and therapeutic cargo loading. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 31, 1231–1250. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.02.013>
- Rajasingham, R., Govender, N.P., Jordan, A., Loyse, A., Shroufi, A., Denning, D.W., Meya, D.B., Chiller, T.M., Boulware, D.R., 2022. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* 22, 1748–1755. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00499-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00499-6)
- Rathore, S.S., Sathiyamoorthy, J., Lalitha, C., Ramakrishnan, J., 2022. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. *Microb. Pathog.* 166, 105521. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105521>
- Rayner, S., Bruhn, S., Vallhov, H., Andersson, A., Billmyre, R.B., Scheynius, A., 2017. Identification of small RNAs in extracellular vesicles from the commensal yeast *Malassezia sympodialis*. *Sci. Rep.* 7, 39742. <https://doi.org/10.1038/srep39742>
- Regente, M., Pinedo, M., San Clemente, H., Balliau, T., Jamet, E., de la Canal, L., 2017. Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth. *J. Exp. Bot.* 68, 5485–5495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx355>
- Reis, F.C.G., Borges, B.S., Jozefowicz, L.J., Sena, B.A.G., Garcia, A.W.A., Medeiros, L.C., Martins, S.T., Honorato, L., Schrank, A., Vainstein, M.H., Kmetzsch, L., Nimrichter, L., Alves, L.R., Staats, C.C., Rodrigues, M.L., 2019. A Novel Protocol for the Isolation of Fungal Extracellular Vesicles Reveals the Participation of a Putative Scramblase in Polysaccharide Export and Capsule Construction in 4, 15.
- Reis, F.C.G., Gimenez, B., Jozefowicz, L.J., Castelli, R.F., Martins, S.T., Alves, L.R., de Oliveira, H.C., Rodrigues, M.L., 2021. Analysis of Cryptococcal Extracellular Vesicles: Experimental Approaches for Studying Their Diversity Among Multiple Isolates, Kinetics of Production, Methods of Separation, and Detection in Cultures of Titan Cells. *Microbiol. Spectr.* 9, 10.1128/spectrum.00125-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00125-21>
- Ren, B., Wang, X., Duan, J., Ma, J., 2019. Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation. *Science* 365, 919–922. <https://doi.org/10.1126/science.aav8907>
- Ressel, S., Rosca, A., Gordon, K., Buck, A.H., 2019. Extracellular RNA in viral–host interactions: Thinking outside the cell. *WIREs RNA* 10, e1535. <https://doi.org/10.1002/wrna.1535>
- Retini, C., Vecchiarelli, A., Monari, C., Tascini, C., Bistoni, F., Kozel, T.R., 1996. Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils. *Infect. Immun.* 64, 2897–2903. <https://doi.org/10.1128/iai.64.8.2897-2903.1996>
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A., 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16, 276–277. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2)
- Rimer, J.M., Lee, J., Holley, C.L., Crowder, R.J., Chen, D.L., Hanson, P.I., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2018. Long-range function of secreted small nucleolar RNAs that direct 2'-O-methylation. *J. Biol. Chem.* 293, 13284–13296. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003410>

- Rivera, J., Cordero, R.J.B., Nakouzi, A.S., Frases, S., Nicola, A., Casadevall, A., 2010. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19002–19007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008843107>
- Rizzo, J., Chaze, T., Miranda, K., Roberson, R.W., Gorgette, O., Nimrichter, L., Matondo, M., Latgé, J.-P., Beauvais, A., Rodrigues, M.L., 2020. Characterization of Extracellular Vesicles Produced by *Aspergillus fumigatus* Protoplasts. *mSphere* 5, e00476-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00476-20>
- Rizzo, J., Taheraly, A., Janbon, G., 2021a. Structure, composition and biological properties of fungal extracellular vesicles. *microLife* 2, uqab009. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqab009>
- Rizzo, J., Trottier, A., Moyrand, F., Coppée, J.-Y., Maufrais, C., Zimbres, A.C.G., Dang, T.T.V., Alanio, A., Desnos-Ollivier, M., Mouyna, I., Péhau-Arnaude, G., Commere, P.-H., Novault, S., Ene, I.V., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., Janbon, G., 2023. Coregulation of extracellular vesicle production and fluconazole susceptibility in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* 14, e00870-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.00870-23>
- Rizzo, J., Wong, S.S.W., Gazi, A.D., Moyrand, F., Chaze, T., Commere, P.-H., Novault, S., Matondo, M., Péhau-Arnaudet, G., Reis, F.C.G., Vos, M., Alves, L.R., May, R.C., Nimrichter, L., Rodrigues, M.L., Aïmanianda, V., Janbon, G., 2021b. *Cryptococcus* extracellular vesicles properties and their use as vaccine platforms. *J. Extracell. Vesicles* 10, e12129. <https://doi.org/10.1002/jev2.12129>
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., Mesirov, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Oliveira, D.L., Frases, S., Miranda, K., Zaragoza, O., Alvarez, M., Nakouzi, A., Feldmesser, M., Casadevall, A., 2007. Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport. *Eukaryot. Cell* 6, 48–59. <https://doi.org/10.1128/EC.00318-06>
- Ruf, A., Oberkofler, L., Robatzek, S., Weiberg, A., 2022. Spotlight on plant RNA-containing extracellular vesicles. *Curr. Opin. Plant Biol.* 69, 102272. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102272>
- Rutter, B.D., Chu, T.-T.-H., Dallery, J.-F., Zajt, K.K., O’Connell, R.J., Innes, R.W., 2022. The development of extracellular vesicle markers for the fungal phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *J. Extracell. Vesicles* 11, e12216. <https://doi.org/10.1002/jev2.12216>
- Rutter, B.D., Innes, R.W., 2017. Extracellular Vesicles Isolated from the Leaf Apoplast Carry Stress-Response Proteins. *Plant Physiol.* 173, 728–741. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01253>
- Ryan, O.W., Skerker, J.M., Maurer, M.J., Li, X., Tsai, J.C., Poddar, S., Lee, M.E., DeLoache, W., Dueber, J.E., Arkin, A.P., Cate, J.H.D., 2014. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *eLife* 3, e03703. <https://doi.org/10.7554/eLife.03703>
- Sahr, T., Escoll, P., Rusniok, C., Bui, S., Pehau-Arnaudet, G., Lavieu, G., Buchrieser, C., 2022. Translocated *Legionella pneumophila* small RNAs mimic eukaryotic microRNAs targeting the host immune response. *Nat. Commun.* 13, 762. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28454-x>
- Sajid, S., 2018. Applications of fungal pigments in Biotechnology. *Pure Appl. Biol.* 7. <https://doi.org/10.19045/bspab.2018.700111>

- Sales-Lee, J., Perry, D.S., Bowser, B.A., Diedrich, J.K., Rao, B., Beusch, I., Yates, J.R., Roy, S.W., Madhani, H.D., 2021. Coupling of spliceosome complexity to intron diversity. *Curr. Biol.* CB 31, 4898-4910.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.09.004>
- Schaack, B., Hindré, T., Quansah, N., Hannani, D., Mercier, C., Laurin, D., 2022. Microbiota-Derived Extracellular Vesicles Detected in Human Blood from Healthy Donors. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 13787. <https://doi.org/10.3390/ijms232213787>
- Scheiber, A.L., Clark, C.A., Kaito, T., Iwamoto, M., Horwitz, E.M., Kawasawa, Y.I., Otsuru, S., 2022. Culture Condition of Bone Marrow Stromal Cells Affects Quantity and Quality of the Extracellular Vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1017. <https://doi.org/10.3390/ijms23031017>
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M., 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>
- Scott, Ono, M., 2011. From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie* 93. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.026>
- Shabalina, S.A., Koonin, E.V., 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol. Evol.* 23, 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>
- Sharma, M., Zhang, H., Ehrenkauf, G., Singh, U., 2023. Stress Response in *Entamoeba histolytica* Is Associated with Robust Processing of tRNA to tRNA Halves. *mBio* 14, e0345022. <https://doi.org/10.1128/mbio.03450-22>
- Shen, G., Whittington, A., Song, K., Wang, P., 2010. Pleiotropic function of intersectin homologue Cin1 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 76, 662–676. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07121.x>
- Shorter, J., Watson, R., Giannakou, M.E., Clarke, M., Warren, G., Barr, F.A., 1999. GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *EMBO J.* 18, 4949–4960. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.4949>
- Sicard, D., 2022. Du blé au pain : diversité des pratiques et biodiversité microbienne dans la filière boulangerie à faible intrant, in: *Aux Sources Végétales de Notre Alimentation*. Société Botanique de France, Paris - Amphithéâtre de l'école Nationale de Physique Chimie Biologie, France.
- Silva, B.M.A., Prados-Rosales, R., Espadas-Moreno, J., Wolf, J.M., Luque-Garcia, J.L., Gonçalves, T., Casadevall, A., 2014. Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. *Med. Mycol.* 52, 202–210. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt003>
- Singh, A., Panting, R.J., Varma, A., Saijo, T., Waldron, K.J., Jong, A., Ngamskulrungraj, P., Chang, Y.C., Rutherford, J.C., Kwon-Chung, K.J., 2013. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *mBio* 4, e00220-00213. <https://doi.org/10.1128/mBio.00220-13>
- Sioud, M., 2021. RNA Interference: Story and Mechanisms. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 2282, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1298-9_1
- Skoczylas, Ł., Gawin, M., Fochtman, D., Wiślak, P., Whiteside, T.L., Pietrowska, M., 2023. Immune capture and protein profiling of small extracellular vesicles from human plasma. *Proteomics* e2300180. <https://doi.org/10.1002/pmic.202300180>
- Souza, J.A.M., Baltazar, L. de M., Carregal, V.M., Gouveia-Eufrasio, L., de Oliveira, A.G., Dias, W.G., Campos Rocha, M., Rocha de Miranda, K., Malavazi, I., Santos, D. de A., Frézard, F.J.G., de Souza, D. da G., Teixeira, M.M., Soriani, F.M., 2019. Characterization of *Aspergillus fumigatus*

- Extracellular Vesicles and Their Effects on Macrophages and Neutrophils Functions. *Front. Microbiol.* 10, 2008. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02008>
- Spencer, G.W.K., Chua, S.M.H., Erpf, P.E., Wizrah, M.S.I., Dyba, T.G., Condon, N.D., Fraser, J.A., 2020. Broadening the spectrum of fluorescent protein tools for use in the encapsulated human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 138, 103365. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103365>
- Subramanian, I., Verma, S., Kumar, S., Jere, A., Anamika, K., 2020. Multi-omics Data Integration, Interpretation, and Its Application. *Bioinforma. Biol. Insights* 14, 1177932219899051. <https://doi.org/10.1177/1177932219899051>
- Thompson, M.K., Kiourlappou, M., Davis, I., 2020. Ribo-Pop: simple, cost-effective, and widely applicable ribosomal RNA depletion. *RNA* 26, 1731–1742. <https://doi.org/10.1261/rna.076562.120>
- Thumuluri, V., Almagro Armenteros, J.J., Johansen, A.R., Nielsen, H., Winther, O., 2022. DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Res.* 50, W228–W234. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac278>
- Tian, X., Ding, H., Ke, W., Wang, L., 2021. Quorum Sensing in Fungal Species. *Annu. Rev. Microbiol.* 75, 449–469. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-060321-045510>
- Tkach, M., Kowal, J., Zucchetti, A.E., Enserink, L., Jouve, M., Lankar, D., Saitakis, M., Martin-Jaular, L., Théry, C., 2017. Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. *EMBO J.* 36, 3012–3028. <https://doi.org/10.15252/emj.201696003>
- Tkach, M., Théry, C., 2016. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164, 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>
- Torchet, C., Badis, G., Devaux, F., Costanzo, G., Werner, M., Jacquier, A., 2005. The complete set of H/ACA snoRNAs that guide rRNA pseudouridylations in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA N. Y.* N 11, 928–938. <https://doi.org/10.1261/rna.2100905>
- Tosar, J.P., Gámbaro, F., Darré, L., Pantano, S., Westhof, E., Cayota, A., 2018. Dimerization confers increased stability to nucleases in 5' halves from glycine and glutamic acid tRNAs. *Nucleic Acids Res.* 46, 9081–9093. <https://doi.org/10.1093/nar/gky495>
- Tosar, J.P., Gambaro, F., Sanguinetti, J., Bonilla, B., Witwer, K.W., Cayota, A., 2015. Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res.* 43, 5601–5616. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv432>
- Tosar, J.P., Witwer, K., Cayota, A., 2021. Revisiting extracellular RNA release, processing, and function. *Trends Biochem. Sci.* 46, 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.12.008>
- Toyofuku, M., Schild, S., Kaparakis-Liaskos, M., Eberl, L., 2023. Composition and functions of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* 21, 415–430. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00875-5>
- Tsatsaronis, J.A., Franch-Arroyo, S., Resch, U., Charpentier, E., 2018. Extracellular Vesicle RNA: A Universal Mediator of Microbial Communication? *Trends Microbiol.* 26, 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.009>
- Tsui, N.B., Ng, E.K., Lo, Y.D., 2002. Stability of Endogenous and Added RNA in Blood Specimens, Serum, and Plasma. *Clin. Chem.* 48, 1647–1653. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.10.1647>

- Upadhyaya, R., Lam, W.C., Maybruck, B.T., Donlin, M.J., Chang, A.L., Kayode, S., Ormerod, K.L., Fraser, J.A., Doering, T.L., Lodge, J.K., 2017. A fluorogenic *C. neoformans* reporter strain with a robust expression of m-cherry expressed from a safe haven site in the genome. *Fungal Genet. Biol.* 108, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.08.008>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Vallhov, H., Johansson, C., Veerman, R.E., Scheynius, A., 2020. Extracellular Vesicles Released From the Skin Commensal Yeast *Malassezia sympodialis* Activate Human Primary Keratinocytes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00006>
- van Niel, G., Carter, D.R.F., Clayton, A., Lambert, D.W., Raposo, G., Vader, P., 2022. Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 369–382. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00460-3>
- van Niel, G., D’Angelo, G., Raposo, G., 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., Dillies, M.-A., 2016. SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLOS ONE* 11, e0157022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157022>
- Varma, A., Kwon-Chung, K.J., 1999. Characterization of the Glyceraldehyde-3-phosphate Gene and the use of its promoter for heterologous expression in *Cryptococcus neoformans*, a human pathogen. *Gene* 232, 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00132-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00132-8)
- Velagapudi, R., Hsueh, Y.-P., Geunes-Boyer, S., Wright, J.R., Heitman, J., 2009. Spores as Infectious Propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77, 4345–4355. <https://doi.org/10.1128/iai.00542-09>
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., Remaley, A.T., 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* 13, 423–433. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>
- Villarreal, D.D., Lee, K., Deem, A., Shim, E.Y., Malkova, A., Lee, S.E., 2012. Microhomology directs diverse DNA break repair pathways and chromosomal translocations. *PLoS Genet.* 8, e1003026. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003026>
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F., 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4, 2980. <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>
- Villena, S.N., Pinheiro, R.O., Pinheiro, C.S., Nunes, M.P., Takiya, C.M., DosReis, G.A., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., Freire-de-Lima, C.G., 2008. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cell. Microbiol.* 10, 1274–1285. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01125.x>
- Vincenti, S., Chiara, V.D., Bozzoni, I., Presutti, C., 2007. The position of yeast snoRNA-coding regions within host introns is essential for their biosynthesis and for efficient splicing of the host pre-mRNA. *RNA* 13, 138–150. <https://doi.org/10.1261/rna.251907>

- Voelz, K., Johnston, S.A., Smith, L.M., Hall, R.A., Idnurm, A., May, R.C., 2014. “Division of labour” in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nat. Commun.* 5, 5194. <https://doi.org/10.1038/ncomms6194>
- Walker, L., Sood, P., Lenardon, M.D., Milne, G., Olson, J., Jensen, G., Wolf, J., Casadevall, A., Adler-Moore, J., Gow, N.A.R., 2018. The Viscoelastic Properties of the Fungal Cell Wall Allow Traffic of AmBisome as Intact Liposome Vesicles. *mBio* 9, e02383-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02383-17>
- Wallace, E.W.J., Maufrais, C., Sales-Lee, J., Tuck, L.R., de Oliveira, L., Feuerbach, F., Moyrand, F., Natarajan, P., Madhani, H.D., Janbon, G., 2020. Quantitative global studies reveal differential translational control by start codon context across the fungal kingdom. *Nucleic Acids Res.* 48, 2312–2331. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa060>
- Walton, F.J., Idnurm, A., Heitman, J., 2005. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 57, 1381–1396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04779.x>
- Wang, H., Lin, Q., Dong, L., Wu, W., Liang, Z., Dong, Z., Ye, H., Liao, L., Zhang, L.-H., 2022. A Bacterial Isolate Capable of Quenching Both Diffusible Signal Factor- and N-Acylhomoserine Lactone-Family Quorum Sensing Signals Shows Much Enhanced Biocontrol Potencies. *J. Agric. Food Chem.* 70, 7716–7726. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01299>
- Wang, M., Dean, R.A., 2020. Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Mol. Plant Pathol.* 21, 589–601. <https://doi.org/10.1111/mpp.12911>
- Wang, M., Weiberg, A., Dellota, E., Yamane, D., Jin, H., 2017. Botrytis small RNA *Bc* -siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biol.* 14, 421–428. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1291112>
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.-M., Thomma, B.P.H.J., Huang, H.-D., Jin, H., 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nat. Plants* 2, 16151. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- Wang, X., Hsueh, Y.-P., Li, W., Floyd, A., Skalsky, R., Heitman, J., 2010. Sex-induced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. *Genes Dev.* 24, 2566–2582. <https://doi.org/10.1101/gad.1970910>
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Weaver, A.M., Patton, J.G., 2020. Argonauts in Extracellular Vesicles: Artifact or Selected Cargo? *Cancer Res.* 80, 379–381. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2782>
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D., Jin, H., 2013. Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *Science* 342, 118–123. <https://doi.org/10.1126/science.1239705>
- WHO FFPL, 2022. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization.
- Wolf, P., 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 13, 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
- Xu, C.-Y., Zhu, H.-M., Wu, J.-H., Wen, H., Liu, C.-J., 2014. Increased permeability of blood–brain barrier is mediated by serine protease during *Cryptococcus meningitis*. *J. Int. Med. Res.* 42, 85–92. <https://doi.org/10.1177/0300060513504365>

- Yadav, V., Sun, S., Billmyre, R.B., Thimmappa, B.C., Shea, T., Lintner, R., Bakkeren, G., Cuomo, C.A., Heitman, J., Sanyal, K., 2018. RNAi is a critical determinant of centromere evolution in closely related fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 3108–3113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713725115>
- Yang, B., Wang, J., Jiang, H., Lin, H., Ou, Z., Ullah, A., Hua, Y., Chen, J., Lin, X., Hu, X., Zheng, L., Wang, Q., 2021. Extracellular Vesicles Derived From *Talaromyces marneffei* Yeasts Mediate Inflammatory Response in Macrophage Cells by Bioactive Protein Components. *Front. Microbiol.* 11, 603183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603183>
- Yuen, J., 2021. Pathogens which threaten food security: *Phytophthora infestans*, the potato late blight pathogen. *Food Secur.* 13, 247–253. <https://doi.org/10.1007/s12571-021-01141-3>
- Zakhartsev, M., Reuss, M., 2018. Cell size and morphological properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in relation to growth temperature. *FEMS Yeast Res.* 18. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy052>
- Zamith-Miranda, D., Heyman, H.M., Couvillion, S.P., Cordero, R.J.B., Rodrigues, M.L., Nimrichter, L., Casadevall, A., Amatuzzi, R.F., Alves, L.R., Nakayasu, E.S., Nosanchuk, J.D., 2021. Comparative Molecular and Immunoregulatory Analysis of Extracellular Vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. *mSystems* 6, e0082221. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00822-21>
- Zaragoza, O., Chrisman, C.J., Castelli, M.V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L., Casadevall, A., 2008. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell. Microbiol.* 10, 2043–2057. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01186.x>
- Zaragoza, O., García-Rodas, R., Nosanchuk, J.D., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J.L., Casadevall, A., 2010. Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. *PLOS Pathog.* 6, e1000945. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000945>
- Zarnowski, R., Sanchez, H., Covelli, A.S., Dominguez, E., Jaromin, A., Bernhardt, J., Mitchell, K.F., Heiss, C., Azadi, P., Mitchell, A., Andes, D.R., 2018. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLOS Biol.* 16, e2006872. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006872>
- Zarnowski, R., Sanchez, H., Jaromin, A., Zarnowska, U.J., Nett, J.E., Mitchell, A.P., Andes, D., 2022. A common vesicle proteome drives fungal biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119, e2211424119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2211424119>
- Zhang, Huang, P., Lin, J., Zeng, H., 2022. The Role of Extracellular Vesicles in Osteoporosis: A Scoping Review. *Membranes* 12, 324. <https://doi.org/10.3390/membranes12030324>
- Zhang, L., Chen, F., Liang, X., Ponnusamy, M., Qin, H., Lin, Z., 2022. Crosstalk among long non-coding RNA, tumor-associated macrophages and small extracellular vesicles in tumorigenesis and dissemination. *Front. Oncol.* 12.
- Zhang, L., Zhang, K., Li, H., Coelho, C., de Souza Gonçalves, D., Fu, M.S., Li, X., Nakayasu, E.S., Kim, Y.-M., Liao, W., Pan, W., Casadevall, A., 2021. *Cryptococcus neoformans*-Infected Macrophages Release Proinflammatory Extracellular Vesicles: Insight into Their Components by Multi-omics. *mBio* 12, 10.1128/mbio.00279-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.00279-21>
- Zhang, Q., Jeppesen, D.K., Higginbotham, J.N., Graves-Deal, R., Trinh, V.Q., Ramirez, M.A., Sohn, Y., Neining, A.C., Taneja, N., McKinley, E.T., Niitsu, H., Cao, Z., Evans, R., Glass, S.E., Ray, K.C., Fissell, W.H., Hill, S., Rose, K.L., Huh, W.J., Washington, M.K., Ayers, G.D., Burnette, D.T., Sharma, S., Rome, L.H., Franklin, J.L., Lee, Y.A., Liu, Q., Coffey, R.J., 2021. Supermeres are

- functional extracellular nanoparticles replete with disease biomarkers and therapeutic targets. *Nat. Cell Biol.* 23, 1240–1254. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00805-8>
- Zhang, S., Liu, F., Yang, B., Liu, Y., Wang, G.-R., 2023. Functional characterization of sex pheromone receptors in *Spodoptera frugiperda*, *S. exigua*, and *S. litura* moths. *Insect Sci.* 30, 305–320. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13098>
- Zhao, K., Bleackley, M., Chisanga, D., Gangoda, L., Fonseka, P., Liem, M., Kalra, H., Al Saffar, H., Keerthikumar, S., Ang, C.-S., Adda, C.G., Jiang, L., Yap, K., Poon, I.K., Lock, P., Bulone, V., Anderson, M., Mathivanan, S., 2019. Extracellular vesicles secreted by *Saccharomyces cerevisiae* are involved in cell wall remodelling. *Commun. Biol.* 2, 305. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0538-8>
- Zhao, Y., Lin, J., Fan, Y., Lin, X., 2019. Life Cycle of *Cryptococcus neoformans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 17–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120210>
- Zhao, Y., Ye, L., Zhao, F., Zhang, L., Lu, Z., Chu, T., Wang, S., Liu, Z., Sun, Y., Chen, M., Liao, G., Ding, C., Xu, Y., Liao, W., Wang, L., 2023. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. *Infect. Dis. Poverty* 12, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01073-4>
- Zhu, D., Fang, H., Kusuma, G.D., Schwab, R., Barabadi, M., Chan, S.T., McDonald, H., Leong, C.M., Wallace, E.M., Greening, D.W., Lim, R., 2021. Impact of chemically defined culture media formulations on extracellular vesicle production by amniotic epithelial cells. *PROTEOMICS* 21, 2000080. <https://doi.org/10.1002/pmic.202000080>

Table des figures

Figure 1 : Liste de priorité des champignons pathogènes publiée par l’OMS en octobre 2022 (traduite depuis WHO FPPL, 2022).....	17
Figure 2 : Arbre phylogénique des champignons (d’après Li et al., 2021).....	19
Figure 3 : Cycle simplifié de reproduction unisexuée et bisexuée chez <i>Cryptococcus neoformans</i> (adaptée de Zhao et al., 2019)	23
Figure 4 : Processus d’infection par les levures des espèces du complexe <i>neoformans</i> (vert) et <i>gattii</i> (bleue)	25
Figure 5 : Réponse aux stress environnementaux lors de l’infection et expression de facteurs de virulence	28
Figure 6 : Diverses stratégies de séquençage ont été utilisées pour annoter le génome de <i>Cryptococcus</i>	30
Figure 7 : Représentation consensuelle d’un gène de <i>C. neoformans</i> H99 (adapté de Wallace et al., 2020).....	32
Figure 8 : Voies de production des ARNex (adapté de Chai et al., 2023).....	35
Figure 9 : Rôles intra-espèce des vésicules extracellulaires des pathogènes fongiques humains	46
Figure 10 : Rôles des vésicules extracellulaires fongiques dans la communication inter-espèce	48
Figure 11 : Purification des vésicules extracellulaires par ultracentrifugation	55
Figure 12 : Structure des VE produites par <i>C. neoformans</i>	57
Figure 13 : Certaines molécules d'ARN sont associées aux VE	62
Figure 14 : les tRFs sont associés aux VE chez <i>Cryptococcus</i>	65
Figure 15 : Des siARN sont associés aux VE produites par <i>C. neoformans</i>	67
Figure 16 : Des siARN et des tRF sont spécifiquement adressés vers les VE.....	69
Figure 17 : Des snoARN sont associés aux VE chez <i>Cryptococcus</i>	71

Figure 18 : Diagramme « Volcano plot » illustrant les différences entre les transcriptomes cellulaire et vésiculaire chez <i>C. neoformans</i> après séquençage des ARN polyadénylés	74
Boîte 1 : Mécanisme de dégradation des ARN par ARNi.....	82
Figure 19 : L'expression d'un ARN en épingle à cheveux est associée avec la présence de siARN spécifiques dans les VE chez <i>C. deneoformans</i>	84
Figure 20 : Représentation schématique de la stratégie de communication par siARN	86
Figure 21 : Photographies de cellules de <i>C. neoformans</i> cultivées en milieu complet liquide pendant 16h à 30°C et observées par microscopie en lumière blanche (DIC) ou à épifluorescence (mNeonGreen).....	87
Figure 22 : Photographies de cellules de <i>C. neoformans</i> cultivées sur milieu minimum solide pendant 24h à 30°C et observées par microscopie en lumière blanche (DIC) ou à épifluorescence (mNEONGreen)	89
Figure 23 : Mesure de la fluorescence des cellules par cytométrie en flux.....	90
Figure 24 : Quantification de l'ARNm mNEONGreen par RT-qPCR	91
Boîte 2 : Fonction des snoARN (traduit à partir de Kufel et al., 2019)	94
Figure 25 : Stratégie de complémentation de phénotype en présence de VE	95
Figure 26 : Recherche de phénotypes de mutants de de snoARN	98
Figure 27 : Stratégie de communication basée sur le système CRISPR/Cas9	101
Figure 28 : Analyse du taux de réversion de différents allèles du gène URA5 en présence d'ARN guides spécifiques ou non.....	107
Figure 29 : Essais de communication entre des souches émettrices (E) d'un ARN guide spécifique avec ou sans Cas9 et des souches réceptrices (R).....	109
Figure supplémentaire 1 : Les tRFs sont retrouvés dans les vésicules extracellulaires de <i>C. neoformans</i> , <i>C. deneoformans</i> et <i>C. deuterogattii</i>	169
Figure supplémentaire 2 : Les siARN vésiculaires sont retrouvés chez <i>C. neoformans</i> et <i>C. deneoformans</i> , mais ils sont absents chez <i>C. deuterogattii</i>	170
Figure supplémentaire 3 : Les snoARN sont conservés dans le genre <i>Cryptococcus</i>	171

Table des tableaux

Tableau 1 : Nomenclature des <i>Cryptococcus spp.</i> (Hagen et al., 2015 ; Farrer et al., 2019)...	21
Tableau 2 : Liste des publications associées à la description du transcriptome des VE chez les champignons.....	51
Tableau 3 : Liste des gènes candidats pour une délétion	97
Tableau 4 : Liste des souches construites pour réaliser les essais de communication basés sur le système CRISPR/Cas9	104

Annexes

Comparaison du transcriptome de *C. neoformans*, *C. deneoformans* et *C. deuterogattii*

Figure supplémentaire 1 : Les tRFs sont retrouvés dans les vésicules extracellulaires de *C. neoformans*, *C. deneoformans* et *C. deuterogattii*.

Couverture en reads d'ARNT-Leu homologues chez trois espèces pathogènes de *Cryptococcus*. L'annotation des gènes est indiquée par une ligne bleue pleine, dont les régions introniques sont marquées par des tirets.

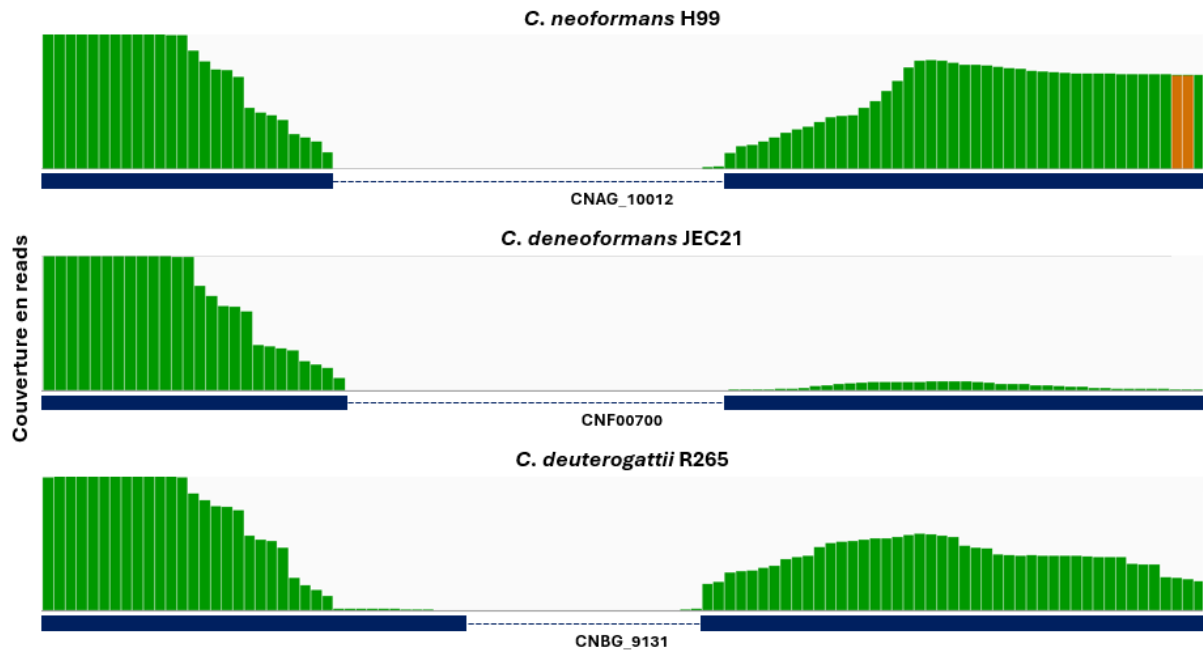


Figure supplémentaire 2 : Les siARN vésiculaires sont retrouvés chez *C. neoformans* et *C. deneoformans*, mais ils sont absents chez *C. deuterogattii*.

Comparaison de la distribution en reads (de 19 à 30 nt) en fonction de la taille et du premier nucléotide dans le transcriptome vésiculaire de trois espèces pathogènes du genre *Cryptococcus*.

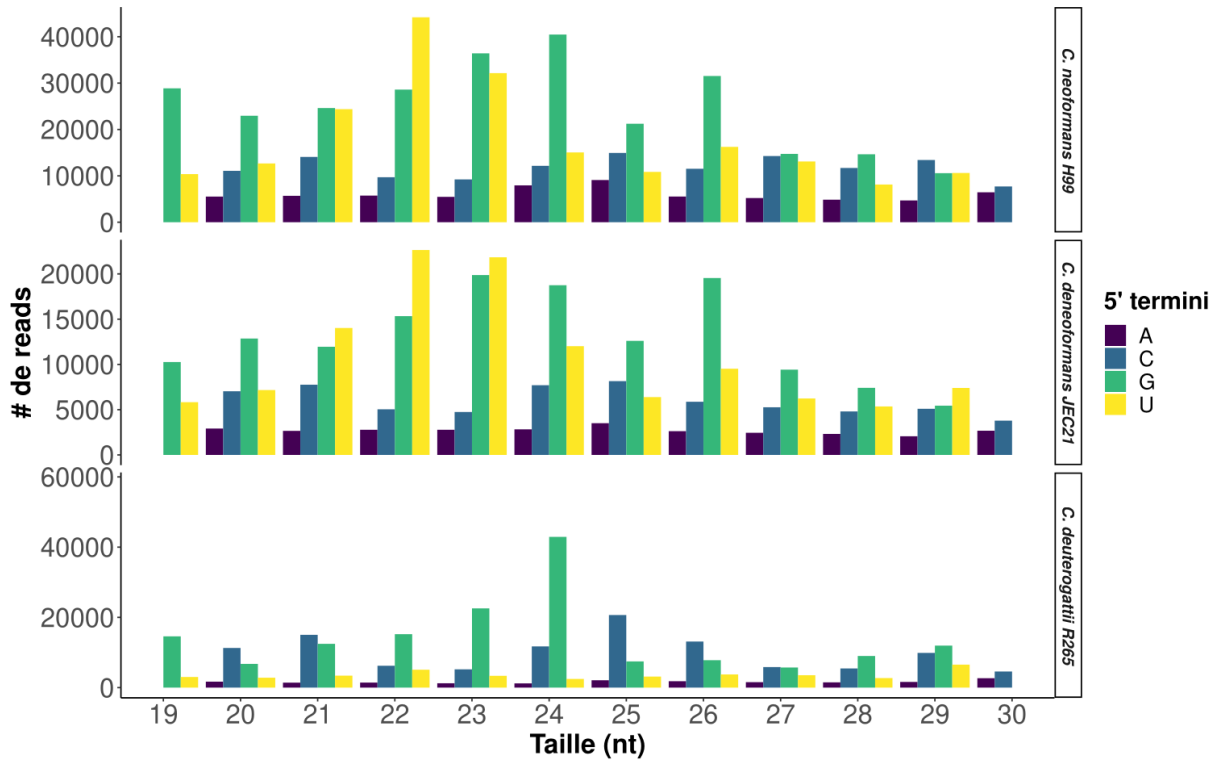
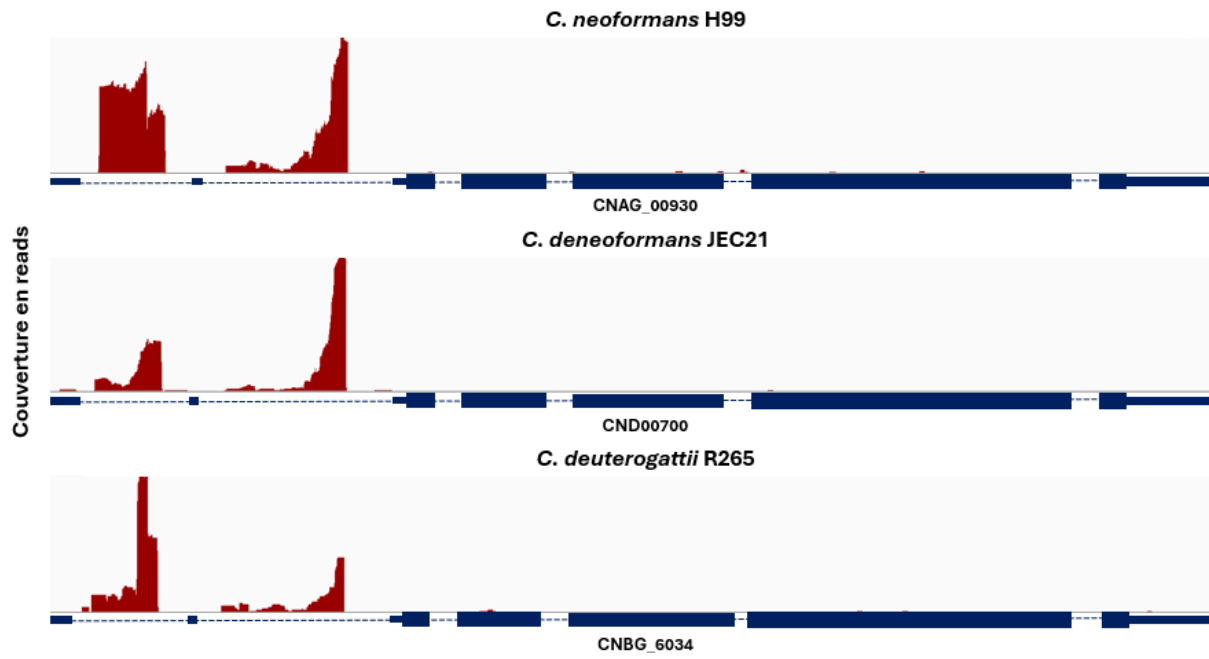


Figure supplémentaire 3 : Les snoARN sont conservés dans le genre *Cryptococcus*.

Couverture en reads des gènes homologues codant pour l'argininosuccinate synthase chez trois espèces pathogènes de *Cryptococcus*. L'annotation des gènes est indiquée par une ligne bleue, dont les régions introniques sont marquées par des tirets, et les régions codantes sont marquées par une ligne pleine plus large que pour les régions non traduites (UTR).



Liste des souches

Identifiant	Fond	Génotype	Nom
NE241	-	<i>MATa</i>	<i>C. neoformans</i> KN99
NE11	-	<i>MATa</i>	<i>C. deneoformans</i> JEC21
NE902	-	<i>MATa</i>	<i>C. deuterogattii</i> R265
NE546	NE11	<i>MATa URA5 ::ade2RNAi</i>	JEC21 + ade2i
NE1594	NE241	<i>MATa SH2Δ::pSDMA57- pGDP1-mNeonNGreen</i>	pGDP1-mNeon
NE1665	NE241	<i>MATa SH1Δ::pSDMA25- ARNshmNEONGreen</i>	pGDP1-ARNsh
NE1664	NE241	<i>MATa SH2Δ::pSDMA57- pGDP1-mNeonNGreen SH1Δ::psDMA25- ARNshmNEONGreen</i>	pGDP1- mNEON+pGDP1-ARNsh
NE1538	NE241	<i>MATa SH2 ::HYGB-CnoCAS9</i>	CnoCAS9
NE1457	NE241	<i>MATa cnag_12489Δ::NEO1</i>	<i>cnag_12489Δ</i>
NE1493	NE241	<i>MATa cnag_12093Δ::NEO1</i>	<i>cnag_12093Δ</i>
NE1696	NE241	<i>MATa cnag_12274Δ::NEO1</i>	<i>cnag_12274Δ</i>
NE1466	NE241	<i>MATa cnag_13018Δ::NEO1</i>	<i>cnag_13018Δ</i>
NE1494	NE241	<i>MATa cnag_12831Δ::NEO1</i>	<i>cnag_12831Δ</i>
NE1697	NE1538	<i>MATa cnag_03637Δ::NEO1</i>	<i>ku80Δ</i>
NE1656	NE241	<i>MATa SH1Δ::pSDMA25- BAPF2872</i>	E-insert
NE1661	NE1538	<i>MATa SH1Δ::pSDMA25- BAPF2872</i>	E-Cas9-insert

NE1659	NE1538	<i>MATa ura5-insert SH1Δ::pSDMA57</i>	R-ura5-insert
NE1657	NE241	<i>MATa SH1Δ::pSDMA25- BAPF2978</i>	E-dup8pb
NE1662	NE1538	<i>MATa SH1Δ::pSDMA25- BAPF2978</i>	E-Cas9-dup8pb
NE1660	NE1538	<i>MATa ura5-dup8pb SH1Δ::pSDMA57</i>	R-dup8pb
NE1658	NE241	<i>MATa SH1Δ::pSDMA25- BAPF2887</i>	E-dup24pb
NE1663	NE1538	<i>MATa SH1Δ::pSDMA25- BAPF2887</i>	E-Cas9-dup24pb
NE1698	NE1538	<i>MATa ura5-dup24pb SH1Δ::pSDMA57</i>	R-dup24pb

Liste des oligonucléotides

Généralité	
	BAPF2057 : Amplification des guides
PCR	CCGCTTGCATTAGAACTAAAAAC
guide	BAPF2058 : Amplification des guides
	AAAGCACCGACTCGGTGCCA
<hr/>	
	BAPF1987 : Guide ciblant SH1 (recoupe)
	catacaccggcagggatatactgttgATTCCATGATTTGAAGTCTAgtttagagctagaaatagcaagtt
	BAPF2926 : Guide ciblant SH1 (ne recoupe pas)
Guide	catacaccggcagggatatactgttgAGTGCTGTGGTGAAAGAGATgtttagagctagaaatagcaagtt
Safe	
Have	BAPF1985 : Guide 1 ciblant SH2
	catacaccggcagggatatactgttgTAATCCCTCCGCGCTTGCCGgtttagagctagaaatagcaagtt
	BAPF1986 : Guide 2 ciblant SH2
	catacaccggcagggatatactgttgGACCGACAGCGCACCTCTTgtttagagctagaaatagcaagtt
<hr/>	
	BAPF2059 : Amplification CAS9
PCR	GGTGACGCTGTGAGAGTGG
Cas9	BAPF2060 : Amplification CAS9
	GGGCCCTCTTACGTGG
<hr/>	
	BAPF2890 : qPCR mNEONGreen
	AAGACCGAGCTCAAGCACTC
	BAPF2891 : qPCR mNEONGreen
	CTTAAAGCGGTTGGCTGCTG
	BAPF580 : qPCR ACT1
qPCR	CACCGGTATCGTTCCTGACTCTGGTGAC
	BAPF581 : qPCR ACT1
	CACGCTCCATGAGAATCTTGACGAGGTAG
	CNAG_03602-F : qPCR snoARN du CNAG_03602
	ATAAGTGATGATCACAACACG
	CNAG_03602-R : qPCR snoARN du CNAG_03602
	AGTCAGATTGGGTGCCCGGAA
	CNAG_00656-F : qPCR snoARN du CNAG_00656
	CAGAATGATGCAGAACACCGAC
	CNAG_00656-R : qPCR snoARN du CNAG_00656
	GTTTCAGCCCCGAAAGATGGTT

MKRf

BAPF426 : Amplification de NEO et site de recombinaison avec 5'3

gaaggagatttcagtaacgttaagtggaTGGTTTATCTGTATTAACACGGAAGAG

BAPF2420 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggttttcccagtcacgacgAGACGGAGACCATGTCTGGT

BAPF2421 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcGCTGAAGCAGTGGTCAGGAT

BAPF2422 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgcagcGCTCGCCTAACGTGGTCTTA

BAPF2424 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcggataacaatttcacacaggaaacagcGGATCGAGAGGCGATTTCGT

CNAG_05651

BAPF2423 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

TAAGACCACGTTAGGCGAGCgctgagaggatgtgagctgga

BAPF2419 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

TGGAATGTCGTCTTCGGTGG

BAPF2425 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

GCCTCTCCCCGAAGTTTTGA

BAPF2824 : guide 1 pour délétion

catacaccggcagggtatactgttgGCCGTAAGGTAAGTACTGAGTGGgggttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2825 : guide 2 pour délétion

catacaccggcagggtatactgttgAGCGTGTGTTAGGTGCTGCTgggttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2324 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggttttcccagtcacgacgCTCTTGATGAGGGAATGACTGTCT

CNAG_12022

BAPF2325 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcCTTGATCCATCAAACAACCTGTC

BAPF2326 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgcagcGTGTTATTCCACGTCACCCTTTG

BAPF2328 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcgataacaatttcacacaggaacagcCATCCTTTCTTGCCGAATTAC

BAPF2327 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

CAAAGGGTGACGTGGAATAACACgctgagggatgtgagctgga

BAPF2323 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

GATCTTCCCACCAAGTTGTC

BAPF2329 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

GACAGATCAGGATGGAACTC

BAPF2330 : guide pour délétion

catacaccggcaggtatactgttgGGCCTGTTTGACAGTACTGAgggttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2301 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggtttcccagtcacgacgGTGTATCCTGGTTCTCTGTCGATAC

BAPF2302 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcTCTTAATCAGACATCCGCCATCCA

BAPF2303 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

CNAG_12093

tccagctcacatcctcgcagcCACCCATACCAAGCTAACTATTGCA

BAPF2305 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcgataacaatttcacacaggaacagcCCTTTCTTCTACCTATACTAGCA

BAPF2304 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

TGCAATAGTTAGCTTGGTATGGGTGgctgagggatgtgagctgga

BAPF2300 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

GAGACGATCAAAGACGATACGGTTG

BAPF2306 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

GAAGTATTACATACTGGTACTTATGG

Guide 1 pour délétion

catacaccggcaggggtatactgttgGTTTCGCTCCGGAACCTACACggttttagagctagaaatagcaagtt

Guide 2 pour délétion

catacaccggcaggggtatactgttgACGTTGCGGGATCAAATGAGggttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2364 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccaggggtttcccagtcacgacgGACATCCGGCTGGGTGAAAT

BAPF2365 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctcttcCGAAAGCGGTTTGATGGGAG

BAPF2366 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgacgGGACACTGCACATTCCATGC

BAPF2368 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

CNAG_12216

gcggataacaatttcacacaggaacagcAGAAGACCAGAACCGAGGGT

BAPF2367 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

GCATGGAATGTGCAGTGTCCgctgagagatgtgagctgga

BAPF2363 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

TCACCTAACAAGACGTCCGGC

BAPF2369 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

CGGCGGTGGCGTAATAATAG

BAPF2370 : guide 1 pour délétion

catacaccggcaggggtatactgttgACGCAGGCCACTGCTCTAAACggttttagagctagaaatagcaagtt

CNAG_12256

BAPF2356 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggttttcccagtcacgacgGAATCGCTCGGCCAGTAGTT

BAPF2357 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcGGACCAACCGTGGGAAAAAG

BAPF2358 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgagcTCATAGCTCGGTGGAATGCG

BAPF2360 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcggataacaatttcacacaggaacagcCCTCATTAGGCTGGGTGCAT

BAPF2359 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

CGCATTCCACCGAGCTATGAgctgcgaggatgtgagctgga

BAPF2355 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

CGACTGCGAGAGCTTACGAT

BAPF2361 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

GCGAGGTGTTGAAGAAGGGA

BAPF2362 : guide 1 pour délétion

catacaccggcagggtatactgttgATGGTACCAGCTGACCTTTCGgggttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2372 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggttttcccagtcacgacgCGTGGTTGCTTACAATCCGC

BAPF2373 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcTCCAAGGAAGGACGTAGTGC

CNAG_12258

BAPF2374 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgagcCACTCAGCAAACGCGAGAAG

BAPF2376 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcggataacaatttcacacaggaacagcACTGGGTAAGCGGGTTGATG

BAPF2375 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

CTTCTCGCGTTTGCTGAGTGgctgagagatgtgagctgga

BAPF2371 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

CCAGAAACAACAACCGGCAG

BAPF2377 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

AGAGATTACGGCCACCTCCT

BAPF3004 : guide 1 pour délétion

catacaccggcagggatactgttgGTTCCGGATCATTATCCTGCTgtttagagctagaaatagcaagtt

BAPF3005 : guide 2 pour délétion

catacaccggcagggatactgttgGGAGATCTATACGCCTAGAAgtttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2436 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggtttcccagtcacgacgCACGGTGCTATGAACATGCG

BAPF2437 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcTCGACAACGAAGCGGAATCA

BAPF2438 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgcagcGTTTCACAAATCTCGCCGCA

CNAG_12265

BAPF2440 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcgataacaatttcacacaggaacagcAAAGCATTGTCAGTCTCCCC

BAPF2439 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

TGCGGCGAGATTTGTGAAACgctgagagatgtgagctgga

BAPF2435 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

GTACGGCGGTACTIONCAGCTTT

BAPF2441 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

ACTGCCCTTATCACTCTGC

BAPF2442 : guide 1 pour délétion

catacaccggcaggtataactgttgGAAGGATGGCGGGTTGACAATgggttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2332 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggttttcccagtcacgacgGAGCGATCCGATCAGGTGTT

BAPF2333 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcACTGTCCTGCGGAGATTACG

BAPF2334 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgacgGGCCGTTACATGGACTTGGA

BAPF2336 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

CNAG_12274

gcggataacaatttcacacaggaacagcCTCCAGAAGCAGACGGACAA

BAPF2335 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

TCCAAGTCCATGTAACGGCCgctgagggatgtgagctgga

BAPF2331 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

CACCGTTCTTCAGCTAACGC

BAPF2337 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

CGAGCTGACCTTGCTCGTAT

BAPF2338 : Guide pour délétion

catacaccggcaggtataactgttgGCACCAGTCTTACCGTATCGTgggttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2452 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggttttcccagtcacgacgTACTCGGCACAACCTCCACC

BAPF2453 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

CNAG_12486

atccacttaacgttactgaaatctccttcTCGCGAACCAACAATCTGC

BAPF2454 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgacgCGAGGTGAGTGTGGCAGATT

BAPF2456 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcggataacaatttcacacaggaacagcTGAGCCTCTTTGCTGGAAGG

BAPF2455 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

AATCTGCCACACTCACCTCGgctgcgaggatgtgagctgga

BAPF2451 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

CGGTATAGGGCTGTGTGCAT

BAPF2457 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

GCGTGGATGGTTAGCTCCTT

BAPF3002 : guide 1 pour délétion

catacaccggcaggtatactgttgATTCTTATCGCGGCTGCCACgtttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2340 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggtttcccagtcacgacgGGCCACCTTGTCTGATTGTG

BAPF2341 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcTCTTTGAAACCGGCCACCAC

BAPF2342 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgcagcGCTGTGGGAGTTTCGTTTGG

CNAG_12489

BAPF2344 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcggataacaatttcacacaggaacagcCTGTTGGCTGGGAGAGCATT

BAPF2343 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

CCAAACGAAACTCCCACAGCgctgcgaggatgtgagctgga

BAPF2339 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

CCGTAGCTTGACGTGGATCA

BAPF2345 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

AGTCTTGTTCCAGCTGTCCG

BAPF2346 : guide 1 pour délétion

catacaccggcagggtatactgttgAATGCGGGCGGGCTTGAAAAAGGgttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2315 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggttttcccagtcacgacgTCACCGCTGACTGAGGAACAACAGA

BAPF2316 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcTGTCTAGATGTGACACGTAATGAC

