



HAL
open science

Etude des gènes de la famille IFF dans les interactions de *C. albicans* avec son hôte.

Amandine Cornu

► **To cite this version:**

Amandine Cornu. Etude des gènes de la famille IFF dans les interactions de *C. albicans* avec son hôte..
Biologie moléculaire. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0046 . pastel-00600903

HAL Id: pastel-00600903

<https://pastel.hal.science/pastel-00600903>

Submitted on 16 Jun 2011

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.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Microbiologie et Génétique Moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

Amandine CORNU

le 24 Juin 2010

Etude des gènes de la famille *IFF* dans les interactions de *C. albicans* avec l'hôte

Directeur de thèse : **Claude GAILLARDIN**

Co-encadrement de la thèse : **Mathias LAVIE-RICHARD**

Jury

M. Christophe d'Enfert , Directeur de Recherche, Unité de Biologie et Pathogénicité fongiques, Institut Pasteur	Rapporteur
M. Thierry Jouault , CR1, Unité de Physiopathologie des Candidoses, Inserm	Rapporteur
M. Mathias Lavie-Richard , CR1, Unité de Microbiologie et Génétique Moléculaire	Examineur
M. Claude Gaillardin , Professeur, Unité de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA	Directeur de Thèse

Remerciements

Je remercie Jean-Marie Beckerich pour m'avoir accueillie dans son unité en Avril 2007 et je remercie conjointement Stephane Aymerich.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Christophe d'Enfert et Thierry Jouault pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs ainsi qu'à et Mathias Lavie-Richard d'en être l'examinateur.

Je voudrais aussi remercier ERA-NET PathoGenoMics pour le support financier. Cela m'a permis de faire des rencontres enrichissantes, merci à tous les membres de Glycoshield.

Un grand merci à Claude Gaillardin qui m'a accueillie dans son équipe, m'a fait part de son savoir et surtout m'a soutenue en fin de thèse.

Je remercie Mathias Lavie-Richard pour avoir encadré ce travail de thèse et je remercie également Anita Boisramé pour son co-encadrement et son étude de localisation des protéines Iffs.

Merci à Grégory Da-Costa pour les expérimentations qu'il a réalisées pour ce travail de thèse, pour ses petits coups de main de manière générale et aussi pour sa bonne humeur constante.

Je remercie chaleureusement Marisa Gil et Daniel Gonzalbo ainsi que toute leur équipe pour m'avoir enseigné la culture cellulaire et m'avoir fait visiter Valencia !

Je remercie Carol Munro de m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que Kerstin Nather et Kathy K. Lee pour leur collaboration active dans les manip de qPCR chez la souris et aussi pour m'avoir fait découvrir Aberdeen sous la pluie et le vent. Bon courage les filles !

Merci à tous mes collègues de MGM et LGMPA pour leurs services, leurs conseils et les discussions plus ou moins sérieuses que nous avons échangées pendant 3 ans. Je remercie aussi mes amis qui m'ont permis de passer de bons moments à Grignon.

Je pense aussi à mes amis Docteurs car je crois que je suis la petite dernière dans la course. Je vous remercie pour vos conseils et votre soutien.

Un grand merci à ma famille et mes proches pour leur pensée positive.

Enfin, pour leur soutien sans faille je remercie de tout mon cœur mes parents.

Table des Matières

I. Introduction	5
1. Présentation générale de <i>Candida albicans</i>	5
1.1 Caractéristiques générales.....	5
1.1.1 Taxonomie et morphologie de <i>C. albicans</i>	5
1.1.2 Génétique de <i>C. albicans</i>	6
1.2 Le pathogène opportuniste <i>C. albicans</i>.....	8
1.2.1 De l'état commensal à l'état pathogène	8
1.2.2 Aspects cliniques	8
1.2.3 Epidémiologie des infections à <i>Candida</i>	9
1.3 Traitement des candidoses : mode d'action des antifongiques et résistances chez <i>C. albicans</i>.....	11
1.3.1. Les polyènes : amphotéricine B.....	12
1.3.2. Les azolés.....	12
1.3.3. Les échinocandines : la caspofungine.....	13
2. La paroi de <i>Candida albicans</i>	13
2.1 Organisation de la paroi	14
2.1.1 Le squelette glucidique	14
2.1.2 La matrice protéique : les trois classes de protéines pariétales.....	15
2.2 Modifications post-traductionnelles des protéines de paroi.....	18
2.2.1 Glycosylation et mannosylation des protéines de paroi	18
Les Glycosylations	18
Les b-mannosylations	21
2.2.2 Addition d'une ancre GPI aux protéines de paroi	21
Synthèse de l'ancre	22
Structure de l'ancre GPI.....	23
Fonction de l'ancre GPI	23
Caractéristiques des protéines à ancre GPI.....	24
Localisation des protéines à ancre GPI.....	24
3 La paroi et les interactions hôte-pathogène	25
3.1 Les défenses de l'hôte.....	25
3.1.1 Les barrières naturelles	26
3.1.2 La réponse immunitaire innée	26
Les PAMPs fongiques.....	28

Les PRRs.....	29
3.2. Modèles de l'interaction	31
3.3 Analyse des facteurs de virulence	33
4. Les grandes familles de protéines à ancre GPI et les interactions hôte / pathogène.	34
4. 1 La famille <i>ALS</i>	36
4. 2 La famille <i>SAP</i> (secreted aspartic proteases).....	42
4.3. Les gènes <i>RBT</i>.....	46
4.4 La famille <i>IFF</i>	47
4.4.1 Le premier gène étudié : <i>HYR1</i>	47
4.4.2 Etude par surexpression ou inactivation d'un gène <i>IFF</i>	49
4.4.3 La protéine Iff11 : une Iff sécrétée.	51
Projet de recherche	53
<i>II Matériel et méthodes</i>	54
1 Matériel	54
1.1-Matériel biologique	54
1.1.1-Les souches des différents microorganismes utilisés	54
1.1.2-Les cellules de mammifères	55
1.2-Les enzymes	55
1.3-Les solutions	56
1.4-Milieus de culture	57
2 Méthodes	60
2.1 Techniques de base en biologie moléculaire	60
2.1.1.- Préparation des acides nucléiques.	60
2.1.2. – Amplification des séquences par PCR et qPCR	61
2.1.3. - Vérification des séquences <i>IFF1</i> et <i>IFF10</i>	62
2. 2- Construction des souches	63
2.2.1. Techniques de transformation.....	63
2.2.1.1.Transformation d' <i>E. coli</i>	63
2.2.1.2.Transformation de <i>C. albicans</i>	64
2.2.2. Disruption de gènes <i>IFF</i> chez <i>C. albicans</i>	64

2.2.3. Surexpression des gènes <i>IFF</i>	65
2.2.4. Construction des souches de surexpression des gènes <i>IFF</i> portant un tag V5.....	67
2.2.5. - Vérification des clones hétérozygotes ou homozygotes.....	67
2.2.5.1. Criblage des transformants par PCR.....	67
2.2.5.2. Confirmation de la structure par Southern-blot.....	68
2.3- Technique de bioinformatique.....	69
2.3.1- Banque de donnée.....	69
2.3.2- Analyse des séquences.....	69
2.3.3- Réalisation des arbres phylogénétiques.....	70
2.3.4- Recherche de modifications post-traductionnelles.....	70
2.3.5- Analyses statistiques.....	71
2.4- Analyses phénotypiques.....	71
2.4.1 Test en gouttes.....	71
2.4.2 Test de croissance en milieu liquide.....	72
2.4.3 Test de survie des levures après phagocytose.....	72
2.4.4 Test d'adhérence des levures sur cellules HeLa.....	73
2.5- Techniques de biochimie.....	74
2.5.1- Préparation des fractions.....	74
2.5.2- Analyse par Western-blotting.....	75
2.5.3- Localisation par immunofluorescence.....	75
<i>III. Résultats</i>.....	77
Chapitre 1 : Analyse génétique de la famille <i>IFF</i> chez <i>Candida albicans</i>....	77
1.1- Introduction.....	77
1.2- Séquençage des gènes <i>IFF1</i> et <i>IFF10</i>.....	77
1.3- Alignement des séquences protéiques des Iffs.....	78
1.4- Répartition des <i>IFF</i> chez quelques champignons.....	79
1.5- Prédiction in silico de l'ancrage GPI.....	80
1.6- Localisation biochimique des protéines Iffs.....	83
Conclusion.....	84
Chapitre 2: Création des mutants <i>iff</i>-/-.....	85
2.1 Introduction.....	85
2.2 Transformation basée sur un produit de PCR Jumbo.....	86

2.3 Analyse des mutants	88
2.3.1. Vérification du génotype par Southern blot.....	88
2.3.2. Etude des phénotypes par des tests en gouttes et des tests en milieux liquides.....	89
Conclusion	92
Chapitre 3 : Cas particulier des gènes <i>IFF3</i> et <i>IFF9</i>	94
3.1 Introduction	94
3.2 Similarité des gènes <i>IFF3</i> et <i>IFF9</i>	94
3.3 Disruption par la méthode classique de PCR jumbo	94
3.4 Stratégie Tet-Off	95
3.4.1 Construction des souches.....	95
3.4.2 Analyse des souches exprimant les constructions TR: <i>IFF</i>	96
3.4.2.1 Phénotype de croissance sur boîte.....	96
3.4.2.1 Expression des gènes <i>IFF3</i> et <i>IFF9</i> sauvages ou sous contrôle de TR.....	96
Conclusion	97
Chapitre 4 : Analyse fonctionnelle de la famille IFF	99
4.1 Introduction	99
4.2 Etude transcriptomique des gènes IFF dans un contexte sauvage ou mutant	100
4.2.1 Conditions d'expression des gènes <i>IFF</i>	100
4.2.2 Régulation des gènes <i>IFF</i> par un autre membre de la famille.....	101
4.3 Rôle des Iffs dans l'interaction avec les cellules de l'hôte	102
4.3.1 Criblage de la banque pour l'adhérence à des cellules épithéliales.....	102
4.3.2 Criblage de la banque pour la sensibilité à la phagocytose.....	103
Conclusion	104
IV. Conclusion et perspectives	106
Références bibliographique.....	115

I. Introduction

1. Présentation générale de *Candida albicans*

1.1 Caractéristiques générales.

1.1.1 Taxonomie et morphologie de *C. albicans*

Ce microorganisme est classé dans le Phylum des Ascomycota, classe des Saccharomycetes, ordre des Saccharomycetales, famille des Saccharomycetales mitosporiques.

Ce champignon adopte trois formes morphologiques majeures : la forme levure (encore appelée blastoconidie), la forme pseudo-hyphe et la forme hyphe (**Figure 1**). La forme levure est ovoïde, mesure de 3 à 10 μm de diamètre, se multiplie par bourgeonnement et se présente généralement sous forme de cellules isolées. Les pseudohyphes résultent d'un allongement apical des bourgeons qui ne se séparent plus de la cellule mère et conduisent donc à la formation de chaînettes. Les hyphes forment des structures tubulaires, parfois branchées, constituées d'une suite d'articles mononucléés ; ils s'allongent par l'apex et l'article terminal se divise par scissiparité quand leur taille a environ doublée (Sudbery *et al.*, 2004).