BAPF2321 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgacgGCTTGACAGCCAAGAGAATCGCTG

BAPF2319 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

CNAG_12831

gcggataacaatttcacacaggaacagcCGTCCATGAAACCTTCAAGAGGAGA

BAPF2322 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

CAGCGATTCTCTTGGCTGTCAAGCgctgcgaggatgtgagctgga

BAPF2314 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

AAGATCTGCGTGGTTCTTTGGATCT

BAPF2320 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

GCGGAAAACCGACTTACGAAGTGAG

Guide 1 pour délétion

catacaccggcagggtatactgttgACGATATCGAAGTTGCTGGGgttttagagctagaaatagcaagtt

Guide 2 pour délétion

catacaccggcagggtatactgttgGCAACTGTTGTAACCTTCTTcgttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2308 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

CNAG_13018

gtaacgccagggttttcccagtcacgacgCATACAACCCCTACTCCTTCAGGCC

BAPF2309 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcCACTACTTGTTTCATGATCTCCTAC

BAPF2310 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgcagcAAGACACCGAAGTTGTTGGCTGCTG

BAPF2312 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcggataacaatttcacacaggaacagcTCCGTTAGCGAGTCGGCTTTAAGGC

BAPF2311 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

CAGCAGCCAACAACCTTCGGTGTCTTgctgcgaggatgtgagctgga

BAPF2307 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

CTGATTATATCTTTAGACTACGACG

BAPF2313 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

ACTTGCTAATGGTTGACGATGCACA

Guide 1 pour délétion

catacaccggcagggatatactggtgAAAACCTGCATGTAGAGAACggttttagagctagaaatagcaagtt

Guide 2 pour délétion

catacaccggcagggatatactggtgGGTCTGACAATACATGCTTAGgttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2380 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggtttccagtcacgacgACTAGCTTCACCGACAGTGG

BAPF2381 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcGTCGACTACCGCACTGATGT

BAPF2382 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgcagcCCCTAATGATGTTGCCTCCACC

BAPF2384 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcggataacaatttcacacaggaacagcCACCGCCAGTCTTGACTTCT

BAPF2383 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

GGTGGAGGCAACATCATTAGGGgctgcgaggatgtgagctgga

CNAG_13104

BAPF2379 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

GGAAACTGGGCCATGAGTGT

BAPF2385 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

TTCCGCCTCGAACATAGCTG

Guide 1 pour délétion

catacaccggcaggggtatactgttgGAGAGGCATGCATACAAATAgtttagagctagaaatagcaagtt

Guide 2 pour délétion

catacaccggcaggggtatactgttgACTCCGAATGCGACCCCTCAgtttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2348 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaaccgaggggtttccagtcacgacgGATGTAAGCCAGGCAGTCGT

BAPF2349 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctcttcGTTGTGTCCGGCCATGTTTC

BAPF2350 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgagcATCCCATGGAAGGTCTGGGT

BAPF2352 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gcggataacaatttcacacaggaacagcCGACGATTCGATGAGGCTGA

CNAG_13174

BAPF2351 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

ACCCAGACCTCCATGGGATgctgagggatgtgagctgga

BAPF2347 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

CCTGCTTGAGTCACCGAAGA

BAPF2353 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

CATGATGGTCCCTCGTTAGC

BAPF2832 : guide 1 pour délétion

catacaccggcaggggtatactgttgGAAATCAGACGTCAGGACGGggggttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2833 : guide 2 pour délétion

catacaccggcaggggtatactgttgGTCTGGGTGTCATCCTTGggggttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2412 : amorce 5'5 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

gtaacgccagggttttcccagtcacgacgACATGCGTTTTGCATAGCTG

BAPF2413 : amorce 5'3 pour amplifier la région homologue en 5' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

atccacttaacgttactgaaatctccttcTTCGACACCTCTTTGGTGGT

BAPF2414 : amorce 3'5 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec MKR NEO1

tccagctcacatcctcgagcCAGCATGCAGCGTAAAGAGC

BAPF2416 : amorce 3'3 pour amplifier la région homologue en 3' de la délétion et queue de recombinaison avec pRS427

CNAG_13212

gcggataacaatttcacacaggaacagcGGGTTGGCTTGACATCGAAC

BAPF2415 : amorce MKRr pour amplifier MKR NEO1 queue de recombinaison avec la région d'homologie en 3' de la région à déléter

GCTCTTACGCTGCATGCTGgctgagaggatgtgagctgga

BAPF2411 : amorce ex5 pour vérification de la délétion

GAGTTTCATCGCTTCCCCCA

BAPF2417 : amorce ex3 pour vérification de la délétion

CATGGTTCTCCCATCAGCCA

BAPF3006 : Guide pour délétion

catacaccggcagggtatactggtgGCAATGATGCTACCCACTCGgttttagagctagaaatagcaagtt

Souches pGDP1-mNeon/pGDP1-ARNsh/pGDP1-mNeon+pGDP-ARNsh

BAPF2772 : amplification promoteur GDP1 (HindIII)

ccccctcagaggtcgacggtatcgataagcttATCGTCGCCATAAACCGTATC

BAPF2498 : amplification promoteur GDP1

ctcctcacccttgagacatTGTATTTATGCAAGTATACTC

mNeonGreen

BAPF2506 : amplification CDS du mNeonGreen

gagtatactgcataaatacaATGGTCTCCAAGGGTGAGGAG

BAPF2527 : amplification CDS du mNeonGreen

(NotI)

ctggagctccaccgcggtgcgggcGCTCGAGGTGAGTCGAAGATC

BAPF2920 : amplification promoteur GDP1 et 500 pb du CDS du mNeonGreen

ATCGATATCGTCGCCATAAACCGTATCG

BAPF2921 : amplification promoteur GDP1 et 500 pb du CDS du mNeonGreen (XbaI)

tctagaCACTTGAAGGTGGAGATGATGG

BAPF2924 : amplification du spacer (XbaI)

tctagaATAGGCGTATCACGAGGCCCTT

BAPF2920 : amplification du spacer (XbaI)

tctagaAAGCTGTGGTATGGTGCCTC

mNeonGreen-i

BAPF2504 : amplification du 500 pb du CDS du mNeonGreen en orientation inverse

GTACAATTGACATGTCCAGAATGGTCTCCAAGGGTGAGGAG

BAPF2922 : amplification du 500 pb du CDS du mNeonGreen en orientation inverse (XbaI)

ATCGATtaggatatcaattaagatgctgtttgctagtatacgtctaggcTCTAGAcacttgaaggtggagatgatgg

BAPF2503 : amplification du terminateur du mNeonGreen

CTCCTCACCTTGGAGACCATTCTGGACATGTCAATTGTAC

BAPF2923 : amplification du terminateur du mNeonGreen (SpeI)

actagtGCTCGAGGTGAGTCGAAGATCATC

URA5

BAPF2863 : Amplification partie 1 de l'allèle *ura5-insert*

TACATCCCGCTAACCGGTGT

BAPF2864 : Amplification partie 1 de l'allèle *ura5-insert*

(**BamHI**)

TGAATTGCTCGATATGGCTCACCGGggatcCGGACTTCAAGGTAAAGTTGCCGA

BAPF2865 : Amplification partie 2 de l'allèle *ura5-insert*

(**BamHI**)

**ura5
(insertion
ATCC)**

TCGGCAACTTTACCTTGAAGTCCGgatccCCGGTGAGCCATATCGAGCAATTCA

BAPF : 2866 : Amplification partie 2 de l'allèle *ura5-insert*

GACAATTCCAACGAGCTTCG

BAPF2871 : Guide ciblant *URA5* pour remplacer l'allèle par *ura5-insert*

catacaccggcagggatactgttgACTTTACCTTGAAGTCCGGCgttttagagctagaaatagcaagtt

BAF2872 : Guide ciblant l'allèle *ura5-insert*

catacaccggcagggatactgttgTACCTTGAAGTCCGGATCCCgttttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2867 : Amplification partie 1 de l'allèle *ura5-dup8pb* et *ura5-dup24pb*

TTGGATCTTGTGACAACGG

BAPF2976 : Amplification partie 1 de l'allèle *ura5-dup8pb* (**NcoI**)

ccatgGTGCACCAACCATAGTACC

BAPF2977 : Amplification partie 2 de l'allèle *ura5-dup8pb* (**NcoI**)

ccatggtgtgcaCTCTCAAGGGACGAATCGTCA

**Ura5
duplication
8 pb**

BAPF2876 : Amplification partie 2 de l'allèle *ura5-dup8pb*

GGCAGTGAAGTCAGTATTGAG

BAPF2873 : Guide ciblant *URA5* pour remplacer l'allèle par *ura5-dup8pb*

catacaccggcagggatactgttgGCATGGTGAGGGCGGTACTAgtttagagctagaaatagcaagtt

BAPF2978 : Guide ciblant l'allèle *ura5-dup8pb*

catacaccggcagggatactgttgGTATGGTTGGTGACCCATGGgttttagagctagaaatagcaagtt

**Ura5
dup24pb**

BAPF2880 : Amplification partie 1 de l'allèle *ura5-dup24pb* (**XmaI**)

cccgGTGCACCAACCATAGTACCGC

BAPF2881 : Amplification partie 2 de l'allèle *ura5-dup24pb* (XmaI)

cccgGGGCGGTACTATGGTTGGTGCA

BAPF2882 : Amplification partie 2 de l'allèle *ura5-dup24pb*

atgcgctaccgcgactagtGGCAGTGAAGTCAGTATTGAG

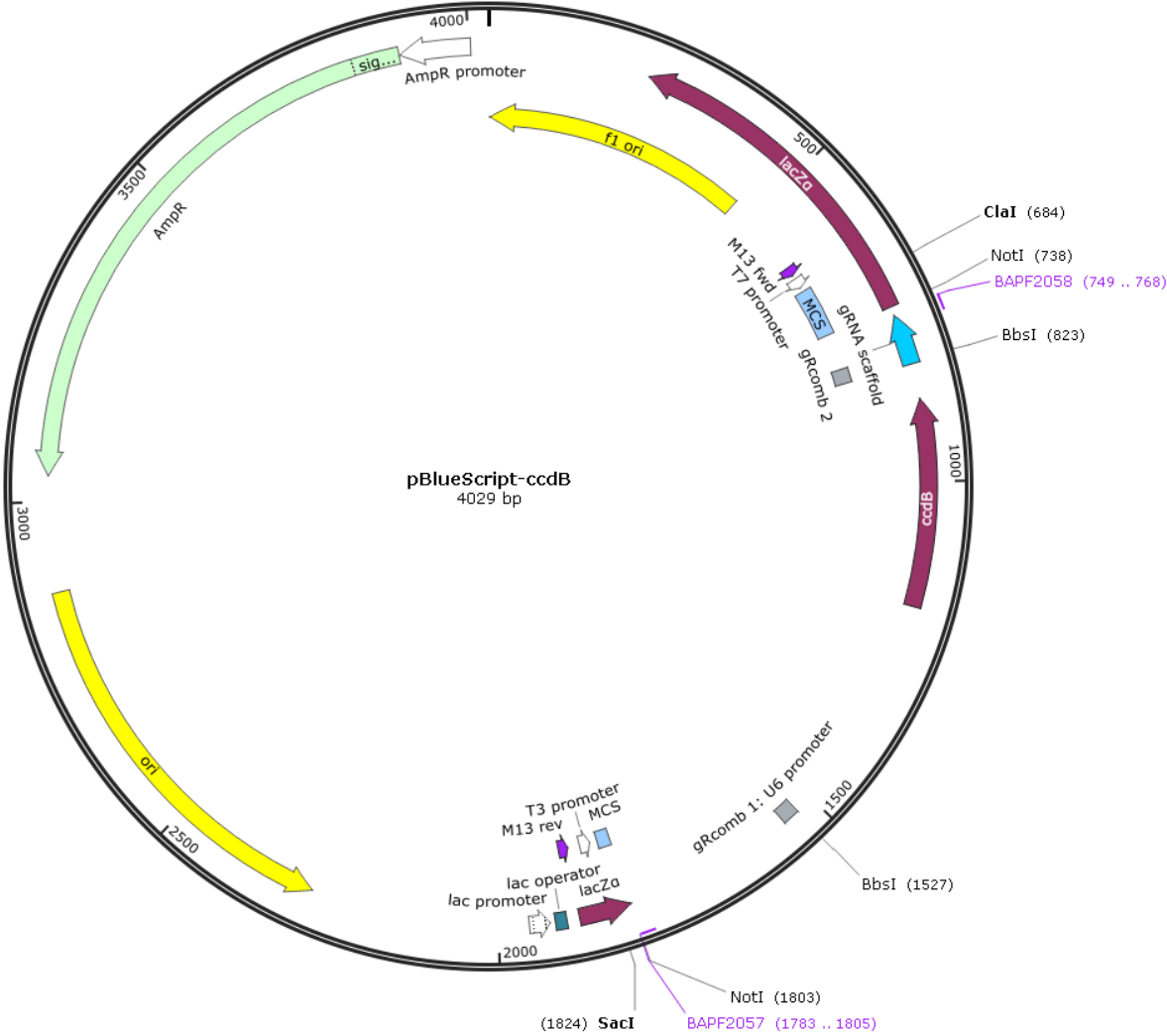
BAPF2887 : Guide ciblant l'allèle *ura5-dup24pb*

catacaccggcaggtatactgttgTACTATGGTTGGTGCACCCgttttagagctagaaatagcaagtt

Cartes des plasmides

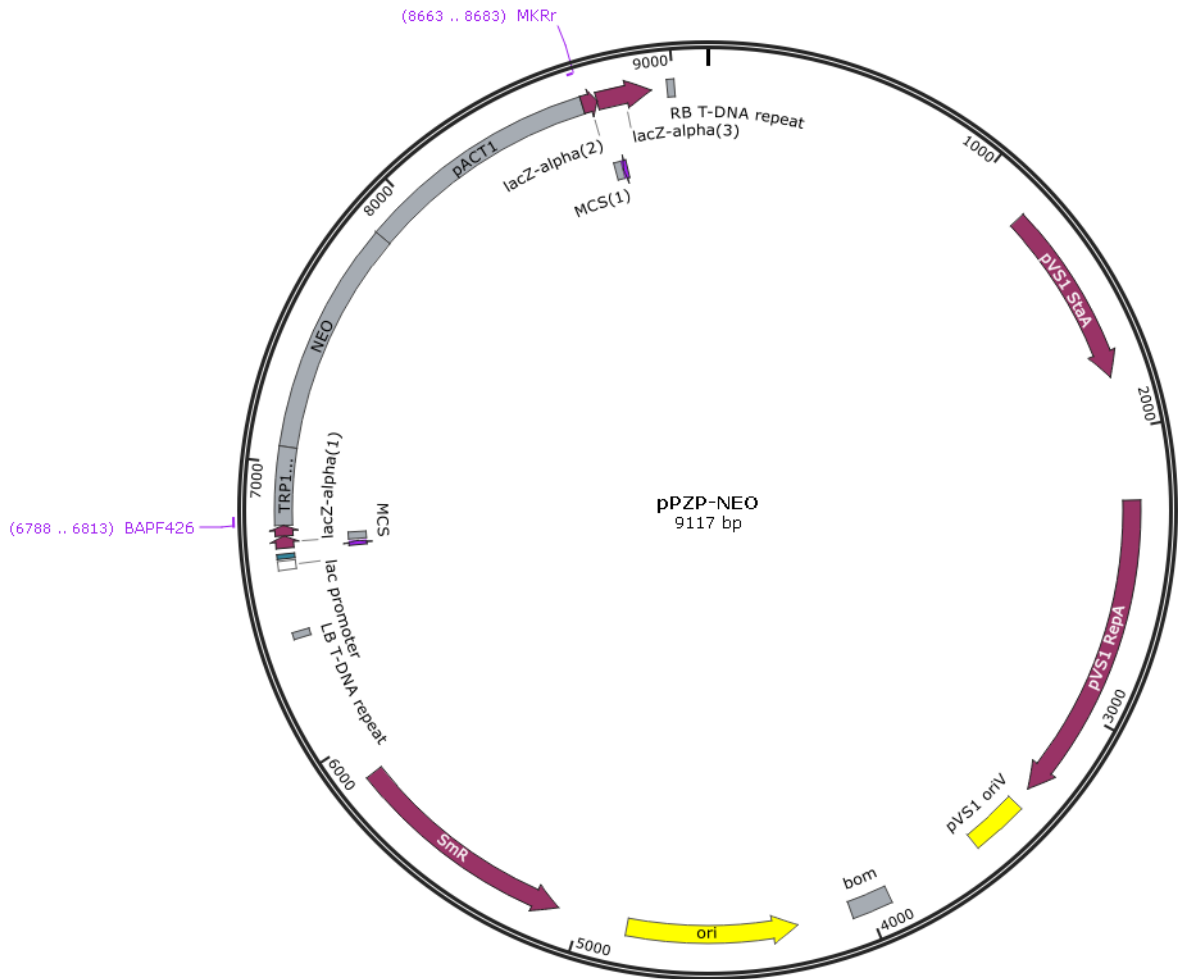
pBlueScript-ccdB

Created with SnapGene®



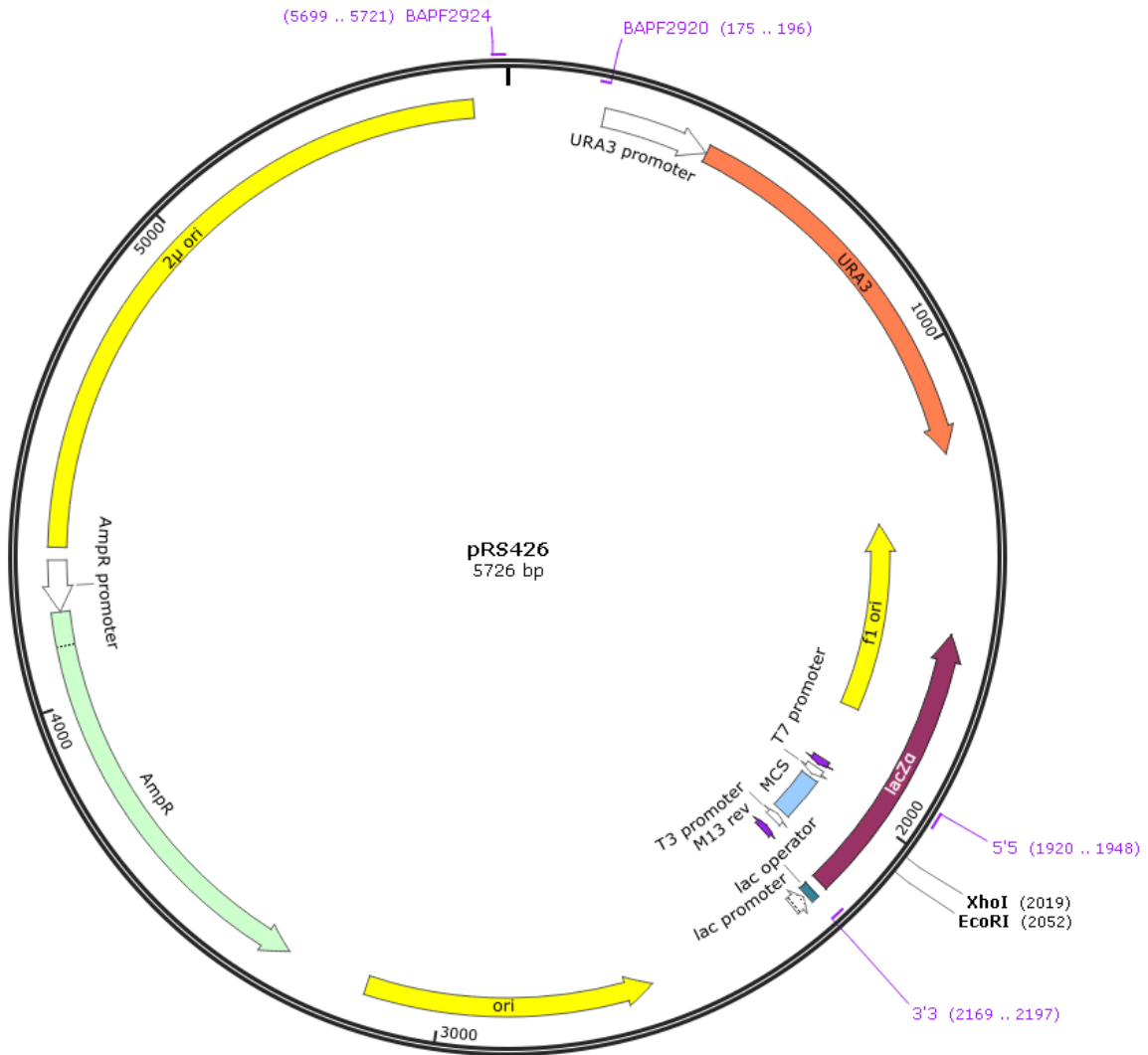
pPZP-NEO

Created with SnapGene®



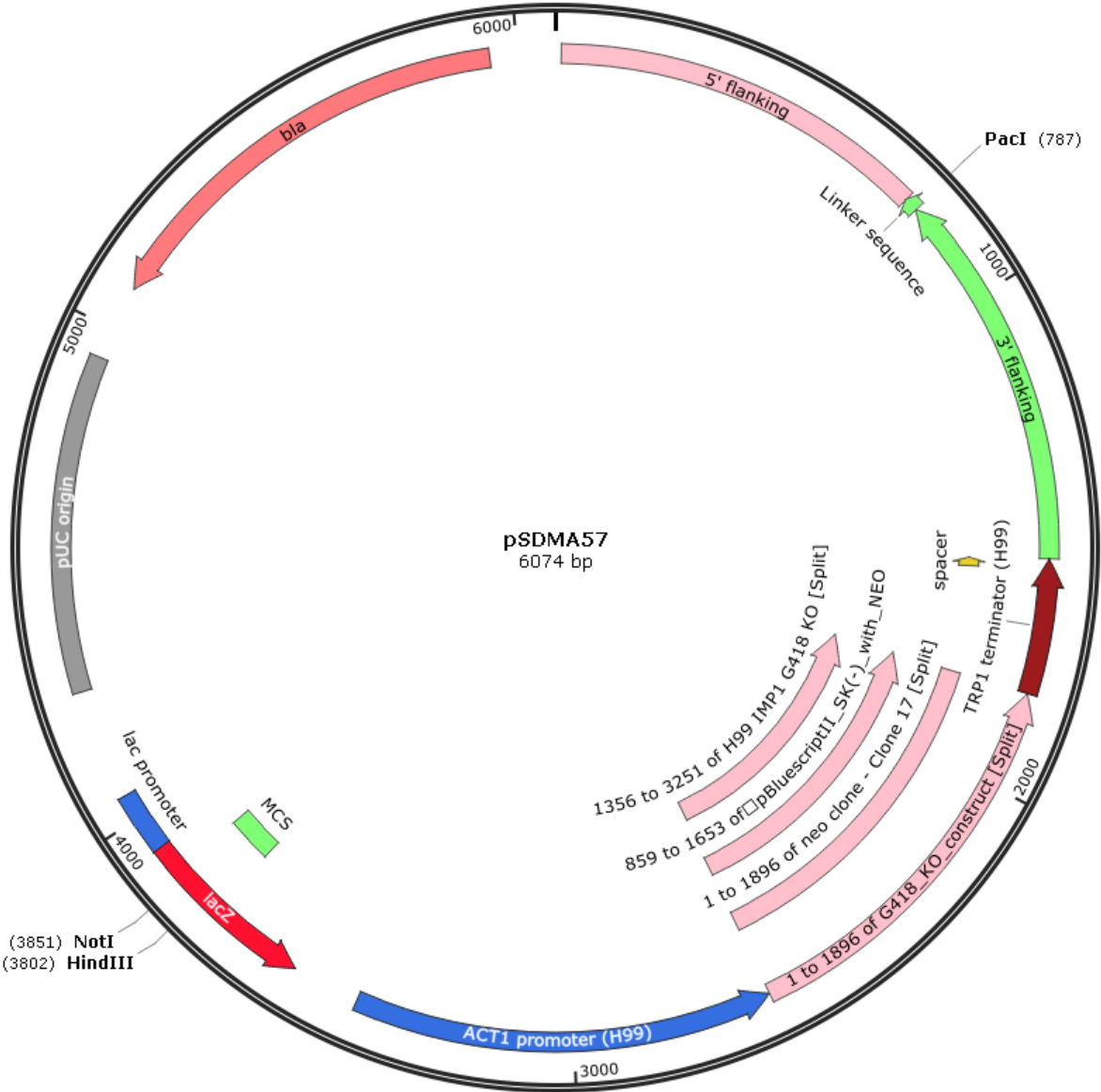
pRS426

Created with SnapGene®



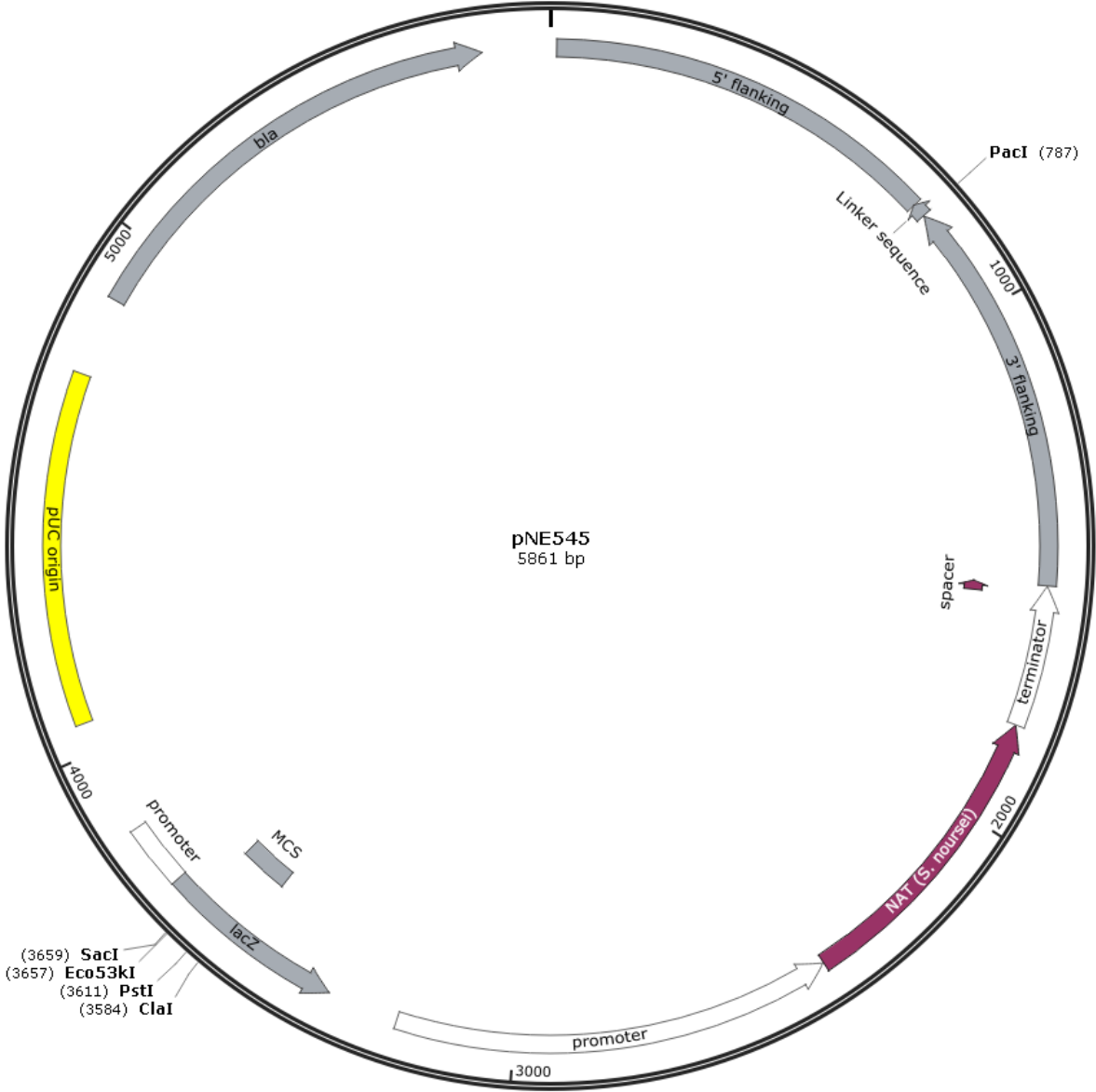
pSDMA57

Created with SnapGene®



pSDMA25

Created with SnapGene®



pBHM2404

Created with SnapGene®

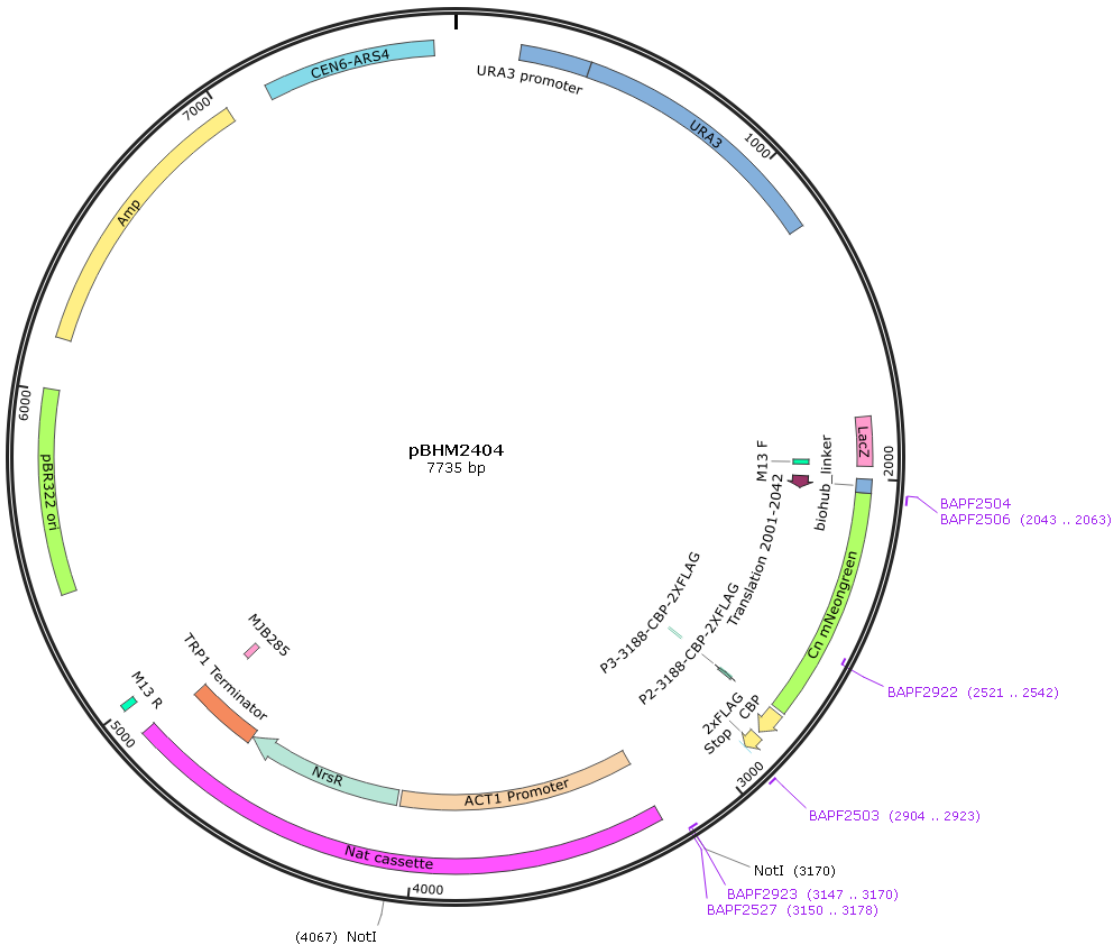


Tableau S1 : Abondance des protéines (IBAQ) en fonction des fractions d'un gradient de iodixanol

Id	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
CNAG_00009	0	0	0	0	0	349380	22291000	724270
CNAG_00010	0	0	0	0	0	0	32956	0
CNAG_00012;CNAG_06529	0	0	0	0	0	0	369610	0
CNAG_00025	0	0	0	0	0	574650	13897000	0
CNAG_00034	0	0	0	0	0	0	0	908400
CNAG_00057	0	0	0	0	0	0	281890	422400
CNAG_00062	0	0	0	0	0	0	132490	0
CNAG_00065	0	0	0	0	0	0	1550800	1675700
CNAG_00066	0	0	0	0	0	98064	5375700	263650
CNAG_00074	0	0	0	0	0	7022600	42666000	1049800
CNAG_00075	0	0	0	0	0	0	0	492840
CNAG_00077	0	0	0	0	0	0	925540	46611
CNAG_00091	1646000	804070	0	0	0	175860	1673300	24231000
CNAG_00106	0	0	0	0	0	279010	8165800	412680
CNAG_00115	0	0	0	0	0	0	100040	0
CNAG_00116	0	0	0	0	0	54200	313000	1450900
CNAG_00121	0	0	0	0	0	87986	1143200	846160
CNAG_00122	0	0	0	0	0	0	84769	0
CNAG_00130	0	0	0	0	0	0	1805700	220780
CNAG_00136	254240	0	0	0	0	0	0	54713
CNAG_00137	0	0	0	0	0	1738900	9594500	0

CNAG_00139	0	0	0	0	0	124610	2024300	2167900
CNAG_00144	0	0	0	0	0	0	624390	0
CNAG_00147	0	0	0	0	0	0	35454	36319
CNAG_00150	0	0	0	0	0	1163400	1612500	2591600
CNAG_00165	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_00176	0	0	0	0	0	32493	844940	332740
CNAG_00232	0	0	0	0	0	4612200	34046000	76970000
CNAG_00233	0	0	0	0	0	0	450260	128310
CNAG_00235	0	0	0	0	0	531830	5621200	510970
CNAG_00237	0	0	0	0	0	0	64047	79138
CNAG_00249	0	0	0	0	0	0	337190	0
CNAG_00250	0	0	0	0	0	0	0	903510
CNAG_00256	0	0	0	0	0	0	357290	664150
CNAG_00261	0	36793000	17841000	10544000	7620600	509550000	1130000000	7015500
CNAG_00274	0	0	0	0	0	0	442420	0
CNAG_00277	0	0	0	0	0	148200	3260700	0
CNAG_00293	0	0	0	0	0	24307000	117630000	11773000
CNAG_00305	0	0	0	0	0	0	343420	0
CNAG_00315	0	0	0	0	0	0	267130	0
CNAG_00316	0	0	0	0	0	0	476010	0
CNAG_00326	0	0	0	0	0	179850	12526000	305660
CNAG_00334	0	0	0	0	0	6337700	61564000	7200800
CNAG_00356	0	0	0	0	0	520430	2592200	648920
CNAG_00383	0	0	0	0	0	1166000	9853200	322310
CNAG_00388	0	0	0	0	0	308690	11757000	516070
CNAG_00393	0	0	0	0	0	0	74088	0
CNAG_00396	0	0	0	0	0	0	692360	61147

CNAG_00407	0	2729300	299230	102220	136790	14397000	60086000	40866000
CNAG_00409	0	0	0	0	0	95111	1176600	343080
CNAG_00417	0	0	0	0	0	0	817260	1745400
CNAG_00418	0	0	0	97597	0	0	5254100	6470300
CNAG_00421	0	0	0	0	0	0	252510	0
CNAG_00436	0	0	0	435100	0	0	0	458270
CNAG_00441	0	0	0	0	0	0	1776700	1535800
CNAG_00450	0	0	0	0	0	1767300	1066400	0
CNAG_00457	0	0	0	0	0	0	239640	0
CNAG_00475	0	0	0	0	0	0	0	372610
CNAG_00483	84007000	1686700	4750000	24345000	1451100	5163900	30769000	26270000
CNAG_00502	0	0	0	0	0	0	1157000	0
CNAG_00510	0	0	0	0	0	0	1057500	0
CNAG_00529	0	0	0	0	0	0	611990	0
CNAG_00531	0	0	0	0	0	196420	6383300	298320
CNAG_00532	0	0	0	0	0	214020	2136600	0
CNAG_00539	0	0	0	0	0	1331700	7528500	0
CNAG_00546	0	0	0	0	0	575530	9928300	957090
CNAG_00554	0	0	0	0	0	0	2275100	0
CNAG_00556	0	0	0	0	0	2939700	37641000	4169700
CNAG_00565	0	0	0	0	0	0	150730	0
CNAG_00568	0	0	0	0	0	0	1346000	0
CNAG_00574	0	0	0	0	0	0	516420	0
CNAG_00581	0	0	0	0	0	488670	1790800	1377300
CNAG_00584	0	0	0	0	0	0	9537000	5522600
CNAG_00587	0	0	0	0	0	0	0	6651500
CNAG_00588	0	0	0	0	0	4767200	36740000	41679000

CNAG_00595	0	0	0	0	0	0	353320	0
CNAG_00599	0	0	0	0	0	0	1336800	0
CNAG_00601	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_00609	0	0	0	0	0	0	43756	0
CNAG_00626	0	0	0	0	0	0	0	330490
CNAG_00639	0	0	0	0	0	0	0	143400
CNAG_00640	0	0	0	0	0	0	0	1003100
CNAG_00648	0	0	0	0	0	329170	5696800	237370
CNAG_00649	0	0	0	0	0	0	719800	75082
CNAG_00656	0	0	0	0	0	0	187720	466690
CNAG_00663	0	0	0	0	0	0	5437700	258600
CNAG_00668	0	0	0	0	0	30027000	255130000	19923000
CNAG_00672	0	0	0	0	0	0	579820	7490100
CNAG_00678	0	0	0	0	0	0	603210	0
CNAG_00684	0	0	0	0	0	0	2764400	0
CNAG_00691	0	0	0	0	0	2106800	8399900	596140
CNAG_00697	0	0	0	0	0	0	240910	0
CNAG_00698	0	0	0	0	0	62519	4529100	0
CNAG_00700	0	0	0	0	0	0	564090	211110
CNAG_00703	0	0	0	0	0	118360	1063600	3162000
CNAG_00716	144910	341360	0	0	0	4398200	34842000	192290000
CNAG_00717	0	0	0	0	0	0	955240	0
CNAG_00730	0	0	0	0	0	16379000	174860000	24604000
CNAG_00741	289940	0	0	0	0	0	487500	294440
CNAG_00743	0	0	0	0	0	0	0	71055
CNAG_00745	0	0	0	0	0	184970	6813000	629510
CNAG_00771	0	0	0	0	0	13662000	39391000	130940000

CNAG_00774	0	0	0	0	0	0	66843	89788
CNAG_00776	56008000	1911800000	962010000	1003900000	747200000	8186400000	19096000000	5321000000
CNAG_00777	0	0	0	0	0	0	510870	0
CNAG_00779	0	0	0	0	0	1073700	14901000	63472000
CNAG_00785	2196600	0	0	662310	0	406210	5631100	1230500
CNAG_00796	0	0	0	0	0	178540	9037900	355560
CNAG_00797	0	0	0	0	0	0	0	494580
CNAG_00799	0	0	0	0	0	0	868390	2710100
CNAG_00809	0	0	0	0	0	0	55004	0
CNAG_00811	0	0	0	0	0	0	0	69872
CNAG_00815	0	0	0	0	0	285640	3063500	194340
CNAG_00816	0	0	0	0	0	0	0	3004400
CNAG_00819	0	0	0	0	0	0	507240	2564900
CNAG_00821	0	0	0	0	0	885460	11073000	52276000
CNAG_00829	0	0	0	0	0	0	6021000	348110
CNAG_00848	0	0	0	0	0	0	0	281260
CNAG_00869	0	33550000	0	0	0	14662000	26512000	4771900
CNAG_00876	0	0	0	0	0	217540	1685900	0
CNAG_00879	0	0	0	0	0	0	0	26633
CNAG_00886	562420	0	65296	236790	0	399560	7056900	24436000
CNAG_00890	0	0	0	0	0	0	145450	0
CNAG_00891	0	0	0	0	0	0	206550	0
CNAG_00894	0	0	0	0	0	0	2174600	0
CNAG_00895	0	545870	0	303460	4423000	334040000	1858100000	59907000
CNAG_00897	0	0	0	0	0	381730	7262900	314850
CNAG_00904	0	0	0	0	0	94594	4095400	0
CNAG_00914	0	127340	0	0	0	1447500	11063000	3496500

CNAG_00930	0	0	0	0	0	0	76502	295960
CNAG_00933	0	0	0	0	0	0	0	698270
CNAG_00935	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_00977	0	0	0	103860	0	0	60329	0
CNAG_00979	0	1264600	305130	441370	344860	96445000	651510000	53539000
CNAG_00982	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_00988	0	0	0	0	0	0	104080	0
CNAG_01005	0	0	0	0	0	0	1230900	805220
CNAG_01007	0	0	0	0	0	221010	4012900	277000
CNAG_01008	0	0	0	0	0	0	341540	0
CNAG_01009	0	0	0	0	0	3153200	16570000	1285100
CNAG_01019	0	0	0	0	0	1479400	10603000	53303000
CNAG_01031	0	0	0	0	0	0	461280	0
CNAG_01035	0	0	0	0	0	0	0	90066
CNAG_01043	0	0	0	0	0	5702600	56234000	0
CNAG_01049	0	0	0	0	0	0	1041400	0
CNAG_01055	0	0	0	0	0	2128600	21766000	1180200
CNAG_01087	0	0	0	0	0	1484800	26226000	2643800
CNAG_01088	0	0	0	0	0	425930	3690100	206680
CNAG_01107	0	0	0	0	0	0	1245700	0
CNAG_01108	157820	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_01109	0	0	0	0	0	0	2400300	7923000
CNAG_01113	0	0	0	0	0	0	1208000	1692700
CNAG_01117	0	0	0	0	0	0	33034	44134
CNAG_01129	0	0	0	0	0	0	111830	0
CNAG_01137	0	0	0	0	0	0	0	52907
CNAG_01148	0	0	0	0	0	0	96694	0

CNAG_01149	0	0	0	0	0	0	220980	0
CNAG_01152	0	0	0	0	0	0	143620	3405400
CNAG_01153	0	0	0	0	0	0	0	1366500
CNAG_01164	0	0	0	0	0	0	3122900	290180
CNAG_01165	0	0	0	0	0	0	530360	0
CNAG_01170	0	0	0	0	0	0	3415700	8013500
CNAG_01174	0	0	0	0	0	959420	18327000	2625600
CNAG_01181	0	0	0	0	0	0	359700	0
CNAG_01182	610800	361580	322790	314250	188290	219580	1007800	4640600
CNAG_01197	0	0	0	0	0	0	68129	234120
CNAG_01207	0	0	0	0	0	55085	3602400	0
CNAG_01208	0	0	0	0	0	0	505050	0
CNAG_01216	0	0	0	0	0	0	1841300	1595200
CNAG_01224	0	0	0	0	0	0	866240	4238000
CNAG_01230	0	19734000	4123300	0	2268100	206100000	876450000	90787000
CNAG_01232	0	0	0	0	0	176900	8502400	541020
CNAG_01233	0	0	0	0	0	0	278670	0
CNAG_01239	0	8635200	3849000	1725200	1909000	143740000	509790000	46637000
CNAG_01255	0	0	0	0	0	0	4915900	0
CNAG_01257	0	0	0	0	0	0	239810	141570
CNAG_01262	0	0	0	0	0	206280	3541600	0
CNAG_01270	0	0	0	0	0	0	204550	57676
CNAG_01273	0	0	0	0	0	0	821930	12264000
CNAG_01274	0	0	0	0	0	0	114860	0
CNAG_01278	0	0	0	0	0	528830	7332500	1325000
CNAG_01300	0	0	0	0	0	0	3331600	10560000
CNAG_01309	0	0	0	0	0	0	390570	0

CNAG_01332	0	0	0	0	0	0	0	6290800
CNAG_01354	0	0	0	0	0	541620	5310600	84591
CNAG_01355	0	0	0	0	0	0	105040	0
CNAG_01361	0	0	0	0	0	0	437580	0
CNAG_01364	0	0	0	0	0	0	212420	0
CNAG_01371	0	0	0	0	0	0	241180	0
CNAG_01373	0	0	0	0	0	0	598210	0
CNAG_01375	0	0	0	0	0	0	53776	0
CNAG_01390	0	0	0	0	0	0	444430	0
CNAG_01395	0	0	0	0	0	0	0	397840
CNAG_01400	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_01413	0	0	0	0	0	0	205960	0
CNAG_01414	0	0	0	0	0	0	652480	0
CNAG_01415	0	0	0	0	0	0	59910	0
CNAG_01421	0	0	0	0	0	0	322030	0
CNAG_01428	0	0	0	0	0	0	8621900	11819000
CNAG_01435	0	0	0	0	0	0	86523	91100
CNAG_01448	0	0	0	0	0	0	489460	0
CNAG_01455	0	0	0	0	0	2820300	34536000	57917000
CNAG_01475	0	0	0	0	0	0	3934800	407660
CNAG_01480	0	0	0	0	0	0	1759300	2266100
CNAG_01486	0	0	0	0	0	0	0	160790
CNAG_01492	0	0	0	0	0	0	0	77715
CNAG_01523	0	0	0	0	0	0	4265300	0
CNAG_01525	0	0	0	0	0	0	430140	0
CNAG_01526	0	0	0	0	0	0	71002	0
CNAG_01535	0	0	0	0	0	348460	2966400	676330

CNAG_01539	0	0	0	0	0	0	598220	688940
CNAG_01547	0	0	0	0	0	0	0	217380
CNAG_01557	0	0	0	3001600	0	0	328910	736660
CNAG_01558	0	0	0	0	0	0	186370	0
CNAG_01562	0	671840	0	0	0	0	0	26007000
CNAG_01571	0	0	0	0	0	0	437500	0
CNAG_01577	0	0	0	0	0	0	1573600	2339600
CNAG_01590	0	0	0	0	0	0	0	1604600
CNAG_01613	0	0	0	0	0	0	13148	0
CNAG_01621	0	0	0	0	0	93889000	572310000	56424000
CNAG_01627	0	0	0	0	0	0	427710	464300
CNAG_01628	0	0	0	0	0	0	0	2501500
CNAG_01632	301550	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_01647	0	0	0	0	0	0	0	75953
CNAG_01664	0	0	0	0	0	0	655430	0
CNAG_01668	0	0	0	0	0	1073600	5022000	0
CNAG_01670	0	0	0	0	0	0	777980	0
CNAG_01678	0	0	0	0	0	51960	2293400	71332
CNAG_01681	0	0	0	0	0	0	845800	0
CNAG_01683	0	0	0	0	0	5646900	55759000	1851500
CNAG_01691	0	0	0	0	0	318780	11640000	156180
CNAG_01701	0	0	0	0	0	4154600	28894000	764870
CNAG_01704	331110	0	0	0	0	7143400	112250000	11197000
CNAG_01722	0	0	0	0	0	0	6723	0
CNAG_01727	3892100	0	0	1303900	0	15064000	142100000	25585000
CNAG_01737	0	0	0	0	0	0	175510	0
CNAG_01740	0	0	0	0	0	0	1133900	0

CNAG_01744	0	0	0	0	0	0	313770	158460
CNAG_01745	0	0	0	0	0	0	0	111760
CNAG_01750	0	0	0	0	0	0	1625000	0
CNAG_01753	0	1601700	0	0	0	1116400	6393200	17898000
CNAG_01761	0	4815700	830110	0	1572300	122170000	843130000	70634000
CNAG_01768	0	0	0	0	0	197710	5562200	0
CNAG_01777	0	0	0	0	0	0	47945	0
CNAG_01789	0	0	0	0	0	0	0	274280
CNAG_01796	0	0	0	0	0	0	392890	0
CNAG_01798	0	0	0	0	0	62371	3868300	91020
CNAG_01810	0	0	0	0	0	0	0	149550
CNAG_01811	0	0	0	0	0	0	0	421630
CNAG_01813	0	0	0	0	0	0	658650	538260
CNAG_01814	0	0	0	0	0	0	367280	0
CNAG_01820	0	0	0	0	0	46821	3531900	1871200
CNAG_01821	0	0	0	0	0	11933000	72531000	4227500
CNAG_01822	0	0	0	0	0	0	720220	829170
CNAG_01823	0	0	0	0	0	0	0	284370
CNAG_01824	0	0	0	0	0	0	1088100	80521
CNAG_01839	0	0	0	0	0	0	1193500	394930
CNAG_01840	6269400	0	0	2116400	109870	0	960410	235350
CNAG_01844	0	0	0	0	0	0	1470700	0
CNAG_01845	0	0	0	0	0	11424000	65435000	9281900
CNAG_01854	249230	3094700	0	385000	952790	64695000	193450000	65636000
CNAG_01856	0	16661000	10724000	10925000	8159200	101450000	244030000	837890
CNAG_01874	0	0	0	0	0	0	368090	0
CNAG_01884	0	0	0	0	0	0	0	108270

CNAG_01890	0	0	0	0	0	1127400	10992000	16128000
CNAG_01892	0	0	0	0	0	15726000	147520000	15546000
CNAG_01893	0	0	0	0	0	0	164720	0
CNAG_01896	0	0	0	0	0	4826100	27015000	43458000
CNAG_01918	0	0	0	0	0	0	131780	0
CNAG_01920	14406000	2409900	888810	15408000	2396000	66464000	300360000	42554000
CNAG_01925;CNAG_07869	0	0	0	0	0	0	280520	0
CNAG_01930	0	0	0	0	0	72765	589140	0
CNAG_01938	0	0	0	0	0	74886	4507900	267730
CNAG_01941	0	0	0	0	0	0	1817800	0
CNAG_01946	0	0	0	0	0	153760	1269400	0
CNAG_01951	2696000	0	0	0	0	0	739980	442090
CNAG_01958	0	0	0	0	0	118520	2159800	313980
CNAG_01961	0	0	0	0	0	0	0	822250
CNAG_01976	0	0	0	0	0	0	0	599150
CNAG_01982	0	0	0	0	0	0	457940	0
CNAG_01984	0	0	0	0	0	9363600	44495000	58190000
CNAG_01985	0	0	0	0	0	0	1081800	0
CNAG_01990	0	0	0	0	0	0	0	887590
CNAG_02029	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_02030	0	1413700	257360	135390	105030	12984000	56667000	97172000
CNAG_02035	0	0	0	0	0	2047600	11931000	7663100
CNAG_02084	0	0	0	0	0	0	402770	118190
CNAG_02090	0	0	0	0	0	889340	11501000	940290
CNAG_02091	0	0	0	0	0	0	399690	0
CNAG_02092	0	0	0	0	0	235090	8524300	612800
CNAG_02094	0	0	0	0	0	0	152280	0

CNAG_02097	0	0	0	0	0	0	0	130210
CNAG_02099	0	0	0	0	0	0	0	22516
CNAG_02100	0	0	0	0	0	0	459770	0
CNAG_02104	0	0	0	0	0	443880	11278000	0
CNAG_02108	0	0	0	0	0	0	285700	0
CNAG_02114	0	0	0	0	0	3443600	23085000	3511900
CNAG_02124	0	0	0	0	0	0	847200	0
CNAG_02128	0	0	0	0	0	0	480300	195150
CNAG_02129	0	0	0	0	0	12646000	134600000	13548000
CNAG_02133	0	0	0	0	0	125160	2655900	430750
CNAG_02139	0	0	0	0	0	0	242500	131240
CNAG_02144	0	0	0	0	0	0	0	1239000
CNAG_02156	0	0	0	0	0	6459600	34468000	1860600
CNAG_02177	0	0	0	0	0	0	144210	0
CNAG_02181	0	0	0	0	0	0	314420	0
CNAG_02182	0	0	0	0	0	92372	405330	0
CNAG_02189	0	552820	0	0	0	13647000	33157000	22607000
CNAG_02196	0	0	0	0	0	0	2326100	0
CNAG_02201	0	0	0	0	0	0	786440	4021800
CNAG_02202	0	0	0	0	0	0	969660	0
CNAG_02213	0	0	0	0	0	230630	4285500	225860
CNAG_02220	0	0	0	0	0	124440	2926500	111920
CNAG_02225	0	0	0	0	0	176830	4526800	35214000
CNAG_02234	0	0	0	0	0	0	2244100	4057200
CNAG_02237	0	0	0	0	0	20318	637880	28935
CNAG_02254	0	0	0	0	0	0	146810	0
CNAG_02257	287680	0	0	160560	0	583110	4239900	2172900

CNAG_02261	0	169740	0	0	170520	5104600	78019000	5426900
CNAG_02263	0	0	0	0	0	0	0	47955
CNAG_02280	0	0	0	0	0	0	0	516180
CNAG_02285	0	0	0	0	0	0	4121400	2019500
CNAG_02292	0	0	0	0	0	0	176990	210780
CNAG_02297	0	0	0	0	0	0	1911900	0
CNAG_02299	0	0	0	0	0	0	725500	0
CNAG_02308	0	0	0	0	0	163670	10638000	495600
CNAG_02318	0	0	0	0	0	0	461050	0
CNAG_02326	151840	0	0	0	0	0	77692	0
CNAG_02330	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_02331	640730	0	0	0	0	0	0	180360
CNAG_02336	0	0	0	0	0	0	279370	0
CNAG_02337	0	0	0	0	0	0	168280	0
CNAG_02338	0	0	0	0	0	334950	6301600	20657000
CNAG_02341	0	0	0	0	0	60650	1615900	28296
CNAG_02359	0	0	0	0	0	0	5179700	42963000
CNAG_02367	2719600	0	0	687200	0	4636300	35652000	1260500
CNAG_02377	0	0	0	0	0	0	0	130550
CNAG_02378	0	0	0	0	0	0	0	228950
CNAG_02404	0	0	0	0	0	0	0	139210
CNAG_02407	0	0	0	0	0	595450	20323000	2253800
CNAG_02415	0	0	0	0	0	1719100	9610400	504990
CNAG_02417	0	0	0	0	0	0	274520	0
CNAG_02434	0	0	0	0	0	0	2152700	1832800
CNAG_02445	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_02455	0	0	0	0	0	2362600	7634500	2197200

CNAG_02473	0	0	0	0	0	380030	16056000	741210
CNAG_02485	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_02493	0	0	0	0	0	0	1878700	0
CNAG_02503	0	0	0	0	0	624550	7551700	596040
CNAG_02505	0	0	0	0	0	113210	6469700	75463
CNAG_02506	0	0	0	0	0	0	293010	779550
CNAG_02510	0	0	0	0	0	4321500	23702000	2298000
CNAG_02524	0	0	0	0	0	0	881980	0
CNAG_02527	0	0	0	0	0	905880	28784000	847370
CNAG_02529	0	0	0	0	0	0	507170	750420
CNAG_02539	0	0	0	0	0	0	1070200	0
CNAG_02545	0	0	0	0	0	1607900	24843000	24145000
CNAG_02561	0	0	0	0	0	0	172390	0
CNAG_02568	0	0	0	0	0	0	3024200	115020
CNAG_02575	0	0	0	0	0	225510	1351100	0
CNAG_02585	0	0	0	0	0	6109000	46832000	13910000
CNAG_02655	0	0	0	0	0	0	0	168410
CNAG_02673	0	0	0	0	0	188010	550550	1336100
CNAG_02675	0	0	0	0	0	0	49807	0
CNAG_02683	0	0	0	0	0	630300	12817000	919930
CNAG_02692	0	0	0	0	0	0	396400	351430
CNAG_02714	0	0	0	0	0	0	332920	0
CNAG_02716	0	0	0	0	0	0	413640	0
CNAG_02722	0	0	0	0	0	194550	3838700	257000
CNAG_02726	0	0	0	0	0	213540	2707100	155570
CNAG_02730	0	0	0	0	0	0	75399	0
CNAG_02736	0	0	307030	0	0	0	0	0

CNAG_02748	0	0	0	0	0	0	410250	437400
CNAG_02753	0	0	0	0	0	777710	3016400	1419100
CNAG_02754	0	0	0	0	0	0	4591800	9838000
CNAG_02775	5968700	218680000	97466000	91331000	136480000	1455300000	2372000000	136620000
CNAG_02787	0	0	0	0	0	0	1112800	0
CNAG_02798	0	0	0	0	0	0	302930	0
CNAG_02801	0	0	0	0	0	5026300	27559000	24061000
CNAG_02811	0	0	0	0	0	12833000	116820000	97283000
CNAG_02817	0	0	0	0	0	2567300	15849000	2793300
CNAG_02839	0	0	0	0	0	0	336670	0
CNAG_02843	0	0	0	0	0	8948800	62485000	24903000
CNAG_02850	0	0	0	0	0	0	203740	550550
CNAG_02856	0	0	0	0	0	0	1679100	0
CNAG_02858	0	0	0	0	0	0	1730600	201060
CNAG_02860	0	0	0	0	0	0	754060	505700
CNAG_02869	0	0	0	0	0	0	443180	0
CNAG_02880	0	0	0	0	0	0	337610	0
CNAG_02883	0	0	0	0	0	1715300	13691000	0
CNAG_02896	0	0	0	0	0	0	63885	802210
CNAG_02903	0	0	0	0	0	0	74745	0
CNAG_02911	0	0	0	0	0	0	474590	0
CNAG_02915	0	0	0	0	0	0	34388	0
CNAG_02918	0	0	0	0	0	0	699300	654820
CNAG_02920	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_02924	0	0	0	0	0	0	0	1072000
CNAG_02928	0	0	0	0	0	0	0	592750
CNAG_02933	0	0	0	0	0	14380000	122940000	10575000

CNAG_02942	0	0	0	0	0	0	2490800	0
CNAG_02943	0	0	0	0	0	0	1565500	95337
CNAG_02958	0	0	0	0	0	883010	1842400	162650
CNAG_02959	0	0	0	0	0	7703600	77191000	12060000
CNAG_02964	0	0	0	0	0	0	401960	0
CNAG_02966	0	0	0	0	0	0	0	1864700
CNAG_02974	0	0	0	0	0	206070	3426900	127890
CNAG_02991	0	0	0	0	0	0	6549400	1381300
CNAG_02994	0	0	0	0	0	0	3980600	435250
CNAG_03000	0	0	0	0	0	0	360540	4663800
CNAG_03007	5967600	2100700	0	151230	214530	30656000	134400000	31930000
CNAG_03013	0	0	0	0	0	55040	1522600	0
CNAG_03015	0	0	0	0	0	0	14978000	67536000
CNAG_03024	0	0	0	0	0	0	434470	0
CNAG_03040;CNAG_00866	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_03047	0	0	0	0	0	406270	5036200	148770
CNAG_03049	0	0	0	0	0	0	367980	0
CNAG_03051	0	0	0	0	0	245650	6757900	0
CNAG_03053	0	0	0	0	0	0	0	4950700
CNAG_03058	0	0	0	0	0	0	1730400	0
CNAG_03060	0	0	0	0	0	0	543340	80803
CNAG_03061	0	0	0	0	0	0	9257800	710460
CNAG_03072	0	82950	0	0	0	2556400	21319000	32189000
CNAG_03099	0	0	0	0	0	0	206360	0
CNAG_03119	0	0	0	0	0	0	0	94128000
CNAG_03120	0	0	0	0	0	951090	16045000	3625000
CNAG_03127	0	0	0	0	0	0	1456500	2597700

CNAG_03130	0	0	0	0	0	697710	3820000	0
CNAG_03135	0	0	0	0	0	108950	3573900	0
CNAG_03142	0	0	0	0	0	0	0	6669300
CNAG_03144	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_03146	0	0	0	0	0	0	887850	1944800
CNAG_03152	0	0	0	0	0	0	4263600	201990
CNAG_03153	0	0	0	0	0	531910	12244000	4257500
CNAG_03155	0	0	0	0	0	0	2777000	70437
CNAG_03196	0	0	0	0	0	0	149530	213540
CNAG_03198	0	0	0	0	0	0	0	990410
CNAG_03215	0	0	0	0	0	0	1422900	0
CNAG_03223	0	159360000	56516000	23375000	35286000	2649000000	4699200000	837340000
CNAG_03225	0	0	0	0	0	0	0	579970
CNAG_03228	0	0	0	0	0	495360	14366000	259450
CNAG_03241	0	0	0	0	0	0	198030	0
CNAG_03245	697400	136890	303230	561780	137990	111630	219950	296320
CNAG_03249	0	0	0	0	0	0	207160	1954600
CNAG_03251	2894600	0	150790	744490	156950	32894000	110400000	13361000
CNAG_03262	0	0	0	0	0	0	112580	0
CNAG_03266	0	0	0	0	0	932080	10260000	10748000
CNAG_03268	0	0	0	0	0	9968900	16871000	0
CNAG_03281	0	0	0	0	0	0	1978700	0
CNAG_03283	0	0	0	0	0	576930	11859000	160830000
CNAG_03299	0	0	0	0	0	0	68864	0
CNAG_03303	0	0	0	0	0	0	52760000	82262000
CNAG_03308	0	0	0	0	0	28367	1108600	38478
CNAG_03311	0	0	0	0	0	0	313180	997950

CNAG_03315	0	226350	0	301660	526190	84523000	257190000	41928000
CNAG_03316	0	0	0	0	0	972770	5600100	19609000
CNAG_03319	0	0	0	0	0	113080	5475100	136020
CNAG_03320	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_03322	0	0	0	0	0	0	1998200	889440
CNAG_03325	0	0	0	0	0	0	69115	0
CNAG_03326	0	0	0	0	0	0	115050	0
CNAG_03328	0	0	0	0	0	2281200	41126000	4934000
CNAG_03358	0	0	0	0	0	1024100	7901800	8640100
CNAG_03365	0	0	0	0	0	1889700	10361000	516320
CNAG_03370	0	0	0	0	0	2975500	37629000	4069100
CNAG_03372	0	0	0	0	0	0	142620	0
CNAG_03378	286140	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_03410	0	0	0	0	0	0	178600	0
CNAG_03413	0	570210	336310	124330	110910	11709000	40758000	1420100
CNAG_03435	0	0	0	0	0	0	11767000	0
CNAG_03437	0	0	0	0	0	0	1261400	1475100
CNAG_03438	0	0	0	189570	0	62502000	279540000	12927000
CNAG_03445	0	0	0	0	0	0	122950	0
CNAG_03454	0	0	0	0	0	0	218400	0
CNAG_03463	0	0	0	0	0	2565300	11342000	902500
CNAG_03465	0	0	0	0	0	0	408710	5179900
CNAG_03476	0	0	0	0	0	0	69950	625780
CNAG_03479	0	0	0	0	0	28693	2666800	67121
CNAG_03482	0	0	0	0	0	0	679280	631170
CNAG_03485	0	0	0	0	0	6886600	65231000	4527000
CNAG_03486	0	0	0	0	0	0	0	320770

CNAG_03498	0	0	0	0	0	0	261030	0
CNAG_03502	0	0	0	0	0	54717	1436500	187510
CNAG_03503	0	0	0	0	0	0	225350	0
CNAG_03510	0	0	0	0	0	2230900	15267000	129660000
CNAG_03524	0	0	0	0	0	0	0	27259
CNAG_03528	0	0	0	0	0	0	276720	0
CNAG_03554	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_03565	0	0	0	0	0	0	892150	0
CNAG_03567	0	0	0	0	0	0	391370	0
CNAG_03577	0	0	0	0	0	0	90269	514700
CNAG_03588	0	0	0	0	0	0	148220	37219
CNAG_03591	0	0	0	0	0	369650	1996600	0
CNAG_03595	0	0	0	0	0	0	1727500	136960
CNAG_03612	0	0	0	0	0	0	470100	360840
CNAG_03621	0	0	0	0	0	2186000	20414000	7309000
CNAG_03627	0	0	0	0	0	25256000	158070000	50045000
CNAG_03638	0	0	0	0	0	33573	828900	49592
CNAG_03664	0	0	0	0	0	0	5574600	1446400
CNAG_03673	178410	0	0	87116	0	0	767190	209370
CNAG_03677	0	0	0	0	0	202930	8888900	1166600
CNAG_03682	0	0	0	0	0	1879100	37602000	10647000
CNAG_03689	0	0	0	0	0	0	102910	0
CNAG_03705	0	0	0	0	0	0	778350	845340
CNAG_03706	553230	0	0	0	0	681550	11770000	616940
CNAG_03713	0	0	0	0	0	61195	5176900	0
CNAG_03717	0	0	0	0	0	0	104900	0
CNAG_03719	0	0	0	0	0	0	269210	0

CNAG_03720	0	0	0	0	0	0	0	415970
CNAG_03725	0	0	0	0	0	856160	5886900	3745200
CNAG_03726	0	0	0	0	0	0	1370700	61335
CNAG_03739	0	0	0	0	0	0	0	392760
CNAG_03747	0	0	0	0	0	0	1171600	5313800
CNAG_03765	0	0	0	0	0	0	41231	0
CNAG_03771	0	0	0	0	0	80804	1110000	77462
CNAG_03772	0	0	0	0	0	246090	14272000	376570
CNAG_03780	0	0	0	0	0	0	0	3347300
CNAG_03786	0	0	0	0	0	0	104730	0
CNAG_03787	3969700	0	0	2089900	0	0	884420	508040
CNAG_03791	0	0	0	0	0	0	35860	0
CNAG_03793	0	0	0	0	0	0	1415000	0
CNAG_03796	0	0	0	0	0	0	210780	5250500
CNAG_03811	0	0	0	0	0	79517	2309900	0
CNAG_03815	0	0	0	0	0	213390	2576000	0
CNAG_03816	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_03819	0	0	0	0	0	0	946830	0
CNAG_03836	0	0	0	0	0	0	718590	0
CNAG_03847	0	0	0	0	0	459560	6471700	0
CNAG_03853	0	0	0	0	0	3756200	21704000	239830
CNAG_03863	0	0	0	0	0	0	173440	0
CNAG_03871	0	0	0	0	0	0	345770	0
CNAG_03876	0	0	0	0	0	0	2098300	0
CNAG_03910	0	0	0	0	0	0	1377200	0
CNAG_03915	0	0	0	0	0	0	2117000	0
CNAG_03916	0	0	0	0	0	265150	2972000	4250700

CNAG_03920	412050	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_03928	0	0	0	0	0	0	244240	0
CNAG_03936	0	0	0	0	0	11695000	77258000	7675100
CNAG_03944	0	0	0	0	0	0	428510	0
CNAG_03948	0	0	0	0	0	11131000	87349000	6556500
CNAG_03957	0	0	0	0	0	0	0	166030
CNAG_03959	0	0	0	0	0	0	178820	0
CNAG_03974	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_03983	0	0	0	0	0	4776000	27890000	25149000
CNAG_04001	0	0	149430	170700	0	0	0	0
CNAG_04002	0	0	0	0	0	0	193330	0
CNAG_04004	0	0	0	0	0	0	0	443770
CNAG_04009	0	0	0	0	0	0	0	335880
CNAG_04011	0	0	0	0	0	2381600	16791000	121220000
CNAG_04016	0	0	0	0	0	0	0	1387200
CNAG_04017	0	0	0	0	0	0	314630	939350
CNAG_04021	0	0	0	0	0	691740	6230900	111430000
CNAG_04027	0	0	0	0	0	0	1076900	921710
CNAG_04050	0	0	0	0	0	0	0	133080
CNAG_04054	0	0	0	0	0	0	780140	10378000
CNAG_04068	0	0	0	0	0	2254500	33142000	94078000
CNAG_04074	0	0	0	0	0	0	168240	0
CNAG_04098	0	0	0	0	0	33100	707550	26007
CNAG_04114	0	0	0	0	0	0	340420	261860
CNAG_04119	0	0	0	0	0	0	947050	0
CNAG_04137	0	0	0	0	0	0	164230	0
CNAG_04142	0	0	0	0	0	1299700	21023000	1052400

CNAG_04163	0	0	0	0	0	0	0	63532
CNAG_04168	0	0	0	0	0	0	444360	4799100
CNAG_04182	0	552480	737470	737440	335910	319360	187050	589990
CNAG_04192	0	0	0	0	0	0	23002	0
CNAG_04197	0	0	0	0	0	74960	1544400	24262
CNAG_04210	0	0	0	0	0	200480	5578800	0
CNAG_04213	0	0	0	0	0	0	41879	0
CNAG_04215	0	0	0	0	0	0	0	85380
CNAG_04219	1116400	11030000	11469000	9248200	12064000	13805000	7942200	1948800
CNAG_04224	0	0	0	0	0	0	2627200	52324
CNAG_04258	0	0	0	0	0	699560	7904000	0
CNAG_04259	0	0	0	0	0	0	0	151230
CNAG_04272	0	0	0	0	0	0	873970	0
CNAG_04273	0	0	0	0	0	0	0	430020
CNAG_04277	0	0	0	0	0	0	114620	0
CNAG_04281	0	0	0	0	0	3332800	34050000	2537900
CNAG_04283	0	0	0	0	0	591250	10338000	0
CNAG_04284	0	0	0	0	0	0	0	234680
CNAG_04291	0	0	0	0	0	0	1725600	11354000
CNAG_04306	0	0	0	0	0	0	5286900	0
CNAG_04312	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_04320	0	0	0	0	0	49474000	312770000	22984000
CNAG_04321	0	0	0	0	0	0	66329	0
CNAG_04323	0	0	0	0	0	0	618690	0
CNAG_04335	0	0	0	0	0	0	2806200	73199
CNAG_04350	0	0	0	0	0	0	256300	0
CNAG_04361	0	0	0	0	0	0	67683	0

CNAG_04362	0	0	0	0	0	0	178550	0
CNAG_04373	0	0	0	0	0	0	164750	966760
CNAG_04380	0	0	0	0	0	0	496770	339380
CNAG_04388	0	0	0	0	0	0	4532500	3711300
CNAG_04399	0	0	0	0	0	0	0	214690
CNAG_04401	0	0	0	0	0	349360	3530500	563060
CNAG_04439	149360	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_04443	0	0	0	0	0	0	794280	433620
CNAG_04444	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_04445	0	0	0	0	0	0	0	923630
CNAG_04448	0	0	0	0	129950	210110	2430100	26079000
CNAG_04485	0	0	0	0	0	587320	18369000	1530900
CNAG_04505	0	0	0	0	0	1394500	22992000	1850800
CNAG_04514	0	0	0	0	0	95034	1805300	158910
CNAG_04524	0	0	0	0	0	1081000	4784000	477690
CNAG_04530	0	0	0	0	0	0	3016400	0
CNAG_04566	0	0	0	0	0	1620700	8886700	2017100
CNAG_04584	0	0	0	0	0	0	317360	268230
CNAG_04601	0	0	0	0	0	101770	905220	3410200
CNAG_04606	0	0	0	0	0	78924	12021000	675930
CNAG_04609	0	0	0	0	0	0	651750	708420
CNAG_04622	0	0	0	0	0	939030	11637000	1063400
CNAG_04625	0	0	0	0	0	0	1087300	781530
CNAG_04628	0	0	0	0	0	0	431680	238150
CNAG_04637	0	0	0	0	0	0	0	8599300
CNAG_04640	0	0	0	0	0	0	1824000	2440400
CNAG_04642	0	42828	0	0	74501	37474000	261030000	24924000

CNAG_04651	0	0	0	0	0	267920	1560200	0
CNAG_04652	0	0	2147800	0	0	0	467190	734560
CNAG_04659	0	0	0	0	0	0	2160200	5495700
CNAG_04666	192750	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_04678	0	0	0	0	0	206450	1403300	161550
CNAG_04681	0	0	0	0	0	1342800	34091000	2645300
CNAG_04684	0	0	0	0	0	0	669890	76204
CNAG_04687	0	0	0	0	0	0	163180	97788
CNAG_04714	0	0	0	0	0	0	5037800	0
CNAG_04730	0	0	0	0	0	0	542740	0
CNAG_04738	0	0	0	0	0	0	74814	0
CNAG_04749	0	0	0	0	0	0	763120	371600
CNAG_04752	0	0	0	0	0	9042400	76944000	15423000
CNAG_04753	0	0	0	0	0	0	0	214360
CNAG_04755	0	0	0	0	0	0	226040	0
CNAG_04760	0	0	0	0	0	210660	4501400	416530
CNAG_04761	0	0	0	0	0	373380	2827800	259010
CNAG_04762	0	0	0	0	0	0	373280	2074100
CNAG_04765	0	0	0	0	0	0	0	201650
CNAG_04767	0	0	0	0	0	0	2464200	0
CNAG_04771	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_04776	0	0	0	0	0	0	0	283120
CNAG_04783	0	0	0	0	0	0	1126700	0
CNAG_04785	0	0	0	0	0	0	3705600	11150000
CNAG_04789	0	0	0	0	0	0	1329900	0
CNAG_04794	0	0	0	0	0	0	3433600	0
CNAG_04796	0	0	0	0	0	0	586340	0

CNAG_04799	0	0	0	0	0	780980	8058100	10285000
CNAG_04803	0	0	0	0	0	0	0	20392
CNAG_04806	0	0	0	0	0	191580	3530500	343410
CNAG_04816	0	0	0	0	0	0	2400000	0
CNAG_04840	351060	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_04849	0	0	0	0	0	55681	967900	0
CNAG_04851	138630	0	0	0	0	91829	2397300	374700
CNAG_04859	0	0	0	0	0	0	3368900	0
CNAG_04861	0	0	0	0	0	0	773500	0
CNAG_04867	0	0	0	0	0	0	112210	0
CNAG_04869	0	0	0	0	0	0	0	1029300
CNAG_04874	0	0	0	0	0	31227000	72995000	6168500
CNAG_04876	0	0	0	0	0	12326000	44936000	7457600
CNAG_04883	0	0	0	0	0	0	2844300	4638300
CNAG_04884	0	0	0	0	0	0	447410	27685000
CNAG_04891	0	0	0	0	0	0	2148100	94051000
CNAG_04904	0	0	0	0	0	0	0	21984
CNAG_04911	0	0	0	0	0	0	141650	0
CNAG_04920	0	0	0	0	0	0	616680	0
CNAG_04934	0	0	0	0	0	0	665730	0
CNAG_04938	0	0	0	0	0	0	566170	0
CNAG_04943	0	0	0	0	0	0	1377100	0
CNAG_04952	0	0	0	0	0	0	13276000	0
CNAG_04953	0	0	0	0	0	42312000	299570000	7562900
CNAG_04961	0	0	0	0	0	0	164550	299530
CNAG_04969	0	0	0	0	0	94395	1010900	3108000
CNAG_04984	0	0	0	0	0	0	721170	0

CNAG_04985	0	0	0	0	0	0	483090	3213700
CNAG_04986	0	0	0	0	0	0	0	110350
CNAG_04990	0	0	0	0	0	0	222800	0
CNAG_05036	0	0	0	0	0	1212600	17134000	272140
CNAG_05050	0	0	0	0	0	0	149940	0
CNAG_05068	2379800	0	0	894620	0	6610400	32872000	1487700
CNAG_05074	0	0	0	0	0	193270	5896700	0
CNAG_05083	0	0	0	0	0	27753	2941000	138610
CNAG_05084	0	0	0	0	0	0	40402	0
CNAG_05100	0	0	0	0	0	0	108080	0
CNAG_05110	0	0	0	0	0	0	0	182910
CNAG_05117	0	0	0	0	0	416980	9358700	470750
CNAG_05125	0	0	0	0	0	0	202080	142400
CNAG_05131	0	0	0	0	0	0	154830	0
CNAG_05134	0	0	0	0	0	0	51094	0
CNAG_05138	0	193900	0	103640	108070	17668000	89545000	10735000
CNAG_05144	0	0	0	0	0	0	736190	0
CNAG_05156	0	0	0	0	0	0	4195900	0
CNAG_05172	0	0	0	0	0	107630	6387100	176740
CNAG_05180	0	0	0	0	0	0	0	985430
CNAG_05197	0	0	0	0	0	0	0	732300
CNAG_05199	383610	0	0	182510	0	0	0	0
CNAG_05221	27925000	0	0	4136800	0	1100700	0	0
CNAG_05229	0	0	0	0	0	0	7085800	0
CNAG_05232	0	0	0	0	0	106010	1078500	15722000
CNAG_05235	28513000	0	0	10926000	181550	5651600	55258000	11338000
CNAG_05258	0	0	0	0	0	0	421950	1363500

CNAG_05260	0	0	0	0	0	37440	222840	419220
CNAG_05277	0	0	0	1078200	704180	134620000	295950000	43052000
CNAG_05287	0	0	0	0	0	0	0	348510
CNAG_05293	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_05312	0	0	0	0	0	16569000	60618000	30768000
CNAG_05314	0	0	0	0	0	0	48832	44364
CNAG_05348	0	0	0	0	0	8689700	58389000	2890800
CNAG_05351	0	0	0	0	0	0	556630	327760
CNAG_05355	0	0	0	0	0	384020	7936100	191490
CNAG_05366	0	0	0	0	0	0	0	194170
CNAG_05387	0	0	0	0	0	41982000	346440000	27724000
CNAG_05398	0	0	0	0	0	0	0	94011
CNAG_05411	0	0	0	0	0	11330000	56402000	707590
CNAG_05415	0	0	0	0	0	0	1864100	192960
CNAG_05434	0	0	0	0	0	0	11675000	8648500
CNAG_05437	0	0	0	0	0	0	2572000	12856000
CNAG_05458	0	0	0	0	0	12630000	39326000	2580200
CNAG_05459	0	0	0	0	0	880050	8849900	257710
CNAG_05465	0	0	0	0	0	0	0	378560
CNAG_05480	0	0	0	0	0	0	100940	87075
CNAG_05499	0	0	0	0	0	4484300	38296000	1912700
CNAG_05502	0	0	0	0	0	0	1019900	74864
CNAG_05521	0	0	0	0	0	1015700	5115000	5063900
CNAG_05525	0	0	0	0	0	0	1327800	5862800
CNAG_05530	0	0	0	0	0	0	1049700	307570
CNAG_05534	0	0	0	0	0	0	259590	0
CNAG_05539	0	0	0	0	0	0	378170	0

CNAG_05550	0	0	0	0	0	768550	14394000	0
CNAG_05555	0	0	0	0	0	109800	991530	6495500
CNAG_05556	0	0	0	0	0	10598000	69138000	244990000
CNAG_05558	0	0	0	0	0	0	0	639580
CNAG_05581	0	0	0	0	0	3311500	34193000	3758900
CNAG_05586	0	0	0	0	0	0	67039	0
CNAG_05595	0	2120400	0	0	1081000	36599000	141620000	23793000
CNAG_05607	0	0	0	0	0	0	596280	0
CNAG_05615	0	1553500	324050	798420	1069600	140560000	649390000	99995000
CNAG_05616	147310	0	224750	187910	0	0	0	236420
CNAG_05638	0	0	0	0	0	1473000	6717100	2311500
CNAG_05640	0	0	0	0	0	0	637510	0
CNAG_05650	0	0	0	0	0	0	1767500	84790
CNAG_05652	0	0	0	0	0	213290	2810100	50295
CNAG_05653	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_05654	0	3249200	1202500	0	0	79672000	361620000	18219000
CNAG_05662	0	0	0	0	0	2142900	32964000	2561300
CNAG_05665	0	0	0	0	0	0	1303500	0
CNAG_05678	0	0	0	0	0	6701400	73131000	5406500
CNAG_05683	0	0	0	0	0	0	483610	356520
CNAG_05696	0	0	0	0	0	614390	6530400	0
CNAG_05701	0	0	0	0	0	101910	652400	556580
CNAG_05722	0	0	0	0	0	0	0	81014
CNAG_05724	0	0	0	0	0	1094300	13348000	997230
CNAG_05731	0	0	0	0	0	238170	6900300	1765800
CNAG_05732	0	0	0	0	0	0	1185900	307670
CNAG_05734	227510	0	0	0	0	0	244920	0

CNAG_05750	571950	0	0	353420	0	0	46639	298510
CNAG_05759	0	0	0	0	0	0	53005	16777
CNAG_05769	0	0	0	0	0	470090	4708800	0
CNAG_05788	0	0	0	0	0	0	5368500	17063000
CNAG_05791	0	0	0	0	0	0	580140	0
CNAG_05799	0	15644000	3026900	1334200	6449000	238990000	787170000	204860000
CNAG_05800	0	0	0	0	0	0	1923400	26751000
CNAG_05803	0	0	0	0	0	89298	906750	0
CNAG_05812	0	0	0	0	0	133810	3531300	199330
CNAG_05814	0	0	0	0	0	0	321870	860680
CNAG_05818	0	0	0	0	0	684830	9849300	989700
CNAG_05824	0	0	0	0	0	236770	1303900	0
CNAG_05826	0	0	0	0	0	0	29474	0
CNAG_05828	0	0	0	0	0	0	464390	427260
CNAG_05831	0	0	0	0	0	0	170240	0
CNAG_05839	0	0	0	0	0	0	0	3915500
CNAG_05847	0	0	0	0	0	0	921550	134850
CNAG_05872	0	0	0	0	0	7069800	33002000	416970
CNAG_05878	271870	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_05882	0	0	0	0	0	0	278940	0
CNAG_05884	0	0	0	0	0	0	966900	40287
CNAG_05886	2829700	0	0	0	0	0	1179600	447280
CNAG_05890	0	0	0	0	0	0	2409800	321410
CNAG_05892	0	0	0	0	0	0	345890	258490
CNAG_05893	0	0	0	0	0	0	0	565960
CNAG_05900	0	0	0	0	0	0	34649	0
CNAG_05904	0	0	0	0	0	1530800	33920000	58127000

CNAG_05907	0	0	0	0	0	0	70479	260020
CNAG_05918	1019000	0	0	538140	0	0	0	92647
CNAG_05925	0	0	0	0	0	0	382110	0
CNAG_05932	0	0	0	0	0	0	419270	93474
CNAG_05933	0	0	0	0	0	0	55806	0
CNAG_05935	0	0	0	0	0	2044400	12528000	1609900
CNAG_05968	0	0	0	0	0	0	4211100	0
CNAG_05993	0	0	0	0	0	913180	12949000	390250
CNAG_05994	0	0	0	0	0	1617300	8020300	0
CNAG_05998	0	0	0	0	0	0	5508500	0
CNAG_06026	0	0	0	0	0	69328	221350	209930
CNAG_06034	0	0	0	0	0	1923900	8425200	0
CNAG_06049	2173200	92649	118740	168940	0	1367100	5180400	867800
CNAG_06060	0	0	0	0	0	1951800	15233000	1752100
CNAG_06075	181450	0	0	0	0	1141800	3825400	58916000
CNAG_06081	0	331090	166020	0	0	29647000	179700000	19602000
CNAG_06085	0	0	0	0	0	0	1188200	627490
CNAG_06093	0	0	0	0	0	0	643430	0
CNAG_06095	0	0	0	0	0	0	7563100	63741000
CNAG_06101	0	0	0	0	0	0	2159400	483870
CNAG_06104	0	0	0	0	0	0	116930	0
CNAG_06109	0	0	0	0	0	466460	8096400	8662300
CNAG_06113	360370	984000	0	0	0	146150	1541000	20564000
CNAG_06114	0	0	0	0	0	192310	3929300	0
CNAG_06122	0	0	0	0	0	0	361550	182500
CNAG_06123	0	0	0	0	0	0	54143	0
CNAG_06125	19002000	0	193020	9516100	822850	7854600	51173000	34270000

CNAG_06140	0	0	0	0	0	480390	283820	938470
CNAG_06144	0	0	0	0	0	1243600	6853200	4260900
CNAG_06147	0	0	0	0	0	0	0	222000
CNAG_06148	0	0	0	0	0	164490	9159200	299600
CNAG_06150	0	0	0	0	0	136800	5068400	1494200
CNAG_06151	0	0	0	0	0	0	139160	0
CNAG_06168	0	0	0	0	0	0	0	709560
CNAG_06170	0	0	0	0	0	0	332580	0
CNAG_06184	162100	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_06192	644350	1037400	0	0	1033100	0	562650	0
CNAG_06193	0	0	0	0	0	0	118590	0
CNAG_06196	0	0	0	0	0	0	289870	336640
CNAG_06208	0	0	0	0	0	0	4419900	702370
CNAG_06214	0	0	0	0	0	0	1562200	0
CNAG_06220	162350	0	0	0	0	438360	2701700	25675000
CNAG_06222	0	0	0	0	0	0	1479500	4723700
CNAG_06242	0	0	0	0	0	1424900	7098300	1463400
CNAG_06287	0	0	0	0	0	0	1774100	253600
CNAG_06291	0	0	0	0	0	0	5996900	130150000
CNAG_06311	0	0	0	0	0	2651500	17001000	1467600
CNAG_06313	0	0	0	0	0	80562	7412700	6400400
CNAG_06314	0	0	0	0	0	0	0	90353
CNAG_06320	0	0	0	0	0	0	593660	0
CNAG_06323	0	0	0	0	0	34943	241640	0
CNAG_06336	0	3842000	645830	2019900	1422900	119300000	468820000	41042000
CNAG_06347	0	0	0	0	0	0	20674000	34637000
CNAG_06348	0	0	0	0	0	14467	316300	0

CNAG_06377	0	0	0	0	0	0	539980	0
CNAG_06381	0	0	0	0	0	5711200	47641000	4119900
CNAG_06399	0	0	0	0	0	199680	732550	0
CNAG_06400	0	874460	97143	594170	1497800	451270000	2959400000	513220000
CNAG_06403	3616000	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_06424	0	0	0	0	0	1480100	31206000	6290600
CNAG_06432	0	0	0	0	0	0	45487	192090
CNAG_06443	903250	0	0	235130	0	0	0	0
CNAG_06447	0	0	0	0	0	0	3620800	53765000
CNAG_06450	0	0	0	0	0	83424	12804000	727010
CNAG_06453	0	0	0	0	0	0	327510	0
CNAG_06465	0	0	0	0	0	6624400	73314000	10535000
CNAG_06467	0	0	47210000	0	0	48664000	0	0
CNAG_06469	0	0	0	0	0	4173700	45885000	6072700
CNAG_06473	0	0	0	0	0	18434	1235500	0
CNAG_06489	0	0	0	0	0	365360	5875600	2727300
CNAG_06499	0	0	0	0	0	1754600	20336000	411510
CNAG_06501	0	10511000	6323900	6151000	3648300	150660000	435170000	67953000
CNAG_06508	0	0	0	0	0	23014000	187680000	33799000
CNAG_06512	0	0	0	0	0	0	114270	0
CNAG_06541	0	0	0	0	0	1053400	10244000	416860
CNAG_06544	0	0	0	0	0	0	0	6248300
CNAG_06553	0	0	0	0	0	0	173140	0
CNAG_06566	0	0	0	0	0	0	72783	372390
CNAG_06576	0	0	0	0	0	951870	5821200	51230000
CNAG_06594	0	0	0	0	0	562730	3398100	370350
CNAG_06600	390850	0	0	115210	0	0	1039300	183600

CNAG_06602	0	0	0	0	0	0	707460	0
CNAG_06605	894630	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_06606	0	0	0	0	0	5649100	23652000	4265200
CNAG_06610	0	0	0	0	0	0	287550	0
CNAG_06633	0	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_06646	0	0	0	0	0	373020	13530000	3573700
CNAG_06658	0	79948	0	0	0	10268000	44794000	4517800
CNAG_06666	0	0	0	0	0	0	0	114010
CNAG_06669	0	0	0	0	0	0	888440	0
CNAG_06673	0	0	0	0	0	0	205670	0
CNAG_06696	0	0	0	0	0	69369	1260300	0
CNAG_06699	0	0	0	0	0	3074400	36173000	83292000
CNAG_06710	0	0	0	0	0	0	542220	0
CNAG_06730	0	0	0	0	0	0	4524400	276650
CNAG_06737	3218900	511230	11763000	1358200	2185800	0	2045500	64219
CNAG_06740	0	0	0	0	0	0	1452700	129840
CNAG_06745	8408200	0	0	3474700	0	0	968170	1841900
CNAG_06746	0	0	0	0	0	736620	13177000	6062700
CNAG_06747	22042000	1225600	472920	4237700	929020	1133900	3046800	9789500
CNAG_06754	0	0	313460	319930	0	0	0	273980
CNAG_06761	0	0	0	0	0	0	244090	0
CNAG_06764	0	0	0	0	0	0	0	163470
CNAG_06770	0	0	0	0	0	1790500	8444200	11196000
CNAG_06773	0	0	0	0	0	0	78255	0
CNAG_06779	0	0	0	0	0	0	820530	0
CNAG_06785	0	0	0	0	0	98424	3605300	0
CNAG_06811	0	0	0	0	0	0	2844600	10297000

CNAG_06812	0	0	0	0	0	0	1320200	37057
CNAG_06835	0	0	0	0	0	11448000	63019000	5139000
CNAG_06840	497060	0	0	89040	0	0	1357500	1154000
CNAG_06847	0	0	0	0	0	3155500	33788000	116200000
CNAG_06849	0	0	0	0	0	0	887870	136480
CNAG_06861	0	0	116170	0	0	0	0	1579600
CNAG_06889	0	0	0	0	0	0	601000	0
CNAG_06892	0	0	0	0	0	0	88597	0
CNAG_06898	0	0	0	0	0	0	7361200	1570800
CNAG_06900	0	0	0	0	0	0	253880	1809200
CNAG_06905	0	0	0	0	0	0	620750	322270
CNAG_06906	0	0	0	0	0	0	0	415430
CNAG_06908	0	0	0	0	0	0	690470	341010
CNAG_06917	0	0	0	0	0	0	466150	0
CNAG_06923	0	0	0	0	0	0	62408	1586900
CNAG_06963	0	0	0	0	0	926730	6454400	0
CNAG_07322	0	0	0	0	0	204800	0	0
CNAG_07334	0	0	0	0	0	6939200	64163000	7757600
CNAG_07354	0	0	0	0	0	0	304490	0
CNAG_07400	0	0	0	0	0	0	0	35342
CNAG_07402	0	0	0	0	0	921420	5823500	0
CNAG_07408	0	0	0	0	0	0	107620	0
CNAG_07427	0	0	0	0	0	883140	19021000	1767100
CNAG_07445	0	0	0	0	0	384470	6264200	15753000
CNAG_07474	0	0	0	0	0	0	477160	0
CNAG_07487	0	0	0	0	0	159590	10443000	1851500
CNAG_07498	0	0	0	0	0	1404600	8229900	299840

CNAG_07499	0	0	0	0	0	1514400	8173600	845590
CNAG_07517	0	0	0	0	0	0	702410	0
CNAG_07519	0	0	0	0	0	649160	4579500	233510
CNAG_07530	0	0	0	0	0	0	2172000	74087
CNAG_07535	0	0	0	0	819830	0	0	0
CNAG_07538	0	0	0	0	0	290120	8057900	540670
CNAG_07558	0	0	0	0	0	0	1101600	577660
CNAG_07559	0	0	0	0	0	0	205100	272300
CNAG_07561	882150	0	0	287050	0	2193200	16935000	23252000
CNAG_07562	0	0	0	0	0	0	220230	0
CNAG_07570	0	0	0	0	0	1420100	6058000	261390
CNAG_07571	0	0	0	0	0	0	864490	51051
CNAG_07625	0	0	0	0	0	0	8216300	359520
CNAG_07636	0	0	0	0	0	511530	5262300	461750
CNAG_07638	0	0	0	0	0	0	17875000	0
CNAG_07659	0	94655	0	0	98464	18405000	154580000	10345000
CNAG_07667	0	0	0	0	0	45699	2515900	122560
CNAG_07668	0	0	0	0	0	1079200	11832000	0
CNAG_07701	0	0	0	0	0	2048300	49644000	2080100
CNAG_07718	0	0	0	0	0	0	22849	0
CNAG_07719	54311	0	0	0	0	0	0	0
CNAG_07736	0	0	0	0	0	0	83733	1181000
CNAG_07740	0	0	0	0	0	0	3012300	562920
CNAG_07745	0	0	0	0	0	178310	3472900	6623400
CNAG_07746	0	0	0	0	0	0	32445	0
CNAG_07770	0	0	0	0	0	2273900	20337000	1424300
CNAG_07799	0	0	0	0	0	177370	9619500	486430

CNAG_07800	0	0	0	0	0	0	338220	0
CNAG_07801	0	0	0	0	0	0	388710	0
CNAG_07807;CNAG_01648	41552000	959530	0	15388000	771830	634970	3604600	8396600
CNAG_07808	0	0	0	0	0	0	1264600	3255000
CNAG_07839	0	0	0	0	0	0	0	776300
CNAG_07842	0	0	0	0	0	0	2243500	0
CNAG_07856	0	0	0	0	0	0	102780	0
CNAG_07887	0	0	0	0	0	0	1800900	0
CNAG_07902	0	0	0	0	0	0	3156500	231550
CNAG_07903	0	0	0	0	0	0	236280	0
CNAG_07914	0	0	0	0	0	28209	1554800	0
CNAG_08018	0	0	0	0	0	0	170300	12340
CNAG_08022	0	0	0	0	0	0	337280	0
Id	F9	F10	F11	F12				
CNAG_00009	0	0	0	0				
CNAG_00010	0	0	0	0				
CNAG_00012;CNAG_06529	0	0	0	0				
CNAG_00025	0	0	0	0				
CNAG_00034	416030	0	0	0				
CNAG_00057	589720	0	0	0				
CNAG_00062	0	0	0	0				
CNAG_00065	245870	0	0	0				
CNAG_00066	0	0	0	0				
CNAG_00074	0	0	0	0				
CNAG_00075	0	0	0	0				
CNAG_00077	0	0	0	0				
CNAG_00091	0	0	0	0				

CNAG_00106	0	0	78963	0
CNAG_00115	0	0	0	0
CNAG_00116	294100	71395	0	0
CNAG_00121	180810	0	0	0
CNAG_00122	0	0	0	0
CNAG_00130	0	0	0	0
CNAG_00136	31578	0	0	0
CNAG_00137	0	0	0	0
CNAG_00139	175630	0	0	0
CNAG_00144	0	0	0	0
CNAG_00147	0	0	0	0
CNAG_00150	434620	0	0	0
CNAG_00165	75134	0	0	0
CNAG_00176	361720	0	0	0
CNAG_00232	28499000	6847200	0	3956400
CNAG_00233	0	0	0	0
CNAG_00235	0	0	0	0
CNAG_00237	0	0	0	0
CNAG_00249	0	0	0	0
CNAG_00250	0	0	0	0
CNAG_00256	311930	0	0	0
CNAG_00261	243260000	49708000	0	23901000
CNAG_00274	0	0	0	0
CNAG_00277	0	0	0	0
CNAG_00293	375240	0	0	0
CNAG_00305	0	0	0	0
CNAG_00315	0	0	0	0

CNAG_00316	0	0	0	0
CNAG_00326	0	0	0	0
CNAG_00334	1194700	0	0	30279
CNAG_00356	104940	0	0	0
CNAG_00383	0	0	0	0
CNAG_00388	0	0	0	0
CNAG_00393	0	0	0	0
CNAG_00396	0	0	0	0
CNAG_00407	9348700	2453100	0	1973000
CNAG_00409	237420	0	0	0
CNAG_00417	996920	0	0	0
CNAG_00418	5308400	578520	158630	169680
CNAG_00421	0	0	0	0
CNAG_00436	0	0	0	0
CNAG_00441	1225500	0	0	0
CNAG_00450	0	0	0	0
CNAG_00457	0	0	0	0
CNAG_00475	0	0	0	0
CNAG_00483	13868000	2419000	39880000	1553500
CNAG_00502	0	0	0	0
CNAG_00510	0	0	0	0
CNAG_00529	0	0	0	0
CNAG_00531	0	0	0	0
CNAG_00532	0	0	0	0
CNAG_00539	0	0	0	0
CNAG_00546	0	0	0	0
CNAG_00554	0	0	0	0

CNAG_00556	241330	0	0	0
CNAG_00565	0	0	0	0
CNAG_00568	0	0	0	0
CNAG_00574	0	0	0	0
CNAG_00581	0	0	0	0
CNAG_00584	0	0	0	0
CNAG_00587	0	0	0	0
CNAG_00588	9601100	5497900	0	218030
CNAG_00595	0	0	0	0
CNAG_00599	0	0	0	0
CNAG_00601	0	0	0	390290
CNAG_00609	0	0	0	0
CNAG_00626	0	0	0	0
CNAG_00639	0	0	0	0
CNAG_00640	213740	0	0	0
CNAG_00648	0	0	0	0
CNAG_00649	0	0	0	0
CNAG_00656	423450	0	0	0
CNAG_00663	0	0	0	0
CNAG_00668	0	0	0	0
CNAG_00672	7892700	355340	0	0
CNAG_00678	88916	0	0	0
CNAG_00684	563640	0	0	0
CNAG_00691	0	0	0	0
CNAG_00697	183670	0	0	0
CNAG_00698	0	0	0	0
CNAG_00700	57289	0	0	0

CNAG_00703	1838500	214050	0	0
CNAG_00716	77173000	15060000	0	6714900
CNAG_00717	0	0	0	0
CNAG_00730	2298200	0	0	0
CNAG_00741	104890	0	0	0
CNAG_00743	41686	0	0	0
CNAG_00745	0	0	0	0
CNAG_00771	61308000	27602000	0	593400
CNAG_00774	265460	0	0	0
CNAG_00776	#####	4491800000	36111000	2845800000
CNAG_00777	0	0	0	0
CNAG_00779	34867000	4724100	0	713150
CNAG_00785	196990	0	1350300	0
CNAG_00796	0	0	0	0
CNAG_00797	222930	0	0	0
CNAG_00799	930050	106890	0	0
CNAG_00809	0	0	0	0
CNAG_00811	0	0	0	0
CNAG_00815	0	0	0	0
CNAG_00816	0	0	0	0
CNAG_00819	2028300	0	0	1444400
CNAG_00821	36160000	4194800	0	2508200
CNAG_00829	0	0	0	0
CNAG_00848	0	0	0	0
CNAG_00869	40751	0	0	0
CNAG_00876	0	0	0	0
CNAG_00879	16555	0	0	0

CNAG_00886	17884000	2764000	585920	922620
CNAG_00890	0	0	0	0
CNAG_00891	0	0	0	0
CNAG_00894	0	0	0	0
CNAG_00895	26000000	10155000	3040700	7181600
CNAG_00897	0	0	0	0
CNAG_00904	0	0	0	0
CNAG_00914	1141800	360670	0	88189
CNAG_00930	405430	0	0	0
CNAG_00933	0	0	0	0
CNAG_00935	135300	0	0	0
CNAG_00977	0	0	141400	0
CNAG_00979	9043000	622770	0	553060
CNAG_00982	66440	0	0	0
CNAG_00988	0	0	0	0
CNAG_01005	0	0	0	0
CNAG_01007	0	0	0	0
CNAG_01008	0	0	0	0
CNAG_01009	0	0	0	0
CNAG_01019	5175300	2159900	0	505850
CNAG_01031	0	0	0	0
CNAG_01035	0	0	0	0
CNAG_01043	0	0	0	0
CNAG_01049	0	0	0	0
CNAG_01055	0	0	0	0
CNAG_01087	0	0	0	0
CNAG_01088	0	0	0	0

CNAG_01107	0	0	0	0
CNAG_01108	0	0	190730	0
CNAG_01109	866860	0	0	0
CNAG_01113	0	0	0	0
CNAG_01117	18674	0	0	0
CNAG_01129	0	0	0	0
CNAG_01137	27011	0	0	0
CNAG_01148	0	0	0	0
CNAG_01149	0	0	0	0
CNAG_01152	126280	0	0	0
CNAG_01153	1186700	0	0	0
CNAG_01164	0	0	0	0
CNAG_01165	0	0	0	0
CNAG_01170	2803200	226520	0	0
CNAG_01174	96034	0	0	0
CNAG_01181	956590	0	0	0
CNAG_01182	1002000	149960	559410	278580
CNAG_01197	0	0	0	93845
CNAG_01207	0	0	0	0
CNAG_01208	0	0	0	0
CNAG_01216	894240	0	0	0
CNAG_01224	312230	326330	0	0
CNAG_01230	87451000	9017700	0	6227000
CNAG_01232	0	0	0	0
CNAG_01233	0	0	0	0
CNAG_01239	88173000	25668000	0	10510000
CNAG_01255	0	0	0	0

CNAG_01257	0	0	0	0
CNAG_01262	0	0	0	0
CNAG_01270	0	0	0	0
CNAG_01273	5798300	117460	0	0
CNAG_01274	0	0	0	0
CNAG_01278	0	0	0	0
CNAG_01300	2897200	139480	0	0
CNAG_01309	0	0	0	0
CNAG_01332	2276700	284300	0	0
CNAG_01354	0	0	0	0
CNAG_01355	0	0	0	0
CNAG_01361	0	0	0	0
CNAG_01364	69770	0	0	0
CNAG_01371	0	0	0	0
CNAG_01373	0	0	0	0
CNAG_01375	0	0	0	0
CNAG_01390	0	0	0	0
CNAG_01395	229700	0	0	0
CNAG_01400	40177	0	0	0
CNAG_01413	0	0	0	0
CNAG_01414	0	0	0	0
CNAG_01415	0	0	0	0
CNAG_01421	0	0	0	0
CNAG_01428	442460	0	0	0
CNAG_01435	0	0	0	0
CNAG_01448	0	0	0	0
CNAG_01455	14931000	0	0	0