Exceptionnellement et sous certaines conditions *in vitro*, *C. albicans* peut former des chlamydospores, comme par exemple après une culture à faible température dans un milieu pauvre complémenté d'un détergent (Tween 80) (**Figure1e**). Les chlamydospores sont des cellules rondes à paroi épaisse et lisse, formées par différents champignons, voire même des algues. Chez *C. albicans*, ou *C. tropicalis*, elles se forment à l'extrémité des hyphes

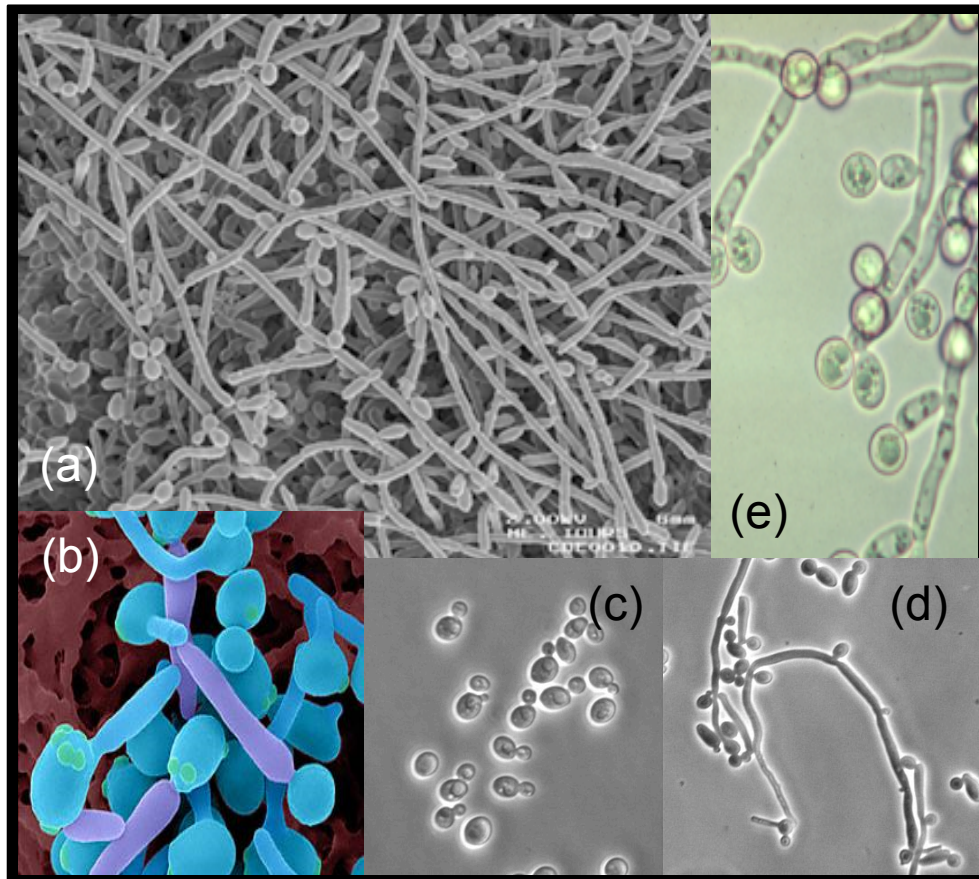


Figure 1 : Les quatre formes de *C. albicans*.

C. albicans est sous forme levure (c) et peut se retrouver sous forme hyphe (a, d) lorsque les conditions le permettent (pH basique, 37°C, sérum). L'hyphe est généralement précédé par la formation d'un tube germinatif (b). Sur cette même photo faite au microscope électronique, on peut voir les cicatrices laissées par la cellule fille lors de la multiplication cellulaire qui se fait par bourgeonnement. Plus rarement on rencontre la chlamydo-spore, réfringente au bout des hyphes en microscopie optique (e).

(Hasenclever, 1971). Les mécanismes moléculaires aboutissant à cette forme sont très mal connus, de même que sa fonction et son implication dans la virulence.

D'une manière plus générale, le basculement d'une forme à l'autre est fortement dépendant des conditions environnementales (pH, température, présence ou non d'un support, nature du milieu, P_{CO_2} ...), Nous n'avons cependant qu'une maîtrise empirique de ces conditions, les signaux moléculaires exacts restant inconnus.

1.1.2 Génétique de *C. albicans*

Cette levure est strictement diploïde et possède 8 paires de chromosomes pour un génome haploïde d'environ 16 Mbases. L'important polymorphisme allélique touchant certains de ses gènes lui permet d'augmenter sa diversité génétique et contribue à son adaptation à différents environnements et à l'acquisition de résistance aux antifongiques (Cowen, 2001; Cowen *et al.*, 2001; Yesland & Fonzi, 2000).

Cette levure a deux particularités génétiques qui feraient aussi partie des mécanismes qu'elle a développé pour maintenir sa diversité génétique (Odds, 2010), en l'absence de cycle sexuel complet. Ces particularités sont aussi pour les phylogénéticiens des indices précieux permettant de retracer son évolution dans le règne des champignons :

- L'usage particulier du codon CUG

Comme d'autres espèces du genre *Candida* phylogénétiquement proches, *C. albicans* a une lecture particulière pour un codon : CUG est traduit en sérine et non en leucine. Ces espèces forment le clade CTG (**Figure 2**). Ceci semble être dû à l'apparition d'un nouveau tRNA sérine (tRNA_{CAGSer}) chargé dans 97% des cas par une aminoacyl acyl tRNA synthase sérine (SerRS) et dans 3% des cas par la synthase LeuRS. Cette ambiguïté élargit le protéome et accroît la diversité phénotypique, en particulier en conditions de stress où l'ambiguïté atteint 5% et permet l'expression de phénotypes mieux adaptés (sécrétion accrue de lipases,

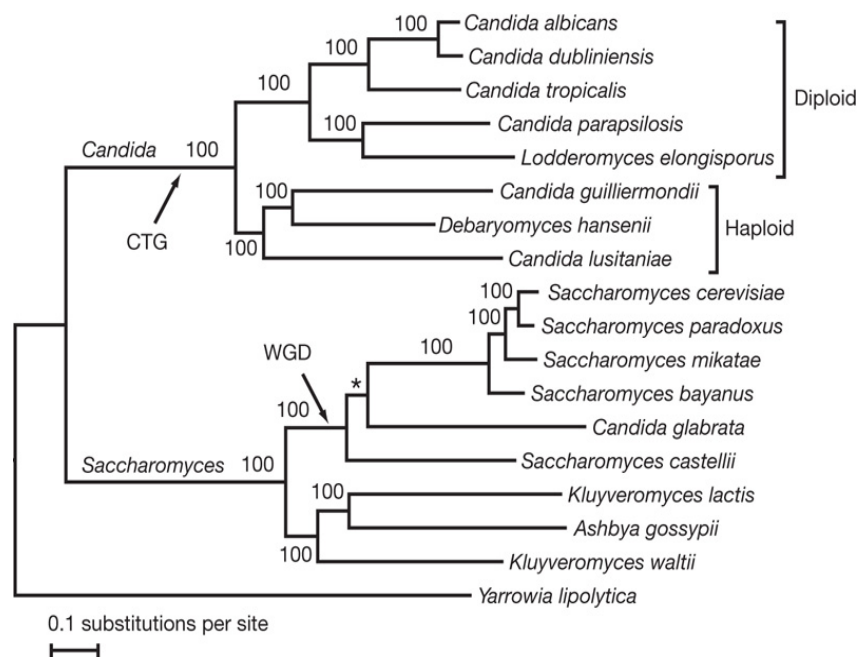


Figure 2 : Phylogénie de souches de *Candida sp* pathogènes parmi des espèces pathogènes ou non-pathogènes (Odds 2010).

protéases, adhésines et colonisation de l'hôte par exemple). En corollaire, cette évolution a entraîné la disparition de 99% des codons ancestraux CUG remplacés par un codon synonyme par mutation du codon CUG, lorsque l'ambiguïté ne pouvait être tolérée (Butler *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2009).

- Le cycle parasexuel

Sa deuxième particularité réside dans le fait qu'elle a un cycle parasexuel : elle peut conjuguer pour former des tétraploïdes, mais il n'a jamais été observé de méiose pour le retour à l'état diploïde. Ce champignon diploïde strict peut en effet se croiser puisqu'il existe deux idiomorphes au locus du signe sexuel, similaires aux gènes *MATa* et *MATα* de *S. cerevisiae*. Ces gènes régulent l'identité sexuelle des champignons par des systèmes de régulations transcriptionnelles qui ont par ailleurs divergé non seulement entre *C. albicans* et *S. cerevisiae* mais également au sein du genre *Candida* (Soll *et al.*, 2009). La plupart des souches étant hétérozygotes pour le locus du signe, la conjugaison nécessite en première étape de générer des homozygotes pour le signe, et en seconde étape de trouver un partenaire homozygote de signe opposé. Une étude récente a cependant montré que, tout comme chez le champignon pathogène *Cryptococcus neoformans*, des souches de même signe sexuel chez *C. albicans* peuvent parfois se croiser et donc présenter un phénotype homothallique (Alby *et al.*, 2009; Heitman, 2009). Après la conjugaison, le retour à l'état diploïde se fait non pas par méiose mais par perte chromosomique aléatoire sans production de spores. (Alby *et al.*, 2009; Heitman, 2009). Ce cycle parasexuel peut être à l'origine de réarrangements chromosomiques et générer de nouvelles combinaisons d'allèles (Odds, 2010).

1.2 Le pathogène opportuniste C. albicans

1.2.1 De l'état commensal à l'état pathogène

C. albicans est un microorganisme naturellement présent chez l'homme (d'Enfert, 2009). La colonisation concerne majoritairement le tractus gastro-intestinal, mais aussi le tractus génital et/ou la peau. La transmission peut se faire de la mère à l'enfant lors de l'acquisition de la flore maternelle pendant la période périnatale. La persistance de commensaux chez l'homme suggère qu'ils possèdent un arsenal de molécules dirigées contre les mécanismes de défenses de l'hôte aboutissant à un état de tolérance. Lorsque le système immunitaire est affaibli ou que le microbiote est altéré, cet équilibre est rompu et le commensal devient un pathogène opportuniste qui peut alors se développer, envahir l'hôte et induire la maladie.

1.2.2 Aspects cliniques

C. albicans peut alors être à l'origine d'infections de gravité proportionnelle à l'état immunologique du patient.

- Candidoses superficielles :

Les candidoses génitales sont fréquentes et touchent 3 femmes sur 4, souvent pendant la grossesse (Soong & Einarson, 2009). Les muqueuses buccales (muguet du nourrisson) et les régions humides de l'épiderme (plis, ongles) peuvent aussi être le siège d'infections superficielles. Les candidoses oropharyngées représentent la cause d'infection opportuniste la plus commune chez les sujets immunodéficients et c'est une des premières manifestations du SIDA. Ces patients sont prédisposés à des infections chroniques, d'intensité variable et proportionnelle au développement du SIDA. De plus, le traitement de ces candidoses peut être limité par l'apparition de résistances aux antifongiques accentuées par la récurrence de l'infection (Hamza *et al.*, 2008) et l'obligation d'un traitement préventif en permanence.

- Candidoses systémiques :

Le terme de candidoses systémiques désigne à la fois les candidémies (dissémination hématogène objectivée par une hémoculture positive), les candidoses viscérales profondes ainsi que les candidoses œsophagiennes (Thom & Forrest, 2006). Du fait de leur survenue au cours du traitement de pathologies lourdes chez des patients fragiles ou immunodéprimés comme les transplantés, les candidoses profondes se déclarent le plus souvent à l'hôpital et sont donc considérées comme des infections nosocomiales. La mortalité globale varie entre 30 % et 50 %, cependant elle est difficile à évaluer compte tenu de la gravité des pathologies associées.

1.2.3 Épidémiologie des infections à *Candida*

Les études épidémiologiques font suite à des questions posées par les cliniciens, telles que : Quelles sont les sources d'infection ? L'infection est-elle causée par une seule souche ? Est ce qu'il y a des souches spécifiques d'un degré d'infection ? Pour répondre à ces questions il existe aujourd'hui des approches fiables pour identifier et comparer les souches cliniques comme le « MultiLocus Sequence Typing » (MLST) ou l'analyse des microsatellites (Odds, 2010).

- Épidémiologie de *Candida spp*

De manière générale, le recensement mondial des candidoses a montré une augmentation des candidoses invasives, avec une augmentation des candidoses à *Candida spp* non *albicans*. Cette observation est corrélée à la tolérance élevée que présentent certaines de ces nouvelles espèces vis-à-vis des antifongiques habituellement utilisés en première intention comme les azolés (voir plus bas) (Concia *et al.*, 2009). La résistance de ces souches aux antifongiques communs a également été observée en Amérique du Nord et en Europe Centrale (Sobel, 2006). La prédominance de *Candida spp.* (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et *C.*

parapsilosis) s'est faite progressivement. Même si les candidoses invasives sont toujours majoritairement provoquées par *C. albicans*, *Candida glabrata* est responsable de 15 à 20% des infections dans le monde (Mean *et al.*, 2008). Le taux d'isolats de *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* est en augmentation depuis 1997 (Pfaller & Diekema, 2007).

En ce qui concerne les candidémies à *Candida spp*, des variations non seulement temporelles mais aussi géographiques ont été observées. Les candidémies à *Candida spp* occupent le quatrième rang des septicémies nosocomiales aux USA et sont le plus souvent observées chez les patients séjournant en unités de soins intensifs (Mean *et al.*, 2008).

C. albicans est l'espèce la plus souvent isolée dans les candidoses oropharyngées (84,5%), suivie de *C. glabrata* (6,8%) et *C. krusei* (3,4%). Il n'a pas été observé de différences de la distribution des espèces entre les infections primaires et celles récurrentes (Hamza *et al.*, 2008). *C. dubliniensis*, connu pour être résistant aux azolés, est un pathogène émergent pour ce type infection (Chunchanur *et al.*, 2009).

Pour conclure, si certaines espèces sont plus représentées dans un type de candidose, il n'a pas été mis en évidence d'espèce typiquement virulente ou spécifique d'un type d'infection.

- Épidémiologie de *C. albicans*

Des études épidémiologiques plus fines des souches de *C. albicans* ont été menées par typage moléculaire de séquences répétées à l'aide de la sonde Ca3 et ont permis d'identifier 5 clades de *C. albicans* : groupes I, II, III, SA et E (Pujol *et al.*, 2002; Soll & Pujol, 2003). Ces groupes montrent une spécificité géographique. Le groupe SA est bien représenté en Afrique du Sud, le groupe E en Europe, le groupe III en Amérique du Nord, et le groupe II au Canada en étant totalement absent du sud ouest des Etats-Unis et de l'Amérique du Nord. Les liens phylogénétiques entre ces clades sont assez bien conservés quand d'autres marqueurs

polymorphes sont utilisés, ce qui a été interprété comme confirmant la propagation majoritairement clonale des isolats (Lott *et al.*, 1999; Pujol *et al.*, 2002)

Il existe ainsi chez les souches d'un même clade des similitudes dans le nombre de répétition en tandem présentes chez certaines protéines de la paroi, telles que les Als et Hyr1/Iff (Soll & Pujol, 2003), voir aussi plus loin.

On observe également des spécificités phénotypiques caractéristiques de certains clades. Le groupe I a par exemple la particularité d'être majoritairement résistant à la flucytosine (Tavanti *et al.*, 2005) et à la terbinafine (Odds, 2009).

En conclusion on remarque que les clades de *Candida* ont des spécificités géographiques, génétiques et phénotypiques. Cette capacité de changer en fonction de l'environnement semble s'exprimer aussi à une plus petite échelle, puisqu'on a remarqué des microvariations d'une souche colonisant un même patient. Cela a compliqué l'étude mais néanmoins il reste admis qu'en cas de candidose un sujet est généralement infecté par une seule souche commensale. Ces microvariations pourraient résulter de microévolutions répondant aux différentes niches du corps humain. Le clade I, majoritairement (33%) et universellement répertorié lors de candidoses, semble être de ce fait le clade le mieux adapté en tant que commensal humain.

1.3 Traitement des candidoses : mode d'action des antifongiques et résistances chez C. albicans

Comparativement aux antibactériens, le nombre de médicaments antifongiques disponibles est resté limité. Les champignons étant plus proches des cellules humaines que les bactéries, la possibilité de trouver des cibles spécifiques est réduite. Les cibles des antifongiques sont essentiellement l'ergostérol de la membrane plasmique pour les polyènes

et les azolés, les acides nucléiques pour la 5-flucytosine et la paroi pour les échinocandines. Le nombre restreint d'antifongiques rend l'émergence de résistances d'autant plus préoccupante. Le développement de résistances chez *C. albicans* est un problème majeur dans le traitement des candidoses superficielles récidivantes chez les patients atteints de SIDA (Witzel *et al.*, 2008).

Voici les antifongiques les plus utilisés aujourd'hui :

1.3.1. Les polyènes : amphotéricine B

Les polyènes sont principalement représentés par l'amphotéricine B. Elle augmente la perméabilité de la membrane par formation de complexes avec l'ergostérol (Holz, 1974). La membrane devient notamment perméable au potassium, et cette fuite ionique entraîne la mort de la cellule. La résistance à l'amphotéricine B est associée à des mutations de la voie de synthèse de l'ergostérol affectant, entre autres, le gène *ERG3* (Young *et al.*, 2003).

1.3.2. Les azolés

Plusieurs générations d'azolés ont été mises sur le marché jusqu'aux triazolés présentant l'avantage d'associer un large spectre d'activité (comparable à celui de l'amphotéricine B) et une toxicité minimale. Alors que les nouveaux triazolés ont une activité fongicide sur les champignons filamenteux, ils restent fongistatiques vis-à-vis des levures qui sont considérées comme « tolérantes » aux azolés car elles survivent à des concentrations supérieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les azolés agissent en bloquant la biosynthèse de l'ergostérol par inhibition de l'enzyme Erg11. Les azolés favorisent ainsi l'accumulation de métabolites intermédiaires toxiques qui entraînent la mort de la cellule. Il existe principalement deux mécanismes de résistance de *C. albicans* aux azolés : la mutation de la cible entraînant une altération de sa reconnaissance par

l'azolé, ou l'activation de transporteurs non spécifiques qui sont des pompes à efflux de type ABC (ATP Binding Cassette) et MFS (Major Facilitator Superfamily) (Morschhauser, 2010).

1.3.3. Les échinocandines : la caspofungine

Elles agissent sur les levures du genre *Candida* et les champignons filamenteux du genre *Aspergillus* et ont donc un spectre plus étroit que l'amphotéricine B ou les derniers triazolés développés. Les échinocandines inhibent la synthèse des glucanes de la paroi en bloquant l'enzyme β 1-3 D-glucane synthase. Malgré l'utilisation croissante des échinocandines, le développement de résistances reste exceptionnel. Des mutants résistants de *S. cerevisiae* ont pu être obtenus *in vitro* et ont permis d'identifier plusieurs mécanismes de résistance qui impliquent les protéines de la voie de la Pkc1-MAP kinase. Certains auteurs ont décrit un « effet paradoxal » *in vitro* correspondant à la croissance de souches sensibles de *C. albicans* à des concentrations élevées de caspofungine (Stevens *et al.*, 2005). Ce phénomène pourrait être lié à une augmentation de la synthèse de la chitine (Stevens *et al.*, 2006). Les conséquences *in vivo* sur l'efficacité d'un traitement semblent négligeables (Clemons *et al.*, 2006).

2. La paroi de *Candida albicans*

La surface cellulaire des levures est constituée par une paroi rigide qui joue deux rôles essentiels : maintenir l'intégrité de la cellule et interagir avec l'environnement, organique ou inerte. Pour *C. albicans*, la paroi fait l'objet de nombreuses attentions depuis les dernières décennies. La recherche de mot clé comme « *albicans* » ou « paroi de *C. albicans* » dans pubmed (www.pubmed.gov) montre que le nombre total de publications sur ce sujet a

augmenté considérablement entre les années 2000 et les décennies précédentes (Chaffin, 2008). La disponibilité des séquences, ainsi que les données de puces et de protéomiques ont contribué fortement à l'augmentation des études sur la paroi soit par des approches globales soit en ciblant un gène en particulier.

2.1 Organisation de la paroi

Le laboratoire de Frans Klis a mis en évidence les similarités de structure de la paroi de *C. albicans* et *S. cerevisiae* (De Groot *et al.*, 2003; de Groot *et al.*, 2004; Kapteyn *et al.*, 1995). L'intégrité de la paroi est clairement très importante pour la survie de ces organismes. Le réseau microfibrillaire de chitine et de glucanes forme un squelette pariétal solide et protecteur (**Figure 3**). La concentration des différents composants dépend de facteurs variés tels que la morphologie, le milieu de culture ou le pH (Klis *et al.*, 2001), mais la composition globale de la paroi en carbohydate reste constante (80% à 90% de la paroi de *C. albicans*). Trois constituants basiques représentent les polysaccharides principaux de la paroi : les polymères ramifiés de glucoses liés en β -(1,3) et en β -(1,6), les polymères non-ramifiés de N-acétylglucosamine contenant des liaisons β -1,4 (chitine), et les polymères de mannose (mannane) covalamment associés à un squelette peptidique et liés entre eux par des liaisons α -(1,2), α -(1,6) et α -(1,3) (Sendid *et al.*, 2009). De plus la paroi contient 6 à 25% de protéines et 1 à 7% de lipides. Les glycoprotéines sont plutôt représentées à la surface, ce qui suggère qu'elles pourraient jouer un rôle important dans les interactions avec l'environnement. D'autres composants sont présents comme les sels et les lipides qui à très faible concentration sont néanmoins essentiels pour l'intégrité de la paroi.

2.1.1 Le squelette glucidique

La structure de la paroi de *C. albicans* est semblable à celle de *S. cerevisiae*. Le coeur de cette structure est composé de β -1,3 glucanes qui sont de longs polymères dont la synthèse

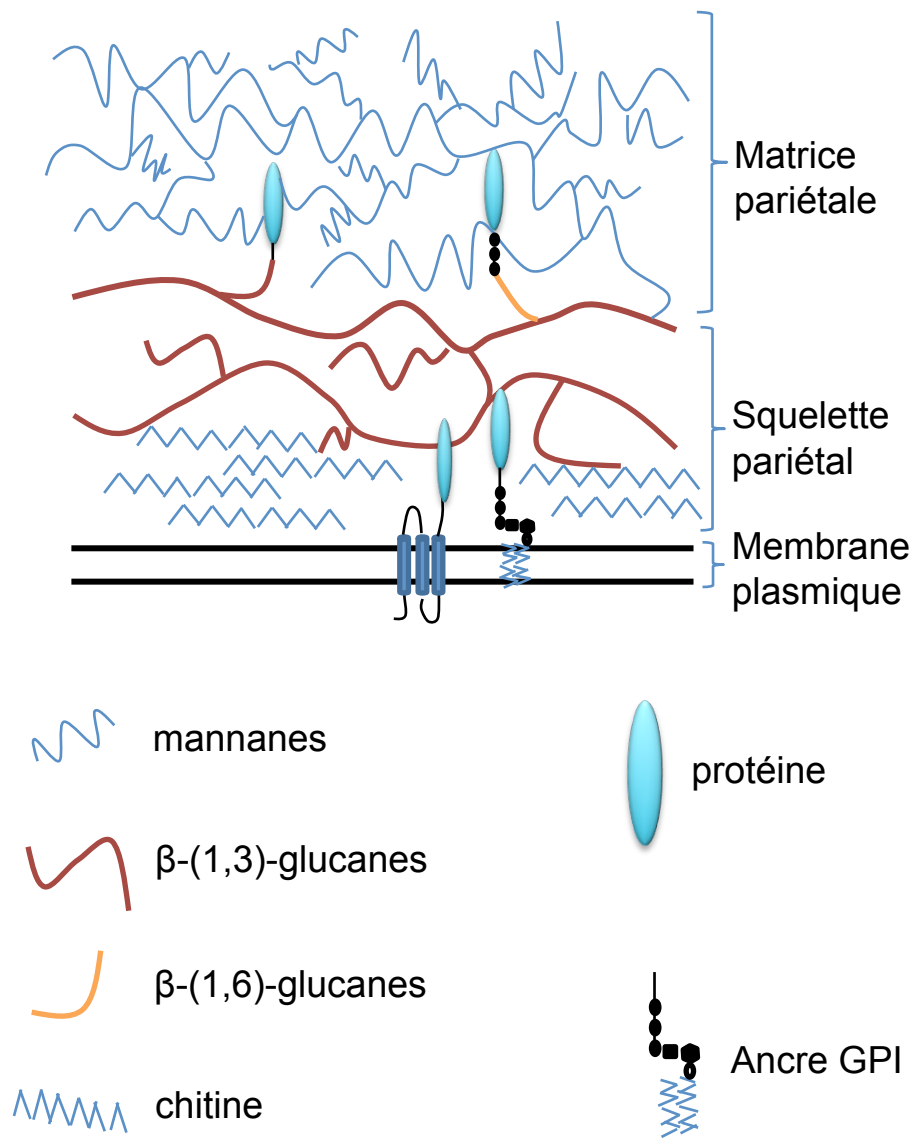


Figure 3 : Architecture de la paroi de *C. albicans*.

implique différentes enzymes localisées dans différents compartiments cellulaires, telles que les protéines Kre1 ou Big1 (Boone *et al.*, 1991; Umeyama *et al.*, 2006). Les β -1,3 glucanes sont attachés de façon covalente à la chitine grâce aux β -1,6 glucanes (Lesage & Bussey, 2006). Les liaisons hydrogènes entre les chaînes polysaccharidiques vont former des feuillettes antiparallèles. Ce réseau en trois dimensions de microfibrilles va conférer à la paroi sa rigidité ainsi qu'une forte insolubilité. Chitine et glucanes peuvent parfois se retrouver à la surface, notamment au niveau de la cicatrice de la cellule mère (Lenardon *et al.*, 2007).

2.1.2 La matrice protéique : les trois classes de protéines pariétales

La matrice protéique est majoritairement composée de protéines glycosylées. Les protéines pariétales sont de trois classes, les deux premières font intervenir des liaisons covalentes, la troisième classe est attachée par des liaisons non-covalentes :

- La première et la plus abondante est liée aux β -1,6-glucanes par une ancre Glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les GPIs sont décrites dans le paragraphe 3.2

- La deuxième classe correspond aux protéines Pir (Proteins with internal repeats), qui sont liées directement aux β -1,3-glucanes.