CNAG_01475	0	0	0	0
CNAG_01480	1059500	0	0	0
CNAG_01486	0	0	0	0
CNAG_01492	0	0	0	0
CNAG_01523	128960	0	0	0
CNAG_01525	0	0	0	0
CNAG_01526	37527	0	0	0
CNAG_01535	0	0	0	0
CNAG_01539	686940	0	0	0
CNAG_01547	0	0	0	0
CNAG_01557	0	0	7012500	0
CNAG_01558	0	0	0	0
CNAG_01562	1425300	0	0	0
CNAG_01571	0	0	0	0
CNAG_01577	1464300	0	0	0
CNAG_01590	643120	0	0	0
CNAG_01613	0	0	0	0
CNAG_01621	0	0	0	0
CNAG_01627	0	0	0	0
CNAG_01628	0	1113900	0	0
CNAG_01632	0	0	0	0
CNAG_01647	0	0	0	0
CNAG_01664	0	0	0	0
CNAG_01668	0	0	0	0
CNAG_01670	0	0	0	0
CNAG_01678	0	0	0	0
CNAG_01681	0	0	0	0

CNAG_01683	175800	0	0	0
CNAG_01691	0	0	0	0
CNAG_01701	0	0	0	0
CNAG_01704	922750	0	0	0
CNAG_01722	0	0	0	0
CNAG_01727	5135400	400480	3804900	269380
CNAG_01737	0	0	0	0
CNAG_01740	0	0	0	0
CNAG_01744	0	0	0	0
CNAG_01745	0	0	0	0
CNAG_01750	287280	0	0	0
CNAG_01753	0	0	0	0
CNAG_01761	9952300	1155200	0	1318200
CNAG_01768	0	0	0	0
CNAG_01777	0	0	0	0
CNAG_01789	0	0	0	0
CNAG_01796	0	0	0	0
CNAG_01798	0	0	0	0
CNAG_01810	0	0	0	0
CNAG_01811	0	0	0	0
CNAG_01813	472650	0	0	0
CNAG_01814	0	0	0	0
CNAG_01820	631050	0	0	0
CNAG_01821	0	0	0	0
CNAG_01822	0	0	0	0
CNAG_01823	0	0	0	0
CNAG_01824	0	0	0	0

CNAG_01839	0	0	0	0
CNAG_01840	1486300	72862	1946000	0
CNAG_01844	0	0	0	0
CNAG_01845	660250	0	0	0
CNAG_01854	13332000	1605200	0	1573700
CNAG_01856	26653000	17283000	0	17589000
CNAG_01874	0	0	0	0
CNAG_01884	0	0	0	0
CNAG_01890	14705000	974690	0	462120
CNAG_01892	694140	0	0	0
CNAG_01893	117640	0	0	0
CNAG_01896	15746000	2813900	0	779030
CNAG_01918	0	0	0	0
CNAG_01920	10843000	1530400	48578000	2501700
CNAG_01925;CNAG_07869	0	0	0	0
CNAG_01930	0	0	0	0
CNAG_01938	0	0	0	0
CNAG_01941	0	0	0	0
CNAG_01946	0	0	0	0
CNAG_01951	362800	0	0	0
CNAG_01958	0	0	0	0
CNAG_01961	153240	0	0	0
CNAG_01976	587140	0	0	0
CNAG_01982	0	0	0	0
CNAG_01984	37474000	8188700	219840	2795300
CNAG_01985	0	0	0	0
CNAG_01990	0	0	0	0

CNAG_02029	674560	2994100	0	0
CNAG_02030	9639100	1390100	0	3322600
CNAG_02035	6841900	346600	0	107950
CNAG_02084	97252	0	0	0
CNAG_02090	0	0	0	0
CNAG_02091	0	0	0	0
CNAG_02092	0	0	0	0
CNAG_02094	0	0	623010	0
CNAG_02097	0	0	0	0
CNAG_02099	11831	0	0	0
CNAG_02100	35047	0	0	0
CNAG_02104	0	0	0	0
CNAG_02108	0	0	0	0
CNAG_02114	152670	0	0	0
CNAG_02124	0	0	0	0
CNAG_02128	0	0	0	0
CNAG_02129	920340	0	0	0
CNAG_02133	456900	0	0	0
CNAG_02139	0	0	0	0
CNAG_02144	298620	0	0	0
CNAG_02156	0	0	0	0
CNAG_02177	0	0	0	0
CNAG_02181	164410	0	0	0
CNAG_02182	680790	0	0	0
CNAG_02189	2324900	0	0	66254
CNAG_02196	0	0	0	0
CNAG_02201	1560700	0	0	0

CNAG_02202	498330	0	0	0
CNAG_02213	0	0	0	0
CNAG_02220	0	0	0	0
CNAG_02225	12679000	2955600	0	543250
CNAG_02234	1080000	0	0	0
CNAG_02237	0	0	0	0
CNAG_02254	0	0	0	0
CNAG_02257	1085500	0	866690	0
CNAG_02261	626760	0	0	178530
CNAG_02263	0	0	0	0
CNAG_02280	0	0	0	0
CNAG_02285	1084000	0	0	0
CNAG_02292	63353	0	0	0
CNAG_02297	0	0	0	0
CNAG_02299	0	0	0	0
CNAG_02308	0	0	0	0
CNAG_02318	0	0	0	0
CNAG_02326	0	0	0	0
CNAG_02330	288860	0	0	0
CNAG_02331	165050	0	0	0
CNAG_02336	0	0	0	0
CNAG_02337	129060	0	0	0
CNAG_02338	19763000	1833300	0	420430
CNAG_02341	0	0	0	0
CNAG_02359	12489000	4631200	0	1818400
CNAG_02367	225680	0	678810	0
CNAG_02377	0	0	0	0

CNAG_02378	0	0	0	0
CNAG_02404	0	0	0	0
CNAG_02407	58866	0	0	0
CNAG_02415	0	0	0	0
CNAG_02417	0	0	0	0
CNAG_02434	0	0	0	0
CNAG_02445	62163	0	0	0
CNAG_02455	0	0	0	0
CNAG_02473	0	0	0	0
CNAG_02485	0	0	0	159670
CNAG_02493	0	0	0	0
CNAG_02503	0	0	0	0
CNAG_02505	0	0	0	0
CNAG_02506	195360	0	0	0
CNAG_02510	0	0	0	0
CNAG_02524	0	0	0	0
CNAG_02527	0	0	0	0
CNAG_02529	0	0	0	0
CNAG_02539	0	0	0	0
CNAG_02545	8465600	781550	0	257990
CNAG_02561	0	0	0	0
CNAG_02568	0	0	0	0
CNAG_02575	0	0	403170	0
CNAG_02585	1755400	175610	0	133050
CNAG_02655	0	0	0	0
CNAG_02673	661230	77545	0	0
CNAG_02675	0	0	0	0

CNAG_02683	0	0	0	0
CNAG_02692	0	0	0	0
CNAG_02714	0	0	0	0
CNAG_02716	0	0	0	0
CNAG_02722	105460	0	0	0
CNAG_02726	59727	0	0	0
CNAG_02730	0	0	0	0
CNAG_02736	0	0	0	0
CNAG_02748	255950	0	0	0
CNAG_02753	0	0	0	0
CNAG_02754	0	0	0	0
CNAG_02775	171090000	89395000	0	84422000
CNAG_02787	0	0	0	0
CNAG_02798	0	0	0	0
CNAG_02801	3505400	463770	0	214290
CNAG_02811	39914000	10149000	0	3491800
CNAG_02817	166990	0	0	0
CNAG_02839	0	0	0	0
CNAG_02843	6339800	2094600	0	1137800
CNAG_02850	188720	0	0	0
CNAG_02856	0	0	0	0
CNAG_02858	0	0	0	0
CNAG_02860	516550	140210	0	0
CNAG_02869	0	0	0	0
CNAG_02880	0	0	0	0
CNAG_02883	0	0	0	0
CNAG_02896	938450	0	0	0

CNAG_02903	620500	0	0	0
CNAG_02911	0	0	0	0
CNAG_02915	0	0	0	0
CNAG_02918	748970	0	0	0
CNAG_02920	74913	0	0	0
CNAG_02924	446920	0	0	0
CNAG_02928	451790	0	0	0
CNAG_02933	447970	0	0	0
CNAG_02942	0	0	0	0
CNAG_02943	0	0	0	0
CNAG_02958	0	0	0	0
CNAG_02959	180440	0	0	0
CNAG_02964	0	0	0	0
CNAG_02966	0	0	0	0
CNAG_02974	0	0	0	0
CNAG_02991	532950	0	0	0
CNAG_02994	0	0	0	0
CNAG_03000	0	0	0	0
CNAG_03007	6210100	1147100	0	750890
CNAG_03013	0	0	0	0
CNAG_03015	4363700	2406900	0	2514200
CNAG_03024	0	0	0	0
CNAG_03040;CNAG_00866	38054	0	281340	0
CNAG_03047	0	0	0	0
CNAG_03049	0	0	0	0
CNAG_03051	0	0	0	0
CNAG_03053	444350	0	0	0

CNAG_03058	0	0	0	0
CNAG_03060	0	0	0	0
CNAG_03061	0	0	0	0
CNAG_03072	21637000	1809000	0	1141400
CNAG_03099	0	0	0	0
CNAG_03119	0	0	0	0
CNAG_03120	91742	0	0	0
CNAG_03127	1553300	469990	0	0
CNAG_03130	0	0	0	0
CNAG_03135	0	0	0	0
CNAG_03142	0	0	0	0
CNAG_03144	140350	0	0	0
CNAG_03146	1401200	129700	0	0
CNAG_03152	0	0	0	0
CNAG_03153	628050	0	0	0
CNAG_03155	0	0	0	0
CNAG_03196	0	0	0	0
CNAG_03198	241650	0	0	0
CNAG_03215	0	0	0	0
CNAG_03223	758630000	169440000	0	63197000
CNAG_03225	274850	0	0	0
CNAG_03228	0	0	0	0
CNAG_03241	0	0	0	0
CNAG_03245	298770	0	1932100	135010
CNAG_03249	0	0	0	0
CNAG_03251	2879400	976730	258710	659710
CNAG_03262	0	0	0	0

CNAG_03266	11114000	1164100	0	107430
CNAG_03268	0	0	0	0
CNAG_03281	0	0	0	0
CNAG_03283	67043000	8269300	0	4288400
CNAG_03299	0	0	0	0
CNAG_03303	31057000	4434700	0	2569600
CNAG_03308	0	0	501690	0
CNAG_03311	1060900	72439	0	0
CNAG_03315	4164400	0	0	0
CNAG_03316	1373900	461930	0	0
CNAG_03319	28306	0	0	0
CNAG_03320	109680	0	0	0
CNAG_03322	669560	80709	0	0
CNAG_03325	0	0	0	0
CNAG_03326	0	0	0	0
CNAG_03328	0	0	0	0
CNAG_03358	6467900	171220	0	105300
CNAG_03365	0	0	0	0
CNAG_03370	523380	0	0	0
CNAG_03372	0	0	0	0
CNAG_03378	0	0	195940	0
CNAG_03410	175450	0	0	0
CNAG_03413	177140	0	0	0
CNAG_03435	212320	0	0	0
CNAG_03437	0	0	0	0
CNAG_03438	4453300	91355	0	0
CNAG_03445	0	0	0	0

CNAG_03454	380330	0	0	0
CNAG_03463	0	0	0	0
CNAG_03465	486860	0	0	0
CNAG_03476	747780	0	0	0
CNAG_03479	0	0	0	0
CNAG_03482	329040	110050	0	0
CNAG_03485	109690	0	0	0
CNAG_03486	0	0	0	0
CNAG_03498	0	0	0	0
CNAG_03502	0	0	0	0
CNAG_03503	0	0	0	0
CNAG_03510	69681000	10508000	0	3297600
CNAG_03524	0	0	0	0
CNAG_03528	0	0	0	0
CNAG_03554	16219	0	0	0
CNAG_03565	0	0	0	0
CNAG_03567	0	0	0	0
CNAG_03577	231840	0	0	0
CNAG_03588	38022	0	0	0
CNAG_03591	0	0	0	0
CNAG_03595	0	0	0	0
CNAG_03612	0	0	0	0
CNAG_03621	2495300	489940	0	0
CNAG_03627	27351000	4444600	0	506800
CNAG_03638	0	0	0	0
CNAG_03664	0	0	0	0
CNAG_03673	0	0	0	0

CNAG_03677	107720	0	0	0
CNAG_03682	3209300	0	0	0
CNAG_03689	0	0	0	0
CNAG_03705	0	0	0	0
CNAG_03706	0	0	266890	0
CNAG_03713	0	0	0	0
CNAG_03717	0	0	0	0
CNAG_03719	0	0	0	0
CNAG_03720	0	0	0	0
CNAG_03725	2648900	178880	0	70368
CNAG_03726	0	0	0	0
CNAG_03739	0	0	0	0
CNAG_03747	951850	462340	0	0
CNAG_03765	0	0	0	0
CNAG_03771	0	0	0	0
CNAG_03772	78845	0	0	0
CNAG_03780	345080	0	0	0
CNAG_03786	0	0	0	0
CNAG_03787	1438000	0	3295300	0
CNAG_03791	0	0	0	0
CNAG_03793	0	0	0	0
CNAG_03796	0	0	0	0
CNAG_03811	0	0	0	0
CNAG_03815	0	0	0	0
CNAG_03816	0	0	882540	0
CNAG_03819	0	0	0	0
CNAG_03836	0	0	0	0

CNAG_03847	0	0	0	0
CNAG_03853	133360	0	0	0
CNAG_03863	0	0	0	0
CNAG_03871	0	0	0	0
CNAG_03876	0	0	0	0
CNAG_03910	0	0	0	0
CNAG_03915	0	0	0	0
CNAG_03916	4915000	502270	0	135660
CNAG_03920	0	0	0	0
CNAG_03928	0	0	0	0
CNAG_03936	901860	0	0	0
CNAG_03944	0	0	0	0
CNAG_03948	590480	0	0	0
CNAG_03957	0	0	0	0
CNAG_03959	0	0	0	0
CNAG_03974	71955	0	0	0
CNAG_03983	14550000	2578100	0	729310
CNAG_04001	0	0	0	0
CNAG_04002	0	0	0	0
CNAG_04004	0	0	0	0
CNAG_04009	329000	0	0	0
CNAG_04011	63771000	11240000	0	4842900
CNAG_04016	0	0	0	0
CNAG_04017	0	0	0	0
CNAG_04021	35894000	11636000	0	3760100
CNAG_04027	118760	0	0	0
CNAG_04050	0	0	0	0

CNAG_04054	1620700	0	0	232280
CNAG_04068	40067000	11924000	0	4621400
CNAG_04074	0	0	0	0
CNAG_04098	0	0	0	0
CNAG_04114	0	0	0	0
CNAG_04119	0	0	0	0
CNAG_04137	0	0	0	0
CNAG_04142	0	0	0	0
CNAG_04163	0	0	0	0
CNAG_04168	3685600	0	0	269520
CNAG_04182	0	0	0	0
CNAG_04192	13533	0	0	0
CNAG_04197	0	0	0	0
CNAG_04210	0	0	0	0
CNAG_04213	0	0	0	0
CNAG_04215	0	0	0	0
CNAG_04219	565120	5290300	0	8465100
CNAG_04224	0	0	0	0
CNAG_04258	0	0	0	0
CNAG_04259	0	0	0	0
CNAG_04272	0	0	0	0
CNAG_04273	0	0	0	0
CNAG_04277	0	0	0	0
CNAG_04281	129150	0	0	0
CNAG_04283	0	0	0	0
CNAG_04284	0	0	0	0
CNAG_04291	1508700	380800	0	207080

CNAG_04306	0	0	0	0
CNAG_04312	110230	0	0	0
CNAG_04320	2277700	0	0	392860
CNAG_04321	0	0	0	0
CNAG_04323	0	0	0	0
CNAG_04335	0	0	0	0
CNAG_04350	0	0	0	0
CNAG_04361	0	0	0	0
CNAG_04362	0	0	0	0
CNAG_04373	201580	0	0	0
CNAG_04380	193320	0	0	0
CNAG_04388	1159000	0	0	0
CNAG_04399	0	0	0	0
CNAG_04401	0	0	0	0
CNAG_04439	0	0	232290	0
CNAG_04443	153640	0	0	0
CNAG_04444	0	0	1082500	0
CNAG_04445	179310	0	0	0
CNAG_04448	8818000	1278700	0	443200
CNAG_04485	0	0	0	0
CNAG_04505	0	0	0	0
CNAG_04514	0	0	0	0
CNAG_04524	0	0	0	0
CNAG_04530	0	0	2264200	0
CNAG_04566	0	0	0	0
CNAG_04584	0	0	0	0
CNAG_04601	2242200	195210	0	39680

CNAG_04606	0	0	0	0
CNAG_04609	261000	0	0	0
CNAG_04622	0	0	0	0
CNAG_04625	0	0	0	0
CNAG_04628	0	0	0	0
CNAG_04637	0	0	0	0
CNAG_04640	1636100	13597	0	0
CNAG_04642	1275800	46536	0	375550
CNAG_04651	0	0	0	0
CNAG_04652	0	0	0	0
CNAG_04659	8575600	393650	0	279910
CNAG_04666	0	0	75529	0
CNAG_04678	0	0	0	0
CNAG_04681	0	0	0	0
CNAG_04684	0	0	0	0
CNAG_04687	0	0	0	0
CNAG_04714	0	0	0	0
CNAG_04730	0	0	0	0
CNAG_04738	0	0	0	0
CNAG_04749	190730	0	0	0
CNAG_04752	0	0	0	0
CNAG_04753	0	0	0	0
CNAG_04755	0	0	0	0
CNAG_04760	0	0	0	0
CNAG_04761	0	0	0	0
CNAG_04762	832430	0	0	0
CNAG_04765	114270	0	0	0

CNAG_04767	0	0	0	0
CNAG_04771	0	0	757570	0
CNAG_04776	0	0	0	0
CNAG_04783	0	0	0	0
CNAG_04785	783530	305140	0	0
CNAG_04789	0	0	0	0
CNAG_04794	0	0	0	0
CNAG_04796	0	0	0	0
CNAG_04799	1441900	788840	0	155590
CNAG_04803	0	0	0	0
CNAG_04806	0	0	0	0
CNAG_04816	0	0	0	0
CNAG_04840	0	0	0	0
CNAG_04849	0	0	0	0
CNAG_04851	34189	0	146130	0
CNAG_04859	0	0	0	0
CNAG_04861	0	0	0	0
CNAG_04867	0	0	0	0
CNAG_04869	0	0	0	0
CNAG_04874	0	0	0	1794500
CNAG_04876	5672900	0	0	0
CNAG_04883	1485500	155790	0	0
CNAG_04884	3447100	0	0	0
CNAG_04891	1774900	550560	0	0
CNAG_04904	0	0	0	0
CNAG_04911	0	0	0	0
CNAG_04920	0	0	0	0

CNAG_04934	0	0	0	0
CNAG_04938	0	0	0	0
CNAG_04943	0	0	0	0
CNAG_04952	0	0	0	0
CNAG_04953	7715100	636900	0	2029800
CNAG_04961	146330	0	0	0
CNAG_04969	1164000	112470	0	74665
CNAG_04984	0	0	0	0
CNAG_04985	280230	0	0	0
CNAG_04986	0	0	0	0
CNAG_04990	0	0	0	0
CNAG_05036	0	0	0	0
CNAG_05050	0	0	0	0
CNAG_05068	0	0	373150	0
CNAG_05074	0	0	0	0
CNAG_05083	0	0	0	0
CNAG_05084	0	0	0	0
CNAG_05100	0	0	0	0
CNAG_05110	0	0	0	0
CNAG_05117	0	0	0	0
CNAG_05125	104620	0	0	0
CNAG_05131	0	0	0	0
CNAG_05134	0	0	0	0
CNAG_05138	2118500	201710	0	125600
CNAG_05144	0	0	0	0
CNAG_05156	11277000	0	0	5517200
CNAG_05172	0	0	0	0

CNAG_05180	0	0	0	0
CNAG_05197	0	0	0	0
CNAG_05199	0	0	0	0
CNAG_05221	4678700	0	0	0
CNAG_05229	0	0	0	0
CNAG_05232	6397800	1382600	0	495560
CNAG_05235	2911100	104170	5228300	0
CNAG_05258	2482400	158200	0	95542
CNAG_05260	201310	0	0	0
CNAG_05277	1110900	0	0	0
CNAG_05287	0	0	0	0
CNAG_05293	0	73645	0	1486600
CNAG_05312	21262000	6395400	0	2500200
CNAG_05314	0	0	0	0
CNAG_05348	633060	0	0	0
CNAG_05351	0	0	0	0
CNAG_05355	0	0	0	0
CNAG_05366	0	0	0	0
CNAG_05387	2342400	128270	0	0
CNAG_05398	293460	0	0	0
CNAG_05411	0	0	0	0
CNAG_05415	0	0	0	0
CNAG_05434	492660	260370	0	0
CNAG_05437	6710400	1252400	0	0
CNAG_05458	2969700	318730	0	623080
CNAG_05459	0	0	0	0
CNAG_05465	463020	0	0	0

CNAG_05480	0	0	0	0
CNAG_05499	218570	0	0	0
CNAG_05502	0	0	0	0
CNAG_05521	2512300	95589	0	42597
CNAG_05525	1343000	0	0	0
CNAG_05530	0	0	0	0
CNAG_05534	0	0	0	0
CNAG_05539	0	0	0	0
CNAG_05550	0	0	0	0
CNAG_05555	1100000	217470	0	118210
CNAG_05556	36941000	14487000	0	12197000
CNAG_05558	0	0	0	0
CNAG_05581	162160	0	0	0
CNAG_05586	0	0	0	0
CNAG_05595	15528000	2684500	0	2100800
CNAG_05607	0	0	0	0
CNAG_05615	7191000	603150	0	989640
CNAG_05616	0	0	376880	57686
CNAG_05638	1227700	168140	0	0
CNAG_05640	0	0	0	0
CNAG_05650	0	0	0	0
CNAG_05652	0	0	0	0
CNAG_05653	74101	0	0	0
CNAG_05654	2654200	0	0	0
CNAG_05662	233770	0	0	0
CNAG_05665	0	0	0	0
CNAG_05678	337750	0	0	0

CNAG_05683	0	0	0	0
CNAG_05696	934360	0	0	0
CNAG_05701	0	0	0	0
CNAG_05722	18150	0	0	0
CNAG_05724	0	0	0	0
CNAG_05731	0	0	0	0
CNAG_05732	0	0	0	0
CNAG_05734	0	0	0	0
CNAG_05750	421420	0	148440	0
CNAG_05759	0	0	0	0
CNAG_05769	0	0	0	0
CNAG_05788	4812400	0	0	0
CNAG_05791	0	0	98995	0
CNAG_05799	111210000	51450000	0	28971000
CNAG_05800	12359000	1425900	0	840120
CNAG_05803	0	0	0	0
CNAG_05812	0	0	0	0
CNAG_05814	342540	0	0	0
CNAG_05818	30409	0	0	0
CNAG_05824	0	0	0	0
CNAG_05826	0	0	0	0
CNAG_05828	383880	0	0	0
CNAG_05831	0	0	0	0
CNAG_05839	0	0	0	0
CNAG_05847	305820	0	0	0
CNAG_05872	631640	159790	0	0
CNAG_05878	0	0	342430	0

CNAG_05882	0	0	0	0
CNAG_05884	0	0	0	0
CNAG_05886	0	0	0	0
CNAG_05890	0	0	0	0
CNAG_05892	0	0	0	0
CNAG_05893	172380	0	0	0
CNAG_05900	0	0	0	0
CNAG_05904	51959000	5073000	0	4219300
CNAG_05907	93341	0	0	0
CNAG_05918	211570	0	0	0
CNAG_05925	0	0	0	0
CNAG_05932	0	0	0	0
CNAG_05933	0	0	0	0
CNAG_05935	0	0	0	0
CNAG_05968	0	0	0	0
CNAG_05993	0	0	0	0
CNAG_05994	0	0	0	0
CNAG_05998	0	0	0	0
CNAG_06026	330080	0	200480	0
CNAG_06034	0	0	0	0
CNAG_06049	0	0	1847800	0
CNAG_06060	93403	0	0	0
CNAG_06075	8432300	2087100	0	839000
CNAG_06081	6724600	1196700	503910	739230
CNAG_06085	645020	615290	0	77185
CNAG_06093	0	0	0	0
CNAG_06095	33194000	3653900	0	626630

CNAG_06101	94371	0	1481800	0
CNAG_06104	0	0	0	0
CNAG_06109	0	0	0	0
CNAG_06113	3005300	1188200	0	931370
CNAG_06114	0	0	0	0
CNAG_06122	0	0	0	0
CNAG_06123	0	0	0	0
CNAG_06125	25542000	2629600	10460000	728810
CNAG_06140	212840	0	0	0
CNAG_06144	291530	0	0	0
CNAG_06147	0	0	0	0
CNAG_06148	0	0	0	0
CNAG_06150	512020	35360	0	0
CNAG_06151	0	0	0	0
CNAG_06168	181170	0	0	0
CNAG_06170	417330	0	0	0
CNAG_06184	0	0	260230	0
CNAG_06192	0	0	0	0
CNAG_06193	0	0	0	0
CNAG_06196	0	0	0	0
CNAG_06208	247410	0	0	0
CNAG_06214	0	0	0	0
CNAG_06220	0	0	0	0
CNAG_06222	8446200	1936500	0	828130
CNAG_06242	0	0	0	0
CNAG_06287	0	0	0	0
CNAG_06291	13938000	1350000	0	670730

CNAG_06311	0	0	0	0
CNAG_06313	6771200	319380	0	73353
CNAG_06314	85123	0	0	0
CNAG_06320	0	0	0	0
CNAG_06323	0	0	0	0
CNAG_06336	4316900	0	0	1166900
CNAG_06347	3978900	0	0	0
CNAG_06348	0	0	0	0
CNAG_06377	0	0	0	0
CNAG_06381	257860	0	0	0
CNAG_06399	0	0	0	0
CNAG_06400	74049000	2199600	145500	9420900
CNAG_06403	0	0	2875600	0
CNAG_06424	0	0	0	0
CNAG_06432	0	0	0	0
CNAG_06443	0	0	879350	0
CNAG_06447	16866000	2375500	0	295500
CNAG_06450	0	0	0	0
CNAG_06453	0	0	0	0
CNAG_06465	264100	0	0	0
CNAG_06467	0	0	0	0
CNAG_06469	333830	0	0	13943
CNAG_06473	0	0	0	0
CNAG_06489	1138800	251260	0	0
CNAG_06499	0	0	0	0
CNAG_06501	68045000	33163000	0	16443000
CNAG_06508	2910400	0	0	15510

CNAG_06512	0	0	0	0
CNAG_06541	0	0	0	0
CNAG_06544	1508700	0	0	0
CNAG_06553	0	0	0	0
CNAG_06566	0	0	0	0
CNAG_06576	812790	0	0	0
CNAG_06594	0	0	0	0
CNAG_06600	0	0	338120	0
CNAG_06602	0	0	0	0
CNAG_06605	410680	0	0	0
CNAG_06606	198260	0	0	0
CNAG_06610	0	0	0	0
CNAG_06633	165780	0	0	0
CNAG_06646	0	0	0	0
CNAG_06658	130410	0	0	0
CNAG_06666	0	0	0	0
CNAG_06669	0	0	0	0
CNAG_06673	0	0	0	0
CNAG_06696	0	0	309970	0
CNAG_06699	76976000	10424000	0	3340500
CNAG_06710	0	0	0	0
CNAG_06730	244700	0	0	0
CNAG_06737	0	1159800	6686300	2192900
CNAG_06740	0	0	0	0
CNAG_06745	10750000	0	10916000	0
CNAG_06746	1808600	361130	0	267270
CNAG_06747	447540	0	14698000	0

CNAG_06754	0	0	890330	0
CNAG_06761	0	0	0	0
CNAG_06764	0	0	0	0
CNAG_06770	11155000	1818400	0	882600
CNAG_06773	0	0	0	0
CNAG_06779	1439400	0	0	0
CNAG_06785	0	0	0	0
CNAG_06811	2441500	0	0	0
CNAG_06812	0	0	0	0
CNAG_06835	826670	0	0	0
CNAG_06840	73746	0	1720300	0
CNAG_06847	25281000	4350600	0	5979900
CNAG_06849	279470	0	0	0
CNAG_06861	0	0	164300	370060
CNAG_06889	0	0	0	0
CNAG_06892	0	0	0	0
CNAG_06898	0	0	0	0
CNAG_06900	489590	46089	0	0
CNAG_06905	232320	0	0	0
CNAG_06906	0	0	0	0
CNAG_06908	0	369950	0	0
CNAG_06917	0	0	0	0
CNAG_06923	613040	0	0	0
CNAG_06963	0	0	0	0
CNAG_07322	0	0	0	0
CNAG_07334	141920	0	0	0
CNAG_07354	91265	0	0	0

CNAG_07400	0	0	0	0
CNAG_07402	0	0	0	0
CNAG_07408	0	0	0	0
CNAG_07427	494370	0	0	0
CNAG_07445	14720000	1108200	0	209630
CNAG_07474	0	0	0	0
CNAG_07487	0	0	0	0
CNAG_07498	0	0	0	0
CNAG_07499	0	0	0	0
CNAG_07517	0	0	0	0
CNAG_07519	0	0	0	0
CNAG_07530	0	0	0	0
CNAG_07535	0	0	0	0
CNAG_07538	0	0	0	0
CNAG_07558	0	0	0	0
CNAG_07559	54358	0	0	0
CNAG_07561	28284000	4048600	329280	1589600
CNAG_07562	0	0	0	0
CNAG_07570	0	0	0	0
CNAG_07571	72431	0	0	0
CNAG_07625	0	0	0	0
CNAG_07636	0	0	0	0
CNAG_07638	0	0	0	0
CNAG_07659	411640	118870	0	0
CNAG_07667	0	0	0	0
CNAG_07668	0	0	0	0
CNAG_07701	0	0	0	0

CNAG_07718	0	0	0	0
CNAG_07719	0	0	0	0
CNAG_07736	618670	0	0	0
CNAG_07740	0	0	0	0
CNAG_07745	4093000	208080	0	0
CNAG_07746	0	0	0	0
CNAG_07770	0	0	0	0
CNAG_07799	0	0	0	0
CNAG_07800	0	0	0	0
CNAG_07801	0	0	0	0
CNAG_07807;CNAG_01648	51464000	504290	34007000	299840
CNAG_07808	944600	0	0	0
CNAG_07839	333310	127290	0	0
CNAG_07842	0	0	0	0
CNAG_07856	0	0	0	0
CNAG_07887	0	0	0	0
CNAG_07902	0	0	0	0
CNAG_07903	0	0	0	0
CNAG_07914	0	0	0	0
CNAG_08018	0	0	0	0
CNAG_08022	0	0	0	0

Tableau S2 : Gènes ciblés par des siARN de VE chez *C. neoformans*

Gène	Nb siARN	Description
CNAG_07972	39648	Centromérique proximal
CNAG_04059	25510	ARNnc
CNAG_07683	23016	ARNnc
CNAG_02392	15946	Putative transposase or transposase fragment
CNAG_06757	15071	Putative Kyakuja-Dileera-Zisupton transposase
CNAG_07421	13230	Protéine hypothétique
CNAG_05487	11505	Putative Kyakuja-Dileera-Zisupton transposase
CNAG_06845	10590	STE/STE11/CDC15 protein kinase
CNAG_00128	8052	Putative Kyakuja-Dileera-Zisupton transposase
CNAG_07786	6810	Putative transposase or transposase fragment
CNAG_07819	6715	Putative transposase or transposase fragment
CNAG_00229	6492	Putative transposase or transposase fragment
CNAG_04590	6087	Protéine hypothétique
CNAG_03387	5877	Protéine hypothétique
CNAG_01781	5470	Protéine hypothétique
CNAG_04921	5080	ARNnc
CNAG_12519	5010	ARNnc
CNAG_05185	4670	Protéine hypothétique
CNAG_04102	4470	Putative Kyakuja-Dileera-Zisupton transposase
CNAG_01370	4045	Protéine hypothétique
CNAG_00814	3794	Transposon
CNAG_00941	3642	Non identifié
CNAG_14002	3353	Putative Kyakuja-Dileera-Zisupton transposase
CNAG_02176	3282	Putative transposase
CNAG_01367	3276	Transposon
CNAG_06955	3080	Transposon
CNAG_06705	2792	Non identifié
CNAG_05212	2724	Non identifié
CNAG_08006	2706	Non identifié
CNAG_03231	2660	Non identifié
CNAG_02711	2472	Protéine hypothétique
CNAG_06863	2310	Non identifié

CNAG_12037	2310	ARNnc
CNAG_12168	2232	ARNnc
CNAG_00903	2000	Type Harbinger
CNAG_07401	1968	Non identifié
CNAG_13138	1747	ARNnc
CNAG_07650	1708	Non identifié
CNAG_12551	1568	ARNnc
CNAG_07946	1436	Transposon
CNAG_12552	1365	ARNnc
CNAG_06704	1240	Non identifié
CNAG_00549	1150	Protéine hypothétique
CNAG_03896	969	Non identifié
CNAG_12553	934	ARNnc
CNAG_07358	875	Putative transposase
CNAG_07447	864	Non identifié
CNAG_07613	840	Non identifié
CNAG_05986	770	Non identifié
CNAG_08020	744	Non identifié
CNAG_07950	657	Non identifié
CNAG_02058	616	Non identifié
CNAG_04548	504	Non identifié
CNAG_12946	501	ARNnc
CNAG_12619	393	ARNnc
CNAG_07596	360	Non identifié
CNAG_12954	352	ARNnc
CNAG_01928	345	Non identifié
CNAG_07575	345	Non identifié
CNAG_12521	343	ARNnc
CNAG_07523	312	Non identifié
CNAG_13063	298	ARNnc
CNAG_02160	290	Non identifié
CNAG_03643	258	Non identifié
CNAG_12697	229	ARNnc
CNAG_12782	219	ARNnc
CNAG_03797	216	Putative
CNAG_06814	198	SXI1alpha
CNAG_12766	198	ARNnc
CNAG_03407	190	Non identifié
CNAG_05083	170	Non identifié
CNAG_04331	156	Non identifié
CNAG_07633	145	Non identifié
CNAG_00878	138	Non identifié
CNAG_12415	132	ARNnc

CNAG_06954	130	Non identifié
CNAG_07429	116	Non identifié
CNAG_12763	114	ARNnc
CNAG_02429	111	CNIRT3
CNAG_05670	102	CNIRT3, transposon
CNAG_02707	100	Non identifié
CNAG_07357	94	Non identifié
CNAG_04139	93	Non identifié
CNAG_12851	90	Non identifié
CNAG_01065	84	Non identifié
CNAG_06102	84	Non identifié
CNAG_03763	80	Non identifié
CNAG_13044	80	Non identifié
CNAG_12009	79	LTR14
CNAG_12805	79	Non identifié
CNAG_07620	78	Non identifié
CNAG_07789	78	Non identifié
CNAG_12217	78	Non identifié
CNAG_12853	77	Non identifié
CNAG_05331	72	Non identifié
CNAG_07380	72	Non identifié
CNAG_04562	71	Non identifié
CNAG_13056	71	Non identifié
CNAG_06958	70	Non identifié
CNAG_07998	69	Protéine hypothétique
CNAG_05799	66	Non identifié
CNAG_04100	65	Non identifié
CNAG_04597	65	Non identifié
CNAG_12209	64	Protéine hypothétique
CNAG_12877	64	Non identifié
CNAG_04583	63	Non identifié
CNAG_12566	63	Protéine hypothétique
CNAG_02253	62	Non identifié
CNAG_12435	62	Protéine hypothétique
CNAG_12387	61	Non identifié
CNAG_02972	58	Non identifié
CNAG_02719	56	Non identifié
CNAG_12056	56	Non identifié
CNAG_06877	55	Protéine hypothétique
CNAG_12019	54	Non identifié
CNAG_12064	54	Non identifié
CNAG_12943	54	Non identifié
CNAG_05357	53	Non identifié

CNAG_06956	52	Non identifié
CNAG_01787	50	Non identifié
CNAG_07393	50	Non identifié
CNAG_00539	49	Non identifié
CNAG_04243	49	Non identifié
CNAG_07528	46	Non identifié
CNAG_12747	46	Protéine hypothétique
CNAG_12960	46	Protéine hypothétique
CNAG_00080	45	Non identifié
CNAG_07729	45	Non identifié
CNAG_12443	44	Protéine hypothétique
CNAG_05436	43	CNIRT2
CNAG_00886	42	Non identifié
CNAG_01421	42	Non identifié
CNAG_01052	40	Non identifié
CNAG_01368	40	Non identifié
CNAG_13095	40	Non identifié
CNAG_13134	40	Non identifié
CNAG_00376	39	CNIRT2
CNAG_07026	39	Non identifié
CNAG_07493	39	Non identifié
CNAG_12959	35	Non identifié
CNAG_00859	33	Non identifié
CNAG_00668	30	Non identifié
CNAG_01984	30	Non identifié
CNAG_12780	30	Non identifié
CNAG_06843	29	Non identifié
CNAG_12520	29	Protéine hypothétique
CNAG_02841	28	Non identifié
CNAG_04891	28	Non identifié
CNAG_06611	27	Non identifié
CNAG_04099	26	Protéine hypothétique
CNAG_05966	26	Non identifié
CNAG_06807	26	Non identifié
CNAG_12111	26	Protéine hypothétique
CNAG_12182	26	Protéine hypothétique
CNAG_12843	25	Protéine hypothétique
CNAG_12550	23	Rétrotransposon
CNAG_06375	22	Non identifié
CNAG_01761	21	Non identifié
CNAG_12271	21	Non identifié
CNAG_01087	20	Non identifié
CNAG_07753	20	Non identifié

CNAG_07894	20	Non identifié
CNAG_12675	20	Non identifié
CNAG_05453	17	CNIRT3
CNAG_00336	16	Non identifié
CNAG_01102	16	Non identifié
CNAG_03739	16	Non identifié
CNAG_04556	16	Non identifié
CNAG_07955	16	Non identifié
CNAG_13096	16	Non identifié
CNAG_05592	15	Non identifié
CNAG_07767	15	Non identifié
CNAG_12582	15	Codant
CNAG_13142	15	Non identifié
CNAG_12572	14	Non identifié
CNAG_12438	13	Non identifié
CNAG_12958	13	Non identifié
CNAG_00116	12	Non identifié
CNAG_07746	12	Non identifié
CNAG_10008	12	Non identifié
CNAG_12451	12	Non identifié
CNAG_12193	11	Non identifié
CNAG_07724	10	Non identifié
CNAG_12388	10	Non identifié
CNAG_12657	10	Non identifié

Tableau S3 : Analyse d'expression différentielle entre le transcriptome des petits ARN des VE et des cellules

Id	CELL1	CELL2	CELL3	EV1	EV2	EV3	CELL	EV	Variation	padj	Famille
1.tRNA14-AlaTGC-3'	111	104	100	149	169	410	84	324	2.446	0.00519235864630425	tRF
1.tRNA16-LeuAAG-5'	261	69	249	611	560	471	130	732	4.199	1.69995296073028e-07	tRF
1.tRNA17-LeuAAG-5'	281	62	246	643	555	463	131	742	4.265	1.69995296073028e-07	tRF
1.tRNA18-AlaAGC-3'	56	45	70	129	152	401	43	304	4.101	3.99475944827174e-06	tRF
1.tRNA1-ThrTGT-3'	129	74	149	202	248	188	86	281	2.473	0.00146704454144028	tRF
1.tRNA1-ThrTGT-5'	151	32	111	283	424	55	66	329	2.492	0.00704842420536293	tRF
1.tRNA4-AlaAGC-3'	642	379	518	758	1663	531	385	1256	2.379	0.00174028452539119	tRF
1.tRNA5-AlaAGC-3'	47	39	33	100	114	312	32	235	3.981	2.86793068523993e-05	tRF
1.tRNA6-SerCGA-5'	44	41	76	242	242	144	41	278	4.556	1.11102909734037e-06	tRF
1.tRNA7-AlaAGC-3'	41	33	40	110	116	317	30	243	4.709	2.38483004814639e-06	tRF
1.tRNA9-LeuAAG-3'	181	141	157	413	671	228	125	566	3.202	1.65484465541442e-05	tRF
1.tRNA9-LeuAAG-5'	325	74	245	646	597	481	144	768	4.022	2.8404309438005e-07	tRF
12.tRNA3-LysCTT-3'	56	33	57	106	84	72	36	118	2.269	0.00984190844568975	tRF
13.tRNA3-CysGCA-3'	55	78	34	112	142	170	49	187	2.858	0.00116673882433142	tRF

13.tRNA3-CysGCA-5'	194	231	198	1150	1045	1145	172	1490	7.289	5.23885454180149e-10	tRF
13.tRNA4-CysGCA-3'	83	63	42	133	153	146	50	191	2.8	0.000734088843451748	tRF
13.tRNA4-CysGCA-5'	188	221	203	1117	1050	1104	168	1457	7.303	3.43927528546545e-10	tRF
14.tRNA3-LeuCAA-5'	183	47	127	189	245	117	81	241	2.21	0.00965503858943705	tRF
2.tRNA10-CysGCA-3'	72	88	46	137	171	166	59	209	2.741	0.00121270665000139	tRF
2.tRNA10-CysGCA-5'	218	228	211	1213	1079	1121	178	1524	7.059	3.73830403373677e-10	tRF
2.tRNA1-SerTGA-5'	274	83	257	779	392	331	140	687	3.213	2.86211063449269e-05	tRF
2.tRNA2-LeuTAA-3'	65	40	40	77	108	45	37	100	2.004	0.0298952636550441	tRF
2.tRNA4-ThrCGT-5'	45	34	26	159	145	100	28	180	4.527	1.10492464363901e-06	tRF
2.tRNA5-SerGCT-3'	152	88	161	202	281	338	98	361	2.712	0.000303272588094473	tRF
3.tRNA2-AlaAGC-3'	37	43	28	120	127	336	30	261	5.123	3.72709102400262e-06	tRF
3.tRNA6-LeuAAG-3'	157	130	130	347	568	213	110	487	3.218	1.35063183563219e-05	tRF
3.tRNA6-LeuAAG-5'	287	61	249	633	572	444	132	735	4.154	3.28614345662119e-07	tRF
4.tRNA10-IleAAT-3'	43	72	61	126	123	62	50	138	2.058	0.0303921320816454	tRF
4.tRNA12-ValAAC-3'	69	83	63	171	187	98	60	201	2.51	0.00268393431263594	tRF
4.tRNA15-TrpCCA-3'	36	42	42	122	246	237	33	262	6.202	6.06755661412377e-09	tRF
4.tRNA9-PheGAA-3'	28	17	26	78	80	88	18	109	3.935	1.32146575474358e-05	tRF
5.tRNA16-TrpCCA-3'	38	34	31	133	211	249	28	260	7.312	2.43893478921487e-09	tRF
5.tRNA1-ProAGG-3'	332	127	407	643	1394	1444	201	1508	5.652	8.14430834840122e-10	tRF
5.tRNA8-PheGAA-3'	279	185	326	573	924	593	197	908	3.47	1.83357506739539e-06	tRF

5.tRNA9-PheGAA-3'	45	43	48	176	185	178	36	239	4.785	2.8404309438005e-07	tRF
6.tRNA10-TrpCCA-3'	50	60	69	178	219	289	48	303	4.546	5.51645039459434e-07	tRF
6.tRNA5-ProTGG-3'	184	106	175	539	909	862	115	1007	7.102	3.63426795552341e-12	tRF
6.tRNA6-PheGAA-3'	44	56	45	168	181	190	41	239	4.303	2.65352337990039e-06	tRF
6.tRNA7-PheGAA-3'	42	34	37	183	186	161	30	235	5.956	1.55131240663628e-08	tRF
6.tRNA8-AlaCGC-3'	71	67	46	126	224	62	50	177	2.528	0.00174028452539119	tRF
6.tRNA9-MetCAT-3'	103	94	87	422	404	306	76	503	4.979	4.6963995040478e-08	tRF
7.tRNA11-LeuAAG-3'	180	112	167	420	650	230	115	563	3.338	1.1324657085312e-05	tRF
7.tRNA11-LeuAAG-5'	278	99	230	653	577	440	142	745	3.839	3.99738134111158e-07	tRF
7.tRNA15-MetCAT-3'	55	36	54	193	224	175	36	261	5.255	2.22931506894319e-08	tRF
7.tRNA16-LysTTT-3'	65	35	45	99	92	65	36	114	2.262	0.00945404096157344	tRF
7.tRNA6-AlaAGC-3'	41	49	35	122	132	339	35	265	4.478	9.2343789202595e-06	tRF
7.tRNA7-ThrAGT-3'	53	46	49	88	141	71	39	130	2.428	0.00370085853169478	tRF
7.tRNA8-MetCAT-3'	61	57	58	210	220	166	47	264	4.029	2.089836642608e-06	tRF
8.tRNA10-ArgTCT-5'	25	17	20	143	98	93	16	151	6.585	5.15557927112916e-08	tRF
8.tRNA12-ProAGG-3'	333	184	454	680	1579	1565	234	1652	5.296	7.60659296799648e-10	tRF
8.tRNA1-ProAGG-3'	369	156	426	643	1426	1502	224	1547	5.051	4.60135511318651e-09	tRF
8.tRNA2-LeuCAA-5'	210	57	131	197	249	116	91	246	2.064	0.0183603866404455	tRF
8.tRNA4-HisGTG-3'	133	98	113	164	279	107	89	237	2.053	0.0170149971028202	tRF
9.tRNA10-IleAAT-3'	46	68	44	123	153	55	45	145	2.34	0.00808476864674393	tRF

9.tRNA11-IleAAT-3'	46	68	59	114	140	52	48	134	2.039	0.0304784383679542	tRF
9.tRNA12-ProAGG-3'	321	151	442	625	1460	1452	216	1529	5.278	1.47163300876224e-09	tRF
9.tRNA13-ThrAGT-3'	54	44	47	120	134	80	38	147	2.722	0.000905255981914516	tRF
9.tRNA14-LeuCAA-5'	186	36	126	198	234	96	77	232	2.175	0.0150021104290099	tRF
9.tRNA16-LeuAAG-5'	264	63	251	666	588	442	129	757	4.338	1.8419437903869e-07	tRF
9.tRNA17-GlnTTG-3'	92	27	63	78	154	132	42	158	2.593	0.0018953241797011	tRF
9.tRNA3-ThrAGT-3'	43	36	50	113	137	76	33	143	2.902	0.000450466370835685	tRF
9.tRNA4-IleAAT-3'	61	44	57	113	133	58	41	134	2.248	0.0100710866299299	tRF
9.tRNA6-IleAAT-3'	34	58	52	122	143	58	41	142	2.417	0.00704842420536293	tRF
9.tRNA7-IleAAT-3'	57	52	77	149	136	82	48	163	2.349	0.00708281750981697	tRF
9.tRNA8-AlaAGC-3'	31	48	33	114	127	340	32	259	4.927	4.90854134553895e-06	tRF
9.tRNA9-AlaAGC-3'	52	49	29	130	150	335	36	274	4.571	8.29752707308454e-06	tRF
CNAG_00377	14	13	13	4318	1342	2485	11	3783	293.558	1.67340368926184e-45	siARN
CNAG_00465	36	19	38	791	221	233	23	583	17.831	1.18035791248634e-13	siARN
CNAG_00615	0	0	0	280	95	207	0	269	318.096	9.2343789202595e-06	Microsatellite
CNAG_00819	82	34	67	102	116	59	44	122	2.032	0.0258532217274836	snoARN
CNAG_01152	111	87	91	161	221	95	76	208	2.111	0.0140308137519601	siARN
CNAG_01731	84	120	105	130	197	162	87	214	2.082	0.0189589706694505	siARN
CNAG_02164	48	33	68	104	178	172	37	198	3.755	3.77088444148944e-06	Gène codant
CNAG_02185	71	11	73	120	86	42	33	112	2.191	0.021569088662926	snoARN
CNAG_03038	186	69	143	331	241	383	94	430	3.253	1.35063183563219e-05	snoARN
CNAG_03284	0	0	0	703	227	388	0	612	897.326	3.31657919219416e-08	siARN
CNAG_03478	2	0	0	164	80	78	0	147	233.14	2.77047895313681e-12	siARN
CNAG_03722	2	0	3	312	127	213	1	300	224.696	5.66219171378094e-20	Microsatellite

CNAG_04309	4	3	4	1704	481	1060	3	1510	437.291	2.74058699620402e-37	siARN
CNAG_05294	7	14	8	5087	1581	3747	9	4827	514.287	4.65440651516341e-43	siARN
CNAG_05443	1	2	0	93	345	117	1	232	210.625	1.6629351167665e-14	siARN
CNAG_05834	3	3	2	185	76	110	2	171	69.473	1.96666185584517e-14	Gène codant
CNAG_05910	2	1	0	152	79	83	1	143	158.371	1.62157012415939e-12	siARN
CNAG_06766	6	4	1	731	198	411	3	625	184.639	1.63310639256991e-23	Microsatellite
CNAG_07970	5	6	4	1543	550	921	4	1394	289.491	2.74659149790683e-35	siARN
CNAG_12274	63	35	35	70	103	109	33	124	2.545	0.00287166932034891	snoARN

Tableau S4 : Mise à jour de l'annotation du génome de *C. neoformans* H99 (Wallace et al., 2020)

Chr	Source	Elément	Début	Fin	Score	Brin	Phase	Description
Mt	tRNAscan	tRNA	2221	2292	45.0	+	.	ID=Mt.trna1;Name=Mt.tRNA1-IleGAT;isotype=Ile;anticodon=GAT;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	2221	2292	.	+	.	ID=Mt.trna1.exon1;Parent=Mt.trna1;
Mt	tRNAscan	tRNA	4728	4799	46.0	+	.	ID=Mt.trna2;Name=Mt.tRNA2-AlaTGC;isotype=Ala;anticodon=TGC;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	4728	4799	.	+	.	ID=Mt.trna2.exon1;Parent=Mt.trna2;
Mt	tRNAscan	tRNA	4820	4891	45.2	+	.	ID=Mt.trna3;Name=Mt.tRNA3-PheGAA;isotype=Phe;anticodon=GAA;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	4820	4891	.	+	.	ID=Mt.trna3.exon1;Parent=Mt.trna3;
Mt	tRNAscan	pseudogene	4898	4981	35.2	+	.	ID=Mt.trna4;Name=Mt.tRNA4-TyrGTA;isotype=Tyr;anticodon=GTA;gene_biotype=pseudogene;
Mt	tRNAscan	exon	4898	4981	.	+	.	ID=Mt.trna4.exon1;Parent=Mt.trna4;
Mt	tRNAscan	tRNA	4989	5059	39.9	+	.	ID=Mt.trna5;Name=Mt.tRNA5-HisGTG;isotype=His;anticodon=GTG;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	4989	5059	.	+	.	ID=Mt.trna5.exon1;Parent=Mt.trna5;
Mt	tRNAscan	tRNA	5343	5415	28.6	+	.	ID=Mt.trna6;Name=Mt.tRNA6-MetCAT;isotype=Met;anticodon=CAT;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	5343	5415	.	+	.	ID=Mt.trna6.exon1;Parent=Mt.trna6;
Mt	tRNAscan	tRNA	6438	6522	47.7	-	.	ID=Mt.trna20;Name=Mt.tRNA20-SerTGA;isotype=Ser;anticodon=TGA;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	6438	6522	.	-	.	ID=Mt.trna20.exon1;Parent=Mt.trna20;
Mt	tRNAscan	pseudogene	12228	12300	30.5	+	.	ID=Mt.trna7;Name=Mt.tRNA7-AspGTC;isotype=Asp;anticodon=GTC;gene_biotype=pseudogene;
Mt	tRNAscan	exon	12228	12300	.	+	.	ID=Mt.trna7.exon1;Parent=Mt.trna7;
Mt	tRNAscan	tRNA	14785	14857	45.0	+	.	ID=Mt.trna8;Name=Mt.tRNA8-ProTGG;isotype=Pro;anticodon=TGG;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	14785	14857	.	+	.	ID=Mt.trna8.exon1;Parent=Mt.trna8;
Mt	tRNAscan	tRNA	14931	15002	58.5	+	.	ID=Mt.trna9;Name=Mt.tRNA9-AsnGTT;isotype=Asn;anticodon=GTT;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	14931	15002	.	+	.	ID=Mt.trna9.exon1;Parent=Mt.trna9;
Mt	tRNAscan	tRNA	15811	15882	34.0	+	.	ID=Mt.trna10;Name=Mt.tRNA10-MetCAT;isotype=Met;anticodon=CAT;gene_biotype=tRNA;