Cette petite famille de protéines est liée aux β -1,3-glucanes par une liaison covalente sensible à 30mM de NaOH (Kapteyn *et al.*, 1999). La nature chimique exacte de cette liaison reste inconnue. Ces protéines présentent une séquence signal suivie d'un propeptide, puis d'un site de clivage pour l'endoprotéase Kex2p et enfin d'un domaine C-terminal comprenant 4 résidus cystéines régulièrement espacés. Elles sont caractérisées par la présence de

répétitions en nombre variable de séquences riches en glutamine et de sites de O-glycosylation (Ruiz-Herrera *et al.*, 2006).

Il existe 4 protéines Pirs chez *S. cerevisiae* : Pir1 à Pir4. Grâce à une fusion avec une protéine fluorescente, la protéine Pir1 a été localisée dans l'anneau de division cellulaire et la région répétée permettrait la liaison avec la paroi (Sumita *et al.*, 2005). La délétion des Pirs n'est pas létale même lorsque toutes les protéines sont délétées (le mutant $\Delta pir1,2,3,4$, est viable). Les mutants *pir-* ont un temps de génération plus long d'environ 30%, les colonies grandissent en amas et sont de taille plus importante et ont une surface irrégulière (Mrsa & Tanner, 1999). L'équipe de Mazan a étudié le phénotype des mutants $\Delta pir4$ et $\Delta pir1,2,3,4$ et a montré qu'un pH faible inhibe partiellement la croissance de $\Delta pir4$ alors que $\Delta pir1,2,3,4$ ne pousse plus (Mazan *et al.*, 2008). *A contrario*, à pH élevé, ces deux mutants sont résistants contrairement à la souche sauvage. Les mutants *pir* sont par ailleurs très sensibles au Calcofluor White ainsi qu'aux autres agents perturbant la paroi tels que le sodium dodecyl sulfate, et la caféine. Une autre étude a montré que le mutant $\Delta pir1,2,3,4$ avait une paroi modifiée, contenant moins de β -1,3-glucanes alkali-solubles liant les Pirs à la paroi (Ecker *et al.*, 2006). Au contraire la paroi est enrichie en chitine alkali-soluble, liée aux GPIp par les β -1,6 glucanes (Kollar *et al.*, 1997). Ce déséquilibre est proportionnel à la quantité de *PIR* délétées. Chez *S. cerevisiae* il a été décrit un mécanisme compensatoire appelé Cell Wall Integrity signaling pathway (CWI) et résultant de la synthèse de chitine et de mannoprotéines ainsi que de leur liaison mutuelle comme réponse aux dommages ou aux stress de la paroi (Klis *et al.*, 2006; Levin, 2005). Un élément clé de cette voie est l'activation du complexe Mpk1 et Slt2 (de Nobel *et al.*, 2000). Chez les mutants *pir* ces protéines sont induites (Mazan *et al.*, 2008) ce qui indique une activation de la voie CWI. Globalement chez les organismes qui possèdent des Pirs, il a été montré qu'elles contribuent à la solidité de la paroi, la stabilité

osmotique et qu'elles jouent le rôle de barrière contre les enzymes antifongiques chez les plantes.

Chez *C. albicans*, deux ORF dont les produits de traduction sont semblables à ceux de *ScPIR1* ont été identifiées : *IPF15363* avec 42% de similarité et *IPF19968* avec 45% de similarité (elle atteint 65% dans la partie C-terminale). *IPF19968* possède 39 acides aminés de moins que *IPF15363* et diffère aussi par une substitution d'un acide aminé. Ces deux Orfs sont en fait les deux allèles du gène *PIR1* dans la souche séquencée, ce que confirme la comparaison des séquences promotrices. Ces protéines sont prédites comme étant fortement glycosylées et possèdent les mêmes motifs répétés que Pir4 de *S. cerevisiae*. L'allèle *IPF15363* en a 9 alors que *IPF19968* en a seulement 7. Ces protéines sont détectables en utilisant un antiserum anti Pir2 de *S. cerevisiae* (Russo *et al.*, 1992). Une autre étude a été réalisée chez *S. cerevisiae* en plaçant l'ORF *IPF15363* étiquetée par un épitope V5 sous le contrôle du promoteur ADH. La protéine marquée copurifie (Western-blot) avec la fraction soluble dans la soude, indiquant que chez *S. cerevisiae* cette protéine hétérologue est bien liée au β -1,3-glucanes. La souche transformée n'a montré aucun phénotype.

- La troisième classe de protéines pariétales est fixée par des liaisons non covalentes aux glycanes de la paroi. Leur nature est très diverse, certaines correspondent à des protéines cytoplasmiques abondantes (Hsp70, enzymes glycolytiques) et leur mécanisme d'arrivée en surface fait l'objet de débats (sécrétion non conventionnelle ou lyse cellulaire?). Elles peuvent être distribuées de façon hétérogène à la surface et entraînent parfois la formation d'anticorps spécifiques comme l'antigène Pra1 (Marcil *et al.*, 2008).

2.2 Modifications post-traductionnelles des protéines de paroi

Au cours de leur transit dans l'appareil sécrétoire, les protéines de paroi peuvent subir, comme les autres protéines secrétées, différents types de modifications post-traductionnelles qui modifieront leurs propriétés physico-chimiques et affecteront leur fonction. En dehors de la formation de ponts di-sulfures, nous citerons l'ajout de groupement sucrés (glycosylation, mannosylation) ou de glycolipides. Nous détaillerons plus particulièrement ci-dessous ces deux derniers types de modification.

2.2.1 Glycosylation et mannosylation des protéines de paroi

Les Glycosylations

Il existe deux types de glycosylations. Les protéines N-glycosylées reçoivent un oligosaccharide grâce à la liaison entre l'azote du groupement amide de l'asparagine et la N-acétylglucosamine. Les protéines O-glycosylées reçoivent de courtes chaînes de mannoses grâce à une liaison entre le groupe hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine et d'un mannose.

La N-glycosylation des protéines est une modification hautement conservée chez tous les eucaryotes, certains procaryotes et la perte complète de ce mécanisme est létale.

Chez les eucaryotes ce processus est catalysé par l'oligosaccharyltransférase, localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Ce complexe enzymatique reconnaît le tripeptide Asn-X-Ser/Thr (X=n'importe quel acide aminé excepté la proline) sur le polypeptide en cours de translocation dans le RE et catalyse le transfert de l'oligosaccharide Glc3Man9GlcNAc2 sur l'asparagine. Ce noyau sucré une fois transféré sur la protéine est remanié par les glucosidases I et II lors de la vérification de la qualité du

repliement de la protéine sécrétée. Les protéines correctement repliées poursuivent alors leur transit vers l'appareil de Golgi où la glycosylation est modifiée par l'addition de longues ramifications de mannose (Franzosoﬀ & Schekman, 1989).

La O-glycosylation commence dans le RE, où les mannosyltransférases (Pmt) transfèrent le mannose d'un groupe dolichol-phosphate-mannose à une sérine ou une thréonine, et se poursuit dans le Golgi où d'autres mannosyltransférases (Mnt) étendent les chaînes de mannose. Chez *C. albicans* il existe 5 isoformes de Pmt (Pmt1, Pmt2, Pmt4, Pmt5 et Pmt6). Les mutants knock-out ont pu être obtenus sauf pour le gène *PMT2* qui est essentiel. Tous les autres mutants *pmt* ont montré une hypersensibilité à différents degrés pour des antifongiques et des agents perturbant la paroi. La composition de la paroi est considérablement affectée chez les mutants *pmt1* et *pmt4* qui présentent une forte diminution du nombre de mannoprotéines pariétales. Le mutant *pmt4* a montré une morphogénèse en hyphes défectueuse seulement en condition aérobie. Alors qu'en condition hypoxique cette morphogénèse est plus importante que dans la souche sauvage ce qui suggère que Pmt4 jouerait un rôle spécifique d'un environnement dans la voie de signalisation de la morphogénèse. Par ailleurs, dans un modèle d'infection disséminée chez la souris *PMT4* est nécessaire à la virulence de *C. albicans* (Prill *et al.*, 2005). Le mutant *pmt5* n'a pas montré de phénotype bien que *PMT5* soit transcrit dans ces conditions. L'importance des isoformes Pmt dépend de leurs niches qui est spécifique (Rouabhia *et al.*, 2005).

Les protéines membranaires ou sécrétées, N glycosylées, ou ancrées GPI peuvent être O-glycosylées avec des oligosaccharides contenant jusqu'à 7 mannoses liés à une sérine ou une thréonine chez *C. albicans* (Hayette *et al.*, 1992). Chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*, les mannoses sont ajoutés en nombre variable selon les protéines. La raison des différences de glycosylation est encore méconnue, elle pourrait refléter l'accessibilité des substrats aux sites

catalytiques des mannosyltransférases (Petrescu *et al.*, 2004). Parfois l'addition de mannoses s'accompagne d'ajout de phosphates qui apportent une charge négative à la paroi, changeant ainsi les propriétés de surface (Jigami & Odani, 1999).

Les mannanes ont des rôles importants dans l'intégrité de la paroi, l'adhésion aux cellules et tissus de l'hôte, la virulence, et l'établissement de la réponse par les cellules immunitaire (Bates *et al.*, 2005; Bates *et al.*, 2006; Calderone, 1993; Mora-Montes *et al.*, 2007; Munro *et al.*, 2005; Netea *et al.*, 2008; Sundstrom, 2002; Wang *et al.*, 1998). Les mannanes O ou N-liés de *C. albicans* et *S. cerevisiae* présentent des caractéristiques spécifiques importantes pour la reconnaissance immunitaire (Cambi *et al.*, 2008; Munro *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 1992; Trinel *et al.*, 1997).

La fonction de la O-glycosylation était initialement considérée comme essentiellement structurale puisque ces liaisons donnent aux protéines une conformation plus étendue (Jentoft, 1990), et la délétion des domaines riches en Ser/Thr de différentes enzymes n'affecte pas leur activité catalytique (Gatti *et al.*, 1994). D'autres fonctions de nature très variées ont cependant été associées à la O-glycosylation (Ecker *et al.*, 2003; Proszynski *et al.*, 2004). Chez *S. cerevisiae*, elle semble être impliquée dans la réponse aux stress osmotique et oxydatif (Odani *et al.*, 1997) et elle a été décrite comme nécessaire au maintien de l'intégrité de la paroi et au bourgeonnement (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999; Strahl-Bolsinger & Scheinost, 1999). Chez *C. albicans*, l'inactivation des gènes *PMT1* ou *PMT6* affecte significativement la transition dimorphique, la résistance aux antifongiques et finalement la virulence en modèle souris (Ernst & Prill, 2001). Il a été récemment démontré que les N- et O-glycosylations sont des facteurs clés pour limiter la phagocytose de *C. albicans* par les macrophages et ainsi faciliter le franchissement de la première ligne de défense de l'hôte (McKenzie *et al.*, 2010), voir paragraphe 3.1.2.

Les β -mannosylations

Suzuki *et al.* ont été les premiers à démontrer que *C. albicans* possède des β -(1,2)-mannanes (β -Man) (Dean, 1999; Shibata *et al.*, 1985). Pendant l'infection, ces β -(1,2)-mannanes jouent un rôle important dans les interactions hôte/pathogène en interagissant avec des protéines de surface de l'hôte comme la galectine (Fradin *et al.*, 2000; Kohatsu *et al.*, 2006) et en interférant avec la réponse immunitaire. *S. cerevisiae* ne possède pas de mannoses liés en β -(1,2), par contre il a été retrouvé des β -Mans dans la levure non pathogène *Pichia pastoris*. A l'aide d'analyses *in silico*, une famille de 4 gènes a été identifiée comme étant impliquée dans le transfert des β -mannoses chez *P. pastoris* (Vinogradov *et al.*, 2000), 9 homologues ont été identifiés chez *C. albicans* alors qu'aucun n'a été retrouvé chez *S. cerevisiae* (Mille *et al.*, 2008). La délétion de ces gènes a révélé différents phénotypes immuno-chimiques confirmant leur implication dans l'expression des épitopes β -Man de paroi. Les analyses biochimiques et structurales de ces mutants ont permis de préciser leur rôle dans la biogenèse de la β -mannosylation chez *P. pastoris* et *C. albicans*. (Mille *et al.*, 2008). Les β -(1,2) mannanes sont associés au phosphopeptidomannane (PPM) et au phospholipomannane (PLM) (Trinel *et al.*, 1993; Trinel *et al.*, 2002). Les PLM sont localisés dans la paroi (Poulain *et al.*, 2002) et se caractérisent par une forte mannosylation ainsi que par l'addition de mannose-phosphate au lieu d'inositol-phosphate comme chez les champignons. Ces spécificités confèrent aux PLM des propriétés physico-chimiques et immunomodulatrices particulières. Elles en font aussi de bons identifiants sérotypiques (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003a; Ibata-Ombetta *et al.*, 2003b; Jouault *et al.*, 1998; Trinel *et al.*, 2005).

2.2.2 Addition d'une ancre GPI aux protéines de paroi

En 1976, il a été identifié une nouvelle phospholipase chez *Bacillus cereus* : la phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC). Elle était capable de relarguer de la surface

cellulaire des érythrocytes des phosphatases alcalines, et aussi différentes protéines dont des 5'-nucléotidases et des acétylcholinesterases (Ikezawa *et al.*, 1976). Cela suggérait que ces protéines étaient covalamment attachées à la membrane cellulaire via un groupement phosphatidylinositol. En 1985, les composants structuraux carboxy-terminaux de 2 protéines de surfaces eucaryotes ont été identifiés (Williams *et al.*, 1985), ce qui correspondait quasiment à la structure générale de l'ancre GPI telle que nous la connaissons aujourd'hui.

Synthèse de l'ancre

Tous les eucaryotes sont capables de modifier certaines protéines sécrétées par l'ajout d'une ancre GPI. Ce glycolipide est synthétisé par une voie globalement très conservée comme le démontre la possibilité de compléter des souches de *S. cerevisiae* délétées pour un des gènes de la voie par l'expression d'orthologues humains (Kang *et al.*, 2005).

La synthèse commence à partir d'un groupement phosphatidylinositol (PI) (**Figure 4**) contenant un acide gras insaturé et enchâssé dans la membrane du RE. L'ancre GPI est synthétisée par addition séquentielle. Au moins 11 réactions sont nécessaires pour générer l'ancre GPI avant l'attachement de la protéine. La voie de biosynthèse est initiée du côté cytoplasmique de la membrane du RE par transfert d'une N-acétylglucosamine (GlcNAc) au PI (étape 1) à partir d'un UDP-GlcNAc générant un GlcNAc-PI (étape 2). Celui-ci est ensuite transloqué dans le lumen du RE (étape 3) où il est acétylé (étape 4), mannosylé et modifié par les phosphoéthanolamines (étapes 5 à 10). L'ancre GPI nouvellement synthétisée est accrochée par son éthanolamine postraductionnellement à la protéine transloquée dans le RE et possédant un site d'ancrage (étape 11). Toutes ces étapes sont catalysées par des enzymes répertoriées dans le tableau de la Figure 4.

La plupart des gènes codant les enzymes impliquées dans ces différentes étapes sont essentiels chez *S. cerevisiae* : l'ancrage GPI de certaines protéines au moins semble donc

Etape	Réaction	Protéine
1	Synthèse du GlcNAc-PI	Gpi3p Gpi2p Gpi15p Gpi19p Gpi1p Eri1p —
2	de-N-acétylation du GlcNAc-PI	Gpi12p
3	Basculement du GPI	Non identifiée
4	Acétylation de l'inositol	Gwt1p
5	{alpha}1,4 mannosyltransférase	Gpi14p Pbn1p?
6	Transfère d'une Etn-P au Man-1	Mcd4p
7	{alpha}1,6 mannosyltransférase	Gpi18p
8	{alpha}1,2 mannosyltransférase	Gpi10p
9	Transfère d'une Etn-P au Man-3	Gpi13p Gpi11p?
10	Transfère d'une Etn-P au Man-2	Gpi7p Gpi11p?
11	Transamidase du GPI	Gpi8p Gaa1p Gpi17p Gpi16p Gab1p
<i>p</i>	Déacylation de l'inositol	Bst1p
<i>p</i>	deacylation du sn-2	Per1p
<i>p</i>	acylation du sn-2 C26	Gup1p
<i>p</i>	acylation du sn-2	Cwh43p?

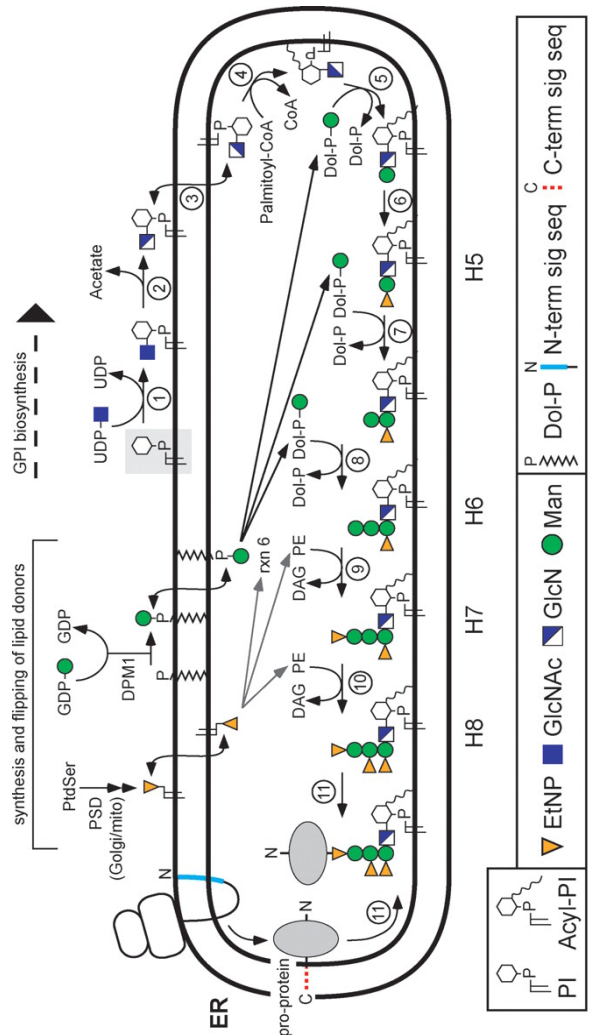


Figure 4 : Schéma général des différentes étapes impliquées dans la synthèse et la fixation de l'ancrage GPI sur les protéines des levures et des mammifères (Orlean *et al.*, 2007). Les enzymes catalysant ces réactions de 1 à 11 sont identifiées dans le tableau. Les étapes *p* concernent les modifications post ancrage GPI.

essentiel chez cette levure, comme d'ailleurs chez *C. albicans* et *S. pombe* (Ellis *et al.*, 2003; Grimme *et al.*, 2004; Leidich *et al.*, 1994). Il en va de même pour certains protozoaires (Ilgoutz *et al.*, 1999), mais de façon surprenante la délétion des gènes de la voie ne conduit pas à un défaut phénotypique fort en cellules animales. On notera cependant qu'une délétion homozygote chez la souris conduit à la mort des embryons (Kawagoe *et al.*, 1996).

Structure de l'ancre GPI

La partie carboxy-terminale de la protéine est liée à un cœur glycanique par un groupement phosphoéthanolamine (**Figure 5**). Ce cœur est composé de 3 mannoses, d'un groupement N-acétyl glucosamine, et d'un résidu inositol. Il est fortement conservé chez les mammifères, les protozoaires et les levures. Une queue phospholipidique attache l'ancre GPI à la membrane cellulaire. Le cœur glycanique peut être ramifié de façon variable selon les organismes. Chez *S. cerevisiae*, il peut y avoir ajout de groupement phosphoéthanolamine et de mannoses.

Fonction de l'ancre GPI

Un défaut dans la biosynthèse de l'ancre est parfois létal pour les levures (Leidich *et al.*, 1994). L'importance de l'ancre dans la fonction de la protéine est très généralement méconnue. Le simple fait de posséder une ancre GPI peut avoir des conséquences sur la fonctionnalité de la protéine puisqu'elle peut affecter sa conformation. L'ancrage lipidique permet une association éventuelle aux radeaux lipidiques et donc une fonction putative dans la transduction du signal (Munro, 2003; Rajendran & Simons, 2005; Simons & Gruenberg, 2000). Le seul rôle confirmé est de permettre l'attachement stable et résistant aux protéases et lipases extracellulaires. D'une façon générale cependant, la signification physiologique des ancras GPI reste mystérieuse : elles pourraient jouer un rôle précis chez certaines voire chez toutes les protéines ou n'être au contraire qu'un vestige structural.

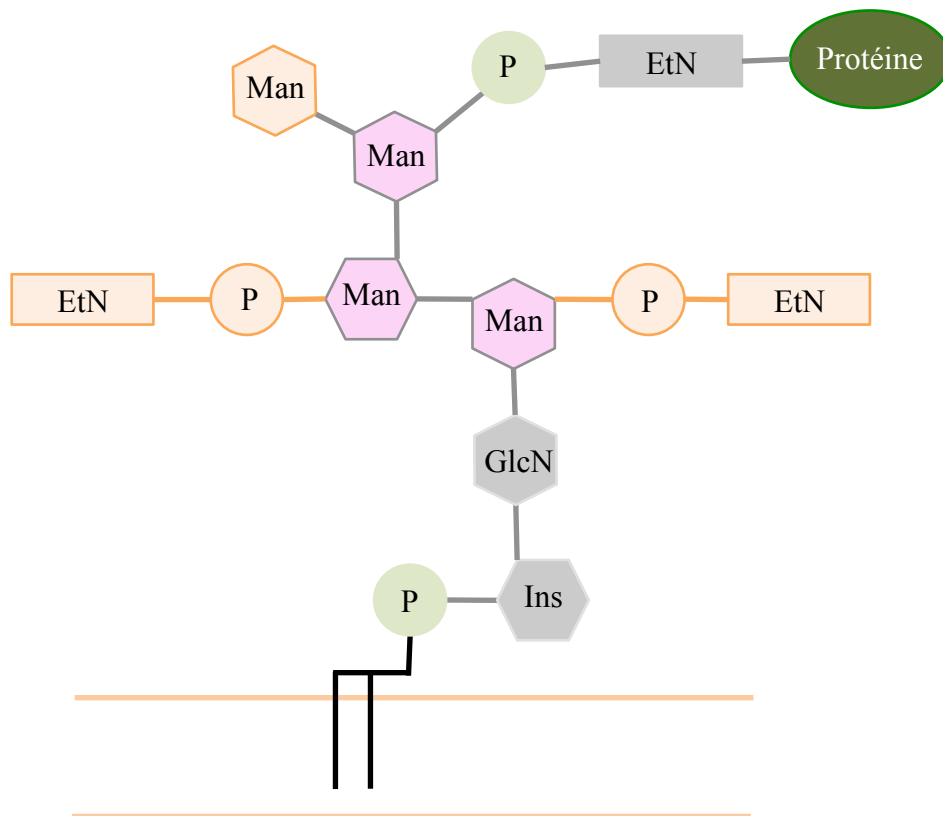


Figure 5 : Structure de l'ancrage GPI. Le cœur est commun à tous les eucaryotes. Les chaînes latérales supplémentaires en orange sont spécifiques de *S. cerevisiae*. EtN : éthanolamine; GlcN : glucosamine; Ins : inositol; Man : mannose; P : groupement phosphate.

Caractéristiques des protéines à ancre GPI

La séquence en acides aminés des protéines à ancre GPI présente trois caractéristiques (**Figure 6**) :

- un peptide N-terminal pour l'envoi vers le réticulum endoplasmique,
- un signal d'ancrage GPI formé d'une région linker flexible d'environ 10 acides aminés polaires ($\omega-10$ à $\omega-1$), d'un acide aminé ω (G, A, S, N, D ou C) qui détermine le site de clivage de la protéine puis son attachement à l'ancre, l'acide aminé $\omega+2$ (le plus souvent G, A, ou S), une région espaceur d'acides aminés polaires ($\omega+3$ à $\omega+9$ ou plus),
- et un peptide C-terminal hydrophobe de longueur variable pour l'ancrage transitoire dans la membrane du réticulum (Eisenhaber *et al.*, 2004).

Comme on le verra plus bas, la séquence signal, le domaine transmembranaire et le site ω sont utilisés pour identifier ces protéines à partir des génomes séquencés.

Généralement, la protéine contient également une région riche en sérines et thréonines, lieu de fortes O-glycosylations (Hamada *et al.*, 1998).

Localisation des protéines à ancre GPI.