Mt	tRNAscan	exon	15811	15882	.	+	.	ID=Mt.trna10.exon1;Parent=Mt.trna10;
Mt	tRNAscan	pseudogene	15891	15962	37.2	+	.	ID=Mt.trna11;Name=Mt.tRNA11-GluTTC;isotype=Glu;anticodon=TTC;gene_biotype=pseudogene;
Mt	tRNAscan	exon	15891	15962	.	+	.	ID=Mt.trna11.exon1;Parent=Mt.trna11;
Mt	tRNAscan	tRNA	15963	16033	45.5	+	.	ID=Mt.trna12;Name=Mt.tRNA12-ThrTGT;isotype=Thr;anticodon=TGT;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	15963	16033	.	+	.	ID=Mt.trna12.exon1;Parent=Mt.trna12;
Mt	tRNAscan	pseudogene	16068	16140	46.3	+	.	ID=Mt.trna13;Name=Mt.tRNA13-GlnTTG;isotype=Gln;anticodon=TTG;gene_biotype=pseudogene;
Mt	tRNAscan	exon	16068	16140	.	+	.	ID=Mt.trna13.exon1;Parent=Mt.trna13;
Mt	tRNAscan	tRNA	16187	16258	63.0	+	.	ID=Mt.trna14;Name=Mt.tRNA14-LysCTT;isotype=Lys;anticodon=CTT;gene_biotype=tRNA;
Mt	tRNAscan	exon	16187	16258	.	+	.	ID=Mt.trna14.exon1;Parent=Mt.trna14;
Mt	tRNAscan	pseudogene	16451	16522	35.1	-	.	ID=Mt.trna19;Name=Mt.tRNA19-TrpCCA;isotype=Trp;anticodon=CCA;gene_biotype=pseudogene;
Mt	tRNAscan	exon	16451	16522	.	-	.	ID=Mt.trna19.exon1;Parent=Mt.trna19;
Mt	tRNAscan	pseudogene	21607	21688	28.6	+	.	ID=Mt.trna15;Name=Mt.tRNA15-LeuTAG;isotype=Leu;anticodon=TAG;gene_biotype=pseudogene;
Mt	tRNAscan	exon	21607	21688	.	+	.	ID=Mt.trna15.exon1;Parent=Mt.trna15;
Mt	tRNAscan	pseudogene	21728	21801	38.9	+	.	ID=Mt.trna16;Name=Mt.tRNA16-ArgTCG;isotype=Arg;anticodon=TCG;gene_biotype=pseudogene;
Mt	tRNAscan	exon	21728	21801	.	+	.	ID=Mt.trna16.exon1;Parent=Mt.trna16;
Mt	tRNAscan	pseudogene	21841	21912	45.5	+	.	ID=Mt.trna17;Name=Mt.tRNA17-GlyTCC;isotype=Gly;anticodon=TCC;gene_biotype=pseudogene;
Mt	tRNAscan	exon	21841	21912	.	+	.	ID=Mt.trna17.exon1;Parent=Mt.trna17;
Mt	tRNAscan	pseudogene	23909	23980	36.0	+	.	ID=Mt.trna18;Name=Mt.tRNA18-ValTAC;isotype=Val;anticodon=TAC;gene_biotype=pseudogene;
Mt	tRNAscan	exon	23909	23980	.	+	.	ID=Mt.trna18.exon1;Parent=Mt.trna18;
13	tRNAscan	tRNA	103413	103483	48.5	-	.	ID=13.trna6;Name=13.tRNA6-GlyGCC;isotype=Gly;anticodon=GCC;gene_biotype=tRNA;
13	tRNAscan	exon	103413	103483	.	-	.	ID=13.trna6.exon1;Parent=13.trna6;
13	tRNAscan	tRNA	213277	213347	48.5	+	.	ID=13.trna1;Name=13.tRNA1-GlyGCC;isotype=Gly;anticodon=GCC;gene_biotype=tRNA;
13	tRNAscan	exon	213277	213347	.	+	.	ID=13.trna1.exon1;Parent=13.trna1;
13	tRNAscan	tRNA	385568	385675	71.9	-	.	ID=13.trna5;Name=13.tRNA5-LysCTT;isotype=Lys;anticodon=CTT;gene_biotype=tRNA;

13	tRNAscan	exon	385639	385675	.	-	.	ID=13.trna5.exon1;Parent=13.trna5;
13	tRNAscan	exon	385568	385603	.	-	.	ID=13.trna5.exon2;Parent=13.trna5;
13	tRNAscan	tRNA	418050	418158	56.0	+	.	ID=13.trna2;Name=13.tRNA2-AsnGTT;isotype=Asn;anticodon=GTT;gene_biotype=tRNA;
13	tRNAscan	exon	418050	418087	.	+	.	ID=13.trna2.exon1;Parent=13.trna2;
13	tRNAscan	exon	418123	418158	.	+	.	ID=13.trna2.exon2;Parent=13.trna2;
13	tRNAscan	tRNA	470879	470966	69.6	+	.	ID=13.trna3;Name=13.tRNA3-CysGCA;isotype=Cys;anticodon=GCA;gene_biotype=tRNA;
13	tRNAscan	exon	470879	470918	.	+	.	ID=13.trna3.exon1;Parent=13.trna3;
13	tRNAscan	exon	470931	470966	.	+	.	ID=13.trna3.exon2;Parent=13.trna3;
13	tRNAscan	tRNA	471040	471130	69.5	+	.	ID=13.trna4;Name=13.tRNA4-CysGCA;isotype=Cys;anticodon=GCA;gene_biotype=tRNA;
13	tRNAscan	exon	471040	471079	.	+	.	ID=13.trna4.exon1;Parent=13.trna4;
13	tRNAscan	exon	471095	471130	.	+	.	ID=13.trna4.exon2;Parent=13.trna4;
12	tRNAscan	tRNA	290325	290396	26.3	-	.	ID=12.trna4;Name=12.tRNA4-MetCAT;isotype=Met;anticodon=CAT;gene_biotype=tRNA;
12	tRNAscan	exon	290325	290396	.	-	.	ID=12.trna4.exon1;Parent=12.trna4;
12	tRNAscan	pseudogene	374092	374188	36.4	+	.	ID=12.trna1;Name=12.tRNA1-AspGTC;isotype=Asp;anticodon=GTC;gene_biotype=pseudogene;
12	tRNAscan	exon	374092	374128	.	+	.	ID=12.trna1.exon1;Parent=12.trna1;
12	tRNAscan	exon	374154	374188	.	+	.	ID=12.trna1.exon2;Parent=12.trna1;
12	tRNAscan	tRNA	663504	663596	53.7	+	.	ID=12.trna2;Name=12.tRNA2-TyrGTA;isotype=Tyr;anticodon=GTA;gene_biotype=tRNA;
12	tRNAscan	exon	663504	663543	.	+	.	ID=12.trna2.exon1;Parent=12.trna2;
12	tRNAscan	exon	663561	663596	.	+	.	ID=12.trna2.exon2;Parent=12.trna2;
12	tRNAscan	tRNA	663606	663724	71.5	+	.	ID=12.trna3;Name=12.tRNA3-LysCTT;isotype=Lys;anticodon=CTT;gene_biotype=tRNA;
12	tRNAscan	exon	663606	663642	.	+	.	ID=12.trna3.exon1;Parent=12.trna3;
12	tRNAscan	exon	663689	663724	.	+	.	ID=12.trna3.exon2;Parent=12.trna3;
14	tRNAscan	tRNA	97827	97921	45.1	+	.	ID=14.trna1;Name=14.tRNA1-SerAGA;isotype=Ser;anticodon=AGA;gene_biotype=tRNA;
14	tRNAscan	exon	97827	97863	.	+	.	ID=14.trna1.exon1;Parent=14.trna1;
14	tRNAscan	exon	97878	97921	.	+	.	ID=14.trna1.exon2;Parent=14.trna1;
14	tRNAscan	tRNA	187352	187461	54.6	-	.	ID=14.trna3;Name=14.tRNA3-LeuCAA;isotype=Leu;anticodon=CAA;gene_biotype=tRNA;
14	tRNAscan	exon	187425	187461	.	-	.	ID=14.trna3.exon1;Parent=14.trna3;

14	tRNAscan	exon	187352	187393	.	-	.	ID=14.trna3.exon2;Parent=14.trna3;
14	tRNAscan	tRNA	208194	208283	49.8	-	.	ID=14.trna2;Name=14.tRNA2-ValAAC;isotype=Val;anticodon=AAC;gene_biotype=tRNA;
14	tRNAscan	exon	208246	208283	.	-	.	ID=14.trna2.exon1;Parent=14.trna2;
14	tRNAscan	exon	208194	208229	.	-	.	ID=14.trna2.exon2;Parent=14.trna2;
10	tRNAscan	tRNA	143464	143546	45.4	+	.	ID=10.trna1;Name=10.tRNA1-iMetCAT;isotype=iMet;anticodon=CAT;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	143464	143499	.	+	.	ID=10.trna1.exon1;Parent=10.trna1;
10	tRNAscan	exon	143511	143546	.	+	.	ID=10.trna1.exon2;Parent=10.trna1;
10	tRNAscan	tRNA	171401	171482	62.7	-	.	ID=10.trna11;Name=10.tRNA11-HisGTG;isotype=His;anticodon=GTG;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	171446	171482	.	-	.	ID=10.trna11.exon1;Parent=10.trna11;
10	tRNAscan	exon	171401	171435	.	-	.	ID=10.trna11.exon2;Parent=10.trna11;
10	tRNAscan	tRNA	287316	287395	55.1	+	.	ID=10.trna2;Name=10.tRNA2-ArgCCG;isotype=Arg;anticodon=CCG;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	287316	287351	.	+	.	ID=10.trna2.exon1;Parent=10.trna2;
10	tRNAscan	exon	287360	287395	.	+	.	ID=10.trna2.exon2;Parent=10.trna2;
10	tRNAscan	tRNA	390791	390905	64.3	-	.	ID=10.trna10;Name=10.tRNA10-ArgACG;isotype=Arg;anticodon=ACG;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	390870	390905	.	-	.	ID=10.trna10.exon1;Parent=10.trna10;
10	tRNAscan	exon	390791	390826	.	-	.	ID=10.trna10.exon2;Parent=10.trna10;
10	tRNAscan	tRNA	529028	529136	64.5	+	.	ID=10.trna3;Name=10.tRNA3-ArgACG;isotype=Arg;anticodon=ACG;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	529028	529063	.	+	.	ID=10.trna3.exon1;Parent=10.trna3;
10	tRNAscan	exon	529101	529136	.	+	.	ID=10.trna3.exon2;Parent=10.trna3;
10	tRNAscan	pseudogene	555786	555888	42.0	+	.	ID=10.trna4;Name=10.tRNA4-GlyCCC;isotype=Gly;anticodon=CCC;gene_biotype=pseudogene;
10	tRNAscan	exon	555786	555821	.	+	.	ID=10.trna4.exon1;Parent=10.trna4;
10	tRNAscan	exon	555854	555888	.	+	.	ID=10.trna4.exon2;Parent=10.trna4;
10	tRNAscan	tRNA	907350	907445	47.0	+	.	ID=10.trna5;Name=10.tRNA5-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	907350	907386	.	+	.	ID=10.trna5.exon1;Parent=10.trna5;
10	tRNAscan	exon	907411	907445	.	+	.	ID=10.trna5.exon2;Parent=10.trna5;
10	tRNAscan	tRNA	907997	908092	47.0	-	.	ID=10.trna9;Name=10.tRNA9-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	908056	908092	.	-	.	ID=10.trna9.exon1;Parent=10.trna9;

10	tRNAscan	exon	907997	908031	.	-	.	ID=10.trna9.exon2;Parent=10.trna9;
10	tRNAscan	tRNA	911024	911113	55.9	-	.	ID=10.trna8;Name=10.tRNA8-ArgTCG;isotype=Arg;anticodon=TCG;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	911078	911113	.	-	.	ID=10.trna8.exon1;Parent=10.trna8;
10	tRNAscan	exon	911024	911059	.	-	.	ID=10.trna8.exon2;Parent=10.trna8;
10	tRNAscan	tRNA	927068	927162	47.0	+	.	ID=10.trna6;Name=10.tRNA6-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	927068	927104	.	+	.	ID=10.trna6.exon1;Parent=10.trna6;
10	tRNAscan	exon	927128	927162	.	+	.	ID=10.trna6.exon2;Parent=10.trna6;
10	tRNAscan	tRNA	1004643	1004732	55.9	+	.	ID=10.trna7;Name=10.tRNA7-ArgTCG;isotype=Arg;anticodon=TCG;gene_biotype=tRNA;
10	tRNAscan	exon	1004643	1004678	.	+	.	ID=10.trna7.exon1;Parent=10.trna7;
10	tRNAscan	exon	1004697	1004732	.	+	.	ID=10.trna7.exon2;Parent=10.trna7;
4	tRNAscan	tRNA	48356	48463	71.9	+	.	ID=4.trna1;Name=4.tRNA1-LysCTT;isotype=Lys;anticodon=CTT;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	48356	48392	.	+	.	ID=4.trna1.exon1;Parent=4.trna1;
4	tRNAscan	exon	48428	48463	.	+	.	ID=4.trna1.exon2;Parent=4.trna1;
4	tRNAscan	tRNA	114737	114831	59.1	+	.	ID=4.trna2;Name=4.tRNA2-GluTTC;isotype=Glu;anticodon=TTC;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	114737	114773	.	+	.	ID=4.trna2.exon1;Parent=4.trna2;
4	tRNAscan	exon	114797	114831	.	+	.	ID=4.trna2.exon2;Parent=4.trna2;
4	tRNAscan	tRNA	298196	298278	59.0	-	.	ID=4.trna15;Name=4.tRNA15-TrpCCA;isotype=Trp;anticodon=CCA;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	298243	298278	.	-	.	ID=4.trna15.exon1;Parent=4.trna15;
4	tRNAscan	exon	298196	298231	.	-	.	ID=4.trna15.exon2;Parent=4.trna15;
4	tRNAscan	tRNA	311610	311699	49.8	-	.	ID=4.trna14;Name=4.tRNA14-ValAAC;isotype=Val;anticodon=AAC;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	311662	311699	.	-	.	ID=4.trna14.exon1;Parent=4.trna14;
4	tRNAscan	exon	311610	311645	.	-	.	ID=4.trna14.exon2;Parent=4.trna14;
4	tRNAscan	tRNA	362662	362751	49.8	-	.	ID=4.trna13;Name=4.tRNA13-ValAAC;isotype=Val;anticodon=AAC;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	362714	362751	.	-	.	ID=4.trna13.exon1;Parent=4.trna13;
4	tRNAscan	exon	362662	362697	.	-	.	ID=4.trna13.exon2;Parent=4.trna13;
4	tRNAscan	tRNA	377974	378062	49.9	+	.	ID=4.trna3;Name=4.tRNA3-ValAAC;isotype=Val;anticodon=AAC;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	377974	378011	.	+	.	ID=4.trna3.exon1;Parent=4.trna3;

4	tRNAscan	exon	378027	378062	.	+	.	ID=4.trna3.exon2;Parent=4.trna3;
4	tRNAscan	tRNA	378699	378787	49.9	-	.	ID=4.trna12;Name=4.tRNA12-ValAAC;isotype=Val;anticodon=AAC;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	378750	378787	.	-	.	ID=4.trna12.exon1;Parent=4.trna12;
4	tRNAscan	exon	378699	378734	.	-	.	ID=4.trna12.exon2;Parent=4.trna12;
4	tRNAscan	tRNA	393984	394073	49.8	-	.	ID=4.trna11;Name=4.tRNA11-ValAAC;isotype=Val;anticodon=AAC;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	394036	394073	.	-	.	ID=4.trna11.exon1;Parent=4.trna11;
4	tRNAscan	exon	393984	394019	.	-	.	ID=4.trna11.exon2;Parent=4.trna11;
4	tRNAscan	tRNA	414384	414476	53.7	+	.	ID=4.trna4;Name=4.tRNA4-ProAGG;isotype=Pro;anticodon=AGG;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	414384	414419	.	+	.	ID=4.trna4.exon1;Parent=4.trna4;
4	tRNAscan	exon	414441	414476	.	+	.	ID=4.trna4.exon2;Parent=4.trna4;
4	tRNAscan	tRNA	428568	428658	51.8	-	.	ID=4.trna10;Name=4.tRNA10-IleAAT;isotype=Ile;anticodon=AAT;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	428620	428658	.	-	.	ID=4.trna10.exon1;Parent=4.trna10;
4	tRNAscan	exon	428568	428603	.	-	.	ID=4.trna10.exon2;Parent=4.trna10;
4	tRNAscan	tRNA	583526	583618	53.7	+	.	ID=4.trna5;Name=4.tRNA5-ProAGG;isotype=Pro;anticodon=AGG;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	583526	583561	.	+	.	ID=4.trna5.exon1;Parent=4.trna5;
4	tRNAscan	exon	583583	583618	.	+	.	ID=4.trna5.exon2;Parent=4.trna5;
4	tRNAscan	tRNA	785102	785189	66.4	-	.	ID=4.trna9;Name=4.tRNA9-PheGAA;isotype=Phe;anticodon=GAA;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	785153	785189	.	-	.	ID=4.trna9.exon1;Parent=4.trna9;
4	tRNAscan	exon	785102	785137	.	-	.	ID=4.trna9.exon2;Parent=4.trna9;
4	tRNAscan	pseudogene	822998	823094	36.4	+	.	ID=4.trna6;Name=4.tRNA6-AspGTC;isotype=Asp;anticodon=GTC;gene_biotype=pseudogene;
4	tRNAscan	exon	822998	823034	.	+	.	ID=4.trna6.exon1;Parent=4.trna6;
4	tRNAscan	exon	823060	823094	.	+	.	ID=4.trna6.exon2;Parent=4.trna6;
4	tRNAscan	tRNA	910474	910581	71.9	-	.	ID=4.trna8;Name=4.tRNA8-LysCTT;isotype=Lys;anticodon=CTT;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	910545	910581	.	-	.	ID=4.trna8.exon1;Parent=4.trna8;
4	tRNAscan	exon	910474	910509	.	-	.	ID=4.trna8.exon2;Parent=4.trna8;
4	tRNAscan	tRNA	971822	971893	63.8	+	.	ID=4.trna7;Name=4.tRNA7-GlnCTG;isotype=Gln;anticodon=CTG;gene_biotype=tRNA;
4	tRNAscan	exon	971822	971893	.	+	.	ID=4.trna7.exon1;Parent=4.trna7;

9	tRNAscan	tRNA	52921	53000	49.1	-	.	ID=9.trna18;Name=9.tRNA18-GlyTCC;isotype=Gly;anticodon=TCC;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	52964	53000	.	-	.	ID=9.trna18.exon1;Parent=9.trna18;
9	tRNAscan	exon	52921	52955	.	-	.	ID=9.trna18.exon2;Parent=9.trna18;
9	tRNAscan	tRNA	174860	174963	55.2	-	.	ID=9.trna17;Name=9.tRNA17-GlnTTG;isotype=Gln;anticodon=TTG;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	174927	174963	.	-	.	ID=9.trna17.exon1;Parent=9.trna17;
9	tRNAscan	exon	174860	174894	.	-	.	ID=9.trna17.exon2;Parent=9.trna17;
9	tRNAscan	tRNA	268555	268666	55.6	+	.	ID=9.trna1;Name=9.tRNA1-AsnGTT;isotype=Asn;anticodon=GTT;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	268555	268592	.	+	.	ID=9.trna1.exon1;Parent=9.trna1;
9	tRNAscan	exon	268631	268666	.	+	.	ID=9.trna1.exon2;Parent=9.trna1;
9	tRNAscan	tRNA	303037	303119	45.4	+	.	ID=9.trna2;Name=9.tRNA2-iMetCAT;isotype=iMet;anticodon=CAT;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	303037	303072	.	+	.	ID=9.trna2.exon1;Parent=9.trna2;
9	tRNAscan	exon	303084	303119	.	+	.	ID=9.trna2.exon2;Parent=9.trna2;
9	tRNAscan	tRNA	317215	317317	51.8	-	.	ID=9.trna16;Name=9.tRNA16-LeuAAG;isotype=Leu;anticodon=AAG;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	317280	317317	.	-	.	ID=9.trna16.exon1;Parent=9.trna16;
9	tRNAscan	exon	317215	317256	.	-	.	ID=9.trna16.exon2;Parent=9.trna16;
9	tRNAscan	tRNA	426791	426880	55.9	-	.	ID=9.trna15;Name=9.tRNA15-ArgTCG;isotype=Arg;anticodon=TCG;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	426845	426880	.	-	.	ID=9.trna15.exon1;Parent=9.trna15;
9	tRNAscan	exon	426791	426826	.	-	.	ID=9.trna15.exon2;Parent=9.trna15;
9	tRNAscan	tRNA	525891	525999	54.7	-	.	ID=9.trna14;Name=9.tRNA14-LeuCAA;isotype=Leu;anticodon=CAA;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	525963	525999	.	-	.	ID=9.trna14.exon1;Parent=9.trna14;
9	tRNAscan	exon	525891	525932	.	-	.	ID=9.trna14.exon2;Parent=9.trna14;
9	tRNAscan	tRNA	678712	678812	57.1	+	.	ID=9.trna3;Name=9.tRNA3-ThrAGT;isotype=Thr;anticodon=AGT;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	678712	678749	.	+	.	ID=9.trna3.exon1;Parent=9.trna3;
9	tRNAscan	exon	678777	678812	.	+	.	ID=9.trna3.exon2;Parent=9.trna3;
9	tRNAscan	tRNA	682567	682664	57.2	-	.	ID=9.trna13;Name=9.tRNA13-ThrAGT;isotype=Thr;anticodon=AGT;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	682627	682664	.	-	.	ID=9.trna13.exon1;Parent=9.trna13;
9	tRNAscan	exon	682567	682602	.	-	.	ID=9.trna13.exon2;Parent=9.trna13;

9	tRNAscan	tRNA	955984	956076	53.7	-	.	ID=9.trna12;Name=9.tRNA12-ProAGG;isotype=Pro;anticodon=AGG;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	956041	956076	.	-	.	ID=9.trna12.exon1;Parent=9.trna12;
9	tRNAscan	exon	955984	956019	.	-	.	ID=9.trna12.exon2;Parent=9.trna12;
9	tRNAscan	tRNA	976969	977057	51.9	+	.	ID=9.trna4;Name=9.tRNA4-IleAAT;isotype=Ile;anticodon=AAT;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	976969	977007	.	+	.	ID=9.trna4.exon1;Parent=9.trna4;
9	tRNAscan	exon	977022	977057	.	+	.	ID=9.trna4.exon2;Parent=9.trna4;
9	tRNAscan	pseudogene	998642	998723	41.2	+	.	ID=9.trna5;Name=9.tRNA5-GlyGCC;isotype=Gly;anticodon=GCC;gene_biotype=pseudogene;
9	tRNAscan	exon	998642	998677	.	+	.	ID=9.trna5.exon1;Parent=9.trna5;
9	tRNAscan	exon	998689	998723	.	+	.	ID=9.trna5.exon2;Parent=9.trna5;
9	tRNAscan	tRNA	1020111	1020200	51.9	-	.	ID=9.trna11;Name=9.tRNA11-IleAAT;isotype=Ile;anticodon=AAT;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	1020162	1020200	.	-	.	ID=9.trna11.exon1;Parent=9.trna11;
9	tRNAscan	exon	1020111	1020146	.	-	.	ID=9.trna11.exon2;Parent=9.trna11;
9	tRNAscan	tRNA	1032113	1032201	51.9	+	.	ID=9.trna6;Name=9.tRNA6-IleAAT;isotype=Ile;anticodon=AAT;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	1032113	1032151	.	+	.	ID=9.trna6.exon1;Parent=9.trna6;
9	tRNAscan	exon	1032166	1032201	.	+	.	ID=9.trna6.exon2;Parent=9.trna6;
9	tRNAscan	tRNA	1039746	1039834	51.9	-	.	ID=9.trna10;Name=9.tRNA10-IleAAT;isotype=Ile;anticodon=AAT;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	1039796	1039834	.	-	.	ID=9.trna10.exon1;Parent=9.trna10;
9	tRNAscan	exon	1039746	1039781	.	-	.	ID=9.trna10.exon2;Parent=9.trna10;
9	tRNAscan	tRNA	1052879	1052967	51.9	+	.	ID=9.trna7;Name=9.tRNA7-IleAAT;isotype=Ile;anticodon=AAT;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	1052879	1052917	.	+	.	ID=9.trna7.exon1;Parent=9.trna7;
9	tRNAscan	exon	1052932	1052967	.	+	.	ID=9.trna7.exon2;Parent=9.trna7;
9	tRNAscan	tRNA	1082335	1082426	53.5	+	.	ID=9.trna8;Name=9.tRNA8-AlaAGC;isotype=Ala;anticodon=AGC;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	1082335	1082371	.	+	.	ID=9.trna8.exon1;Parent=9.trna8;
9	tRNAscan	exon	1082391	1082426	.	+	.	ID=9.trna8.exon2;Parent=9.trna8;
9	tRNAscan	tRNA	1104859	1104950	53.5	+	.	ID=9.trna9;Name=9.tRNA9-AlaAGC;isotype=Ala;anticodon=AGC;gene_biotype=tRNA;
9	tRNAscan	exon	1104859	1104895	.	+	.	ID=9.trna9.exon1;Parent=9.trna9;
9	tRNAscan	exon	1104915	1104950	.	+	.	ID=9.trna9.exon2;Parent=9.trna9;

8	tRNAscan	tRNA	67852	67949	53.6	+	.	ID=8.trna1;Name=8.tRNA1-ProAGG;isotype=Pro;anticodon=AGG;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	67852	67887	.	+	.	ID=8.trna1.exon1;Parent=8.trna1;
8	tRNAscan	exon	67914	67949	.	+	.	ID=8.trna1.exon2;Parent=8.trna1;
8	tRNAscan	tRNA	76999	77096	53.6	-	.	ID=8.trna12;Name=8.tRNA12-ProAGG;isotype=Pro;anticodon=AGG;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	77061	77096	.	-	.	ID=8.trna12.exon1;Parent=8.trna12;
8	tRNAscan	exon	76999	77034	.	-	.	ID=8.trna12.exon2;Parent=8.trna12;
8	tRNAscan	tRNA	120477	120571	45.1	-	.	ID=8.trna11;Name=8.tRNA11-SerAGA;isotype=Ser;anticodon=AGA;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	120535	120571	.	-	.	ID=8.trna11.exon1;Parent=8.trna11;
8	tRNAscan	exon	120477	120520	.	-	.	ID=8.trna11.exon2;Parent=8.trna11;
8	tRNAscan	tRNA	239343	239431	67.6	-	.	ID=8.trna10;Name=8.tRNA10-ArgTCT;isotype=Arg;anticodon=TCT;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	239395	239431	.	-	.	ID=8.trna10.exon1;Parent=8.trna10;
8	tRNAscan	exon	239343	239378	.	-	.	ID=8.trna10.exon2;Parent=8.trna10;
8	tRNAscan	tRNA	259461	259569	54.7	+	.	ID=8.trna2;Name=8.tRNA2-LeuCAA;isotype=Leu;anticodon=CAA;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	259461	259497	.	+	.	ID=8.trna2.exon1;Parent=8.trna2;
8	tRNAscan	exon	259528	259569	.	+	.	ID=8.trna2.exon2;Parent=8.trna2;
8	tRNAscan	tRNA	305269	305340	71.7	+	.	ID=8.trna3;Name=8.tRNA3-HisGTG;isotype=His;anticodon=GTG;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	305269	305340	.	+	.	ID=8.trna3.exon1;Parent=8.trna3;
8	tRNAscan	tRNA	323230	323316	42.9	+	.	ID=8.trna4;Name=8.tRNA4-HisGTG;isotype=His;anticodon=GTG;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	323230	323268	.	+	.	ID=8.trna4.exon1;Parent=8.trna4;
8	tRNAscan	exon	323282	323316	.	+	.	ID=8.trna4.exon2;Parent=8.trna4;
8	tRNAscan	pseudogene	710226	710331	42.3	+	.	ID=8.trna5;Name=8.tRNA5-SerGCT;isotype=Ser;anticodon=GCT;gene_biotype=pseudogene;
8	tRNAscan	exon	710226	710262	.	+	.	ID=8.trna5.exon1;Parent=8.trna5;
8	tRNAscan	exon	710288	710331	.	+	.	ID=8.trna5.exon2;Parent=8.trna5;
8	tRNAscan	tRNA	855109	855202	57.4	+	.	ID=8.trna6;Name=8.tRNA6-ThrAGT;isotype=Thr;anticodon=AGT;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	855109	855146	.	+	.	ID=8.trna6.exon1;Parent=8.trna6;
8	tRNAscan	exon	855167	855202	.	+	.	ID=8.trna6.exon2;Parent=8.trna6;
8	tRNAscan	tRNA	1326602	1326673	63.8	-	.	ID=8.trna9;Name=8.tRNA9-GlnCTG;isotype=Gln;anticodon=CTG;gene_biotype=tRNA;

8	tRNAscan	exon	1326602	1326673	.	-	.	ID=8.trna9.exon1;Parent=8.trna9;
8	tRNAscan	tRNA	1337206	1337277	63.8	-	.	ID=8.trna8;Name=8.tRNA8-GlnCTG;isotype=Gln;anticodon=CTG;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	1337206	1337277	.	-	.	ID=8.trna8.exon1;Parent=8.trna8;
8	tRNAscan	tRNA	1339237	1339327	65.2	-	.	ID=8.trna7;Name=8.tRNA7-ArgACG;isotype=Arg;anticodon=ACG;gene_biotype=tRNA;
8	tRNAscan	exon	1339292	1339327	.	-	.	ID=8.trna7.exon1;Parent=8.trna7;
8	tRNAscan	exon	1339237	1339272	.	-	.	ID=8.trna7.exon2;Parent=8.trna7;
7	tRNAscan	tRNA	184189	184278	55.9	-	.	ID=7.trna19;Name=7.tRNA19-ArgTCG;isotype=Arg;anticodon=TCG;gene_biotype=tRNA;
7	tRNAscan	exon	184243	184278	.	-	.	ID=7.trna19.exon1;Parent=7.trna19;
7	tRNAscan	exon	184189	184224	.	-	.	ID=7.trna19.exon2;Parent=7.trna19;
7	tRNAscan	tRNA	203383	203472	55.9	+	.	ID=7.trna1;Name=7.tRNA1-ArgTCG;isotype=Arg;anticodon=TCG;gene_biotype=tRNA;
7	tRNAscan	exon	203383	203418	.	+	.	ID=7.trna1.exon1;Parent=7.trna1;
7	tRNAscan	exon	203437	203472	.	+	.	ID=7.trna1.exon2;Parent=7.trna1;
7	tRNAscan	tRNA	218855	218953	57.2	-	.	ID=7.trna18;Name=7.tRNA18-ThrAGT;isotype=Thr;anticodon=AGT;gene_biotype=tRNA;
7	tRNAscan	exon	218916	218953	.	-	.	ID=7.trna18.exon1;Parent=7.trna18;
7	tRNAscan	exon	218855	218890	.	-	.	ID=7.trna18.exon2;Parent=7.trna18;
7	tRNAscan	tRNA	286743	286850	71.9	+	.	ID=7.trna2;Name=7.tRNA2-LysCTT;isotype=Lys;anticodon=CTT;gene_biotype=tRNA;
7	tRNAscan	exon	286743	286779	.	+	.	ID=7.trna2.exon1;Parent=7.trna2;
7	tRNAscan	exon	286815	286850	.	+	.	ID=7.trna2.exon2;Parent=7.trna2;
7	tRNAscan	tRNA	292533	292604	56.3	+	.	ID=7.trna3;Name=7.tRNA3-GlyTCC;isotype=Gly;anticodon=TCC;gene_biotype=tRNA;
7	tRNAscan	exon	292533	292604	.	+	.	ID=7.trna3.exon1;Parent=7.trna3;
7	tRNAscan	pseudogene	323508	323580	30.5	-	.	ID=7.trna17;Name=7.tRNA17-AspGTC;isotype=Asp;anticodon=GTC;gene_biotype=pseudogene;
7	tRNAscan	exon	323508	323580	.	-	.	ID=7.trna17.exon1;Parent=7.trna17;
7	tRNAscan	tRNA	332041	332131	68.4	-	.	ID=7.trna16;Name=7.tRNA16-LysTTT;isotype=Lys;anticodon=TTT;gene_biotype=tRNA;
7	tRNAscan	exon	332094	332131	.	-	.	ID=7.trna16.exon1;Parent=7.trna16;
7	tRNAscan	exon	332041	332076	.	-	.	ID=7.trna16.exon2;Parent=7.trna16;
7	tRNAscan	pseudogene	347446	347527	41.2	+	.	ID=7.trna4;Name=7.tRNA4-GlyGCC;isotype=Gly;anticodon=GCC;gene_biotype=pseudogene;
7	tRNAscan	exon	347446	347481	.	+	.	ID=7.trna4.exon1;Parent=7.trna4;

7 tRNAscan	exon	347493	347527	.	+	.	ID=7.trna4.exon2;Parent=7.trna4;
7 tRNAscan	pseudogene	408157	408238	41.2	+	.	ID=7.trna5;Name=7.tRNA5-GlyGCC;isotype=Gly;anticodon=GCC;gene_biotype=pseudogene;
7 tRNAscan	exon	408157	408192	.	+	.	ID=7.trna5.exon1;Parent=7.trna5;
7 tRNAscan	exon	408204	408238	.	+	.	ID=7.trna5.exon2;Parent=7.trna5;
7 tRNAscan	tRNA	412853	412946	53.4	+	.	ID=7.trna6;Name=7.tRNA6-AlaAGC;isotype=Ala;anticodon=AGC;gene_biotype=tRNA;
7 tRNAscan	exon	412853	412889	.	+	.	ID=7.trna6.exon1;Parent=7.trna6;
7 tRNAscan	exon	412911	412946	.	+	.	ID=7.trna6.exon2;Parent=7.trna6;
7 tRNAscan	tRNA	467088	467184	57.3	+	.	ID=7.trna7;Name=7.tRNA7-ThrAGT;isotype=Thr;anticodon=AGT;gene_biotype=tRNA;
7 tRNAscan	exon	467088	467125	.	+	.	ID=7.trna7.exon1;Parent=7.trna7;
7 tRNAscan	exon	467149	467184	.	+	.	ID=7.trna7.exon2;Parent=7.trna7;
7 tRNAscan	tRNA	475393	475489	59.9	+	.	ID=7.trna8;Name=7.tRNA8-MetCAT;isotype=Met;anticodon=CAT;gene_biotype=tRNA;
7 tRNAscan	exon	475393	475428	.	+	.	ID=7.trna8.exon1;Parent=7.trna8;
7 tRNAscan	exon	475455	475489	.	+	.	ID=7.trna8.exon2;Parent=7.trna8;
7 tRNAscan	tRNA	487281	487377	59.9	-	.	ID=7.trna15;Name=7.tRNA15-MetCAT;isotype=Met;anticodon=CAT;gene_biotype=tRNA;
7 tRNAscan	exon	487342	487377	.	-	.	ID=7.trna15.exon1;Parent=7.trna15;
7 tRNAscan	exon	487281	487315	.	-	.	ID=7.trna15.exon2;Parent=7.trna15;
7 tRNAscan	tRNA	703685	703755	48.5	-	.	ID=7.trna14;Name=7.tRNA14-GlyGCC;isotype=Gly;anticodon=GCC;gene_biotype=tRNA;
7 tRNAscan	exon	703685	703755	.	-	.	ID=7.trna14.exon1;Parent=7.trna14;
7 tRNAscan	tRNA	787274	787370	46.1	+	.	ID=7.trna9;Name=7.tRNA9-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
7 tRNAscan	exon	787274	787310	.	+	.	ID=7.trna9.exon1;Parent=7.trna9;
7 tRNAscan	exon	787336	787370	.	+	.	ID=7.trna9.exon2;Parent=7.trna9;
7 tRNAscan	tRNA	1122488	1122587	57.2	+	.	ID=7.trna10;Name=7.tRNA10-ArgCCT;isotype=Arg;anticodon=CCT;gene_biotype=tRNA;
7 tRNAscan	exon	1122488	1122524	.	+	.	ID=7.trna10.exon1;Parent=7.trna10;
7 tRNAscan	exon	1122552	1122587	.	+	.	ID=7.trna10.exon2;Parent=7.trna10;
7 tRNAscan	tRNA	1165871	1165971	51.9	+	.	ID=7.trna11;Name=7.tRNA11-LeuAAG;isotype=Leu;anticodon=AAG;gene_biotype=tRNA;
7 tRNAscan	exon	1165871	1165908	.	+	.	ID=7.trna11.exon1;Parent=7.trna11;
7 tRNAscan	exon	1165930	1165971	.	+	.	ID=7.trna11.exon2;Parent=7.trna11;

7	tRNAscan	tRNA	1370003	1370101	48.5	-	.	ID=7.trna13;Name=7.tRNA13-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
7	tRNAscan	exon	1370065	1370101	.	-	.	ID=7.trna13.exon1;Parent=7.trna13;
7	tRNAscan	exon	1370003	1370037	.	-	.	ID=7.trna13.exon2;Parent=7.trna13;
7	tRNAscan	tRNA	1388431	1388527	48.6	+	.	ID=7.trna12;Name=7.tRNA12-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
7	tRNAscan	exon	1388431	1388467	.	+	.	ID=7.trna12.exon1;Parent=7.trna12;
7	tRNAscan	exon	1388493	1388527	.	+	.	ID=7.trna12.exon2;Parent=7.trna12;
6	tRNAscan	tRNA	27930	28037	71.9	+	.	ID=6.trna1;Name=6.tRNA1-LysCTT;isotype=Lys;anticodon=CTT;gene_biotype=tRNA;
6	tRNAscan	exon	27930	27966	.	+	.	ID=6.trna1.exon1;Parent=6.trna1;
6	tRNAscan	exon	28002	28037	.	+	.	ID=6.trna1.exon2;Parent=6.trna1;
6	tRNAscan	tRNA	286816	286904	68.7	-	.	ID=6.trna10;Name=6.tRNA10-TrpCCA;isotype=Trp;anticodon=CCA;gene_biotype=tRNA;
6	tRNAscan	exon	286868	286904	.	-	.	ID=6.trna10.exon1;Parent=6.trna10;
6	tRNAscan	exon	286816	286851	.	-	.	ID=6.trna10.exon2;Parent=6.trna10;
6	tRNAscan	tRNA	325868	325965	59.9	-	.	ID=6.trna9;Name=6.tRNA9-MetCAT;isotype=Met;anticodon=CAT;gene_biotype=tRNA;
6	tRNAscan	exon	325930	325965	.	-	.	ID=6.trna9.exon1;Parent=6.trna9;
6	tRNAscan	exon	325868	325902	.	-	.	ID=6.trna9.exon2;Parent=6.trna9;
6	tRNAscan	tRNA	354824	354906	45.5	+	.	ID=6.trna2;Name=6.tRNA2-AlaCGC;isotype=Ala;anticodon=CGC;gene_biotype=tRNA;
6	tRNAscan	exon	354824	354859	.	+	.	ID=6.trna2.exon1;Parent=6.trna2;
6	tRNAscan	exon	354872	354906	.	+	.	ID=6.trna2.exon2;Parent=6.trna2;
6	tRNAscan	tRNA	484977	485059	45.5	-	.	ID=6.trna8;Name=6.tRNA8-AlaCGC;isotype=Ala;anticodon=CGC;gene_biotype=tRNA;
6	tRNAscan	exon	485024	485059	.	-	.	ID=6.trna8.exon1;Parent=6.trna8;
6	tRNAscan	exon	484977	485011	.	-	.	ID=6.trna8.exon2;Parent=6.trna8;
6	tRNAscan	pseudogene	492351	492444	36.5	+	.	ID=6.trna3;Name=6.tRNA3-AspGTC;isotype=Asp;anticodon=GTC;gene_biotype=pseudogene;
6	tRNAscan	exon	492351	492387	.	+	.	ID=6.trna3.exon1;Parent=6.trna3;
6	tRNAscan	exon	492410	492444	.	+	.	ID=6.trna3.exon2;Parent=6.trna3;
6	tRNAscan	tRNA	520945	521034	67.4	-	.	ID=6.trna7;Name=6.tRNA7-PheGAA;isotype=Phe;anticodon=GAA;gene_biotype=tRNA;
6	tRNAscan	exon	520998	521034	.	-	.	ID=6.trna7.exon1;Parent=6.trna7;
6	tRNAscan	exon	520945	520980	.	-	.	ID=6.trna7.exon2;Parent=6.trna7;

6	tRNAscan	tRNA	1015359	1015451	67.2	-	.	ID=6.trna6;Name=6.tRNA6-PheGAA;isotype=Phe;anticodon=GAA;gene_biotype=tRNA;
6	tRNAscan	exon	1015415	1015451	.	-	.	ID=6.trna6.exon1;Parent=6.trna6;
6	tRNAscan	exon	1015359	1015394	.	-	.	ID=6.trna6.exon2;Parent=6.trna6;
6	tRNAscan	pseudogene	1149538	1149634	36.4	+	.	ID=6.trna4;Name=6.tRNA4-AspGTC;isotype=Asp;anticodon=GTC;gene_biotype=pseudogene;
6	tRNAscan	exon	1149538	1149574	.	+	.	ID=6.trna4.exon1;Parent=6.trna4;
6	tRNAscan	exon	1149600	1149634	.	+	.	ID=6.trna4.exon2;Parent=6.trna4;
6	tRNAscan	tRNA	1253416	1253502	51.5	-	.	ID=6.trna5;Name=6.tRNA5-ProTGG;isotype=Pro;anticodon=TGG;gene_biotype=tRNA;
6	tRNAscan	exon	1253467	1253502	.	-	.	ID=6.trna5.exon1;Parent=6.trna5;
6	tRNAscan	exon	1253416	1253451	.	-	.	ID=6.trna5.exon2;Parent=6.trna5;
11	tRNAscan	tRNA	341260	341341	49.9	+	.	ID=11.trna1;Name=11.tRNA1-GlnTTG;isotype=Gln;anticodon=TTG;gene_biotype=tRNA;
11	tRNAscan	exon	341260	341296	.	+	.	ID=11.trna1.exon1;Parent=11.trna1;
11	tRNAscan	exon	341307	341341	.	+	.	ID=11.trna1.exon2;Parent=11.trna1;
11	tRNAscan	pseudogene	366135	366216	41.2	+	.	ID=11.trna2;Name=11.tRNA2-GlyGCC;isotype=Gly;anticodon=GCC;gene_biotype=pseudogene;
11	tRNAscan	exon	366135	366170	.	+	.	ID=11.trna2.exon1;Parent=11.trna2;
11	tRNAscan	exon	366182	366216	.	+	.	ID=11.trna2.exon2;Parent=11.trna2;
11	tRNAscan	tRNA	506745	506826	45.4	-	.	ID=11.trna4;Name=11.tRNA4-iMetCAT;isotype=iMet;anticodon=CAT;gene_biotype=tRNA;
11	tRNAscan	exon	506791	506826	.	-	.	ID=11.trna4.exon1;Parent=11.trna4;
11	tRNAscan	exon	506745	506780	.	-	.	ID=11.trna4.exon2;Parent=11.trna4;
11	tRNAscan	pseudogene	1485785	1485867	36.9	-	.	ID=11.trna3;Name=11.tRNA3-AspGTC;isotype=Asp;anticodon=GTC;gene_biotype=pseudogene;
11	tRNAscan	exon	1485831	1485867	.	-	.	ID=11.trna3.exon1;Parent=11.trna3;
11	tRNAscan	exon	1485785	1485819	.	-	.	ID=11.trna3.exon2;Parent=11.trna3;
3	tRNAscan	tRNA	252167	252253	50.8	+	.	ID=3.trna1;Name=3.tRNA1-LeuCAG;isotype=Leu;anticodon=CAG;gene_biotype=tRNA;
3	tRNAscan	exon	252167	252203	.	+	.	ID=3.trna1.exon1;Parent=3.trna1;
3	tRNAscan	exon	252213	252253	.	+	.	ID=3.trna1.exon2;Parent=3.trna1;
3	tRNAscan	tRNA	959193	959295	51.8	-	.	ID=3.trna6;Name=3.tRNA6-LeuAAG;isotype=Leu;anticodon=AAG;gene_biotype=tRNA;
3	tRNAscan	exon	959258	959295	.	-	.	ID=3.trna6.exon1;Parent=3.trna6;
3	tRNAscan	exon	959193	959234	.	-	.	ID=3.trna6.exon2;Parent=3.trna6;

3	tRNAscan	tRNA	1200651	1200741	53.5	+	.	ID=3.trna2;Name=3.tRNA2-AlaAGC;isotype=Ala;anticodon=AGC;gene_biotype=tRNA;
3	tRNAscan	exon	1200651	1200687	.	+	.	ID=3.trna2.exon1;Parent=3.trna2;
3	tRNAscan	exon	1200706	1200741	.	+	.	ID=3.trna2.exon2;Parent=3.trna2;
3	tRNAscan	pseudogene	1319789	1319896	41.8	+	.	ID=3.trna3;Name=3.tRNA3-GlyCCC;isotype=Gly;anticodon=CCC;gene_biotype=pseudogene;
3	tRNAscan	exon	1319789	1319824	.	+	.	ID=3.trna3.exon1;Parent=3.trna3;
3	tRNAscan	exon	1319862	1319896	.	+	.	ID=3.trna3.exon2;Parent=3.trna3;
3	tRNAscan	tRNA	1341614	1341706	59.1	+	.	ID=3.trna4;Name=3.tRNA4-GluTTC;isotype=Glu;anticodon=TTC;gene_biotype=tRNA;
3	tRNAscan	exon	1341614	1341650	.	+	.	ID=3.trna4.exon1;Parent=3.trna4;
3	tRNAscan	exon	1341672	1341706	.	+	.	ID=3.trna4.exon2;Parent=3.trna4;
3	tRNAscan	tRNA	1456859	1456951	53.7	+	.	ID=3.trna5;Name=3.tRNA5-TyrGTA;isotype=Tyr;anticodon=GTA;gene_biotype=tRNA;
3	tRNAscan	exon	1456859	1456898	.	+	.	ID=3.trna5.exon1;Parent=3.trna5;
3	tRNAscan	exon	1456916	1456951	.	+	.	ID=3.trna5.exon2;Parent=3.trna5;
2	tRNAscan	tRNA	78893	78987	69.3	-	.	ID=2.trna10;Name=2.tRNA10-CysGCA;isotype=Cys;anticodon=GCA;gene_biotype=tRNA;
2	tRNAscan	exon	78948	78987	.	-	.	ID=2.trna10.exon1;Parent=2.trna10;
2	tRNAscan	exon	78893	78928	.	-	.	ID=2.trna10.exon2;Parent=2.trna10;
2	tRNAscan	pseudogene	140092	140192	36.2	-	.	ID=2.trna9;Name=2.tRNA9-AspGTC;isotype=Asp;anticodon=GTC;gene_biotype=pseudogene;
2	tRNAscan	exon	140156	140192	.	-	.	ID=2.trna9.exon1;Parent=2.trna9;
2	tRNAscan	exon	140092	140126	.	-	.	ID=2.trna9.exon2;Parent=2.trna9;
2	tRNAscan	tRNA	218098	218169	70.0	-	.	ID=2.trna8;Name=2.tRNA8-HisGTG;isotype=His;anticodon=GTG;gene_biotype=tRNA;
2	tRNAscan	exon	218098	218169	.	-	.	ID=2.trna8.exon1;Parent=2.trna8;
2	tRNAscan	pseudogene	229034	229134	36.2	-	.	ID=2.trna7;Name=2.tRNA7-AspGTC;isotype=Asp;anticodon=GTC;gene_biotype=pseudogene;
2	tRNAscan	exon	229098	229134	.	-	.	ID=2.trna7.exon1;Parent=2.trna7;
2	tRNAscan	exon	229034	229068	.	-	.	ID=2.trna7.exon2;Parent=2.trna7;
2	tRNAscan	tRNA	710605	710711	34.2	-	.	ID=2.trna6;Name=2.tRNA6-ProCGG;isotype=Pro;anticodon=CGG;gene_biotype=tRNA;
2	tRNAscan	exon	710676	710711	.	-	.	ID=2.trna6.exon1;Parent=2.trna6;
2	tRNAscan	exon	710605	710639	.	-	.	ID=2.trna6.exon2;Parent=2.trna6;
2	tRNAscan	pseudogene	911318	911427	35.2	-	.	ID=2.trna5;Name=2.tRNA5-SerGCT;isotype=Ser;anticodon=GCT;gene_biotype=pseudogene;

2	tRNAscan	exon	911391	911427	.	-	.	ID=2.trna5.exon1;Parent=2.trna5;
2	tRNAscan	exon	911318	911361	.	-	.	ID=2.trna5.exon2;Parent=2.trna5;
2	tRNAscan	tRNA	1265237	1265323	50.8	-	.	ID=2.trna4;Name=2.tRNA4-ThrCGT;isotype=Thr;anticodon=CGT;gene_biotype=tRNA;
2	tRNAscan	exon	1265287	1265323	.	-	.	ID=2.trna4.exon1;Parent=2.trna4;
2	tRNAscan	exon	1265237	1265272	.	-	.	ID=2.trna4.exon2;Parent=2.trna4;
2	tRNAscan	tRNA	1282277	1282378	63.0	+	.	ID=2.trna1;Name=2.tRNA1-SerTGA;isotype=Ser;anticodon=TGA;gene_biotype=tRNA;
2	tRNAscan	exon	1282277	1282314	.	+	.	ID=2.trna1.exon1;Parent=2.trna1;
2	tRNAscan	exon	1282335	1282378	.	+	.	ID=2.trna1.exon2;Parent=2.trna1;
2	tRNAscan	tRNA	1488987	1489083	59.0	+	.	ID=2.trna2;Name=2.tRNA2-LeuTAA;isotype=Leu;anticodon=TAA;gene_biotype=tRNA;
2	tRNAscan	exon	1488987	1489023	.	+	.	ID=2.trna2.exon1;Parent=2.trna2;
2	tRNAscan	exon	1489038	1489083	.	+	.	ID=2.trna2.exon2;Parent=2.trna2;
2	tRNAscan	tRNA	1534109	1534205	47.0	-	.	ID=2.trna3;Name=2.tRNA3-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
2	tRNAscan	exon	1534169	1534205	.	-	.	ID=2.trna3.exon1;Parent=2.trna3;
2	tRNAscan	exon	1534109	1534143	.	-	.	ID=2.trna3.exon2;Parent=2.trna3;
5	tRNAscan	tRNA	97516	97613	53.6	+	.	ID=5.trna1;Name=5.tRNA1-ProAGG;isotype=Pro;anticodon=AGG;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	97516	97551	.	+	.	ID=5.trna1.exon1;Parent=5.trna1;
5	tRNAscan	exon	97578	97613	.	+	.	ID=5.trna1.exon2;Parent=5.trna1;
5	tRNAscan	tRNA	107804	107885	59.0	-	.	ID=5.trna16;Name=5.tRNA16-TrpCCA;isotype=Trp;anticodon=CCA;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	107850	107885	.	-	.	ID=5.trna16.exon1;Parent=5.trna16;
5	tRNAscan	exon	107804	107839	.	-	.	ID=5.trna16.exon2;Parent=5.trna16;
5	tRNAscan	tRNA	329359	329456	57.3	+	.	ID=5.trna2;Name=5.tRNA2-ArgCCT;isotype=Arg;anticodon=CCT;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	329359	329395	.	+	.	ID=5.trna2.exon1;Parent=5.trna2;
5	tRNAscan	exon	329421	329456	.	+	.	ID=5.trna2.exon2;Parent=5.trna2;
5	tRNAscan	tRNA	335234	335331	57.3	+	.	ID=5.trna3;Name=5.tRNA3-ArgCCT;isotype=Arg;anticodon=CCT;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	335234	335270	.	+	.	ID=5.trna3.exon1;Parent=5.trna3;
5	tRNAscan	exon	335296	335331	.	+	.	ID=5.trna3.exon2;Parent=5.trna3;
5	tRNAscan	tRNA	488049	488136	59.3	-	.	ID=5.trna15;Name=5.tRNA15-GluTTC;isotype=Glu;anticodon=TTC;gene_biotype=tRNA;

5	tRNAscan	exon	488100	488136	.	-	.	ID=5.trna15.exon1;Parent=5.trna15;
5	tRNAscan	exon	488049	488083	.	-	.	ID=5.trna15.exon2;Parent=5.trna15;
5	tRNAscan	tRNA	532952	533056	55.9	-	.	ID=5.trna14;Name=5.tRNA14-AsnGTT;isotype=Asn;anticodon=GTT;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	533019	533056	.	-	.	ID=5.trna14.exon1;Parent=5.trna14;
5	tRNAscan	exon	532952	532987	.	-	.	ID=5.trna14.exon2;Parent=5.trna14;
5	tRNAscan	pseudogene	706508	706604	40.6	+	.	ID=5.trna4;Name=5.tRNA4-GlyGCC;isotype=Gly;anticodon=GCC;gene_biotype=pseudogene;
5	tRNAscan	exon	706508	706543	.	+	.	ID=5.trna4.exon1;Parent=5.trna4;
5	tRNAscan	exon	706570	706604	.	+	.	ID=5.trna4.exon2;Parent=5.trna4;
5	tRNAscan	tRNA	708511	708618	56.0	+	.	ID=5.trna5;Name=5.tRNA5-AsnGTT;isotype=Asn;anticodon=GTT;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	708511	708548	.	+	.	ID=5.trna5.exon1;Parent=5.trna5;
5	tRNAscan	exon	708583	708618	.	+	.	ID=5.trna5.exon2;Parent=5.trna5;
5	tRNAscan	tRNA	1039597	1039689	53.7	-	.	ID=5.trna13;Name=5.tRNA13-TyrGTA;isotype=Tyr;anticodon=GTA;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	1039650	1039689	.	-	.	ID=5.trna13.exon1;Parent=5.trna13;
5	tRNAscan	exon	1039597	1039632	.	-	.	ID=5.trna13.exon2;Parent=5.trna13;
5	tRNAscan	tRNA	1068608	1068699	53.7	+	.	ID=5.trna6;Name=5.tRNA6-TyrGTA;isotype=Tyr;anticodon=GTA;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	1068608	1068647	.	+	.	ID=5.trna6.exon1;Parent=5.trna6;
5	tRNAscan	exon	1068664	1068699	.	+	.	ID=5.trna6.exon2;Parent=5.trna6;
5	tRNAscan	tRNA	1394754	1394861	71.9	-	.	ID=5.trna12;Name=5.tRNA12-LysCTT;isotype=Lys;anticodon=CTT;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	1394825	1394861	.	-	.	ID=5.trna12.exon1;Parent=5.trna12;
5	tRNAscan	exon	1394754	1394789	.	-	.	ID=5.trna12.exon2;Parent=5.trna12;
5	tRNAscan	tRNA	1624796	1624891	47.0	+	.	ID=5.trna7;Name=5.tRNA7-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	1624796	1624832	.	+	.	ID=5.trna7.exon1;Parent=5.trna7;
5	tRNAscan	exon	1624857	1624891	.	+	.	ID=5.trna7.exon2;Parent=5.trna7;
5	tRNAscan	tRNA	1633902	1633997	47.0	-	.	ID=5.trna11;Name=5.tRNA11-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	1633961	1633997	.	-	.	ID=5.trna11.exon1;Parent=5.trna11;
5	tRNAscan	exon	1633902	1633936	.	-	.	ID=5.trna11.exon2;Parent=5.trna11;
5	tRNAscan	tRNA	1706077	1706164	67.4	+	.	ID=5.trna8;Name=5.tRNA8-PheGAA;isotype=Phe;anticodon=GAA;gene_biotype=tRNA;

5	tRNAscan	exon	1706077	1706113	.	+	.	ID=5.trna8.exon1;Parent=5.trna8;
5	tRNAscan	exon	1706129	1706164	.	+	.	ID=5.trna8.exon2;Parent=5.trna8;
5	tRNAscan	tRNA	1720549	1720652	69.9	-	.	ID=5.trna10;Name=5.tRNA10-ValCAC;isotype=Val;anticodon=CAC;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	1720615	1720652	.	-	.	ID=5.trna10.exon1;Parent=5.trna10;
5	tRNAscan	exon	1720549	1720584	.	-	.	ID=5.trna10.exon2;Parent=5.trna10;
5	tRNAscan	tRNA	1727263	1727349	67.5	+	.	ID=5.trna9;Name=5.tRNA9-PheGAA;isotype=Phe;anticodon=GAA;gene_biotype=tRNA;
5	tRNAscan	exon	1727263	1727299	.	+	.	ID=5.trna9.exon1;Parent=5.trna9;
5	tRNAscan	exon	1727314	1727349	.	+	.	ID=5.trna9.exon2;Parent=5.trna9;
1	tRNAscan	tRNA	593243	593328	60.6	+	.	ID=1.trna1;Name=1.tRNA1-ThrTGT;isotype=Thr;anticodon=TGT;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	593243	593279	.	+	.	ID=1.trna1.exon1;Parent=1.trna1;
1	tRNAscan	exon	593293	593328	.	+	.	ID=1.trna1.exon2;Parent=1.trna1;
1	tRNAscan	tRNA	604436	604530	45.1	+	.	ID=1.trna2;Name=1.tRNA2-SerAGA;isotype=Ser;anticodon=AGA;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	604436	604472	.	+	.	ID=1.trna2.exon1;Parent=1.trna2;
1	tRNAscan	exon	604487	604530	.	+	.	ID=1.trna2.exon2;Parent=1.trna2;
1	tRNAscan	tRNA	604682	604776	45.1	-	.	ID=1.trna20;Name=1.tRNA20-SerAGA;isotype=Ser;anticodon=AGA;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	604740	604776	.	-	.	ID=1.trna20.exon1;Parent=1.trna20;
1	tRNAscan	exon	604682	604725	.	-	.	ID=1.trna20.exon2;Parent=1.trna20;
1	tRNAscan	tRNA	623395	623489	45.1	+	.	ID=1.trna3;Name=1.tRNA3-SerAGA;isotype=Ser;anticodon=AGA;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	623395	623431	.	+	.	ID=1.trna3.exon1;Parent=1.trna3;
1	tRNAscan	exon	623446	623489	.	+	.	ID=1.trna3.exon2;Parent=1.trna3;
1	tRNAscan	tRNA	634364	634458	45.1	-	.	ID=1.trna19;Name=1.tRNA19-SerAGA;isotype=Ser;anticodon=AGA;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	634422	634458	.	-	.	ID=1.trna19.exon1;Parent=1.trna19;
1	tRNAscan	exon	634364	634407	.	-	.	ID=1.trna19.exon2;Parent=1.trna19;
1	tRNAscan	tRNA	874384	874478	53.4	+	.	ID=1.trna4;Name=1.tRNA4-AlaAGC;isotype=Ala;anticodon=AGC;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	874384	874420	.	+	.	ID=1.trna4.exon1;Parent=1.trna4;
1	tRNAscan	exon	874443	874478	.	+	.	ID=1.trna4.exon2;Parent=1.trna4;
1	tRNAscan	tRNA	879922	880016	53.4	+	.	ID=1.trna5;Name=1.tRNA5-AlaAGC;isotype=Ala;anticodon=AGC;gene_biotype=tRNA;

1	tRNAscan	exon	879922	879958	.	+	.	ID=1.trna5.exon1;Parent=1.trna5;
1	tRNAscan	exon	879981	880016	.	+	.	ID=1.trna5.exon2;Parent=1.trna5;
1	tRNAscan	pseudogene	941553	941648	32.0	+	.	ID=1.trna6;Name=1.tRNA6-SerCGA;isotype=Ser;anticodon=CGA;gene_biotype=pseudogene;
1	tRNAscan	exon	941553	941591	.	+	.	ID=1.trna6.exon1;Parent=1.trna6;
1	tRNAscan	exon	941605	941648	.	+	.	ID=1.trna6.exon2;Parent=1.trna6;
1	tRNAscan	tRNA	956893	956986	53.4	+	.	ID=1.trna7;Name=1.tRNA7-AlaAGC;isotype=Ala;anticodon=AGC;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	956893	956929	.	+	.	ID=1.trna7.exon1;Parent=1.trna7;
1	tRNAscan	exon	956951	956986	.	+	.	ID=1.trna7.exon2;Parent=1.trna7;
1	tRNAscan	tRNA	957471	957564	53.4	-	.	ID=1.trna18;Name=1.tRNA18-AlaAGC;isotype=Ala;anticodon=AGC;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	957528	957564	.	-	.	ID=1.trna18.exon1;Parent=1.trna18;
1	tRNAscan	exon	957471	957506	.	-	.	ID=1.trna18.exon2;Parent=1.trna18;
1	tRNAscan	tRNA	1061204	1061275	56.3	+	.	ID=1.trna8;Name=1.tRNA8-GlyTCC;isotype=Gly;anticodon=TCC;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	1061204	1061275	.	+	.	ID=1.trna8.exon1;Parent=1.trna8;
1	tRNAscan	tRNA	1207268	1207368	51.9	-	.	ID=1.trna17;Name=1.tRNA17-LeuAAG;isotype=Leu;anticodon=AAG;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	1207331	1207368	.	-	.	ID=1.trna17.exon1;Parent=1.trna17;
1	tRNAscan	exon	1207268	1207309	.	-	.	ID=1.trna17.exon2;Parent=1.trna17;
1	tRNAscan	tRNA	1207808	1207908	51.9	-	.	ID=1.trna16;Name=1.tRNA16-LeuAAG;isotype=Leu;anticodon=AAG;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	1207871	1207908	.	-	.	ID=1.trna16.exon1;Parent=1.trna16;
1	tRNAscan	exon	1207808	1207849	.	-	.	ID=1.trna16.exon2;Parent=1.trna16;
1	tRNAscan	tRNA	1216994	1217094	51.9	+	.	ID=1.trna9;Name=1.tRNA9-LeuAAG;isotype=Leu;anticodon=AAG;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	1216994	1217031	.	+	.	ID=1.trna9.exon1;Parent=1.trna9;
1	tRNAscan	exon	1217053	1217094	.	+	.	ID=1.trna9.exon2;Parent=1.trna9;
1	tRNAscan	tRNA	1368073	1368143	48.5	-	.	ID=1.trna15;Name=1.tRNA15-GlyGCC;isotype=Gly;anticodon=GCC;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	1368073	1368143	.	-	.	ID=1.trna15.exon1;Parent=1.trna15;
1	tRNAscan	tRNA	1495746	1495835	54.8	+	.	ID=1.trna10;Name=1.tRNA10-IleTAT;isotype=Ile;anticodon=TAT;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	1495746	1495782	.	+	.	ID=1.trna10.exon1;Parent=1.trna10;
1	tRNAscan	exon	1495800	1495835	.	+	.	ID=1.trna10.exon2;Parent=1.trna10;

1	tRNAscan	tRNA	1806540	1806631	55.3	-	.	ID=1.trna14;Name=1.tRNA14-AlaTGC;isotype=Ala;anticodon=TGC;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	1806595	1806631	.	-	.	ID=1.trna14.exon1;Parent=1.trna14;
1	tRNAscan	exon	1806540	1806575	.	-	.	ID=1.trna14.exon2;Parent=1.trna14;
1	tRNAscan	tRNA	1930477	1930565	49.9	-	.	ID=1.trna13;Name=1.tRNA13-ValAAC;isotype=Val;anticodon=AAC;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	1930528	1930565	.	-	.	ID=1.trna13.exon1;Parent=1.trna13;
1	tRNAscan	exon	1930477	1930512	.	-	.	ID=1.trna13.exon2;Parent=1.trna13;
1	tRNAscan	tRNA	2188017	2188118	70.0	-	.	ID=1.trna12;Name=1.tRNA12-ValCAC;isotype=Val;anticodon=CAC;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	2188081	2188118	.	-	.	ID=1.trna12.exon1;Parent=1.trna12;
1	tRNAscan	exon	2188017	2188052	.	-	.	ID=1.trna12.exon2;Parent=1.trna12;
1	tRNAscan	tRNA	2260222	2260315	47.1	-	.	ID=1.trna11;Name=1.tRNA11-GluCTC;isotype=Glu;anticodon=CTC;gene_biotype=tRNA;
1	tRNAscan	exon	2260279	2260315	.	-	.	ID=1.trna11.exon1;Parent=1.trna11;
1	tRNAscan	exon	2260222	2260256	.	-	.	ID=1.trna11.exon2;Parent=1.trna11;
14	manual	gene	328270	328387	.	-	.	ID=CNAG_13208;Name=CNAG_13208.snRNA.U6
5	manual	gene	1228129	1228230	.	+	.	ID=CNAG_13209;Name=CNAG_13209.snRNA.U5
1	manual	gene	801198	801479	.	-	.	ID=CNAG_13210;Name=CNAG_13210.7SL
12	manual	gene	293122	293318	.	-	.	ID=CNAG_13211;Name=CNAG_13211.snoRNAHACA
1	manual	gene	789325	789440	.	-	.	ID=CNAG_13212;Name=CNAG_13212.snoRNACD

Publications

Structure, composition and biological properties of fungal extracellular vesicles

Juliana Rizzo, Adam Taherly et Guilhem Janbon

microLife - Publié

SHORT REVIEW

Structure, composition and biological properties of fungal extracellular vesicles

Juliana Rizzo¹, Adam Taherly^{1,2} and Guilhem Janbon^{1,*†}

¹Unité Biologie des ARN des Pathogènes Fongiques, Département de Mycologie, Institut Pasteur, F-75015 Paris, France and ²Ecole Doctorale BioSPC, Université de Paris, 75006 Paris, France

*Corresponding author: Unité Biologie des ARN des Pathogènes Fongiques, Département de Mycologie, Institut Pasteur, F-75015 Paris, France.
Tel: 33 1 45 68 83 56; E-mail: guilhem.janbon@pasteur.fr

One sentence summary: The study of fungal extracellular vesicles is a fast evolving field which will impact the development of new tools to fight fungal infections in the future.

†Guilhem Janbon, <http://orcid.org/0000-0002-4788-1154>

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are lipidic nanosized particles that deliver a highly complex molecular cargo between cells and organisms and may serve numerous functions in intercellular communication, thereby influencing the evolution of microbial communities. Their roles in infectious diseases have been studied for a long time, comprising viral, bacterial, parasitic and to a less extent, fungal infections. Over the last few years, fungal EVs have become an increasingly active research field. Nevertheless, the understanding of EV functions during fungal infections poses challenging points, comprising the genetics regulating EV release, the EV structural and compositional complexity, the heterogeneity of the EV populations and their impact on host-pathogen interactions. This review explores the state-of-the-art investigations on fungal EVs and how this fast-evolving field can impact the development of new tools to fight fungal infections.

Keywords: fungi; extracellular vesicles; pathogens; intercellular communication; virulence; interkingdom communication

INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs) are membranous compartments that enclose diverse biomolecules and are released by virtually all living cells in the three domains of life (Gill, Catchpole and Forterre 2019). EVs isolated in different studies vary in size, cargo, density and morphology and originate either from the plasma membrane or the endocytic trafficking pathway (Mathieu *et al.* 2019). Extracellular vesicles have been suggested as universal communication players in the microbial world (Tsatsaronis *et al.* 2018). They were reported as circulating particles during the development of different human pathologies and infectious diseases (Schorey and Harding 2016; Szempruch *et al.* 2016; Hosseini-Beheshti and Grau 2018; Shah, Patel and Freedman 2018), as well as in different environmental niches, such as marine ecosystems (Biller *et al.* 2014). Three major EV subtypes have been studied and discussed by several groups: exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. Exosomes

(30–150 nm) are formed in the endosomal pathway through the inward budding of endosomal membranes during their maturation into multivesicular bodies (MVB) that bind to the plasma membrane and release the intraluminal vesicles (ILVs) through exocytosis (Gandham *et al.* 2020). Microvesicles (100–1000 nm) are formed by the outward budding of the plasma membrane, and apoptotic bodies are vesicles formed during apoptosis which are usually larger than 1000 nm (Gandham *et al.* 2020).

EVs were first described as ‘platelet dust’ by Peter Wolf in 1967, and for a long time, they were considered debris of damaged cells (Wolf 1967). However, over the past few decades, EVs were shown to be not simply inert cellular products but biologically active particles instead, regulating cell physiology, delivering virulence-associated molecules, mediating the long-distance transfer of genetic information, among other complex functions (Mathieu *et al.* 2019; Pegtel and Gould 2019). Extracellular vesicle release has been reported in various microorganisms,

Received: 29 April 2021; Accepted: 22 June 2021

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of FEMS. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

such as bacteria, archaea, protozoa, virus-infected cells and fungi and the impact of EV production during host-pathogen interactions is an active research area and has been extensively reviewed (Szempruch et al. 2016; Raab-Traub and Dittmer 2017; Freitas et al. 2019; Gill, Catchpole and Forterre 2019; de Souza and Barrias 2020; Torrecilhas et al. 2020; Rizzo, Rodrigues and Janbon 2020a; Piffer et al. 2021; Sabatke et al. 2021).

In fungi, ultrastructural analysis of *Aspergillus nidulans* protoplasts carried out early in the 1970s showed EV-like particles pinching off from fungal plasma membrane, then referred to as 'subprotoplasts' (Gibson and Peberdy 1972). The presence of secreted vesicles was then indicated in 1973 in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* (Takeo et al. 1973). After these initial microscopical evidences, EV structure and composition were first described more than 30 years later in *C. neoformans* (Rodrigues et al. 2007, 2008) and the number of studies characterizing EVs in fungi have been incredibly increasing since then. Fungal EVs have been described in more than 50 independent studies comprising pathogenic and nonpathogenic species, and the timeline concerning most of these reports was recently reviewed (de Oliveira et al. 2020; Rizzo, Rodrigues and Janbon 2020a).

Extracellular vesicle production is a relevant mechanism of virulence-associated secretion of molecules. It has been described in most of the primary, opportunistic and emerging fungal pathogens, comprising species from the genera *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Aspergillus*, *Sporothrix*, *Paracoccidioides*, *Malassezia*, *Rhizopus*, *Exophiala*, *Pichia*, *Trichophyton* and *Talaromyces* (Albuquerque et al. 2008; Gehrmann et al. 2011; da Silva et al. 2015; Gil-Bona et al. 2015; Bitencourt et al. 2018; Leone et al. 2018; Liu et al. 2018; Peres da Silva et al. 2019; Souza et al. 2019; Brauer et al. 2020; Karkowska-Kuleta et al. 2020; Lavrin et al. 2020; Rizzo et al. 2020b; Yang et al. 2021). EVs were also characterized in many phytopathogens such as *Alternaria infectoria* (Silva et al. 2014), *Trichoderma reesei* (de Paula et al. 2019), *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Bleackley, Dawson and Anderson 2019), *Zymoseptoria tritici* (Hill and Solomon 2020) and *Penicillium digitatum* (Costa et al. 2021). They have also been described in numerous nonpathogenic species such as *Saccharomyces cerevisiae* (Albuquerque et al. 2008), the industrial fungus *T. reesei* (de Paula et al. 2019) and different wine yeast species, including *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida sake* and *Metschnikowia pulcherrima* (Mencher et al. 2020).

The increasing number of publications highlights the interest of the scientific community in fungal EVs and the relevance of these particles in many contexts, including fungal pathophysiology and host interactions (Rodrigues and Casadevall 2018; Zamith-Miranda et al. 2018; de Oliveira et al. 2020; Rizzo, Rodrigues and Janbon 2020a; Piffer et al. 2021), as well as food biotechnology (Morales et al. 2021). However, studies on fungal EV functions are hindered by the limited understanding of their biogenesis, composition and structural diversity. This review explores the recent advances on fungal EVs, focusing on EVs derived from human fungal pathogens.

EVs IN FUNGI: BIOGENESIS, COMPOSITION, STRUCTURE AND CARGO LOADING REGULATION

EV biogenesis

Based on the analogy to EV biogenesis in mammalian cells and the analysis of their structure and cargo, it has been hypothesized that fungal EVs could have different cellular sites of origin as reported earlier (Bielska and May 2019; de Oliveira

et al. 2020; Rizzo, Rodrigues and Janbon 2020a). Electron microscopic approaches revealed that these sites could include the plasma membrane, with events of plasma membrane reshaping and cytoplasmic subtraction (Rodrigues et al. 2013) or the direct vesicle shedding (Rizzo, Rodrigues and Janbon 2020a). It was also suggested that EVs could be originated from vesicles-containing vacuoles or via endosome-derived MVB that fuse with the plasma membrane and release EVs to the extracellular space (Rodrigues et al. 2008). It was also recently suggested that other organelles, such as the intracellular vesicles clusters (IVCs), are important sites for selecting the EV-associated cargo proteins in *S. cerevisiae* (Winters, Hong-Brown and Chiang 2020).

Despite many reports suggesting potential mechanisms of EV production in fungi, mutant strains that cannot produce EVs are yet to be described, suggesting either functional redundancy of genes and pathways implicated in their formation or essentiality of EV production for membrane biosynthesis and consequently for fungal life (Coelho and Casadevall 2019). Nevertheless, many studies suggest that intracellular trafficking might regulate EV formation. In this regard, some members of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) machinery (Hurley 2015) might be implicated in the control of EV production in fungi, as shown in mammalian cells (Mathieu et al. 2019). For instance, Vps2, Vps23, Vps27, Vps36 and Snf7, among others, were shown to regulate the formation, selection of cargo or proper release of EVs in different fungal models such as *S. cerevisiae* (Oliveira et al. 2010b; Zhao et al. 2019), *Candida albicans* (Zarnowski et al. 2018) and *C. neoformans* (Park et al. 2020). Accordingly, some of the corresponding mutant strains produced less EVs than the wild type (WT) without being completely deficient in EV production. Similarly, the autophagy regulator Atg7 and the Golgi reassembly stacking (GRASP) were also suggested to affect EV size. GRASP was also reported to be involved in the transport of vesicular mRNA (Peres da Silva et al. 2018). Recently, the endocytic adaptor protein Cin1 involved in intracellular vesicular traffic in *Cryptococcus deneoformans* has been shown to regulate EV-mediated RNA release (Liu et al. 2020). Also, the anti-fungal drug turbinmicin has been shown to inhibit EV production in *C. albicans* and biofilm formation (Zhao et al. 2021). The mechanism of action of turbinmicin is not completely identified. Still, it seems to target a Sec14-dependent intracellular vesicle trafficking pathway, suggesting that the post-Golgi secretory pathways could also be involved in EV production in this yeast (Zhang et al. 2020).

Other proteins implicated in lipid metabolism and transport, such as the lipid flippase APT1 (Rizzo et al. 2014) and the lipid scramblase AIM25 (Reis et al. 2019) in *Cryptococcus*, as well as the lipid biosynthetic phosphatidylserine decarboxylase encoding genes, PSD1 and PSD2 (Wolf et al. 2015) in *C. albicans* were also reported to regulate EV diversity and composition. Similarly, the sterol C-24 methyltransferase encoding gene *ERG6*, involved in ergosterol biogenesis, regulates EV size and cargo in *C. neoformans* (de Oliveira et al. 2020). Overall, the above studies suggest that several EV production pathways as well as complex cargo sorting mechanisms exist in fungi.

EV composition

Fungal EVs enclose a highly diverse cargo, comprising lipids, proteins, carbohydrates, pigments, nucleic acids, prions, toxins and other small molecules (Rodrigues et al. 2007, 2008; Albuquerque et al. 2008; Vallejo et al. 2012b; da Silva et al. 2015; Gil-Bona et al. 2015; Kabani and Melki 2015; Vargas et al. 2015; Costa et al. 2021; Reis et al. 2021). However, despite significant advances in new isolation strategies and characterization methods, such as powerful electron microscopy techniques and

high-sensitivity nanoparticle analyses (Gandham et al. 2020), the characterization of fungal EV composition is still in its infancy. The major components identified in EVs from the most relevant fungal pathogens are described below and summarized in Fig. 1. It is important to highlight that most compositional studies on fungal EVs have not used any enrichment analysis, which can hinder downstream studies. Moreover, although different gradient-based approaches have been suggested to increase the EV purity in mammals (Roux et al. 2020), only a few reports using such strategies have been published in fungi (Rodrigues et al. 2007; Yang et al. 2021). Thus, most published EV components should be considered better as EV-associated until their genuine EV nature could be more carefully addressed. In this sense, a standardization of fungal EV purification protocols is necessary in order to identify fungal EVs markers as well as for compositional and functional analyses.

Proteins

Different studies exploring fungal EV proteomics were recently discussed (Bleackley, Dawson and Anderson 2019; de Toledo Martins et al. 2019). Overall, proteins related to cell wall biogenesis, plasma membrane, stress responses, pathogenesis, transport and signaling are the most commonly identified in EVs from multiple species (Nimrichter et al. 2016; Bleackley, Dawson and Anderson 2019). Notably, the activity of many virulence-associated enzymes was identified in fungal EVs. In *C. neoformans*, laccase, as well as urease and acid phosphatase activities, were described to be associated with EVs (Rodrigues et al. 2008). Interestingly, it has been recently shown that Vps27, a key protein of the ESCRT-0 complex essential for virulence in *C. neoformans*, is required for the laccase transport to the cell wall (Park et al. 2020). A *vps27*Δ mutant also accumulated MVB and showed a partial defect in EV production, releasing EVs with larger size distribution than wild type, emphasizing the hypothesis that EV-mediated transport of enzymes is an important mechanism for fungal pathogenesis. The presence of active enzymes associated with EVs was also observed in other species, such as a laccase in *Paracoccidioides brasiliensis* (Vallejo et al. 2012a), as well as a laccase and an urease in *H. capsulatum* (Baltazar et al. 2018). A β-glucosidase was also reported to be associated with EVs in *T. reesei* (de Paula et al. 2019).

A total of two recent EV-protein enrichment analyses suggest the existence of EV-marker proteins in fungi. In *C. albicans*, a list of 22 proteins as EV markers, including the claudin-like Sur7 family proteins (including Sur7 and Evp1) and the GPI-anchored glycosidase Phr1, have been suggested (Dawson et al. 2020). In *Cryptococcus*, 17 EV-associated proteins in all three species, *C. neoformans*, *C. deneoformans* and *Cryptococcus deuterogattii* represent potential cryptococcal EV markers (Rizzo et al. 2021). Additionally, six membrane-associated protein families were described as typically associated with these EVs, including the chitin deacetylase (Cda) family, the Ricin-type beta-trefoil lectin domain-containing protein (Ril) family, the putative glyoxal oxidase (Gox) family, the tetraspanin membrane proteins containing a SUR7/Pall family motif (Tsh), the pr4/barwin4 domain protein (Blp) family and the multicopper oxidase (Cfo) (Rizzo et al. 2021). Interestingly, some of these proteins were described as immunogenic, such as Mp65 in *C. albicans* (Gomez et al. 2000) and Mp88 in *C. neoformans* (Levitz et al. 2001; Huang et al. 2002). Antigenic proteins were also identified for other fungal EVs, such as the 70-kDa glycoprotein (Gp70) in *S. brasiliensis* (Ikeda et al. 2018), which was reported as an important virulence factor in *Sporothrix* (de Almeida et al. 2015).

Using an orthology approach, a comparative analysis of EV protein content from multiple fungal species has been recently conducted (Parreira et al. 2021). The data were compiled in a novel free web repository created for fungal EV datasets, named ExVe (<http://exve.icc.fiocruz.br>). Interestingly, the OG6.100083 (Hsp70 Pfam domain) was the only ortholog group found in all considered species, suggesting that heat-shock related proteins might play a universal role in fungal EVs (Parreira et al. 2021).

Lipids

The lipid composition of fungal EVs is still poorly described. The published data are also difficult to compare and integrate due to the diversity of strategies employed in these analyses. Nevertheless, lipid analysis by mass spectrometry revealed that virulence-associated glycosphingolipids, such as glucosylceramide (GlcCer) and sterols are enriched in cryptococcal EVs (Rodrigues et al. 2007). Similarly, in *C. albicans* EVs, the major lipids detected by thin-layer chromatography were sterols (ergosterol and lanosterol) and GlcCer (Vargas et al. 2015). Mass spectrometry identified many phospholipids in *H. capsulatum* EVs (Albuquerque et al. 2008). More recently, lipidomic analysis detected on hundred different lipids, comprising phospholipids, triacylglycerides (TG), diacylglycerides (DG), ceramides, sphingomyelins and fatty acids (FA), suggesting a very complex organization of the lipidic membrane of EVs (Cleare et al. 2020). Interestingly, the EV lipid profile obtained from cells grown in distinct media was remarkably different (Cleare et al. 2020). Similarly, a detailed EV lipidomic analysis performed in *P. brasiliensis* revealed two species of monohexosylceramide and 33 phospholipids, together with glycolipids such as GlcCer, and sterols like brassicasterol, ergosterol and lanosterol (Vallejo et al. 2012a).

Thus, the knowledge of the lipid content in fungal EVs appears today as a very long list of lipid classes without any associated function. A better understanding of fungal lipid components is fundamental since many EV-associated lipids can be closely linked to virulence during infection, as for the immunogenic glycolipid sterylglucoside (SG), which seems to be enriched in *C. neoformans* EVs and can induce protection of the invertebrate host *Galleria mellonella* against a lethal challenge with *C. neoformans* (Colombo et al. 2019). Similarly, *C. albicans* EVs can inhibit yeast-to-hyphae differentiation, this effect being mediated by EV associated lipids (Honorato et al. 2021).

Carbohydrates

Approaches to characterize the fungal EV glycol-profile have also been undertaken. In *C. neoformans* immunogold labeling using a specific monoclonal antibody suggested that the presence of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan (GXM) associated with EVs (Rodrigues et al. 2007). Similarly, in 2011, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) revealed the presence of immunogenic α-linked galactopyranosyl (α-Gal) epitopes associated with *P. brasiliensis* EVs (Vallejo et al. 2011). Subsequently, *Paracoccidioides* EV fractions were exhibited to contain residues of glucose (Glc), mannose (Man) and galactose (Gal), comprising a high molecular mass α-glucan and a galactofuranosylmannan, which were resolved through high-resolution analyses and determined to dominate the population of EV polysaccharides (da Silva et al. 2015). The presence of small amounts of cell wall-associated polysaccharides such as (1-3)-glucan and (1-6)-glucan was also confirmed. Moreover, plant lectin microarray profiling revealed terminal Man and N-acetylglucosamine (GlcNAc) residues exposed at the EV surface (da Silva et al. 2015).

It was also suggested that the vesicular polysaccharide content (specifically mannan and glucan) could be a major

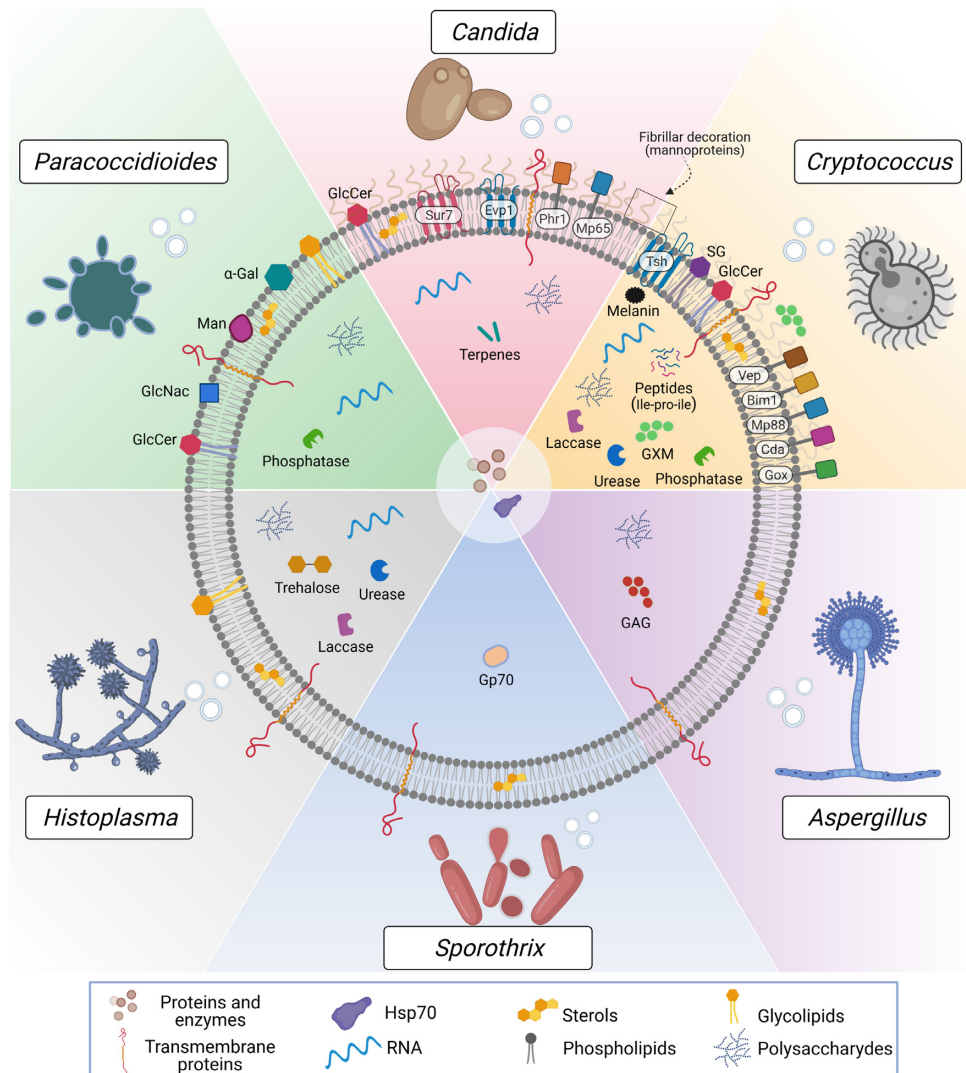


Figure 1. Compositional aspects of EVs released by the main fungal pathogens. EVs are nanoscale lipid bags enclosing a highly complex molecular cargo. EVs have been studied in many pathogenic fungi, including yeast and filamentous species, such as *Cryptococcus*, *Candida*, *Paracoccidioides*, *Histoplasma*, *Sporothrix* and *Aspergillus*. The structure and compositional characterization of fungal EVs are still far from being complete. However, in this scheme, we aimed to summarize the major surface and intraluminal EV components, comprising proteins, polysaccharides, lipids, nucleic acids, small molecules and pigments. Some of the proteins are predicted to be GPI-anchored, such as Phr1 (in *C. albicans*), and Mp88, Vep (Vesicles enriched protein-4 and 5) and other members of the chitin deacetylase family (Cda), the putative glyoxal oxidase family (Gox) and the BCS-inducible membrane protein 1 (Bim1) in *Cryptococcus*. Interestingly, many of these proteins have already been described as highly immunogenic. Other transmembrane proteins, such as Sur7 (*C. albicans*) and Tsh (*Cryptococcus*), are tetraspanins, considered biomarkers of mammalian EVs. Many of those membrane/GPI-anchored proteins are mannosylated and suggested as the molecular composition of the fibrillar decoration on the surface of *C. albicans* and *C. neoformans* EVs revealed by electron microscopy. This mannoprotein-based decoration is not exclusive of pathogenic species since it was also detected in the model yeast *S. cerevisiae*. The presence of this feature needs to be further explored for other pathogens. Carbohydrates involved with stress response were found in *Histoplasma capsulatum* EVs, such as trehalose, and immunogenic polysaccharides were described in fungal EVs, such as the major capsular polysaccharide Glucuronoxylomannan (GXM) in *Cryptococcus* and the exopolysaccharide Galactosaminogalactan (GAG) in *Aspergillus fumigatus*. Glucosyl residues were found on the surface of *Paracoccidioides* EVs, such as mannose (Man) and N-acetylglucosamine (GlcNAc), together with the immunogenic α -linked galactopyranosyl (α -Gal). Some enzymes were biochemically described as active in fungal EVs, including urease, laccase and phosphatase. Besides the presence of laccase, it has been suggested that its final product, the pigment melanin, was also enclosed in *C. neoformans* EVs. Actually, a model of EV-based melanization has been proposed in *C. neoformans* (Eisenman et al. 2009). However, additional experiments are needed to confirm it. Similarly, we cannot exclude the presence of other enzymes detected by proteomics, such as chitinases and cell wall remodeling enzymes, but their activities remain to be confirmed. Some other possible EV-luminal components, such as the 70-kDa glycoprotein (Gp70) in *Sporothrix brasiliensis* were shown to be antigenic, and the peptide leucine-proline-isoleucine (Ile-Pro-Ile) was reported to be biologically active during *C. neoformans* *in vivo* infection. Among the lipids, many phospholipids, sterols and glycolipids were described, comprising the glycosphingolipid Glucosylceramide (GlcCer) and the sterylglucoside (SG); the latter was detected only in *C. neoformans*. Moreover, terpenes were suggested as the major EVs components inhibiting yeast-to-hyphae transition in *C. albicans*. However, it is unknown if this class of lipids would be associated with membranes or in the lumen of the vesicles. Moreover, although more abundantly found in *C. albicans*, some derivatives were also present in *H. capsulatum* and *S. cerevisiae* EVs. Few other EVs-associated structural lipids were not explored as their biological functions are not deciphered so far. By analyzing the EV-associated proteins among different pathogenic species, it is suggested that the ortholog group of the Heat-shock protein (Hsp70) was the only one found in all these species. For clarity, all the RNA sub-classes identified in fungal EVs were not explored in this figure. The vesicular RNA diversity is detailed in plain text.

source of the extracellular polymeric matrix material in *C. albicans* biofilms (Zarnowski et al. 2018). In this study, exogenous wild type EVs were able to rescue the matrix production in ESCRT mutant biofilms. In *A. fumigatus*, it was also shown that protoplasts submitted to cell-wall regeneration change their carbohydrate-associated EV profile compared to non-regeneration conditions (Rizzo et al. 2020b). Thus, the immunogenic polysaccharide galactosaminogalactan (GAG) was detected in EVs during cell wall synthesis but not in control, revealing that the EV carbohydrate composition changes during fungal cell wall biosynthesis. The amount and diversity of EV-associated carbohydrates is also dependent on the conditions of fungal growth. For instance, EVs obtained from *H. capsulatum* cells grown on Ham's medium presented the highest amount of carbohydrates associated with energy production and storage, whereas trehalose, a stress tolerance related carbohydrate, was more abundant in EVs obtained from cells grown on BHI medium (Cleare et al. 2020).

Prions, small molecules and mycotoxins

In fungi, the EV metabolome is generally poorly described. Nevertheless, the presence of EV-associated toxins was suggested in few fungal models, such as the cotton pathogen *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Bleackley, Dawson and Anderson 2019). In the phytopathogen *P. digitatum*, untargeted metabolomics have been identified as EV-metabolite, including tryptotoqualanines and the mycotoxin fungisporin, which are important small molecules for plant pathogenesis (Costa et al. 2021). By using chromatographic and spectrometric approaches and metabolomic techniques, small molecules were identified in EVs obtained from the pathogen *C. deuterogattii*. One of these vesicular peptides, chemically characterized as leucine-proline-isoleucine (Ile-Pro-Ile), was reported as biologically active during fungal infection in the *G. mellonella* model (Reis et al. 2021). These recent studies suggest that EV-associated small molecules could play major roles in host–pathogen interactions and pave the way for further discoveries in this field.

Finally, it has been demonstrated that EVs can also export proteinaceous infectious particles (prions), such as the prion Sup35p (Kabani and Melki 2015). Sup35p is exported in *S. cerevisiae* EVs in its soluble and aggregated infectious states, indicating that prions can also be transmitted between cells through fungal EVs.

RNA

For more than a decade, the composition, function and diversity of RNA molecules in EVs has been the focus of a large number of studies in mammals and in some microorganisms. Accordingly, in 2015, a solid sequencing approach was used to identify several EV-associated RNA sub-classes by *C. neoformans*, *P. brasiliensis*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* (da Silva et al. 2015). They identified mRNAs, microRNA-like (miRNA-like) and several sub-classes of non-coding RNAs (ncRNAs), including transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA), small nucleolar RNA (snoRNAs) and small nuclear RNA (snRNAs). Since then, few studies reported additional RNA sub-classes in fungal EVs depending on the employed sequencing strategy. For instance, *Malassezia sympodialis* produces exosome-like vesicles called MalaEx, which carry very small RNAs of unknown function in a size range of 16–20 nucleotides (Rayner et al. 2017). In *H. capsulatum*, RNA molecules larger than 200 nucleotides such as mRNAs, rRNAs, tRNAs and snRNAs, and snoRNAs were identified (Alves et al. 2019). A group of small RNAs (25–40 nucleotides) was also identified in the same study. These RNAs antisense of several mRNAs

encoding proteins of unknown function has been suggested to belong to the miRNA sub-class (Alves et al. 2019). More recently, the transcriptome of *C. deuseformans* EVs was characterized, and mRNAs and miRNAs-like associated with these particles were confirmed (Liu et al. 2020). This study also identified siRNAs and lncRNAs as the major components of the *C. deuseformans* extracellular transcriptome (Liu et al. 2020). Accordingly, several RNA binding proteins (RBPs) including the main components of the RISC complex were identified in the EV proteome from *H. capsulatum* (Alves et al. 2019).

Although data sets describing the fungal EV transcriptome are still small, several reports suggest its plasticity in response to environmental cues and genetic mutations, as well as a large diversity between fungal species and even strains. Thus, several differences in the composition and abundances of ncRNAs and mRNAs have been shown between the EV transcriptome of two *P. brasiliensis* strains and the one of *Paracoccidoides lutzii* (Peres da Silva et al. 2019). Similarly, among the 124 mRNAs identified in *H. capsulatum* EVs, 93 were enriched in the highly virulent G217B strain and 31 in the less virulent G186AR strain (Alves et al. 2019). Very recently, the analysis of *Candida auris* EV transcriptomes in the presence or absence of caspofungin revealed a dynamic composition of EV specific transcripts (Zamith-Miranda et al. 2020). Moreover, mutations in GRASP, ATG7 or CIN1 have been shown to affect the EV-transcriptome in *Cryptococcus*, suggesting a tight control of its composition (Peres da Silva et al. 2018; Liu et al. 2020).

As for other mammalian cell-derived EVs, identifying diverse RNA sub-classes associated with EVs raises many questions regarding the life cycle of exRNAs in fungi, including the molecular mechanisms underlying their specific loading in EVs and their biological functions (Gruner and McManus 2021). These recent reports also highlight the need for more studies on the characterization of exRNAs associated with different EV subpopulations in fungi.

EV structure

Despite initial reports describing differences in the morphology of fungal EV populations (Albuquerque et al. 2008; Rodrigues et al. 2008), the EV structural diversity remained largely unknown until recently. Thus, recent Cryo-electron microscopy (Cryo-EM) analyses revealed that most *Cryptococcus*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* EV lipid bilayer are superficially covered by a mixture of molecules assuming a fibrillar decoration, mostly composed of membrane-associated mannoproteins (Rizzo et al. 2021). Yet, about 10% of the EVs are not decorated. On average, these EVs are smaller, suggesting different biosynthetic pathways (Rizzo et al. 2021). In *A. fumigatus*, electron microscopy (EM) analysis suggested the presence of fibril-like structure of unknown composition covering EVs extracted from cells that grow under conditions that stimulate cell wall synthesis, suggesting that EV structural changes might also be associated with the cellular physiological status (Rizzo et al. 2020b).

The presence of mannoproteins in EV preparations was also reported in other fungal pathogens (Dawson et al. 2020; Karkowska-Kuleta et al. 2020). However, in *M. sympodialis*, which is largely devoid of GPI-anchor proteins and many other fungal typical mannoproteins (Gioti et al. 2013), EVs exhibit no evidence of decoration on their surface (Johansson et al. 2018). This highlights significant structural diversity in fungal EVs. Many of those fungal-EV associated mannoproteins were previously described as immunogenic proteins (Gomez et al. 2000; Specht et al. 2017), suggesting that these surface decorations might

impact host–pathogen interactions and disease development. Glycans are also a common feature for many types of other non-fungal cell-derived EVs (Williams et al. 2018) and different structures covering the vesicular surfaces were also revealed by Cryo-EM; for instance, in myxobacteria (Goes et al. 2020), virus-infected cells (Yang et al. 2020), human cell lines (Noble et al. 2020) and EVs obtained from human fluids such as urine (Wang et al. 2019). However, the molecular composition and the biological relevance of these structures remain to be explored.

The fungal EVs size ranges from 10 to 1000 nm, but the observed distribution depends on the technique employed for size measurements (Bielska and May 2019; Piffer et al. 2021). It is important to note that larger vesicles (>400 nm) and very small EVs (<50 nm) are not well quantified in most Nanoparticle Tracking Analyses (NTA), and small EVs are not easy to detect by most common flow cytometers. Therefore, a combination of complementary techniques providing single EV imaging and single-particle analyzers is recommended to explore the diversity of EV structure (Théry et al. 2018). The most reliable technique to estimate EV size is Cryo-EM, with the caveat that it can only be performed on a limited number of samples. In *C. neoformans*, for instance, the combination of high-resolution flow cytometry and Cryo-EM techniques allowed the identification of a prominent population of EVs smaller than 100 nm, contrasting to the previous NTA and DLS analyses (Rizzo et al. 2021).

EV cargo loading regulation

Although the underlying mechanisms of EV composition regulation remain unknown, the differential loading of specific or enriched EV molecules seems to be influenced by numerous conditions, such as the environment and nutrition status, including conditions posed by the host cells. For instance, in the dimorphic fungus *H. capsulatum*, distinct media conditions alters EV characteristics and payloads, such as the sorting of organic molecules (Cleare et al. 2020). Similarly, in *C. deneoformans*, nutrient availability interferes with EV size and cargo (Marina et al. 2020). It has been shown that EVs obtained from cells grown on nutrient-poor medium have a higher hydrodynamic diameter, increased activity of virulence-associated enzymes and increased amount of capsular polysaccharide GXM, as compared to EVs obtained from cells grown on rich-medium (Marina et al. 2020). *H. capsulatum* EV protein load and release are modulated by specific antibody binding to fungal cell surface proteins (Matos Baltazar et al. 2016). The binding of these monoclonal antibodies eventually alter EV-associated laccase activity, thereby influencing the pathophysiological roles of these EVs during the host-pathogen interaction (Baltazar et al. 2018).

Some other host factors can also affect EV stability. For instance, serum albumin could lead to the disruption of *C. neoformans* EVs (Wolf, Rivera and Casadevall 2012). Moreover, the mammalian β -galactoside-binding protein Galectin-3 (Gal-3), which is increased during cryptococcal infection, was described to inhibit *C. neoformans* growth and exerts a direct lytic effect on fungal EVs, thereby reducing EV stability and possibly changes the course of infection (Almeida et al. 2017). Similarly, increasing concentrations of Gal-3 disrupted *P. brasiliensis* EVs in a dose-dependent manner (Hatanaka et al. 2019).

EVs MEDIATING INTERCELLULAR AND INTER-KINGDOM COMMUNICATION PROCESSES

By analogy with their mammalian counterparts, fungal EVs are thought to be a mean for communication *in vivo* and *in vitro*

between cells of the same species and with the host during infection. A few examples of EV-based communication in fungi have been reported. In 2018, transwell assays were used to demonstrate that EVs released by *C. deuterogattii* virulent strains can be taken up by infected macrophages where they promote intracellular yeast replication of a less virulent strain. This effect appears to be dependent on some proteins and RNAs, as suggested through proteinase K and RNase EV treatments (Bielska et al. 2018). These results suggest EV-based long-distance pathogen-to-pathogen communication regulating virulence in this fungal pathogen. This hypothesis is enforced by *in vivo* studies, where pre-incubation of poorly virulent *C. neoformans* cells with EVs produced by a hypervirulent strain increases the virulence of the recipient cells when tested in a *G. mellonella* larvae model of infection (Hai et al. 2020).