Les protéines à ancre GPI ont été localisées dans la membrane plasmique ou dans la paroi. Et certaines semblent avoir une localisation ubiquitaire. Donc aujourd'hui encore la localisation précise de ces protéines est dans la plupart des cas toujours inconnue ou fait débat : restent-elles attachées à la membrane plasmique ou sont-elles toutes envoyées à la paroi ? Par exemple, Ecm33 a été localisée dans la membrane (Cabezón *et al.*, 2009) et la paroi (De Groot *et al.*, 2003). Cette protéine pourrait être soit en transit, soit partager sa distribution entre les deux localisations. De plus, Sap9 et Sap10 ont également été visualisées

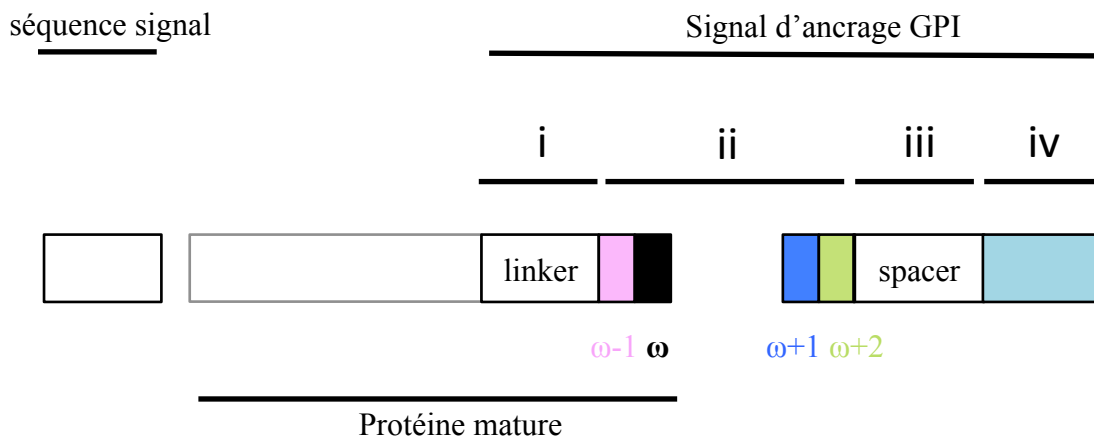


Figure 6 : Schématisation des motifs de prédiction d'un ancrage GPI sur la séquence primaire des protéines à ancre GPI (d'après B. Eisenhaber et al., 2003) :

- la séquence signal N-terminale d'export de la protéine vers le réticulum endoplasmique,

- la séquence signal C-terminale de reconnaissance par la transamidase, avec ses 4 régions (notées i à iv) :

- (i) un linker : région flexible et polaire de 11 résidus $\omega-11$ à $\omega-1$,
- (ii) l'acide aminé ω sur lequel l'ancre GPI est fixée, suivi de l'acide aminé $\omega+1$ qui peut-être n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline et du tryptophane ; puis l'acide aminé $\omega+2$ doit avoir également une petite chaîne latérale,
- (iii) un spacer : 5 à 7 acides aminés hydrophiles ($\omega+3$... $\omega+9$),
- (iv) un segment hydrophobe qui se poursuit jusqu'à la fin de la séquence et qui permet l'ancrage transitoire à la membrane du RE.

par marquage à deux localisations, Sap9 se trouvant majoritairement dans la membrane (Albrecht *et al.*, 2006; Cabezon *et al.*, 2009). Cette double localisation pourrait être assez générale et expliquer les discordances entre les nombres de protéines pariétales rapportés par différents auteurs. Il a été proposé que la nature des acides aminés situés immédiatement en amont du site ω puissent spécifier, chez *S. cerevisiae*, la localisation des protéines à ancre GPI : une paire d'acides aminés basiques favoriseraient un ancrage membranaire (Frieman and Cormack, 2003). Cette règle semble s'appliquer partiellement chez *C. albicans*, puisque 9/12 des protéines à ancre GPI isolées par P. de Groot *et al.* à partir de fractions pariétales hautement purifiées ne portaient pas d'acides aminés dibasiques en amont du site ω (De Groot *et al.*, 2003). Il n'est donc pas possible actuellement de prédire *in silico* avec certitude la localisation des protéines à ancre GPI.

3 La paroi et les interactions hôte-pathogène

3.1 Les défenses de l'hôte.

L'invasion de l'hôte par un microorganisme déclenche les défenses du système immunitaire inné par des molécules conservées à la surface des pathogènes, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern). Ces PAMPs sont identifiées grâce aux récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptors) présents à la surface des cellules de la réponse innée. L'immunité innée est une réponse constitutive dont l'action est immédiate. Bien qu'elle soit indispensable pour mener à bien une première défense et à l'origine de la réponse immune adaptative, elle n'est pas toujours suffisante pour éradiquer le pathogène. L'immunité adaptative est quant à elle spécifique et fait appel à l'éducation de cellules spécialisées du système immunitaire.

3.1.1 Les barrières naturelles

Les cellules constitutives des muqueuses épithéliales du système respiratoire, gastro-intestinal et génito-urinaire sont les premières barrières physiques que va rencontrer *C. albicans* lors d'infections. Si le pathogène réussit à franchir ce premier obstacle, une fois dans le système sanguin, il pourra envahir les organes profonds après avoir adhéré aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et les avoirs pénétrer. La dissémination sous épithéliale est la première étape de l'infection et permet la rencontre avec les macrophages tissulaires.

3.1.2 La réponse immunitaire innée

L'immunité innée est un mécanisme de défense non spécifique. Cette immunité est la réponse initiale de l'hôte pour éliminer le microorganisme et prévenir l'infection. Contrairement à l'immunité adaptative, l'immunité innée ne reconnaît pas des antigènes mais reconnaît des molécules non présentes chez les mammifères : les Pathogen-Associated Molecular Patterns ou PAMPs. La plupart des cellules de défense de l'hôte possèdent des Pathogen-Recognition Receptors ou PRR qui vont reconnaître ces PAMPs et induire une réponse immédiate.

Parmi les cellules de défense de l'hôte, on distingue les cellules non phagocytaires telles que les plaquettes et les cellules NK (Natural Killer) et les cellules phagocytaires. Les phagocytes comprennent les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (DC). Ces cellules effectrices représentent une première ligne de défense de l'hôte. Elles contrôlent la propagation du pathogène par inhibition de sa croissance ou en éliminant. Ces cellules sont disponibles très rapidement et en grand nombre sur le site de l'infection. Quand un phagocyte détecte la présence d'un pathogène, se met en place un

processus d'adhérence qui peut être favorisé par des opsonines. La phagocytose est réalisée après fixation du microbe sur le phagocyte. La cellule engouffre le microbe dans des vésicules qui après fusion forment le phagosome. Ce compartiment devient mature en fusionnant avec des lysosomes créant ainsi un phagolysosome, un organelle à pH acide rempli de composés antimicrobiens. Dans ces phagolysosomes, les pathogènes sont tués par l'action combinée de mécanismes de destructions oxydatifs et non-oxydatifs (Nathan, 2006a; Nathan, 2006b). Les mécanismes oxydatifs impliquent la production d'intermédiaires d'oxygène actif, ROI (Reactive Oxygen Intermediate), et d'oxyde nitrique (NO), toxiques pour les pathogènes dont *C. albicans* (Fang, 2004; Marodi *et al.*, 1991). Les phagocytes sont également doués d'activité lytique intracellulaire et extracellulaire permettant la destruction du pathogène ; ces mécanismes non-oxydatifs peuvent être renforcés par l'action de peptides antifongiques tels que les défensines (Tran *et al.*, 2002).

La réponse immunitaire innée est modulée par des cytokines qui fonctionnent comme des messagers inter-cellulaires. Il existe 3 types de cytokines :

- celles qui régulent la réponse innée,
- celles qui régulent la réponse adaptative
- celles qui stimulent l'hématopoïèse.

La première classe est produite par les mononucléaires, les cellules dendritiques, les lymphocytes T, les cellules NK, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales des muqueuses. Elles sont produites en réponse à une reconnaissance d'un PAMP par un PRR (Netea *et al.*, 2008).

Les PAMPs fongiques

Pour *Candida*, ce sont principalement des composants de la paroi de la levure. Les mannanes O et N-liés ainsi que les β -glucanes représentent les principaux PAMPs reconnus par le système immunitaire (Brown & Gordon, 2001; Gow *et al.*, 2007; Netea *et al.*, 2006).

La présence de composés mannosylés est importante pour la production de cytokines par les cellules de l'immunité innée (Netea *et al.*, 2006). Le phosphopeptidomannane ou mannane est reconnu par les macrophages par différents PRRs dont le complexe TLR4/CD14 (Tada *et al.*, 2002). Cela entraîne la production de cytokines (TNF α , IL-17) (Rizetto *et al.*, 2010).

Certains motifs du mannane, les β -Mans, définissent les sérotypes de *C. albicans* (Suzuki, 2002). Le système immunitaire des mammifères réagit spécifiquement aux β -Mans qui exhibent une conformation spatiale unique (Nitz *et al.*, 2002). Les β -Mans ont été identifiés comme des antigènes potentiels de la réponse immunitaire adaptative et pour induire des anticorps protecteurs (Han *et al.*, 1997; Xin *et al.*, 2008). Leurs rôles dans la virulence a été suggérée car l'administration orale de β -Mans synthétiques inhibe la colonisation par *C. albicans* du tractus intestinal d'un souriceau nouveau-né (Dromer *et al.*, 2002).

Le phospholipomannane ou PLM (Trinel *et al.*, 1993 ; Trinel *et al.*, 1999) un glycolipide présent au sein de la paroi de la levure stimule diverses voies de signalisation de l'hôte. Le PLM est reconnu par les macrophages par la Galectine-3 et le TLR-2 (Fradin *et al.*, 2006 ; Jouault *et al.*, 1994 ; Jouault *et al.*, 2006 ; Kohatsu *et al.*, 2006). Il stimule la production de TNF α (Jouault *et al.*, 1994 ; Jouault *et al.*, 1998) et dérègle la cellule conduisant à l'échappement de la levure à la phagocytose (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003).

Les β -glucanes représentent environ 60% de la paroi de *C. albicans*. Ils sont reconnus par le complexe dectin-1/TLR-2 qui stimule la production de cytokines pro-inflammatoires (Brown *et al.*, 2003; Brown & Gordon, 2005 ; Gantner *et al.*, 2003 ; Netea *et al.*, 2006 ; Obayashi *et al.*, 1995 ; Torosantucci *et al.*, 2000). Expérimentalement, il a été montré que ce composant de la paroi jouerait un rôle important dans la phagocytose par les neutrophiles. En effet des billes enrobées de β -(1,6)-glucane peuvent être phagocytées (Rubin-Bejerano *et al.*, 2007) et inversement, des levures préalablement traitées par une β -glucanase sont moins bien phagocytées.

En plus des mannoprotéines, mannanes, et β -glucanes, d'autres structures peuvent être reconnues comme PAMP fongique. La chitine induit le recrutement des cellules immunitaires qui secrètent les IL4 et IL13 (van der Graaf *et al.*, 2005). Peu de choses sont connues sur la voie de reconnaissance et le rôle de la chitine dans l'infection. Aucun récepteur de chitine n'a encore été décrit.

Les PRRs

Les PRRs sont portés par différents acteurs de l'immunité innée : les monocytes et les neutrophiles, les macrophages tissulaires et les cellules dendritiques. Les monocytes expriment à leur surface plus fortement les Toll-Like Receptor (TLR) et plus modérément les Lectin Receptors (LR) (Netea *et al.*, 2004). Après différenciation en macrophages, ils gardent leur niveau d'expression des TLR mais surexpriment les LR. Les neutrophiles à l'inverse expriment modérément les TLR, alors qu'ils expriment fortement les récepteurs phagocytiques (CR3 et Fc γ R) (Levitz, 2010). Les macrophages portent des récepteurs aux mannosides (MR) (Wileman *et al.*, 1986). La reconnaissance se fait par les MR, les TLR4 et les DC-SIGN, ce qui entraîne la production de cytokines (Tada *et al.*, 2002). Les PAMPs

activent les PRRs qui via des molécules de signalisation présentes dans le cytoplasme initient une réponse pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire.

Les TLR2 et les TLR4 sont impliqués dans l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires responsables de la protection de l'hôte (Villamon *et al.*, 2004 ; Netea *et al.*, 2008). Cependant des données ont montrés que les TLR peuvent aussi permettre à certains microorganismes d'échapper au système immunitaire par induction de cytokines anti-inflammatoires via le TLR-2. Pour les levures, les TLR-2 et TLR-4 jouent un rôle important dans la reconnaissance hôte-pathogène ainsi que dans le développement de l'infection.

Le TLR-4 associé au CD14 reconnaît le mannane de *C. albicans* et *S. cerevisiae* (Tada *et al.*, 2002). Le TLR2 agit en couple avec la dectine-1 pour stimuler les cellules immunitaires en réponse aux β -glucanes pariétaux de *C. albicans* (Brown, 2006), il en est de même avec la Galectine-3 (Jouault *et al.*, 2006).