In *C. albicans*, EVs produced by yeast cells can inhibit filamentation and biofilm formation, suggesting that growth conditions and the status of the cells impact the biological properties of EVs in fungi (Honorato et al. 2021). This study also reported that yeast cells previously incubated with *C. albicans* EVs, lose their ability to invade the agar and became avirulent in *G. mellonella* larvae (Honorato et al. 2021). In contrast, EVs produced from *C. albicans* cells grown under biofilm conditions were shown to complement the extracellular matrix accumulation defect and fluconazole hypersensitivity of ESCRT mutants (Zarnowski et al. 2018). These studies suggest different properties and composition of EVs isolated from yeast cells and filaments in *C. albicans*. Interestingly, adding exogenous EVs reduced the efficacy of combined therapy (turbinmicin–fluzonazole) on *C. albicans* biofilms (Zhao et al. 2021).

Because EV-associated RNA species play central roles in intercellular communication in other models (Tsatsaronis et al. 2018), and because of the wide range of RNA molecules identified in fungal EVs, it is predictable that EV RNAs are among these mediators in fungi. Accordingly, in *P. brasiliensis* EVs, several exonic sRNA-like sequences were identified as mapping to the α -amylase coding gene, which is involved in the synthesis of α - and β -glucans, suggesting a potential role of EVs in the regulation of the expression of these virulence factors (Peres da Silva et al. 2019). Moreover, two spectacular examples of fungal extracellular RNAs interacting with the host in a cross-kingdom communication have been reported. The first one describes an extracellular miRNA produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, which binds to an argonaute protein of the host (*Anopheles stephensi*) and eventually suppresses the host immunity by silencing the expression of a toll receptor ligand (Cui et al. 2019). Yet, it is important to note that the loading of this miRNA in fungal EVs remains to be demonstrated. Similarly, an extracellular miRNA produced by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* was shown to hijack the *Arabidopsis* RISC complex, suppressing the host immunity (Weiberg et al. 2013). Although the delivery pathway was not identified, it is reminiscent of an EV-based host-pathogen interaction. Interestingly, in that model, EVs produced by the host were shown to contain siRNAs together with several *Arabidopsis* RNA-binding proteins that were able to penetrate fungal cells and inhibit the expression of fungal virulence factors (Cai et al. 2018; He et al. 2021). Other examples of fungal-plant interaction are from the studies on the cotton pathogen *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, which was shown to release EVs regulating phytoxic response in the leaves of *Nicotiana benthamiana* (Bleackley, Dawson and Anderson 2019). Recently it has been shown that EVs from *P. digitatum* regulate the germination of *Citrus sinensis* seeds by releasing EV-associated small molecules produced during plant infection, such as the alkaloid tryptocoualalanine A (Costa et al. 2021).

MECHANISMS OF EV-BASED TRANSFER OF INFORMATION

The mechanisms by which EVs can transfer information from a donor fungal cell to recipient cells (either fungal or host cells) remain poorly understood. For instance, the model of EV based long-distance communication regulating intracellular replication of *C. deuterogattii* (Bielska et al. 2018) implies that EVs cross the cell wall from the donor cells, the membrane of the macrophage, reach the phagolysosome in which these yeasts can replicate, and finally the cell wall and plasma membrane of the recipient yeast cells.

Several hypotheses raise the concern on the mechanisms by which fungal EVs can bidirectionally cross the fungal cell wall (Rodrigues and Casadevall 2018). Nevertheless, liposomes containing the antifungal drug amphotericin B were shown to cross the fungal cell wall, suggesting that EVs could also do the same (Walker et al. 2018). Moreover, proteomic analysis of *S. cerevisiae* EVs revealed enrichment in enzymes implicated in cell wall biosynthesis, and EV-based complementation assays suggested potential roles for yeast EVs in the cell wall remodeling. This enrichment of cell wall-related proteins in EV proteome was also observed in other fungi suggesting common properties. Nevertheless, the mechanisms through which EVs can cross the fungal cell wall and plasma membrane remain to be described.

Some experiments using actin polymerization inhibitors or cholesterol depleting agents suggested that fungi EV uptake by the host cell is an active rather than a passive process (Bielska et al. 2018). However, the impact of clathrin-mediated or clathrin-independent endocytosis (macropinocytosis and phagocytosis) or the endocytosis via caveolae and lipid rafts for the EV internalization, previously described as the main mechanisms of EV uptake by host cells in other models, remain to be elucidated in fungi. In the last few years, few studies started to explore the mechanisms regulating these processes. Thus, *C. albicans* EVs were shown to co-localize with the plasma membrane ganglioside GM1 of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells. Since GM1 is a raft marker, it was suggested that EV internalization might be mediated by lipid rafts. *M. sympodialis* EVs were internalized by both keratinocytes and monocytes at 37°C but not at 4°C, suggesting that EVs could actively be engulfed by endocytosis. Co-localization assays using *C. neoformans* EVs and FITC-labeled cholera toxin subunit B suggested that fungal EVs are not fusing with the plasma membrane of the macrophages (Oliveira et al. 2010a). However, it has been demonstrated that EVs from the same fungal pathogen fuse with human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) membranes and potentiate fungal brain invasion (Huang et al. 2012). Although mammalian lectin microarray profiling assays suggested that DC-SIGN receptors could recognize surface carbohydrates in *P. brasiliensis* and *P. lutzii* EVs, very little information is available concerning the surface recognition of fungal EVs by the host cells.

IN VITRO AND IN VIVO EV-MEDIATED FUNGAL-HOST INTERACTIONS

With the notable exceptions of *Malassezia* spp and *C. albicans*, human fungal infections are mostly due to pathogens living in the environment (Janbon et al. 2019). In these cases, the main route of contamination is the respiratory tract, leading to lung infection. Therefore, the first lines of defense against the pulmonary fungal infection are the alveolar macrophages. In

the later stages of infection, phagocytes, including monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils, are involved in nearly all the steps of the host-pathogen interactions. In the past few years, many studies and reviews focused on these immune cells in which fungal pathogens, once internalized, can be either eliminated or survived and multiplied during the infection (Gilbert, Wheeler and May 2014; Heung 2020; Weerasinghe and Traven 2020).

Because of their complex composition, fungal EVs are studied for their impact on the host immune cells. Here again, due to the lack of standardization for fungal EVs purification protocols and to the absence of identified EV specific markers, the following discussed studies need to be regarded as using EV extracts more than purified EVs. Therefore, the associated conclusions should be taken cautiously and might be challenged by experiments using purified EVs in the future. Nevertheless, RAW 264.7 murine macrophage cell line was used to suggest that *C. neoformans* EVs are biologically active and can stimulate immune cells (Oliveira et al. 2010a). In this study, *C. neoformans* EVs were shown to be uptaken by macrophages modulating nitric oxide (NO) concentration and pro-inflammatory cytokines TNF- α production. This overall M1 polarization of the EV-treated macrophages was, as expected, associated with an increase in the phagocyte fungicidal activity (Oliveira et al. 2010a). Surprisingly, EVs treatment also induces anti-inflammatory cytokine response (IL-10 and TGF- β). This apparent conflicting effect was only partly dependent on the presence of capsular polysaccharide, known to be associated with *C. neoformans* EVs (Rodrigues et al. 2007).

C. albicans EVs were shown to be internalized by both bone marrow-derived murine macrophages (BMDM) and dendritic cells, in which they modulate both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines synthesis as well as NO production, in a dose-dependent manner (Vargas et al. 2015). Similar data were recently obtained using *Talaromyces marneffeii* EVs (Yang et al. 2021). In *M. sympodialis*, EVs were shown to induce both TNF- α and IL-4 cytokines production from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), albeit the production of only IL-4 was significantly higher when PBMC from patients suffering from atopic eczema were used as compared to healthy controls (Gehrmann et al. 2011).

All these observations suggest that the very complex composition of fungal EVs can result in multiple effects on immune cells, depending on the organism from which EVs are isolated and on the patient's status. For instance, EVs extracted from *H. capsulatum* decrease phagocytosis of this yeast by 35% and no significant increase of NO production was observed upon treating BMDM with EVs (Baltazar et al. 2018). In contrast, for some organisms, the effect of EVs appears to be only directed towards a Th1 type response. Thus, in recent years, M1 polarization of macrophages upon incubation with fungal EVs has been reported in *P. brasiliensis* (da Silva et al. 2016), *Trichophyton interdigitale* (Bitencourt et al. 2018) and *Aspergillus flavus* (Brauer et al. 2020). Similarly, in *A. fumigatus*, EVs increase macrophage phagocytosis by more than 10% and strongly induced macrophage pro-inflammatory mediators TNF- α and CCL2 production (Souza et al. 2019). A similar effect was reported using bone marrow-derived neutrophils, which are primed by *A. fumigatus* EVs to increase their phagocytic capacity (Souza et al. 2019) and on dendritic cells using *S. brasiliensis* EVs (Ikeda et al. 2018). As produced by pathogens responsible for skin infection, *M. sympodialis* and *T. interdigitale* EVs interactions with keratinocytes have also been studied (Bitencourt et al. 2018; Johansson et al. 2018; Vallhov et al. 2020). *M. sympodialis* EVs are actively

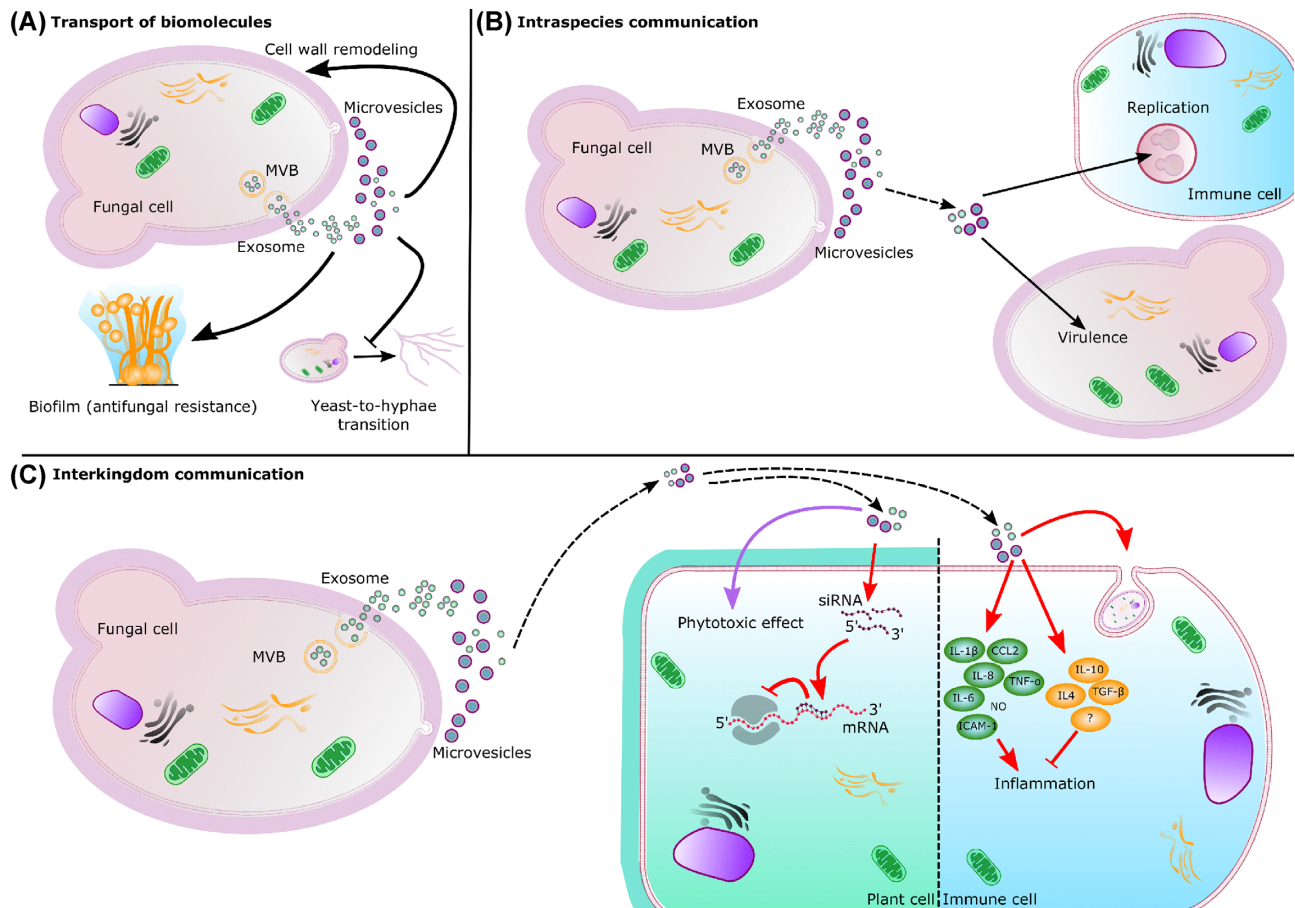


Figure 2. Biosynthesis and roles of fungal EVs. EVs are transported across the cell wall to the extracellular space. Exosomes result from the fusion of multi-vesicular bodies (MVB) with the plasma membrane and microvesicles bud out from the plasma membrane. (A) Transport of biomolecules. EVs can carry and release several biomolecules. In *S. cerevisiae*, the enrichment of several cell wall related enzymes in EVs suggests an impact on cell wall remodeling. In *C. albicans*, EVs are able to promote biofilm formation depending on their origin. In other hand, yeast-derived EVs inhibit yeast-to-hyphae differentiation. (B) Intraspecies communication. EVs released by *Cryptococcus* donor cells (dashed arrow) can also regulate intracellular replication and virulence of receptor cells. (C) Interkingdom communication. Fungal EVs are also implicated in interkingdom interactions influencing immune response (red arrow) during the infection. Fungal siRNAs can enter the plant cells through EVs where their association with the host Argonaute protein inhibits the immune response. Fungal EVs can also have phytotoxic effect (purple arrow) carrying small molecules. In immune cell, fungal EVs can promote the phagocytosis and regulate anti-inflammatory and pro-inflammatory (NO: nitric oxide) responses.

internalized by human keratinocytes, inducing up-regulation of ICAM-1 expression (Johansson et al. 2018; Vallhov et al. 2020). *T. interdigitale* EVs were shown to induce NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-8 from human keratinocyte cell line HaCaT cells in a dose-dependent manner.

The above results suggest that fungal EVs could modulate the innate immune response *in vivo*. This hypothesis was tested using the *G. mellonella* larvae model of fungal infection. In agreement with the variable effect of fungal EVs on phagocytes, the outcomes of these assays are diverse. A pre-treatment of *G. mellonella* larvae with *C. albicans* EVs previously stored at -80, -20 or 4°C reduces the fungal burden in this model without statistically significant increase of the larvae survival (Vargas et al. 2015, 2020). Strikingly, the same experiment performed with freshly prepared EVs prolonged larvae survival (Vargas et al. 2020). In *C. neoformans*, EVs isolated from an acapsular mutant strain does not protect the infected larvae, whereas wild type EVs accelerated their death (Colombo et al. 2019). In contrast, prior stimulation of *G. mellonella* larvae with *A. flavus* EVs promoted decreased fungal burden and increased survival of the larvae (Brauer et al. 2020). These results further illustrate the complexity of the message carried by fungal EVs.

PERSPECTIVES—EV-BASED VACCINE FOR FUNGAL INFECTIONS

In bacteria and parasites, EVs have been shown to stimulate adaptive immunity, and several vaccine candidates have been tested in the murine model of infection and clinical assays (Choi et al. 2015; Shears et al. 2018; Launay et al. 2019). In bacteria, EVs have been used for vaccine development since the end of the 1980s, and several EV-based vaccines are already licensed against meningococcal B disease (Acevedo et al. 2014). Several observations suggest that fungal EVs could also modulate adaptive immune response (Silverman et al. 2010; Pathirana and Kaporakis-Liaskos 2016). For instance, DC exposed to *C. albicans* EVs produce a higher level of CD86 and MHC-II compared to the untreated control (Vargas et al. 2015). Similar data recently obtained using macrophages incubated with *T. marneffei* EVs, suggest that EVs could be involved in T cell activation (Yang et al. 2021).

The analysis of EV proteome isolated from different species also revealed major known antigens associated with these vesicles. For instance, MP65 is one of the most prominent *C. albicans* EV protein and a major antigen in this pathogenic yeast (Gomez et al. 2000; Vargas et al. 2015). Similarly, *M. sympodialis* EVs are

enriched in the two allergens Mala s 1 and s 7 (Zargari et al. 1994; Johansson et al. 2018). Also, in *C. neoformans*, EV proteome analysis revealed a spectacular enrichment of several major antigens such as the mannoproteins MP88 and MP98 (Levitz et al. 2001; Huang et al. 2002; Rizzo et al. 2021). Similar results were obtained in *A. fumigatus* and *S. brasiliensis*, suggesting that EV proteins can be antigenic and sensitize the host immune system (Ikeda et al. 2018; Souza et al. 2019).

Mice pre-treated using *C. albicans* EVs were demonstrated to fully protect against *C. albicans*, whereas non-vaccinated mice died after two weeks (Vargas et al. 2020). Immunization was shown to induce specific profiles of cytokines and is associated with a reduced fungal burden in different organs (Vargas et al. 2020). Similar data were obtained in *C. neoformans*, although pre-treatment with EVs only prolonged the survival of the mice (Rizzo et al. 2021). Interestingly, mice vaccinated with EVs extracted from an acapsular mutant survived longer than the ones vaccinated using wild type EVs, suggesting that the structure and composition of the EVs can also impact their vaccination properties (Rizzo et al. 2021).

In contrast, for some species under some conditions, pre-treatment with EVs appeared to be harmful for the disease outcome in mouse model of infection. Thus, in a mouse model of sporotrichosis, skin lesions and fungal burden are enhanced by a pre-subcutaneous injection of EVs (Ikeda et al. 2018). More surprisingly, some data suggested that EVs could favor the passage of *C. neoformans* through the blood-brain barrier and thus the virulence of this yeast (Huang et al. 2012). This paradoxical impact of fungal EVs during the infection remains poorly understood (Piffer et al. 2021) even though it is predictable that they are produced and can interact with the host cells *in vivo*.

CONCLUDING REMARKS AND PERSPECTIVES ON FUNGAL EV RESEARCH

The field of fungal EVs is only in the early stage, and the knowledge basis regarding their structure, composition and function needs to be improved. Although a general picture of the fungal EV starts to be revealed, it remains unclear due to several challenging points. First, the diversity of fungal species studied for EVs, and the expected diversity of fungal EVs render a general comparison complicated. In this context, the creation of other public databases, similar to the ExVe (Parreira et al. 2021), designed for fungal EV-proteins that could list and compare fungal EV components among different species, would be instrumental. Second, as it has been done for mammalian EVs, the efforts for standardization of purification and characterization protocols of fungal EVs need to be undertaken aiming to identify specific markers to validate the purity of the EV extracts. Large sets of data related to fungal EVs will undoubtedly be produced soon, but standardized methods would be fundamental for a better knowledge of fungal EV structure and composition. This will also greatly impact the study of the fungal EV functionality. Indeed, the biological function of fungal EVs and their involvement in fungal infections remain obscure. Fungal EVs are expected to participate in many aspects of cell-to-cell communication and host-pathogen interactions. Still, only a few examples of EV functional roles have been published, as discussed in this review and summarized in Fig. 2. Yet, the perspectives are huge, although optimized tools and functional assays remain to be set up. Similar to other EV fields, the diversity of fungal EVs is still poorly studied. For instance, it is known that fungal EVs have different sizes and decorations, but the analysis of the heterogeneity of their cargo has not been fully addressed.

Single EV analyses have started to be implemented for mammalian EVs (Chiang and Chen 2019). This type of analysis demands specific markers and adapted protocols. It is expected to see the fungal EV field following this path as well soon. Similarly, the biosynthetic pathways regulating fungal EVs are also mostly unknown, although few analyses suggest a link between intracellular trafficking and the release of EVs. The existence of microvesicles and exosomes has been hypothesized in fungi by analogy with the mammalian EVs. Indeed, several microscopic and flow cytometry observations tend to support this model. However, the genetic and the mechanisms regulating their production are still underexplored.

Fungi are very well suited to genetic screens. Together with adapted biochemistry and cell biology assays, they might assist in deciphering the mechanisms by which EVs are produced and how they transmit a message to another cell and how this message is read. Additionally, the strength of fungal genetics applied to EV research should help, in some instances, to propose models for metazoan EVs.

Several EV-based vaccines have already been licensed in bacteria. Accordingly, fungal EVs have been considered as vaccine candidates in several studies. It is promising, as no antifungal vaccine yet to be licensed. Fungi are usually very easy to grow and, most of the times, easy to amenable to genetic approaches. Adapted protocols are now accessible to produce fungal EVs on large scales and at a low cost. Specific modification of EVs to improve their vaccine capacities should thus be possible soon and pave the way for developing antifungal vaccines. Overall, the study of EVs in the biology of fungal pathogens and the pathophysiology of fungal infections are evolving fast, which might deeply change the scientific approaches in this field soon.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

JR contributed to the conception and writing of this review and the design of Fig. 1, which was created using BioRender. AT contributed to the writing of this review and the design of Fig. 2. GJ contributed to the conception and writing of this review.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the CAPES-COFECUB Franco-Brazilian Research Exchange Program (88887.357947/2019-00) (GJ). JR is supported by Pasteur-Roux-Cantarini Fellowship (Institut Pasteur, Paris, France). AT is funded by a PhD Fellowship from Ecole Doctorale BioSPC, Université de Paris, 75006 Paris, France.

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Acevedo R, Fernandez S, Zayas C et al. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Front Immunol* 2014;5:121.
- Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML et al. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol* 2008;10:1695–710.
- Almeida F, Wolf JM, da Silva TA et al. Galectin-3 impacts *Cryptococcus neoformans* infection through direct antifungal effects. *Nat Commun* 2017;8:1968.
- Alves LR, Peres da Silva R, Sanchez DA et al. Extracellular vesicle-mediated RNA release in *Histoplasma capsulatum*. *mSphere* 2019;4:e00176–119.

- Baltazar LM, Zamith-Miranda D, Burnet MC *et al.* Concentration-dependent protein loading of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum* after antibody treatment and its modulatory action upon macrophages. *Sci Rep* 2018; **8**:8065.
- Bielska E, May RC. Extracellular vesicles of human pathogenic fungi. *Curr Opin Microbiol* 2019; **52**:90–9.
- Bielska E, Sisquella MA, Aldeieg M *et al.* Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nat Commun* 2018; **9**:1556.
- Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE *et al.* Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* 2014; **343**:183–6.
- Bitencourt TA, Rezende CP, Quaresimin NR *et al.* Extracellular vesicles from the dermatophyte *Trichophyton interdigitale* modulate macrophage and keratinocyte functions. *Front Immunol* 2018; **9**.
- Bleackley MR, Dawson CS, Anderson MA. Fungal extracellular vesicles with a focus on proteomic analysis. *Proteomics* 2019; **19**:1800232.
- Brauer VS, Pessoni AM, Bitencourt TA *et al.* Extracellular vesicles from *Aspergillus flavus* induce M1 polarization in vitro. *mSphere* 2020; **5**:e00190–00120.
- Cai Q, Qiao L, Wang M *et al.* Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 2018; **360**:1126.
- Chiang C-Y, Chen C. Toward characterizing extracellular vesicles at a single-particle level. *J Biomed Sci* 2019; **26**:9.
- Choi SJ, Kim M-H, Jeon J *et al.* Active immunization with extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* effectively protects against staphylococcal lung infections, mainly via Th1 cell-mediated immunity. *PLoS ONE* 2015; **10**:e0136021.
- Cleare LG, Zamith D, Heyman HM *et al.* Media matters! Alterations in the loading and release of *Histoplasma capsulatum* extracellular vesicles in response to different nutritional milieus. *Cell Microbiol* 2020; **22**:e13217.
- Coelho C, Casadevall A. Answers to naysayers regarding microbial extracellular vesicles. *Biochem Soc Trans* 2019; **47**:1005–12.
- Colombo AC, Rella A, Normile T *et al.* *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan and sterylglucoside are required for host protection in an animal vaccination model. *mBio* 2019; **10**:e02909–02918.
- Costa JH, Bazioli JM, Barbosa LD *et al.* Phytotoxic tryptoquialanines produced in vivo by *Penicillium digitatum* are exported in extracellular vesicles. *mBio* 2021; **12**:e03393–03320.
- Cui C, Wang Y, Liu J *et al.* A fungal pathogen deploys a small silencing RNA that attenuates mosquito immunity and facilitates infection. *Nat Commun* 2019; **10**:4298.
- da Silva RP, Heiss C, Black I *et al.* Extracellular vesicles from *Paracoccidioides* pathogenic species transport polysaccharide and expose ligands for DC-SIGN receptors. *Sci Rep* 2015; **5**:14213.
- da Silva TA, Roque-Barreira MC, Casadevall A *et al.* Extracellular vesicles from *Paracoccidioides brasiliensis* induced M1 polarization in vitro. *Sci Rep* 2016; **6**:35867.
- Dawson CS, Garcia-Ceron D, Rajapaksha H *et al.* Protein markers for *Candida albicans* EVs include claudin-like Sur7 family proteins. *J Extracell Ves* 2020; **9**:1750810.
- de Almeida JR, Kaihami GH, Jannuzzi GP *et al.* Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Med Mycol* 2015; **53**:42–50.
- de Oliveira HC, Castelli RF, Reis FCG *et al.* Pathogenic delivery: the biological roles of cryptococcal extracellular vesicles. *Pathogens* 2020; **9**:754.
- de Paula RG, Antoniêto ACC, Nogueira KMV *et al.* Extracellular vesicles carry cellulases in the industrial fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels* 2019; **12**:146.
- de Souza W, Barrias ES. Membrane-bound extracellular vesicles secreted by parasitic protozoa: cellular structures involved in the communication between cells. *Parasitol Res* 2020; **119**:2005–23.
- de Toledo Martins S, Szwarc P, Goldenberg S *et al.* Extracellular vesicles in fungi: composition and functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 2019; **422**:45–59.
- Eisenman HC, Frases S, Nicola AM *et al.* Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2009; **155**:3860–7.
- Freitas MS, Bonato VLD, Pessoni AM *et al.* Fungal extracellular vesicles as potential targets for immune interventions. *mSphere* 2019; **4**:e00747–00719.
- Gandham S, Su X, Wood J *et al.* Technologies and standardization in research on extracellular vesicles. *Trends Biotechnol* 2020; **38**:1066–98.
- Gehrmann U, Qazi KR, Johansson C *et al.* Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and host exosomes induce cytokine responses—novel mechanisms for host-microbe interactions in atopic eczema. *PLoS One* 2011; **6**:e21480.
- Gibson RK, Peberdy JF. Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 1972; **72**:529–38.
- Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM *et al.* Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res* 2015; **14**:142–53.
- Gilbert AS, Wheeler RT, May RC. Fungal pathogens: survival and replication within macrophages. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; **5**:a019661.
- Gill S, Catchpole R, Forterre P. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 2019; **43**:273–303.
- Gioti A, Nystedt B, Li W *et al.* Genomic insights into the atopic eczema-associated skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*. *mBio* 2013; **4**:e00572–00512.
- Goes A, Lapuhs P, Kuhn T *et al.* Myxobacteria-derived outer membrane vesicles: potential applicability against intracellular infections. *Cells* 2020; **9**:194.
- Gomez MJ, Maras B, Barca A *et al.* Biochemical and immunological characterization of MP65, a major mannoprotein antigen of the opportunistic human pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* 2000; **68**:694–701.
- Gruner HN, McManus MT. Examining the evidence for extracellular RNA function in mammals. *Nat Rev Genet* 2021; **22**:448–58.
- Hai TP, Tuan TL, Van Anh D *et al.* The virulence of the *Cryptococcus neoformans* VN1a-5 lineage is highly plastic and associated with isolate background. *bioRxiv* 2020. DOI: 2020.2002.2024.962134.
- Hatanaka O, Rezende CP, Moreno P *et al.* Galectin-3 inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* growth and impacts paracoccidioidomycosis through multiple mechanisms. *mSphere* 2019; **4**:e00209–00219.
- He B, Cai Q, Qiao L *et al.* RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nat Plant* 2021; **7**:342–52.
- Heung LJ. Monocytes and the host response to fungal pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; **10**. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00034.
- Hill E, Solomon P. Extracellular vesicles from the apoplastic fungal wheat pathogen *Zymoseptoria Tritici* *Fungal Biol Biotechnol* 2020; **18**. Research Square. DOI: 10.1186/s40694-020-00103-2.

- Honorato L, Demetrio JF, Ellis CC et al. Extracellular vesicles regulate yeast growth, biofilm formation, and yeast-to-hypha differentiation in *Candida albicans*. *bioRxiv* 2021. DOI: 2021.2001.2021.427696.
- Hosseini-Beheshti E, Grau GER. Extracellular vesicles as mediators of immunopathology in infectious diseases. *Immunol Cell Biol* 2018;**96**:694–703.
- Huang C, Nong SH, Mansour MK et al. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses. *Infect Immun* 2002;**70**:5485–93.
- Huang S-H, Wu C-H, Chang YC et al. *Cryptococcus neoformans*-derived microvesicles enhance the pathogenesis of fungal brain infection. *PLoS One* 2012;**7**:e48570.
- Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *EMBO J* 2015;**34**:2398–407.
- Ikeda MAK, de Almeida JRF, Jannuzzi GP et al. Extracellular vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis *Front Microbiol* 2018;**9**. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02286.
- Janbon G, Quintin J, Lanternier F et al. Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. *Genes Immun* 2019;**20**:403–14.
- Johansson HJ, Vallhov H, Holm T et al. Extracellular nanovesicles released from the commensal yeast *Malassezia sympodialis* are enriched in allergens and interact with cells in human skin. *Sci Rep* 2018;**8**:9182.
- Kabani M, Melki R. Sup35p in its soluble and prion states is packaged inside extracellular vesicles. *mBio* 2015;**6**. DOI: 10.1128/mbio.01017-15.
- Karkowska-Kuleta J, Kulig K, Karnas E et al. Characteristics of extracellular vesicles released by the pathogenic yeast-like fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. *Cells* 2020;**9**:1722.
- Launay O, Ndiaye AGW, Conti V et al. Booster vaccination with GVGH *Shigella sonnei* 1790GAHB GMMA vaccine compared to single vaccination in unvaccinated healthy European adults: results from a phase 1 clinical trial. *Front Immunol* 2019;**10**:335.
- Lavrin T, Konte T, Kostanjšek R et al. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* induces neurocytotoxicity in neuroblastoma cells and progressive cell death. *Cells* 2020;**9**:963.
- Leone F, Bellani L, Muccifora S et al. Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*. *J Cell Physiol* 2018;**233**:2759–67.
- Levit Z, Nong S, Mansour MK et al. Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*. *Proc Natl Acad Sci* 2001;**98**:10422–7.
- Liu M, Bruni GO, Taylor CM et al. Comparative genome-wide analysis of extracellular small RNAs from the mucormycosis pathogen *Rhizopus delemar*. *Sci Rep* 2018;**8**:5243.
- Liu M, Zhang Z, Ding C et al. Transcriptomic analysis of extracellular RNA governed by the endocytic adaptor protein Cin1 of *Cryptococcus deneoformans*. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;**10**:256.
- Marina CL, Bürgel PH, Agostinho DP et al. Nutritional conditions modulate *C. neoformans* extracellular vesicles' capacity to elicit host immune response. *Microorganisms* 2020;**8**:1815.
- Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* 2019;**21**:9–17.
- Matos Baltazar L, Nakayasu ES, Sobreira TJ et al. Antibody binding alters the characteristics and contents of extracellular vesicles released by *Histoplasma capsulatum*. *mSphere* 2016;**1**. DOI: 10.1128/mSphere.00085-15.
- Mencher A, Morales P, Valero E et al. Proteomic characterization of extracellular vesicles produced by several wine yeast species. *Microb Biotechnol* 2020;**13**:1581–96.
- Morales P, Mencher A, Tronchoni J et al. Extracellular vesicles in food biotechnology. *Microb Biotechnol* 2021;**14**:8–11.
- Nimrichter L, de Souza MM, Del Poeta M et al. Extracellular vesicle-associated transitory cell wall components and their impact on the interaction of fungi with host cells. *Front Microbiol* 2016;**7**:1034.
- Noble JM, Roberts LM, Vidavsky N et al. Direct comparison of optical and electron microscopy methods for structural characterization of extracellular vesicles. *J Struct Biol* 2020;**210**:107474.
- Oliveira DL, Freire-de-Lima CG, Nosanchuk JD et al. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun* 2010;**78**:1601–9.
- Oliveira DL, Nakayasu ES, Joffe LS et al. Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. *PLoS ONE* 2010b;**5**:e11113.
- Park Y-D, Chen SH, Camacho E et al. Role of the ESCRT pathway in laccase trafficking and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2020;**88**:e00954–00919.
- Parreira VdSC, Santos LGC, Rodrigues ML et al. ExVe: the knowledge base of orthologous proteins identified in fungal extracellular vesicles. *Comput Struct Biotechnol J* 2021;**19**:2286–96.
- Pathirana RD, Kaparakis-Liaskos M. Bacterial membrane vesicles: biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cell Microbiol* 2016;**18**:1518–24.
- Pegtel DM, Gould SJ. Exosomes. *Annu Rev Biochem* 2019;**88**:487–514.
- Peres da Silva R, Longo LGV, Cunha J et al. Comparison of the RNA content of extracellular vesicles derived from *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *Cells* 2019;**8**:765.
- Peres da Silva R, Martins SdT, Rizzo J et al. Golgi Reassembly and Stacking Protein (GRASP) participates in vesicle-mediated RNA export in *Cryptococcus Neoformans*. *Genes* 2018;**9**:400.
- Piffer AC, Kuczera D, Rodrigues ML et al. The paradoxical and still obscure properties of fungal extracellular vesicles. *Mol Immunol* 2021;**135**:137–46.
- Raab-Traub N, Dittmer DP. Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat Rev Microbiol* 2017;**15**:559–72.
- Reis FCG, Borges BS, Jozefowicz LJ et al. A novel protocol for the isolation of fungal extracellular vesicles reveals the participation of a putative scramblase in polysaccharide export and capsule construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere* 2019;**4**:e00080–00019.
- Reis FCG, Costa JH, Honorato L et al. Small molecule analysis of extracellular vesicles produced by *Cryptococcus gattii*: identification of a tripeptide controlling cryptococcal infection in an invertebrate host model. *Front Immunol* 2021;**12**. DOI: 10.3389/fimmu.2021.654574.
- Rizzo J, Chaze T, Miranda K et al. Characterization of extracellular vesicles produced by *Aspergillus fumigatus* protoplasts. *mSphere* 2020;**5**:e00476–00420.
- Rizzo J, Oliveira DL, Joffe LS et al. Role of the Apt1 protein in polysaccharide secretion by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2014;**13**:715–26.
- Rizzo J, Rodrigues ML, Janbon G. Extracellular vesicles in fungi: past, present, and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol* 2020a;**10**. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00346.

- Rizzo J, Wong SSW, Gazi AD et al. Revisiting cryptococcus extracellular vesicles properties and their use as vaccine platforms. *bioRxiv* 2021. DOI: 2020.2008.2017.253716.
- Rodrigues ML, Casadevall A. A two-way road: novel roles for fungal extracellular vesicles. *Mol Microbiol* 2018;110:11–5.
- Rodrigues ML, Franzen AJ, Nimrichter L et al. Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:414–20.
- Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell* 2008;7:58–67.
- Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL et al. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell* 2007;6:48–59.
- Roux Q, Van Deun J, Dedeysne S et al. The EV-TRACK summary add-on: integration of experimental information in databases to ensure comprehensive interpretation of biological knowledge on extracellular vesicles. *J Extracell Ves* 2020;9:1699367–.
- Sabatke B, Gavinho B, Coceres V et al. Unveiling the role of EVs in anaerobic parasitic protozoa. *Mol Immunol* 2021;133:34–43.
- Schorey JS, Harding CV. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. *J Clin Invest* 2016;126:1181–9.
- Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating extracellular vesicles in human disease. *N Engl J Med* 2018;379:958–66.
- Shears RK, Bancroft AJ, Hughes GW et al. Extracellular vesicles induce protective immunity against *Trichuris muris*. *Parasite Immunol* 2018;40:e12536.
- Silva BMA, Prados-Rosales R, Espadas-Moreno J et al. Characterization of *Alternaria infectoria* extracellular vesicles. *Med Mycol* 2014;52:202–10.
- Silverman JM, Clos J, Horakova E et al. Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2010;185:5011–22.
- Souza JAM, Baltazar LDM, Carregal VM et al. Characterization of *Aspergillus fumigatus* extracellular vesicles and their effects on macrophages and neutrophils functions. *Front Microbiol* 2019;10:2008–.
- Specht CA, Lee CK, Huang H et al. Vaccination with recombinant cryptococcus proteins in glucan particles protects mice against cryptococcosis in a manner dependent upon mouse strain and cryptococcal species. *mBio* 2017;8:e01872–01817.
- Szempruch AJ, Sykes SE, Kieft R et al. Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. *Cell* 2016;164:246–57.
- Takeo K, Uesaka I, Uehira K et al. Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vitro as observed by freeze-etching. *J Bacteriol* 1973;113:1442–8.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Ves* 2018;7:1535750–.
- Torreilhas AC, Soares RP, Schenkman S et al. Extracellular vesicles in trypanosomatids: host cell communication. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:602502.
- Tsatsaronis JA, Franch-Arroyo S, Resch U et al. Extracellular vesicle RNA: a universal mediator of microbial communication? *Trends Microbiol* 2018;26:401–10.
- Vallejo MC, Matsuo AL, Ganiko L et al. The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* exports extracellular vesicles containing highly immunogenic α -Galactosyl epitopes. *Eukaryotic Cell* 2011;10:343–51.
- Vallejo MC, Nakayasu ES, Longo LVG et al. Lipidomic analysis of extracellular vesicles from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS ONE* 2012a;7:e39463–.
- Vallejo MC, Nakayasu ES, Matsuo AL et al. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. *J Proteome Res* 2012;11:1676–85.
- Vallhov H, Johansson C, Veerman RE et al. Extracellular vesicles released from the skin commensal yeast *Malassezia sympodialis* activate human primary keratinocytes. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00006.
- Vargas G, Honorato L, Guimarães AJ et al. Protective effect of fungal extracellular vesicles against murine candidiasis. *Cell Microbiol* 2020;10:e13238.
- Vargas G, Rocha JDB, Oliveira DL et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 2015;17:389–407.
- Walker L, Sood P, Lenardon MD et al. The viscoelastic properties of the fungal cell wall allow traffic of AmBisome as intact liposome vesicles. *mBio* 2018;9:e02383–02317.
- Wang S, Kojima K, Mobley JA et al. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles reveal biomarkers for neurologic disease. *EBioMedicine* 2019;45:351–61.
- Weerasinghe H, Traven A. Immunometabolism in fungal infections: the need to eat to compete. *Curr Opin Microbiol* 2020;58:32–40.
- Weiberg A, Wang M, Lin FM et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 2013;342:118–23.
- Williams C, Royo F, Aizpurua-Olaizola O et al. Glycosylation of extracellular vesicles: current knowledge, tools and clinical perspectives. *J Extracell Ves* 2018;7:1442985.
- Winters CM, Hong-Brown LQ, Chiang HL. Intracellular vesicle clusters are organelles that synthesize extracellular vesicle-associated cargo proteins in yeast. *J Biol Chem* 2020;295:2650–63.
- Wolf JM, Espadas J, Luque-Garcia J et al. Lipid biosynthetic genes affect *Candida albicans* extracellular vesicle morphology, cargo, and immunostimulatory properties. *Eukaryotic Cell* 2015;14:745–54.
- Wolf JM, Rivera J, Casadevall A. Serum albumin disrupts *Cryptococcus neoformans* and *Bacillus anthracis* extracellular vesicles. *Cell Microbiol* 2012;14:762–73.
- Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967;13:269–88.
- Yang B, Wang J, Jiang H et al. Extracellular vesicles derived from *Talaromyces marneffei* yeasts mediate inflammatory response in macrophage cells by bioactive protein components. *Front Microbiol* 2021;11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.603183.
- Yang JE, Rossignol ED, Chang D et al. Complexity and ultrastructure of infectious extracellular vesicles from cells infected by non-enveloped virus. *Sci Rep* 2020;10:7939.
- Zamith-Miranda D, Nimrichter L, Rodrigues ML et al. Fungal extracellular vesicles: modulating host-pathogen interactions by both the fungus and the host. *Microbes Infect* 2018;20:501–4.
- Zargari A, Härfast B, Johansson S et al. Identification of allergen components of the opportunistic yeast *Pityrosporum orbiculare* by monoclonal antibodies. *Allergy* 1994;49:50–6.

- Zarnowski R, Sanchez H, Covelli AS et al. *Candida albicans* biofilm-induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLoS Biol* 2018;**16**:e2006872.
- Zhang F, Zhao M, Braun DR et al. A marine microbiome anti-fungal targets urgent-threat drug-resistant fungi. *Science* 2020;**370**:974–8.
- Zhao K, Bleackley M, Chisanga D et al. Extracellular vesicles secreted by *Saccharomyces cerevisiae* are involved in cell wall remodelling. *Commun Biol* 2019;**2**:305.
- Zhao M, Zhang F, Zarnowski R et al. Turbinmicin inhibits *Candida* biofilm growth by disrupting fungal vesicle-mediated trafficking. *J Clin Invest* 2021;**131**. DOI: 10.1172/JCI145123..

The *Cryptococcus* extracellular vesicle transcriptome

Adam TAHERALY, Corinne MAUFRAIS, Frédérique MOYRAND, Jessie COLIN, Jean-Yves COPPEE et Guilhem JANBON

bioRxiv - Soumis

The *Cryptococcus* extracellular vesicle transcriptome

Adam TAHERALY¹, Corinne MAUFRAIS^{1,2}, Frédérique MOYRAND¹, Jessie COLIN^{1,3}, Jean-Yves COPPEE¹ and Guilhem JANBON^{1*}

1. Institut Pasteur, Université Paris Cité, Unité Biologie des ARN des Pathogènes Fongiques, Département de Mycologie, F-75015, Paris, France

2. Institut Pasteur, Université Paris Cité, HUB Bioinformatique et Biostatistique, C3BI, USR 3756 IP CNRS, F-75015, Paris, France

3. Ecole Pratique des Hautes Etudes, PSL Research University, F-75014, Paris, France

* To whom correspondence should be addressed. Email: janbon@pasteur.fr

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are now recognized as key players in the biology of numerous organisms, including pathogenic fungi. However, studying EVs in these organisms remains challenging. The recent implementation of new protocols to purify EVs in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* has resulted in a more detailed description of their structure and protein composition. Although a few publications describing RNA molecules associated with EVs have already been published, we reasoned that these new protocols would be beneficial for gaining a deeper understanding of the EV transcriptome. We thus purified EVs and confirmed that some RNAs were associated with these EV extracts. Iodixanol gradient analyses also revealed that these RNAs co-sedimented with EVs. We then sequenced these RNAs in parallel with RNAs extracted from the very cells producing these EVs using different types of sequencing libraries. Our data confirm the presence of siRNAs and tRFs associated with EVs, some of which are enriched. We also identified some snoRNAs, which in *Cryptococcus* are mostly borne by coding gene or lncRNA introns.

Extracellular vesicles (EVs) are membrane bounded particles released by cells into the extracellular space. EVs have been described in all organisms in which they have been looked for (Van Niel *et al.* 2018). In mammals, in which they have been extensively studied, they have been shown to participate in cell-to-cell communication during development and normal physiology (Van Niel *et al.* 2018). They can also play a positive or negative role in pathological situations such as cancer, diabetes, etc. (Van Niel *et al.* 2022). In most cases, RNAs (mRNAs, tRNA halves, miRNAs, siRNAs...) have been identified as the active 'message-bearing' molecules within EVs (Valadi *et al.* 2007). EV RNAs have also been shown to play major roles in host-pathogen interactions (Munhoz Da Rocha *et al.* 2020). Seminal examples in parasitic worms, pathogenic bacteria and plant and insect fungal pathogens have been published in recent years, revealing a widespread usage of this type of interaction during infections (Buck *et al.* 2014; Cui *et al.* 2019; Rutter *et al.* 2022; Sahr *et al.* 2022). Here also, some RNA molecules have been shown to be implicated in these interactions (Weiberg *et al.* 2013; Buck *et al.* 2014; Cui *et al.* 2019; Sahr *et al.* 2022).

EVs have been identified in fungi for the first time in 2007 (Rodrigues *et al.* 2007), and since then they have isolated from every class of fungi (Rizzo *et al.* 2020). In human pathogens, EVs have been shown to play a role in cell intercommunication impacting fungal drug resistance in biofilm or filamentation as well as fungal replication within macrophages and virulence (Bielska *et al.* 2018; Zarnowski *et al.* 2021; Bitencourt *et al.* 2022a; Honorato *et al.* 2022). Yet, the physical bases of the exchanged messages and their mechanism of action remain mostly unknown. By analogy with other systems, one can anticipate that some RNAs could play essential roles. In agreement with this hypothesis, long-distance action of EVs on *Cryptococcus* intracellular replication within macrophages can be abolished by EV RNase treatment (Bielska *et al.* 2018).

Cryptococcus neoformans is a pathogenic yeast responsible for 200 000 deaths every year in the world (Rajasingham *et al.* 2017) which has been listed as one of four human fungal pathogens of the “critical group” by the WHO (Fisher and Denning 2023). The production of polysaccharidic capsule, the synthesis of melanin, the production of diverse enzymes associated with its ability to grow at 37°C have been considered as the main *Cryptococcus* virulence factors (Kwon-Chung *et al.* 2014). More recently, EVs produced by pathogenic fungi have been suggested to be also key factors in fungal pathobiology (Rizzo *et al.* 2021a). Nevertheless, EVs studies in *Cryptococcus* have long been limited by cumbersome protocols needed to obtain sufficient EVs even though fungal EVs have been isolated for the first time in this species (Rodrigues *et al.* 2007). Indeed, the initial published protocols used extended cultures (2 to 3 days) in complete liquid medium and often required several liters of culture to obtain enough vesicular extract for a single experiment (Rodrigues *et al.* 2007). This extended duration for cultures also led some to believe that the obtained vesicles actually originated from dead cells with no physiological role (Brown *et al.* 2015). A new protocol published in 2019 by Reis and colleagues in which cells are grown on solid medium for 24h helped resolve this issue and partially address these criticisms (Reis *et al.* 2019). We recently used EVs isolated with this protocol to study the structure of *Cryptococcus* EVs using proteomics, nano flow cytometry, CryoEM/TM and genetic analyses (Rizzo *et al.* 2021b). These experiments revealed a spectacular diversity in size, shape and structure of *Cryptococcus* EVs and helped us to propose a structural model of *Cryptococcus* EVs in which these extracellular organelles are surrounded by capsular polysaccharide and decorated by GPI-anchored and membrane proteins (Rizzo *et al.* 2021b).

While these analyses have greatly improved our understanding of the structure and protein content of EVs produced by *Cryptococcus*, the other molecules associated with these vesicles, particularly their RNAs, remain superficially described (Rizzo *et al.* 2020; Rizzo *et al.*

2021a). In fact, despite a few published studies (Bitencourt *et al.* 2022b), there is no real consensus on the structure of the fungal EVs transcriptome. This is partly due to the lack of consensus on the protocols to be used to prepare vesicular extracts, but also to the diversity of sequencing and sequence analysis strategies used. For instance, there are three publications describing the results of RNA sequencing from *Cryptococcus* EVs (Peres Da Silva *et al.* 2015; Peres Da Silva *et al.* 2018; Liu *et al.* 2020). Even though these results clearly open up possibilities by describing RNAs associated with fungal EVs, neither the EV purification processes, nor the bioinformatics analyses have been standardized. Moreover, no enrichment analysis has been performed and further experimental validation is often missing. Therefore, it is difficult to estimate the share of simple contaminants within the pool of RNA species identified. Thus, although RNAs associated with fungal EVs have been reported in many species (Bitencourt *et al.* 2022b), the fungal EV transcriptome remains poorly described.

In the present study, we used the Reis protocol to purify EVs from three species of *Cryptococcus* and we studied their transcriptome. Furthermore, we implemented an additional purification step based on iodixanol density gradient to show that RNA molecules co-sediment with EVs. Finally, we used several types of RNA sequencing libraries and bioinformatic strategies to compare the cellular and vesicular transcriptomes in *C. neoformans*.

Material and Methods

Strains: The strains used in this study were *C. neoformans* KN99 α (Nielsen *et al.* 2003), *C. deneoformans* JEC21 (Loftus *et al.* 2005) and *C. deuterogattii* R265 (Ma *et al.* 2009).

EV sample preparation. EV extracts were obtained as previously described (Rizzo *et al.* 2021b). Briefly, *Cryptococcus* cells were grown for 16-hour in liquid YPD at 30°C and plated onto 24 minimal SD agar medium dishes. The plates were then incubated at 30°C for 24 hours and scratched to collect the cells, which were then gently resuspended in cold 0.01 M PBS (filtered at 0.02 μ m). To separate the supernatant from the cells, two successive centrifugation steps were performed at 5,000 g and 15,000 g for 15 minutes at 4°C. The resulting cell pellets were snap frozen ethanol/dry ice and stored at -80°C. EVs were then pulled down from the 0.45 μ m filtered supernatant by ultracentrifugation at 100,000 g for 1 hour at 4°C using a SW 40Ti rotor. The resulting pellet was resuspended in 400 μ L of filtered 0.01 M PBS. When necessary, EVs were further purified on 40-5% w/v iodixanol gradient as previously described (Reis *et al.* 2021). After 18 h of ultracentrifugation at 100,000 g 4°C, fractions of 1 mL were collected by pipetting to which 9 mL of filtered 0.01 M PBS were added prior ultracentrifugation (1h 100,000 g at 4°C). Each pellet was then resuspended in 100 μ L of filtered 0.01 M PBS and stored at 80°C.

RNA extraction: Both EV and cellular RNA extractions were carried out using a TRIzol protocol under RNase-free conditions at 4°C as previously described (Moyrand *et al.* 2008).

UREA-PAGE : Heat denatured RNA samples were run in TBE-UREA 8M gel for 70 minutes at 120V. The gel was then washed with water and revealed using SYBRGold (Invitrogen) as suggested by the manufacturer.