La réponse des TLRs est variable selon la morphologie de *C. albicans* (Van der Graaf *et al.*, 2005). Cela pourrait être lié au fait que la structure ou la présentation des mannanes changent entre les formes levures et hyphes (Mora-Montes, 2009).

La réponse intégrée complète contre un pathogène spécifique dépend de la mosaïque de PRRs et des complexes de récepteurs qui sont engagés. La co-stimulation via de multiples interactions PAMPs-PRRs peut augmenter à la fois la sensibilité et la spécificité du procédé de reconnaissance immunitaire.

3.2. Modèles de l'interaction

Différents modèles d'interaction ont été développés pour étudier la virulence de *C. albicans*. Ce pathogène opportuniste peut coloniser différents environnement du corps humain c'est pourquoi différents types cellulaires sont utilisés pour étudier une interaction particulière. Il existe des cellules épithéliales des muqueuses humaines telles que les cellules épithéliales buccales (BEC), les cellules œsophagiennes (HET1-A) (Bernhardt *et al.*, 2001) ou les cellules épithéliales vaginale A431 (Hernandez *et al.*, 2009) ou carcinomique du col de la lignée HeLa. Les BEC ont été utilisé pour montré le défaut d'adhérence du mutant *als3/als3* (Zhao *et al.*, 2004). Il existe des modèles d'épithélium plus réalistes, tels que les modèles d'épithélium humain reconstitué (RHE) oral ou vaginal, couramment utilisés pour étudier la formation du biofilm, la filamentation et l'invasion cellulaire, ou encore les lésions cellulaires tel qu'il a été mis en œuvre pour étudier les gènes *ALS* (Zhao *et al.*, 2007), *SAP9* et *SAP10* (Albrecht *et al.*, 2006). Pour ces mêmes études d'autres types cellulaires sont utilisés tels que les cellules endothéliales, les entérocytes (Dalle *et al.*, 2010) ou les cellules Caco-2 (Saegusa *et al.*, 2004).

La virulence peut également être étudié *in vivo* comme cela a été le cas du gène *RBT1* et *RBT5* qui ont été étudiés dans un modèle d'infection localisé de cornée de lapin et de souris (Braun *et al.*, 2000). En complément de ce type de test, la filamentation, l'invasion tissulaire et la dissémination peuvent être étudié dans un modèle murin d'infection systémique.

Tous ces modèles fournissent individuellement des données qui ne sont que très partiellement représentatives des fonctions testées. Si la souris reste par exemple le modèle animal le plus utilisé, il faut noter que *C. albicans* n'est pas un composant normal de la flore des souris : la colonisation des souris par *Candida* est difficile à cause du système immunitaire, de la barrière épithéliale et du microbiote. Cependant il est possible d'établir une

infection du tractus digestif (Mathews & Witek-Janusek, 2002) chez le souriceau nouveau-né en inoculant de fortes concentrations microbiennes. Cette colonisation peut être couplée ensuite à l'administration de deux types de molécules : celles qui altéreront l'épithélium intestinal d'une part et d'autre part celles qui induiront la neutropénie nécessaire au développement de l'infection systémique. Ce traitement n'est pas nécessaire chez les souriceaux nouveau-nés monoxéniques pour *C. albicans*. D'autres modèles de candidoses orales, œsophagiennes et de l'intestin ont été développés chez le rat, le lapin, le porc et le hamster pour évaluer des traitements en chimiothérapie ou pour déterminer les facteurs de pathogénie. L'étude de la réponse immunitaire se fait très majoritairement dans le modèle murin. Les modèles de candidoses vaginales (Fidel, 2002) requièrent que l'animal (rat, souris ou primate) soit dans un état de pseudoœstrus au moment de l'inoculation pour avoir une infection persistante. L'animal est donc hormonalement traité au préalable. Au delà des différences observées au niveau du système immunitaire et des symptômes, ici se pose le problème d'une différence de pH de l'environnement vaginal et dont on ne connaît pas véritablement les effets.

Donc conventionnellement les tests *in vivo* permettant d'étudier la pathogénie relative entre les souches mutantes et sauvages sont réalisés chez des espèces mammifères (Navarro-Garcia *et al.*, 2001). Ces tests ont permis de comprendre les mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse de l'hôte face aux pathogènes fongiques, cependant ils sont coûteux, long, et nécessite également un suivi régulier et minutieux des animaux infectés. C'est pourquoi, pour étudier la réponse immunitaire, des modèles insectes ont également été développés car ils demandent moins de moyens et sont éthiquement plus tolérables. La drosophile est par exemple intéressante car elle possède des cellules phagocytaires circulantes et donc est plus fidèle au modèle mammifère. Chez sa larve, les plasmatocytes représentent 95% des hémocytes et sont des phagocytes actifs. A ce système immunitaire cellulaire,

s'ajoute une réponse humorale telle que la sécrétion de peptides antimicrobiens dans l'hémolymphe. La larve de *Galleria mellonella* est également un modèle admis pour étudier la réponse de l'hôte (Bergin *et al.*, 2006; Mowlds *et al.*, 2010), de même que *Caenorhabditis elegans* (Breger *et al.*, 2007). Il semble préférable de combiner différents modèles pour gommer les biais que chacun présente et avoir une vision plus juste de ce qui se passe dans la réalité (Lohse & Johnson, 2008).

3.3 Analyse des facteurs de virulence

Les facteurs de virulence sont tous les éléments du pathogène qui participent à sa capacité à infecter et à provoquer une maladie dans une espèce donnée. Ces facteurs sont très divers : l'existence d'un ou plusieurs facteurs de virulence dans un germe conditionne son pouvoir pathogène (dose nécessaire pour provoquer une infection, capacité à provoquer une maladie chez un adulte sain ou en présence de conditions favorisantes...).

La définition d'un facteur de virulence chez le pathogène opportuniste *C. albicans* n'est pas simple puisqu'on ne sait toujours pas si c'est sa faculté d'adaptation qui crée l'infection (Casadevall & Pirofski, 2001). Les facteurs de virulence chez *C. albicans* sont complexes, et comme démontré par les profils transcriptomiques, différents facteurs de virulence peuvent agir dans un même organisme mais spécifiquement d'une partie anatomique (Andes *et al.*, 2005; Fradin & Hube, 2003; Fradin *et al.*, 2003; Fradin *et al.*, 2005; Garaizar *et al.*, 2006). Des protéines ont été identifiées comme jouant un rôle important dans la virulence : les SAP (secreted aspartyl proteinases), les LIPS (secreted lipases), les PLBs (phospholipase B) et les adhésines comme les Als ou Hwp1 (Brown *et al.*, 2007). Les protéines de *C. albicans* impliquées dans l'infection de l'hôte sont décrites dans la revue de Tongchusak *et al.* (Tongchusak *et al.*, 2008). Fu *et al.* ont souligné l'importance de tester les facteurs de virulence dans différents modèles car leur rôle semble lié à une niche écologique

particulière (Fu *et al.*, 1998). Comme nous l'avons vu dans le paragraphe « les barrières naturelles », l'interaction avec l'épithélium est un facteur de virulence important et initiateur de l'infection. La première étape est l'adhérence aux cellules de l'hôte. Plusieurs molécules d'adhérence ont été rapportées dans la littérature. Bien que les mannanes et la chitine jouent un rôle dans l'adhérence, les mannoprotéines semblent très importantes (Als, Hwp1, Eap1). Les filaments vont ensuite pénétrer de façon intra ou inter cellulaire, par un mécanisme direct par exemple en protéolysant les E-cadhérines des jonctions intercellulaires (à l'aide des Saps) ou les cellules elles-mêmes (Frank *et al.*, 2007). Elles peuvent aussi entrer de manière indirecte dans les cellules suite à l'induction de l'endocytose. Le mécanisme de reconnaissance éliciteurs-récepteurs est encore mal connu.

4. Les grandes familles de protéines à ancre GPI et les interactions hôte/pathogène.

S'appuyant sur les caractéristiques des protéines à ancre GPI (GPIp) décrites plus haut, plusieurs laboratoires ont développé des algorithmes pour prédire ces protéines. Une étude menée par notre équipe a sélectionné 115 protéines à ancre GPI comme étant les plus probables (Plaine *et al.*, 2008; Richard & Plaine, 2007). Ces protéines ont été extraites de trois listes parues dans la littérature (De Groot *et al.*, 2003; Eisenhaber *et al.*, 2004; Garcera *et al.*, 2003). Il y en a 70 communes à toutes les analyses, 6 communes à l'étude de de Groot et Eisenhaber, les autres proviennent d'une seule étude seulement. Depuis d'autres algorithmes ont été développés comme PredGPI (Pierleoni *et al.*, 2008).

La conclusion commune de toutes ces études est que les protéines à ancre GPI sont sur-représentées dans le génome de *C. albicans* par rapport *S. cerevisiae*. Ce sont donc des candidats de choix pour représenter des facteurs de virulence. Comme on le verra plus bas,

plusieurs protéines à ancre GPI semblent effectivement jouer un rôle dans les interactions hôte-pathogène (**Tableau 1**), mais la fonction de la plupart d'entre elles reste inconnue.

Fonction putative	Protéine	Paroi/Fonction	Virulence en modèle murin ou tissulaire <i>in vitro</i>	Morphogénèse	Expression	Références
Adhésine	Als1	Adhérence réduite	Atténuée en modèle murin et RHE	Délais de filamentation Biofilm diminué	Induit par biofilm,	Zhao <i>et al.</i> , 2004 Kamai <i>et al.</i> , 2002
Adhésine	Als2			Homozygote non viable	Induit par faible concentration en fer	Zhao <i>et al.</i> , 2005
Adhésine	Als3	Adhérence réduite	Atténuée en modèle murin et RHE	Biofilm diminué	Induit dans l'hyphe	Zhao <i>et al.</i> , 2004
Adhésine	Als4	Adhérence réduite		Délais de filamentation		Zhao <i>et al.</i> , 2007
Adhésine	Als5	Adhérence augmentée				Zhao <i>et al.</i> , 2007
Adhésine	Als6	Adhérence augmentée			Induit par macrophages	Zhao <i>et al.</i> , 2007
Adhésine	Als7	Adhérence augmentée				Zhao <i>et al.</i> , 2007
Adhésine	Als9	Adhérence diminuée				Zhao <i>et al.</i> , 2007
?	Hyr1		Résistance aux macrophages		Induit par l'hyphe, macrophages Réprimé par neutrophils	Bailey <i>et al.</i> , 1996 Luo <i>et al.</i> , 2010
?	Iff4	Adhérence des tubes germinatifs diminuée	Atténuée en modèle murin			Kempf <i>et al.</i> , 2007 Kempf <i>et al.</i> , 2009 Fu <i>et al.</i> , 2008
?	Iff11		Atténuée en modèle murin			Bates <i>et al.</i> , 2007
?	Rbt1		Atténuée dans cornée de lapin et en modèle murin.		Induit par le mating, pH alcalin	Braun <i>et al.</i> , 2000
Liaison de l'hème	Rbt5				Induit par serum, milieu Spider, fer	Braun <i>et al.</i> , 2000
Protéinase	Sap9	Sensibilité au CFW, Congo red	Diminution sur RHE	Bourgeonnement anormal Séparation	Induit en phase	Albrecht <i>et al.</i> , 2006

		Chitine augmentée Adhérence aux BECs augmentée		cellulaire affectée	stationnaire, antifongiques	
Protéinase	Sap10		Diminution sur RHE	Bourgeonnement anormal Séparation cellulaire affectée	Induit par une faible concentration en fer	Albrecht <i>et al.</i> , 2006

Tableau 1 : Quelques protéines à ancre GPI : fonction étudiée dans un mutant homozygote et expression.

La disponibilité de la séquence génomique de *C. albicans* a permis de rechercher systématiquement non seulement l'ensemble des protéines à ancre GPI putatives, mais aussi d'examiner leurs relations de paralogie au sein du génome. On a ainsi pu identifier des familles de protéines, dans lesquelles sont réparties près de la moitié de ces GPIp putatives. Le nombre de protéines dans ces familles varie entre 2 et 12 (Richard & Plaine, 2007). Nous examinerons successivement la famille Als (8 protéines) puis deux gènes *RBT* et enfin 2 protéines Sap. Ce sont les protéines à ancre GPI des familles les mieux décrites jusqu'à présent. Nous terminerons par la famille *IFF* (IPF family file F), composée des homologues du gène *HYR1*, nommés *IFF1* à *IFF11*. Avec ses 12 membres, c'est la plus grande famille des protéines à ancre GPI chez *C. albicans* et c'est aussi l'une des plus mal connues.