RNA sequencing:

For the first strategy, total RNA was treated with Cap-Clip Acid Pyrophosphatase (Cellsript). as previously described (Wallace *et al.* 2020). The sequencing libraries were then constructed using the QIAseq® miRNA Library Kit according to the manufacturer protocol. The

sequencing reaction per se were performed using Illumina Iseq100. For small RNA libraries, 20-30 nt RNA molecules were UREA-PAGE purified from both EV and cell samples. RNA was precipitated using a DNA Lo Bind tube (Eppendorf) and recovered in 16.5 μ L of water. Triphosphate in 5' were removed using a RNA 5' polyphosphatase (Euromedex Lucigen) and RNA were purified using 3 volume of absolute isopropanol and 1.8 volume of Agencourt RNAClean XP beads (Beckman). RNA was eluted with 6 μ L of water. After ligation of an adaptater (5'rApp/NNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG/3ddC/) in 3', RNA was purified again. An adaptater (5'GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUCNNNN3') in 5' was added, and RNA was purified as described previously. RT reactions were performed using 5X SuperScript III (Invitrogen) using conditions suggested by the manufacturer. Libraries were finally amplified using Phusion PCR (10 for cell samples and 14 for EVs samples), checked by TapeStation electrophoresis. UREA-PAGE purified cDNA was then sequenced by Illumina NextSeq 500. Finally, strand-specific, paired-end cDNA libraries were prepared from cell or EV total RNA by polyA selection using the TruSeq Stranded mRNA kit (Illumina) according to manufacturer's instructions. Then, 100 bases were sequenced from both ends using an Illumina HiSeq2500 instrument according to the manufacturer's instructions (Illumina). Trimmed reads were mapped to the *Cryptococcus* genome using Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) and Tophat2 (Kim *et al.* 2013) as previously described (Wallace *et al.* 2020).

Bioinformatics analysis: Data preparation, analysis, and visualization were conducted using BASH and R 4.3, unless stated otherwise. For the conservation plot, genomic sequences were obtained from FungiDB, including 1000 nucleotides before the start codon and after the stop codon. Homologous sequences from *C. deneoformans* JEC21, *C. deuterogattii* R265, *Kwoniella mangroviensis* CBS 8507, *Kwoniella heveanensis* CBS 569, *Tremella mesenterica* DSM 1558, and *Kwoniella bestiolae* CBS 10118 were identified using blast and retrieved in

the same manner. Alignment was performed using MUSCLE 5.1 (Edgar 2004), and visualization was done using JalView 2.11.2.7. Conservation plot data were obtained using plotcon (EMBOSS 6.6) (Rice *et al.* 2000) with a window size of 20 nucleotides.

Proteomic analysis: Proteomic analysis was performed as described previously (Rizzo et al., 2021). However, in order to eliminate the iodixanol remaining in the gradient purified samples, proteins were first TCA precipitated before being resuspended in PBS and trypsin digested.

Results

Some RNAs are EV-associated in *Cryptococcus*.

Numerous studies have documented the presence of RNA molecules associated with fungal EVs, including in *Cryptococcus* (Peres Da Silva *et al.* 2015; Peres Da Silva *et al.* 2018; Liu *et al.* 2020; Reis *et al.* 2021; Bitencourt *et al.* 2022b). Nevertheless, the methods of growth, EV purification, and RNA sequencing employed in these studies vary significantly. We also know that the growth conditions can have a strong influence on EV production and EV composition in fungi (Reis *et al.* 2021; Amatuzzi *et al.* 2022; Rizzo *et al.* 2023). This suggested that further analyses would be beneficial for gaining a deeper understanding of the fungal EV transcriptome structure. We here isolated total RNAs from EVs purified from cells cultivated on solid minimum medium, following the established procedure (Reis *et al.* 2021; Rizzo *et al.* 2021b). We then loaded these isolated RNAs onto denaturing urea polyacrylamide gel (Urea-PAGE) alongside RNAs obtained from the cells generating these EVs (Figure 1A). As anticipated, SYBR Gold staining confirmed the presence of RNAs in both cell and EV extracts, indicating that certain RNA molecules are associated with EVs in *C. neoformans*. To further validate this association, we deposited the EV extract on an iodixanol density gradient (Ford *et al.* 1994) (Figure 1B). After 18h of ultracentrifugation at 100 000 g, we observed a single whitish ring at a centered position within the otherwise transparent gradient (Figure 1B). Examination of twelve gradient fractions using both flow cytometry with a NanoFCMTM apparatus and ergosterol concentration evaluation (Rizzo *et al.* 2021b; Rizzo *et al.* 2023) showed that the majority of EVs are found within the fractions 6, 7 and 8 (Figure 1C). In fact, the 7th fraction, which corresponds to the whitish ring position, exhibited the highest concentration of EVs, strongly suggesting that this ring corresponds to concentrated EVs. We then conducted proteomic analysis on all twelve fractions. The assessment of protein relative abundance using Intensity Based Absolute Quantification (IBAQ) (Schwanhäusser *et al.* 2011) further corroborated this observed pattern (Figure 1D) (Table S1). The previously

described most abundant proteins in *C. neoformans* EVs, Mp88 and Vep1, represent here 58% of the total proteins confirming that these proteins are the major EV proteins in *C. neoformans* (Rizzo *et al.* 2021b). We then isolated RNAs from each of the 12 fractions and analyzed these extracts by Urea-PAGE. SYBR Gold staining unveiled that a significant portion of the RNA was linked to fractions 6, 7, and 8, which also contained EVs and EV proteins. Overall, these analyses provide further evidence that the RNAs purified from our initial EV extract are indeed associated with EVs, in line with previous reports (Bitencourt *et al.* 2022b). However, the precise localization of these RNAs, whether inside, on, or at the surface of the EVs, still requires further investigations.

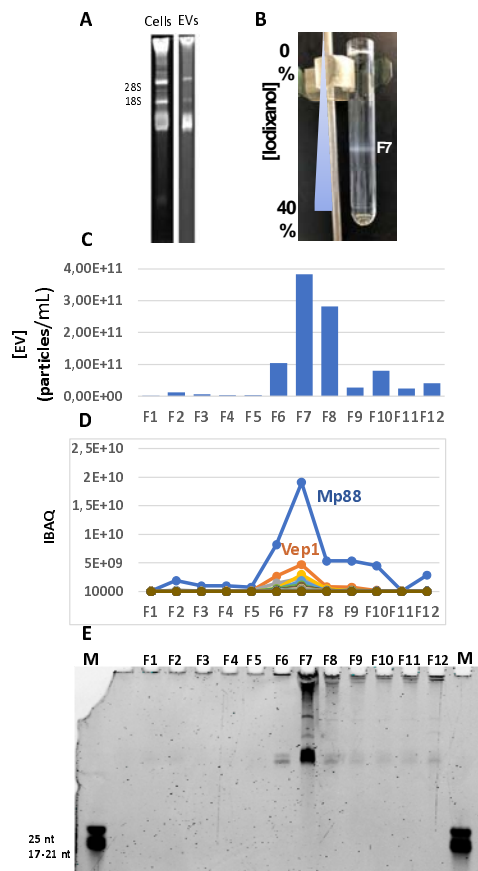


Figure 1. Some RNA molecules are EV associated. (A) Urea-PAGE analysis of cells and EV RNA extracts. (B) Picture of a tube of iodixanol gradient revealing a whitish ring containing EVs around the fraction 7. (C) EV concentration within each fraction evaluated by NanoFCM™. (D) Proteomic analysis of the iodixanol gradient fractions confirming the

prevalence of Mp88 and Vep1 in *C. neoformans* EVs. (E) Urea-PAGE analysis of RNAs purified from each fraction of the iodixanol gradient. EV concentrations evaluation and proteomic analyses were performed on the same gradient. RNAs were extracted from samples obtained from an independent experiment.

Small RNAs associated with EVs

Because a large diversity of RNAs (siRNAs, tRNA halves, lncRNAs, mRNAs, snRNAs, snoRNAs...) have been shown to be associated with EVs in different organisms including fungi (Rizzo *et al.* 2021a; Bitencourt *et al.* 2022b), we first constructed a sequencing library using a small RNA library preparation kit on total RNA extracted from EVs and previously submitted to decapping treatment (Wallace *et al.* 2020), yet no size selection step was implemented at this step. We reasoned that this approach should provide us with a comprehensive view of the *Cryptococcus* EV transcriptome since it should generate small RNA reads as well as, albeit to a lesser extent, longer reads up to 100 nt corresponding to mRNAs or lncRNAs fragments from the same samples. We mapped a total of 1.4 million of reads to the *C. neoformans* H99 reference genome (Janbon *et al.* 2014). A substantial portion of the reads longer than 17 nt (38%) aligned with the ribosomal DNA loci or the mitochondrial genome. The remaining reads exhibited a median size of 26 nt. Among them, the majority (98.3%) mapped to annotated nuclear genome features, either in the sense or antisense orientation. We noticed that most reads aligning in the sense orientation (81.7%) were short reads (median size = 27 nt) aligning to tRNA loci. However, it was obvious that the current annotation of tRNAs was partial with number of them not annotated and several others for which the genomic coordinates were wrong. We thus used tRNAscan (Chan *et al.* 2021) to re-annotate the tRNAs in the *C. neoformans* genome adding 8 pseudo-tRNA loci and updating the coordinates for three tRNAs (CNAG_10023, CNAG_10007, CNAG_10077) (Data S1). The analysis of our sequencing data then revealed that 72.8% of the sense reads

mapped to the 3' and 5' regions of the annotated tRNAs in *C. neoformans* (Figure 2A, C) suggesting the presence of tRFs (tRNA fragments) in the transcriptome of *C. neoformans* EVs. These tRFs have previously been identified as associated with EVs from different organisms (Lambertz *et al.* 2015; Chiou *et al.* 2018; Artuyants *et al.* 2020; Gámbaro *et al.* 2020). In mammals, tRFs hold promise as biomarkers and have been shown to play diverse regulatory roles in various cancers, neurodegenerative diseases, and responses to infections (Pandey *et al.* 2021). Some tRFs have been shown to associate with Argonaute protein (Ago) in different organisms and several studies reported the role of tRFs in the RNA interference pathway (Maute *et al.* 2013; Ren *et al.* 2019; Sharma *et al.* 2023). Reads aligned to tRNA sequences have already been detected in EV transcriptomes including in human fungal pathogens (Peres Da Silva *et al.* 2015; Munhoz Da Rocha *et al.* 2021). Yet, tRFs functions in these organisms remain to be identified (Jöchel *et al.* 2008). Similarly, although our analysis revealed that a subset of these tRNAs are overrepresented (Pro-tRNA (CGG and UGG), Leu-tRNA (AAG), Gly-tRNA (UCC), Gln-tRNA (CUG) and Asp-tRNA (GUC)) (Figure 2C), the mechanisms underlying this enrichment remain unknown. We performed the same experiment in *C. deneoformans* and *C. deuterogattii* and observed similar pattern at the tRNA loci.

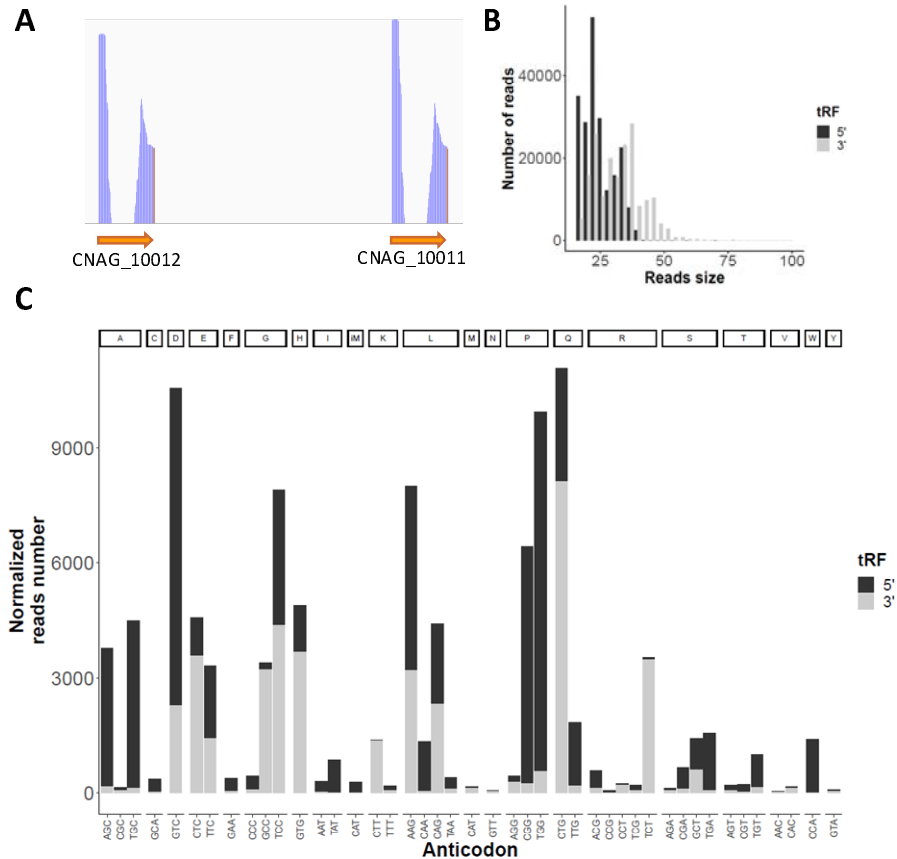


Figure 2. tRFs are associated with *Cryptococcus* EVs. (A) Example of RNA-seq pattern at tRNA loci as visualized by IGV at the loci CNAG_10012 and CNAG_10011 both encoding tRNAs. (B) Number and size of small reads aligned to tRNA loci. (C) RNA-seq reads number associated with the different tRNAs in *C. neoformans*.

By contrast, the examination of reads mapping in the antisense orientation to annotated features showed a significant enrichment of reads ranging from 20 to 25 nucleotides in length, all starting with a uridine. These features are typical of small interfering RNAs (siRNAs) (Figure 3 A, B) (Dumesic *et al.* 2013). As expected, these reads are antisense of transposons or transposon-like sequences (Janbon *et al.* 2010; Dumesic *et al.* 2013) (Table S2). Additionally, we observed a significant number of these siRNA-like reads mapping within the centromere of all chromosomes, which is consistent with the documented transposon-richness

of the centromere structure in *Cryptococcus* (Yadav *et al.* 2018). We performed the same experiment using EVs extracted from *C. deneoformans* and *C. deuterogattii*. The small RNA profile in *C. deneoformans* EVs was very similar to the one obtained in *C. neoformans*. By contrast, as expected, in the RNAi-deficient species *C. deuterogattii*, no siRNA-like species were detected in EVs transcriptome (not shown).

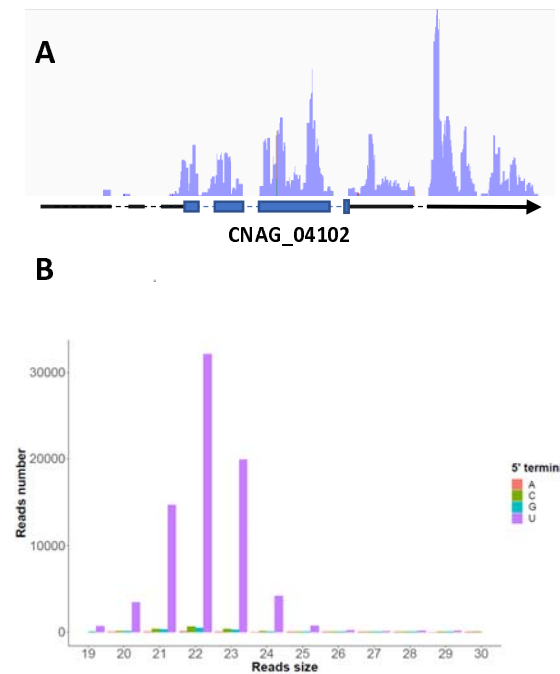


Figure 3. siRNAs are associated with EVs in *C. neoformans*. (A) IGV visualization of antisense reads alignment at the CNAG_04102 locus. (B) Bar plot graph depicting the number of antisense reads as a function of their size and the nature of the 5' terminal nucleotide.

To assess whether the EV small RNA transcriptome differs from that of the cells, we purified on gel 20-30 nt small RNAs from both EVs and cells producing EV to construct small RNA-seq libraries. This experiment was conducted in triplicate and 3.8 to 5.6 million reads obtained from EV libraries and 8 to 9.9 million reads from cell libraries were aligned to the *C. neoformans* genome. Again, most of the reads (98% and 98.6% in EVs and cells, respectively) were either tRFs or siRNAs although their proportion was not identical to the one obtained through sequencing RNAs without implementing a size selection step. By

counting reads aligning on arbitrarily defined 500 bp genomic regions, we identified 86 regions containing annotated features with abundant normalized read counts (>100 reads) enriched or depleted in the EV samples compared to the cell samples (Figure 3A) (Table S3). At eight of these loci, the coverage was due to GAU repeat microsatellite-like sequences that were enriched up to 514-fold in EVs. However, the presence of similar reads in the sequencing data, presenting the same repeats but in larger numbers, and which did not align to the genome might suggest that these reads could be artifacts. The most enriched region was specific for reads nearly exclusive of the EVs with an 897-fold enrichment. This 21-nt long read looks like a siRNAs (5' TTTCACCAACGCCGCTACCAG 3') and aligned in sense to the Rrp36 ribosomal protein encoding gene at the CNAG_03284 locus (Table S3). Moreover, 74 of these EV enriched regions correspond to tRFs (Table S3). Interestingly, at 36 tRNA loci, the ratio of 5' tRF vs 3' tRF reads numbers was statistically different between the cell and the EV samples. For instance, at the CNAG_10094 locus, the 5'tRF is 9.4-fold more abundant in EVs than in the cells whereas the amount of the 3'tRF reads is barely modified (0.8-fold) (Fig 3B). A similar pattern although reverse was observed at the CNAG_10061 locus. Overall, this analysis revealed the presence of siRNAs and tRFs associated with EVs in *Cryptococcus*. The specific enrichment of a subset of small RNAs in EVs suggests a specific mechanism of targeting. In agreement with this model the single Argonaute protein Ago1 was identified in the EV proteome (Table S1)

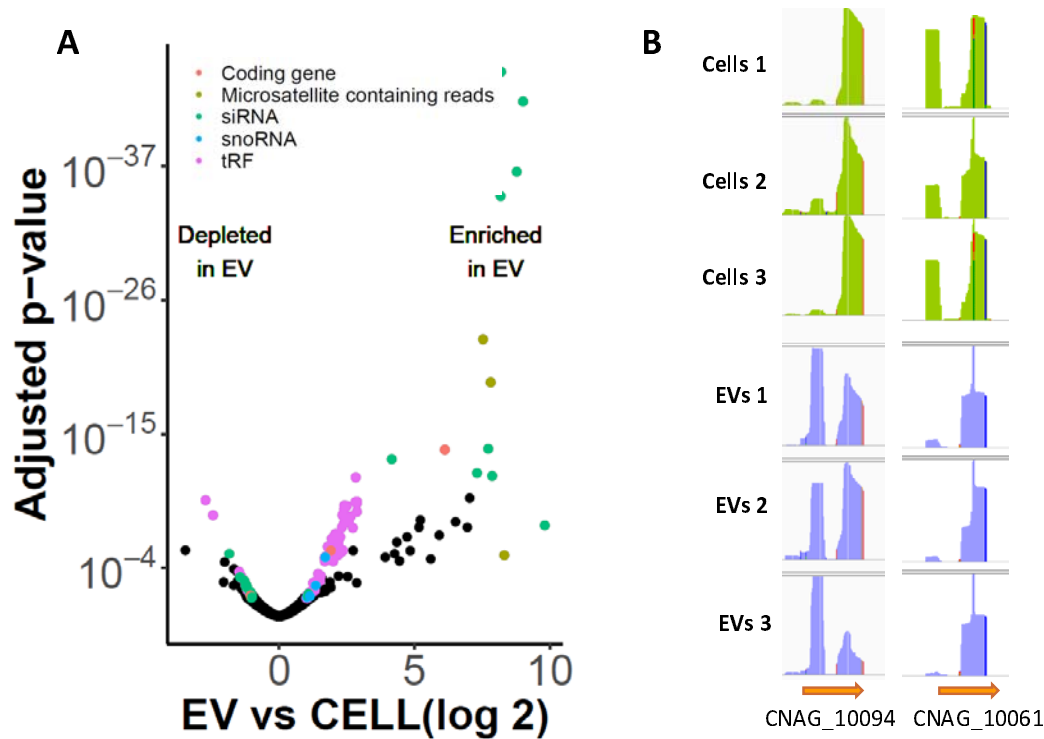


Figure 4. Bias in EV vs cell small RNA content. (A) Volcano plot illustrating the difference between the small RNA transcriptome in EVs and the cells producing these EVs (B) IGV visualization of examples of alteration of the 5'tRF vs 3'tRF repartition in EVs compared to cells at two tRNA loci. Three replicates of the experiment are shown.

SnoRNAs and other RNAs of intermediate size are associated with EVs

The analysis of the sequencing data obtained from total EV RNA samples also identified long reads (>70 nt) (2%, $n = 11928$) aligning to the *C. neoformans* genome. These reads aligned to 105 precise genomic regions. Most of them ($n = 101$) correspond to annotated regions, lncRNAs or coding genes, and, surprisingly, a large proportion of them ($n = 61$) were positioned within introns (Figure 5A). Although these regions did not resemble to any sequence with a known function available in the databases, iterative alignments using BLAST and structure analyses using the RFAM database (Kalvari *et al.* 2021) suggested that number of these sequences are snoRNAs. Further analyses of the sequences data identified 67 snoRNAs with C/D boxes, displaying a classical kink-turn (stem-bulge-stem) structure and characterized by two main terminal consensus sequences (*i.e.* the C box (RUGAUGA) and the

D box (CTGA)). Interestingly, even when only fungi closely related to *Cryptococcus* are considered, the sequence of these introns is not well conserved except for the central region containing the snoRNA. For the snoRNAs carried by lncRNAs, this situation is even more remarkable as the only part of the lncRNAs evolutionary conserved is the part bearing the snoRNAs. Actually, the poor exon sequence conservation in these lncRNAs suggests that their roles might be restricted to the production of these snoRNAs. A representative example of a lncRNA-bearing-snoRNA sequence conservation pattern in close *Cryptococcus* relative species is given on the figure 5B. Outside of these close relative species the sequence conservation of the snoRNA sequences is restricted to the consensus boxes.

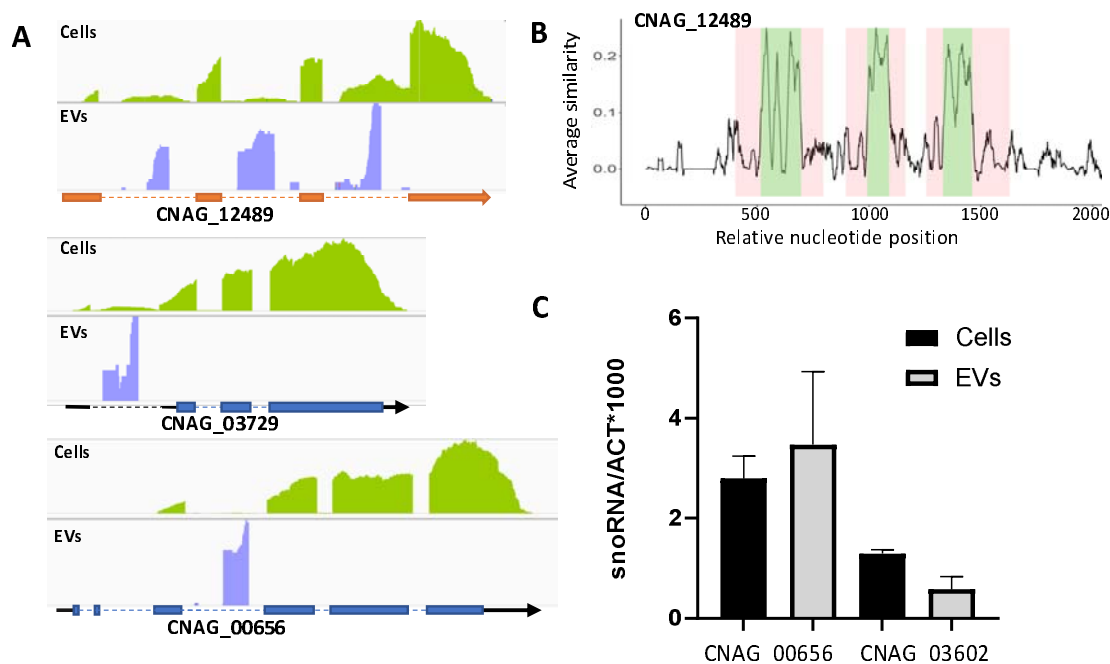


Figure 5. SnoRNAs are associated with EVs in *Cryptococcus*. (A) Examples of snoRNAs associated coverage as observed by IGV. The lncRNA CNAG_12489 encodes three intronic snoRNAs. The coding genes CNAG_03729 and CNAG_00656 contain a snoRNA in a 5'UTR and CDS intron, respectively. (B) Sequence alignment of close *C. neoformans* relative species (*C. deneoformans*, *C. deuterogattii*, *Kwoniella heveanensis*, *Kwoniella bestiolae* and

Kwoniella dejecticola) orthologous loci, revealed that the sequence conservation is restricted to the portion corresponding to the snoRNAs within the introns. The green regions correspond to the snoRNA sequences whereas the intronic sequence outside are highlighted in pink (C) snoRNAs do not seem enriched in EVs as revealed by RT-qPCR.. Experiments were conducted in triplicate on RNAs extracted from EVs or cells producing EVs.

We also identified 29 snoRNAs with H/ACA boxes. However, whereas 83.6% of snoRNAs with C/D boxes are in introns, most H/ACA boxes (55.2%, n =16) are located within lncRNAs and one in the intron of a lncRNA. Few of them were located in 5'UTR (n=2), 3'UTR (n=4) or introns (n=4) of coding genes. One snoRNA was overlapping the CDS and the 3'UTR of CNAG_03007 (*CPCI*) suggesting an annotation issue. The remaining snoRNA H/ACA was located within an intergenic region between the CNAG_06094 and the CNAG_06095 loci. We here annotated it as CNAG_13211. In these cases, the sequence conservation with other fungi outside of close relative is also restricted to the consensus boxes. Visual comparison on IGV of our dataset from EVs or EVs-producing cells (Rizzo *et al.* 2023) suggested that snoRNAs might be enriched in the EV RNA samples (Figure 5A). However, RT-qPCR experiments performed on total RNA purified from EVs and EVs-producing cells did not confirm this impression, highlighting the need of experimental confirmation in this type of analysis (Figure 5C). Analysis of the *C. deneoformans* and *C. deuterogattii* EV sequencing data revealed a similar profile and a very high conservation of these sequences in the three *Cryptococcus* species.

In the EV transcriptome, we also found reads associated with lncRNAs with no annotated function. We manually curated the corresponding annotation and performed RFAM analysis to identify their putative function (Data S1). We identified this way the five main spliceosome components. U1 (CNAG_12993), and U2 (CNAG_12573) were structurally well annotated but had no assigned function. U4 (CNAG_13128) annotation was changed to fit the reads

alignment profile. U6 (newly annotated locus CNAG_13208) located in the region between CNAG_05444 and CNAG_05445 was not annotated. U5 was present within the 5'UTR region of the coding gene CNAG_01093, but the alignment profile of the reads from both EVs and cells suggested that the transcription of U5 and CNAG_01093 might be independent. This is supported by the presence of a thymine stretch at the 3' end of the putative U5 locus, which is a characteristic of RNA polymerase III transcription termination. We thus reannotated this locus, CNAG_13209 being U5. We also identified the loci CNAG_12266 and CNAG_12660 as the RNA moiety of the RNases P and MRP, respectively. Finally, we annotated the 7SL ncRNA at new locus CNAG_13210.

PolyA RNAs in EVs

We also prepared RNA-seq libraries from polyA+ RNA of EV samples in triplicate. Because the first replicate yielded a very low number of reads, it was subsequently excluded from further analysis. Reads were then aligned to the *C. neoformans* H99 reference genome (Janbon *et al.* 2014) and the number of reads aligned to each annotated feature was counted (Wallace *et al.* 2020). We used this counting to compare the mRNA and lncRNA abundances in EVs and in cells producing these EVs (Rizzo *et al.* 2023). Our analysis did not reveal spectacular enrichment of any mRNA in EVs (Figure 6). Among the genes with at least 100 reads in both EV and cell samples, the most enriched mRNA (5.06-fold) in EVs (CNAG_07756) encodes a *C. neoformans* ubiquitin-protein transferase activating protein Cdc20 homolog. It is important to note that this analysis was limited by the fact that number of genes and lncRNAs have no read in at least one EV or cell replicate. Overall, as no outliers were identified, it is difficult to draw definitive conclusions regarding specific mRNA or lncRNA enrichment in EVs.

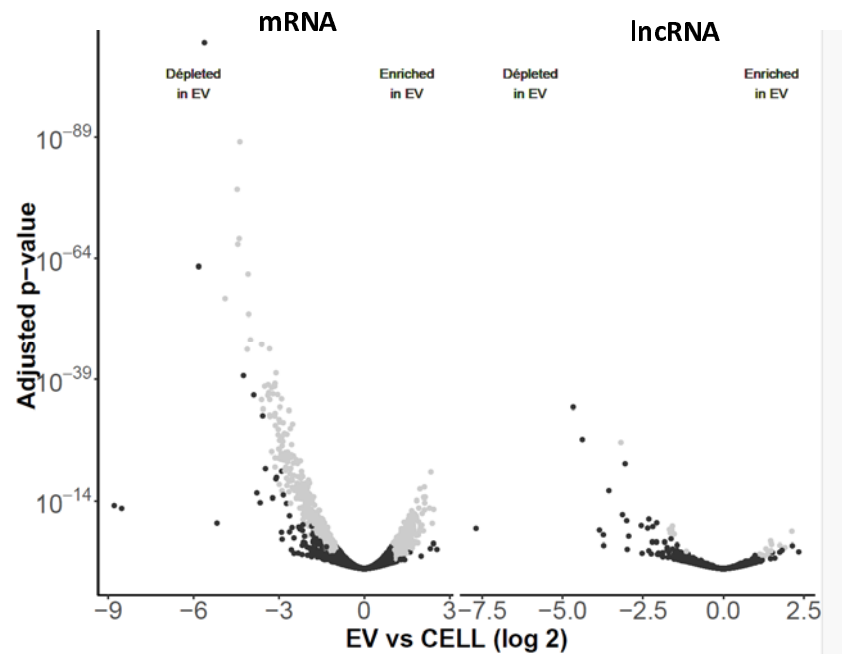


Figure 6. Volcano plot illustrating the difference between the polyA+ RNA transcriptome in EVs and in the cells producing these EVs

Discussion

We and others have produced a large quantity of data describing the structure and the dynamics of the *Cryptococcus* cellular transcriptome (Janbon *et al.* 2014; Gonzalez-Hilarion *et al.* 2016; Gröhs Ferrareze *et al.* 2021; Kalem and Panepinto 2022). However, even though the study of extracellular transcriptome has become a hot topic in number of organisms including microbes (Hulstaert *et al.* 2020; Pita *et al.* 2020; Gruner and Mcmanus 2021), the diversity of RNA molecules secreted by these yeasts remain poorly described. In fungi, the extracellular transcriptome has been mostly studied through the analysis of RNA molecules associated with EVs (Bitencourt *et al.* 2022b). Several papers reported the presence of small RNAs as well as polyA⁺ RNAs associated with fungal EV extracts (Bitencourt *et al.* 2022b). However, due to the heterogeneity of the protocols used to prepare these extracts, the diversity of strategies employed for sequencing library preparation and data analysis, as well as the general absence of experimental validation, the overall picture remains blurry. We here used a standardized and validated protocol to prepare EV extracts from three *Cryptococcus* species, we demonstrated that EVs and RNAs co-sediment in an iodixanol based density gradient. We purified and sequenced these RNAs in parallel with RNAs extracted from the very cells producing these EVs. We finally analyzed this data using a structurally and functionally improved genome annotation. None of the data we have produced is entirely new and they mostly strengthened and improved previous results obtained by other teams. As previously reported (Peres Da Silva *et al.* 2015), we identified a large number of tRF reads in the vesicles transcriptome but we here used an improved version of the tRNA annotation in *C. neoformans* to better quantify them. Our analysis also reveals for the first time that at certain tRNA loci, the proportion of 5'tRF vs 3'tRF is altered in EVs compared to cells suggesting specific targeting mechanisms. The origin of the tRFs in *Cryptococcus* is still

unknown as no angiogenin (Kumar *et al.* 2016) homolog can be identified in these species. Interestingly, the siRNA deficient strain has conserved a Dicer homolog encoding gene in his genome (D'souza *et al.* 2011) but its role in the biogenesis of the tRFs remains to be studied. Similarly, the presence of reads specific of snoRNAs in fungal EV-associated small RNAs sequencing data was already reported (Peres Da Silva *et al.* 2015). We here extended this information by omitting the size selection step in a small RNA library sequencing kit protocol. Our results allow us to complete the characterization of the *Cryptococcus* snoRNAome (Canzler *et al.* 2018; Kalem and Panepinto 2022). Yet, we did not observe a specific enrichment in EV extract for the two snoRNAs we checked by RT-qPCR. It does not mean that these are contaminants and that they have no function in EVs. For instance, the argonaute protein WAGO which has been reported to play a major role in EV biology in the parasitic worm *Heligmosomoides bakeri* is not particularly enriched in EVs compared to the cell (Chow *et al.* 2019). Similar data has been published in mammals in which EV-mediated communication is supposed to rely mostly on miRNA exchange (Weaver and Patton 2020). Besides, the H/CA ribonucleoprotein complex subunit 3, Nop10 (CNAG_01049) was found in our EV proteomic analysis (Rizzo *et al.* 2023) which is in agreement with an active targeting of some snoRNAs to EVs. Our research also confirmed the very poor conservation of snoRNA sequences in fungi. It also suggested that some lncRNA unique function may be to encode snoRNAs in their intron. Finally, we confirmed the presence of siRNAs associated with *C. neoformans* EVs which has been previously reported in both *C. neoformans* and *C. deneoformans* (Peres Da Silva *et al.* 2015; Liu *et al.* 2020). Their structure and the fact that we cannot identify them in the RNAi-deficient species *C. deuterogattii* strongly suggested that these are genuine siRNAs (D'souza *et al.* 2011). As expected, and in agreement with the *Cryptococcus* literature, siRNA reads aligned to transposons or transposon-like sequences (Janbon *et al.* 2010; Dumesic *et al.* 2013). Here also, the analysis of the proteome data

revealed that the unique *C. neoformans* Argonaute protein is associated with EVs suggesting an active targeting of siRNAs. The presence of siRNAs associated with EVs is not unique to *C. neoformans* (Peres Da Silva *et al.* 2015) and seems to be a general pattern in fungi. In the recent literature, some of these siRNAs have been identified as miRNAs (Peres Da Silva *et al.* 2015; Liu *et al.* 2020). However, identifying miRNAs in a fungal species by aligning sequences to mammalian miRNAs remains a questionable strategy. In fact, the re-analysis of miRNAs and miRNA-like molecules identified in fungi has demonstrated that none of these newly miRNAs identified passed the various quality criteria (Johnson *et al.* 2022). At this stage, a miRNA-like role of some of these siRNAs cannot be ruled out without experimental confirmation.

The functions of these EV-associated RNA molecules remain unknown, but the literature is full of examples of cell-to-cell communication mechanisms based on RNA molecules exchanges within the same species but also between species including in host-pathogen interactions (Tsatsaronis *et al.* 2018; Cai *et al.* 2021). Although *C. neoformans* EVs have been deeply studied for their structure and composition, their very role in the communication between cells but also during the interaction with the host remain to be uncovered. Examples of EV-mediated exchanges of RNA species (such as siRNAs, miRNAs, tRFs or snoRNAs) between cells are flourishing both in pathogenic and non-pathogenic settings (Weiberg *et al.* 2013; Buck *et al.* 2014; Rimer *et al.* 2018; Ren *et al.* 2019; Sahr *et al.* 2022). These results suggest that this type of exchanges might exist as well in *Cryptococcus* although the characterization of the associated mechanisms remain very challenging.

Acknowledgements

We here want to thank Eugene Gladyshev and Sebastian Castro Ramirez (Institut Pasteur) for their help in the construction of small RNA libraires. We want Mariette Matondo and Thibault Chase from the Institut Pasteur proteomic facilities for proteomic data production and analysis. The work on EVs in the Janbon's laboratory is supported by the ANR grants ResistEV (AAPG2021 CE35) and FEVCOM (AAPG2023 CE35). A.T. is funded by a PhD Fellowship from Ecole Doctorale BioSPC, Université de Paris, 75006 Paris, France.

Table S1: Proteomic analysis of iodixanol gradient fractions

Table S2: Genes targeted by EV-siRNAs in *C. neoformans*

Table S3: list of the loci enriched in EVs vs cells in small RNA-seq data.

References

- Amatuzzi, R. F., D. Zamith-Miranda, I. F. Munhoz da Rocha, A. C. R. Lucena, S. de Toledo Martins *et al.*, 2022 Caspofungin Affects Extracellular Vesicle Production and Cargo in *Candida auris*. *J Fungi (Basel)* 8.
- Artuyants, A., T. L. Campos, A. K. Rai, P. J. Johnson, P. Dauros-Singorenko *et al.*, 2020 Extracellular vesicles produced by the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* contain a preferential cargo of tRNA-derived small RNAs. *International Journal for Parasitology* 50: 1145-1155.
- Bielska, E., M. A. Sisquella, M. Aldeieg, C. Birch, E. J. O'Donoghue *et al.*, 2018 Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nature communications* 9: 1556-1556.
- Bitencourt, T. A., O. Hatanaka, A. M. Pessoni, M. S. Freitas, G. Trentin *et al.*, 2022a Fungal extracellular vesicles are involved in intraspecies intracellular communication. *mBio* 13: e0327221.
- Bitencourt, T. A., A. M. Pessoni, B. T. M. Oliveira, L. R. Alves and F. Almeida, 2022b The RNA content of fungal extracellular vesicles: at the "cutting-edge" of pathophysiology regulation. *Cells* 11.
- Brown, L., J. M. Wolf, R. Prados-Rosales and A. Casadevall, 2015 Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13: 620-630.
- Buck, A. H., G. Coakley, F. Simbari, H. J. McSorley, J. F. Quintana *et al.*, 2014 Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications* 5488: doi:10.1038/ncomms6488.
- Cai, Q., B. He, S. Wang, S. Fletcher, D. Niu *et al.*, 2021 Message in a Bubble: Shuttling Small RNAs and Proteins Between Cells and Interacting Organisms Using Extracellular Vesicles. *Annual Review of Plant Biology* 72: 497-524.
- Canzler, S., P. F. Stadler and J. Schor, 2018 The fungal snoRNAome. *Rna* 24: 342-360.
- Chan, Patricia P., Brian Y. Lin, Allysia J. Mak and Todd M. Lowe, 2021 tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research* 49: 9077-9096.
- Chiou, N. T., R. Kageyama and K. M. Ansel, 2018 Selective Export into Extracellular Vesicles and Function of tRNA Fragments during T Cell Activation. *Cell Rep* 25: 3356-3370.e3354.
- Chow, F. W., G. Koutsovoulos, C. Ovando-Vázquez, K. Neophytou, J. R. Bermúdez-Barrientos *et al.*, 2019 Secretion of an Argonaute protein by a parasitic nematode and the evolution of its siRNA guides. *Nucleic Acids Res* 47: 3594-3606.
- Cui, C., Y. Wang, J. Liu, J. Zhao, P. Sun *et al.*, 2019 A fungal pathogen deploys a small silencing RNA that attenuates mosquito immunity and facilitates infection. *Nature Communications* 10: 4298.
- D'Souza, C. A., J. W. Kronstad, G. Taylor, R. Warren, M. Yuen *et al.*, 2011 Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *mBio* 2: e00342-00310.
- Dumesic, P. A., P. Natarajan, C. Chen, I. A. Drinnenberg, B. J. Schiller *et al.*, 2013 Stalled spliceosomes are a signal for RNAi-mediated genome defense. *Cell* 152: 957-968.
- Edgar, R. C., 2004 MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792-1797.
- Fisher, M. C., and D. W. Denning, 2023 The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. *Nat Rev Microbiol* 21: 211-212.
- Ford, T., J. Graham and D. Rickwood, 1994 Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal. Biochem.* 220: 360-366.
- Gámbaro, F., M. Li Calzi, P. Fagúndez, B. Costa, G. Greif *et al.*, 2020 Stable tRNA halves can be sorted into extracellular vesicles and delivered to recipient cells in a concentration-dependent manner. *RNA Biol* 17: 1168-1182.

- Gonzalez-Hilarion, S., D. Paulet, K.-T. Lee, C.-C. Hon, P. Lechat *et al.*, 2016 Intron retention-dependent gene regulation in *Cryptococcus neoformans*. *Scientific Reports* 6: 32252.
- Gröhs Ferrareze, P. A., C. Maufrais, R. Silva Araujo Streit, S. J. Priest, C. A. Cuomo *et al.*, 2021 Application of an optimized annotation pipeline to the *Cryptococcus deuterogattii* genome reveals dynamic primary metabolic gene clusters and genomic impact of RNAi loss. *G3* (Bethesda) 11.
- Gruner, H. N., and M. T. McManus, 2021 Examining the evidence for extracellular RNA function in mammals. *Nature Reviews Genetics* 22: 448-458.
- Honorato, L., J. F. D. de Araujo, C. C. Ellis, A. C. Piffer, Y. Pereira *et al.*, 2022 Extracellular vesicles regulate biofilm formation and yeast-to-hypha differentiation in *Candida albicans*. *mBio* 13: e0030122.
- Hulstaert, E., A. Morlion, F. Avila Cobos, K. Verniers, J. Nuytens *et al.*, 2020 Charting Extracellular Transcriptomes in The Human Biofluid RNA Atlas. *Cell Reports* 33: 108552.
- Janbon, G., S. Y. Maeng, D.-F., Y.-J. Ko, K.-W. Jung, F. Moyrand *et al.*, 2010 Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 47: 1070-1080.
- Janbon, G., K. L. Ormerod, D. Paulet, E. J. Byrnes III, G. Chatterjee *et al.*, 2014 Analysis of the genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* reveals complex RNA expression and microevolution leading to virulence attenuation. *PLoS Genet.* 10: e1004261.
- Jöchl, C., M. Rederstorff, J. Hertel, P. F. Stadler, I. L. Hofacker *et al.*, 2008 Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis. *Nucleic Acids Res* 36: 2677-2689.
- Johnson, N. R., L. F. Larrondo, J. M. Álvarez and E. A. Vidal, 2022 Comprehensive re-analysis of hairpin small RNAs in fungi reveals loci with conserved links. *eLife* 11: e83691.
- Kalem, M. C., and J. C. Panepinto, 2022 Long Non-Coding RNAs in *Cryptococcus neoformans*: Insights Into Fungal Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 12: 858317.
- Kalvari, I., E. P. Nawrocki, N. Ontiveros-Palacios, J. Argasinska, K. Lamkiewicz *et al.*, 2021 Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families. *Nucleic Acids Res* 49: D192-d200.
- Kim, D., G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley *et al.*, 2013 TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology* 14: R36-R36.
- Kumar, P., C. Kuscus and A. Dutta, 2016 Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs). *Trends Biochem Sci* 41: 679-689.
- Kwon-Chung, K. J., J. A. Fraser, T. L. Doering, Z. Wang, G. Janbon *et al.*, 2014 *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4: a019760.
- Lambertz, U., M. E. Oviedo Ovando, E. J. R. Vasconcelos, P. J. Unrau, P. J. Myler *et al.*, 2015 Small RNAs derived from tRNAs and rRNAs are highly enriched in exosomes from both old and new world *Leishmania* providing evidence for conserved exosomal RNA Packaging. *BMC Genomics* 16: 151.
- Langmead, B., and S. L. Salzberg, 2012 Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9: 357-359.
- Liu, M., Z. Zhang, C. Ding, T. Wang, B. Kelly *et al.*, 2020 Transcriptomic Analysis of Extracellular RNA Governed by the Endocytic Adaptor Protein Cin1 of *Cryptococcus deuterogattii*. *Front Cell Infect Microbiol* 10: 256.
- Loftus, B., E. Fung, P. Roncaglia, D. Rowley, P. Amedeo *et al.*, 2005 The genome and transcriptome of *Cryptococcus neoformans*, a basidiomycetous fungal pathogen of humans. *Science* 307: 1321-1324.
- Ma, H., F. Hagen, D. J. Stekel, S. A. Johnston, E. Sionov *et al.*, 2009 The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 12980-12985.

- Maute, R. L., C. Schneider, P. Sumazin, A. Holmes, A. Califano *et al.*, 2013 tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 1404-1409.
- Moyrand, F., I. Lafontaine, T. Fontaine and G. Janbon, 2008 *UGE1* and *UGE2* regulate the UDP-glucose/UDP-galactose equilibrium in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 7: 2069-2077.
- Munhoz da Rocha, I. F., R. F. Amatzuzi, A. C. R. Lucena, H. Faoro and L. R. Alves, 2020 Cross-Kingdom extracellular vesicles EV-RNA communication as a mechanism for host-pathogen interaction. *Front Cell Infect Microbiol* 10: 593160.
- Munhoz da Rocha, I. F., S. T. Martins, R. F. Amatzuzi, D. Zamith-Miranda, J. D. Nosanchuk *et al.*, 2021 Cellular and Extracellular Vesicle RNA Analysis in the Global Threat Fungus *Candida auris*. *Microbiol Spectr* 9: e0153821.
- Nielsen, K., G. M. Cox, P. Wang, D. L. Toffaletti, J. R. Perfect *et al.*, 2003 Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic α and α isolates. *Infection and Immunity* 71: 4831-4841.
- Pandey, K. K., D. Madhry, Y. S. Ravi Kumar, S. Malvankar, L. Sapra *et al.*, 2021 Regulatory roles of tRNA-derived RNA fragments in human pathophysiology. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 26: 161-173.
- Peres da Silva, R., S. d. T. Martins, J. Rizzo, F. C. G. Dos Reis, L. S. Joffe *et al.*, 2018 Golgi Reassembly and Stacking Protein (GRASP) Participates in Vesicle-Mediated RNA Export in *Cryptococcus Neoformans*. *Genes* 9: 400.
- Peres da Silva, R., R. Puccia, M. L. Rodrigues, D. L. Oliveira, L. S. Joffe *et al.*, 2015 Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Scientific Reports* 5: 7763.
- Pita, T., J. R. Feliciano and J. H. Leitão, 2020 Extracellular RNAs in Bacterial Infections: From Emerging Key Players on Host-Pathogen Interactions to Exploitable Biomarkers and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* 21.
- Rajasingham, R., R. M. Smith, B. J. Park, J. N. Jarvis, N. P. Govender *et al.*, 2017 Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 17: 873-881.
- Reis, F. C. G., B. S. Borges, L. J. Jozefowicz, B. A. G. Sena, A. W. A. Garcia *et al.*, 2019 A novel protocol for the isolation of fungal extracellular vesicles reveals the participation of a putative scramblase in polysaccharide export and capsule construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere* 4: e00080-00019.
- Reis, F. C. G., B. Gimenez, L. J. Jozefowicz, R. F. Castelli, S. T. Martins *et al.*, 2021 Analysis of Cryptococcal Extracellular Vesicles: Experimental Approaches for Studying Their Diversity Among Multiple Isolates, Kinetics of Production, Methods of Separation, and Detection in Cultures of Titan Cells. *Microbiol Spectr* 9: e0012521.
- Ren, B., X. Wang, J. Duan and J. Ma, 2019 Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation. *Science* 365: 919-922.
- Rice, P., I. Longden and A. Bleasby, 2000 EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16: 276-277.
- Rimer, J. M., J. Lee, C. L. Holley, R. J. Crowder, D. L. Chen *et al.*, 2018 Long-range function of secreted small nucleolar RNAs that direct 2'-O-methylation. *Journal of Biological Chemistry* 293: 13284-13296.
- Rizzo, J., M. L. Rodrigues and G. Janbon, 2020 Extracellular vesicles in fungi: past, present and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*: in press.
- Rizzo, J., A. Taherally and G. Janbon, 2021a Structure, composition and biological properties of fungal extracellular vesicles. *microLife* 2.
- Rizzo, J., A. Trottier, F. Moyrand, J. Y. Coppée, C. Maufrais *et al.*, 2023 Coregulation of extracellular vesicle production and fluconazole susceptibility in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*: e0087023.

- Rizzo, J., S. S. W. Wong, A. D. Gazi, F. Moyrand, T. Chaze *et al.*, 2021b *Cryptococcus* extracellular vesicles properties and their use as vaccine platforms. *Journal of Extracellular Vesicles* 10: e12129.
- Rodrigues, M. L., L. Nimrichter, D. L. Oliveira, S. Frases, K. Miranda *et al.*, 2007 Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell* 6: 48-59.
- Rutter, B. D., T. T. Chu, J. F. Dallery, K. K. Zajt, R. J. O'Connell *et al.*, 2022 The development of extracellular vesicle markers for the fungal phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *Journal of Extracellular Vesicles* 11: e12216.
- Sahr, T., P. Escoll, C. Rusniok, S. Bui, G. Pehau-Arnaudet *et al.*, 2022 Translocated *Legionella pneumophila* small RNAs mimic eukaryotic microRNAs targeting the host immune response. *Nature Communications* 13: 762.
- Schwanhäusser, B., D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt *et al.*, 2011 Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337-342.
- Sharma, M., H. Zhang, G. Ehrenkauf and U. Singh, 2023 Stress Response in *Entamoeba histolytica* Is Associated with Robust Processing of tRNA to tRNA Halves. *mBio* 14: e0345022.
- Tsatsaronis, J. A., S. Franch-Arroyo, U. Resch and E. Charpentier, 2018 Extracellular Vesicle RNA: A Universal Mediator of Microbial Communication? *Trends Microbiol.* 26: 401-410.
- Valadi, H., K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee *et al.*, 2007 Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 9: 654-659.
- van Niel, G., D. R. F. Carter, A. Clayton, D. W. Lambert, G. Raposo *et al.*, 2022 Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23: 369-382.
- van Niel, G., G. D'Angelo and G. Raposo, 2018 Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19: 213-228.
- Wallace, E. W. J., C. Maufrais, J. Sales-Lee, L. R. Tuck, L. de Oliveira *et al.*, 2020 Quantitative global studies reveal differential translational control by start codon context across the fungal kingdom. *Nucleic Acids Research* 48: 2312-2331.
- Weaver, A. M., and J. G. Patton, 2020 Argonauts in Extracellular Vesicles: Artifact or Selected Cargo? *Cancer Res* 80: 379-381.
- Weiberg, A., M. Wang, F. M. Lin, H. Zhao, Z. Zhang *et al.*, 2013 Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342: 118-123.
- Yadav, V., S. Sun, R. B. Billmyre, B. C. Thimmappa, T. Shea *et al.*, 2018 RNAi is a critical determinant of centromere evolution in closely related fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 3108-3113.
- Zarnowski, R., A. Noll, M. G. Chevrette, H. Sanchez, R. Jones *et al.*, 2021 Coordination of fungal biofilm development by extracellular vesicle cargo. *Nature Communications* 12: 6235.