4. 1 La famille ALS

La famille des Agglutinin Like Sequences (ALS) est composée de 8 gènes codant 8 glycoprotéines de surface de grande taille : Als1 à Als7 et Als9 (Hoyer, 2001; Hoyer *et al.*, 2001).

Elles ont 3 domaines conservés :

-
- un domaine N terminal semblable aux domaines des immunoglobulines ou aux lectines et qui porterait la fonction d'adhérence.
 - un domaine central constitué de répétitions en tandem d'une séquence conservée de 36 acides aminés riche en thréonines. Ces répétitions varient en nombre chez différents isolats de *C. albicans*, et les deux allèles d'une même souche peuvent présenter des nombres de répétitions différents (Hoyer *et al.*, 2008). Elles sont parfois associées à des différences fonctionnelles : les Als3 à 12 répétitions contribuent plus à l'adhésion sur cellules épithéliales ou endothéliales que les Als3 à 9 répétitions (Oh *et al.*, 2005).
 - une longue région glycosylée C terminal riche en sérine et thréonine. La structure de la région thréonine est inconnue, cependant elle intervient dans la formation d'agrégats (Otoo *et al.*, 2008; Rauceo *et al.*, 2006).

Généralement la présence d'autant de protéines pour une même famille est synonyme d'une fonction importante que l'organisme doit préserver dans son génome, cette fonction peut être redondante mais codée par des gènes différents et régulés par des conditions différentes. Parfois les fonctions portées par les membres d'une même famille peuvent aussi être différentes comme nous allons le voir.

La fonction des protéines Als semble être reliée à la virulence de *C. albicans* (Hoyer *et al.*, 2008) :

- **Adhérence :**

Les adhésines permettent la liaison aux cellules hôtes, aux substrats environnementaux, aux autres champignons et bactéries (Coronado *et al.*, 2007; Dranginis *et al.*, 2007; Klotz *et al.*, 2007; Kumamoto & Vincles, 2005; Nobile *et al.*, 2008). Les Als possèdent des traits de

prédiction des protéines localisées en surface. Jusqu'à présent deux approches ont été utilisées pour étudier les Als (Hoyer *et al.*, 2008) : la disruption des *ALS* dans *C. albicans* ou la surexpression hétérologue chez *S. cerevisiae*.

L'expression hétérologue a plusieurs avantages : plus simple techniquement à réaliser elle permet d'étudier l'adhérence dans un organisme qui n'adhère quasi pas. Par contre les résultats obtenus ne reflètent pas précisément l'effet de la protéine de *C. albicans* à cause des différences d'utilisation des codons (Santos & Tuite, 1995) et de glycosylation (Herrero *et al.*, 2002). Par ailleurs l'abondance de la protéine et sa distribution en surface ne reflète pas forcément ce qui se passe chez *C. albicans*. De plus, on ne peut observer que l'action d'une protéine unique, et non les fonctions dépendant de l'association de plusieurs Als. Par ailleurs, *S. cerevisiae* ne peut pas révéler une fonction spécifique à *C. albicans*. Enfin, les études dans *S. cerevisiae* portent généralement sur un seul allèle *ALS*, et sans préciser lequel. Tout cela peut amener à erreurs ou artificiellement minimiser le rôle de la protéine étudiée.

La deuxième approche la plus courante consiste à inactiver le gène dans *C. albicans* et à comparer le phénotype du mutant avec celui de la souche complémentée au locus par le gène sauvage. Les constructions génétiques sont souvent laborieuses, même si des méthodes récentes ont facilité cette approche. L'inconvénient, une fois les mutant obtenus, est qu'il faut connaître les conditions d'expression de ces gènes pour choisir le milieu adéquat pour la comparaison. *C. albicans* peut aussi montrer une réponse compensatoire suite à la délétion d'un gène ce qui masque le phénotype dû à la perte du gène interrompu (Selmecki *et al.*, 2005; Wellington & Rustchenko, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

La délétion d'*ALS1* et la surexpression hétérologue confirment la fonction d'adhérence sur les cellules endothéliales vasculaires. Cependant la délétion d'*ALS1* n'affecte pas l'adhérence sur cellule buccale et épithéliales du pharynx FaDu ou sur modèle reconstitué

d'épithélium buccal humain (Zhao *et al.*, 2004) alors que *S. cerevisiae* exprimant *ALS1* adhère aux cellules épithéliales FaDu (Fu *et al.*, 1998; Sheppard *et al.*, 2004).

Comme *ALS2* était difficile à inactiver, il a été placé sous le contrôle du promoteur *MAL2* (Zhao *et al.*, 2005). En condition de non induction la souche montre une diminution de l'adhérence aux cellules endothéliales, mais pas de différences sur cellules épithéliales buccales, sur fibronectine ou laminine.

La délétion d'*ALS4* entraîne une diminution de l'adhérence sur cellules endothéliales mais pas épithéliales (Zhao *et al.*, 2005).

ALS2 et *ALS4* n'ont pas été testés dans *S. cerevisiae*. En raison de leur forte similarité, *ALS2* et *ALS4* ne peuvent pas être discriminés par des études de puces basées sur les produits de PCR. Donc la PCR quantitative plus discriminante a permis de montrer que *ALS2* est environ 3 fois plus exprimée dans *als4*^{-/-} et qu'*ALS4* est surexprimé de la même manière dans la souche n'exprimant plus *ALS2*. L'analyse des profils transcriptomiques des souches *als2*^{-/} *PMAL2::ALS2* montre une dérégulation de l'orf19.4765 qui code une protéine à ancre GPIp de la paroi de fonction inconnue (Zhao *et al.*, 2005) et que l'on ne retrouve pas dans *als4*^{-/-}. Ces résultats suggèrent qu'il y a une réponse des protéines de la paroi à la surexpression ou à l'inactivation d'*ALS2* et qu'il existe des fonctions compensatrices dans la famille Als.

Le mutant *als3*^{-/-} a montré un fort phénotype. Il adhère en effet beaucoup moins sur cellules endothéliales, cellules buccales, et sur monocouches de cellules FaDu (Oh *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004). Il n'y a pas de changement dans l'adhérence à la fibronectine ou à la laminine. La souche de *S. cerevisiae* surexprimant *ALS3* adhère aux cellules endothéliales et épithéliales, à la fibronectine, laminine, gélatine (Sheppard *et al.*, 2004). Als3 serait une invasine fongique qui mime les cadhérines des cellules hôtes et induit l'endocytose par liaison

aux N-cadhérines des cellules endothéliales et aux E-cadhérines des cellules épithéliales orales (Phan *et al.*, 2007).

L'expression hétérologue de *ALS5* à un fort niveau permet à *S. cerevisiae* d'adhérer et de former des agrégats de façon similaire à ce que peut faire la souche sauvage de *C. albicans* (Gaur *et al.*, 1999). A bas niveau d'expression, l'agrégation n'a pas été observée (Gaur *et al.*, 1999). La souche de *S. cerevisiae* exprimant *ALS5* adhère aux cellules endothéliales, buccales, FaDu, fibronectine, laminine, gélatine et collagène type IV (Zhang *et al.*, 2003). L'adhérence d'Als5 se fait via une reconnaissance du motif Ser, Thr, Ala à la surface de l'hôte (Gaur *et al.*, 2002; Gaur & Klotz, 2004; Klotz *et al.*, 2004a; Klotz *et al.*, 2004b). *ALS5* est exprimé chez *C. albicans* dans les conditions de laboratoire utilisées et dans les modèles d'infection (Green *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2006). Cela suggère que les changements globaux observés dans *S. cerevisiae* pourraient ne pas être vrais pour *C. albicans*.

La surexpression d'*ALS6* dans *S. cerevisiae* permet l'adhérence sur gélatine tandis que la surexpression d'*ALS7* ne le permet pas (Sheppard *et al.*, 2004).

Les mutants homozygotes *als5*^{-/-}, *als6*^{-/-} et *als7*^{-/-} chez *C. albicans* présentent une adhérence aux cellules endothéliales et épithéliales augmentée de 2 à 3 fois par rapport au contrôle. Ces résultats sont contraires à ceux attendus pour la délétion d'une adhésine et indiquent que certaines protéines Als auraient un effet anti-adhésif. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre la base de ce phénotype (Zhao *et al.*, 2007).

Chez *S. cerevisiae*, la surexpression d'*ALS9* permet l'adhérence à la laminine seulement (Sheppard *et al.*, 2004). Le mutant *als9*^{-/-} possède une adhérence plus faible que le sauvage sur cellules endothéliales et épithéliales, sans différence sur la laminine. L'adhérence a été attribuée à l'allèle *ALS9-2* qui est plus commun qu'*ALS9-1* dans les isolats cliniques.

En résumé, Als1 et Als3 sont impliquées dans l'adhérence (Fu *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004). Als2 et Als4 sont impliqués dans la formation des tubes germinatifs et l'adhérence sur cellules endothéliales vasculaires mais pas sur cellules épithéliales buccales. Par ailleurs, l'expression hétérologue de *ALS1*, *ALS3*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS7* et *ALS9* induit un phénotype d'adhérence de *S. cerevisiae* (Klotz *et al.*, 2004a; Sheppard *et al.*, 2004). *ALS2* et *ALS4* n'ont pas encore été étudiés par cette approche. En conclusion la majorité des études sur l'adhérence ont été effectuées sur *S. cerevisiae*. Le rôle des Als dans l'adhérence de *C. albicans* reste donc mal connu.

- **Formation de biofilm :**

Les propriétés adhésives étant importantes pour la formation du biofilm ces protéines pourraient être impliquées dans la mise en place du biofilm. Cela a été vérifié par les résultats d'analyses transcriptomiques comparant les cellules en biofilm aux cellules planctoniques (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004). *ALS1* était le gène le plus exprimé en biofilm ce qui suggère son importance lors de la formation du biofilm. Les ALS s'expriment différemment selon les stades de culture.

Tous les mutants *als-/-* sont capables d'initier la formation d'un biofilm. Les Als ont une fonction redondante et complémentaire de celle de Hwp1 (Hyphal cell-Wall Protein) puisque le couple Hwp1 - Als1 ou Hwp1 - Als3 est nécessaire à la formation d'un biofilm complet (Nobile *et al.*, 2008). Nobile *et al.* ont trouvé qu'Als1 jouait un rôle significatif bien que modeste par rapport à Als3 dans la formation du biofilm. Dans un modèle *in vitro* de développement sur cathéter, le mutant *als3-/-* n'est pas capable de former un biofilm mature (Nobile & Mitchell, 2006; Nobile *et al.*, 2006) alors qu'*als3-/-* peut encore adhérer au silicone, et qu'il montre un phénotype levure. *ALS3* n'étant pas exprimé dans la forme levure (Hoyer *et al.*, 1998), il ne serait pas impliqué dans les premières étapes du biofilm mais plus

tard pendant le développement de l'hyphe. L'étude systématique de formation du biofilm par les mutants *als-/-* a montré que le mutant *als2-/-* formait un biofilm plus fin que la souche sauvage (Zhao *et al.*, 2005).

- **Utilisation du fer** : Als3 semble essentiel pour l'utilisation de la ferritine et serait le récepteur de la paroi cellulaire de l'hyphe, cette protéine étant spécifique de l'hyphe (Hoyer *et al.*, 1998). Il joue donc un rôle crucial dans l'utilisation de la ferritine comme source de fer.

Les gènes *ALS1* et *ALS5* n'ont pas ces fonctions (Almeida *et al.*, 2008).

- **Pathogénie** : *ALS3* semble important lors d'infections orales *in vivo* et d'infections systémiques (Thewes *et al.*, 2007; Zakikhany *et al.*, 2008). Ceci serait relié à sa fonction de récepteur à la ferritine (Almeida *et al.*, 2008). La délétion d'*ALS1* accroît le temps de survie de la souris dans un modèle d'infection disséminée et retarde l'apparition des symptômes dans un modèle d'infection orale (Fu *et al.*, 2002; Kawai *et al.*, 2002). Les données sur les autres Als sont plus rares, et ont surtout été obtenues en modèles d'épithélium reconstitué: la délétion d'*ALS4* atténue la destruction de l'épithélium, alors que celle d'*ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS7* ou *ALS9* ne montre pas d'effet (Hoyer, 2001; Hoyer *et al.*, 2008).

4. 2 La famille SAP (secreted aspartic proteases).

Parmi les facteurs qui contribuent à la virulence il existe les enzymes hydrolytiques produits par les bactéries, protozoaires ou levures pathogènes. Les protéinases sont les enzymes hydrolytiques contribuant le plus communément à la virulence chez beaucoup de microorganismes.

Les Saps appartiennent à la classe des aspartyl protéinases. Cette famille est constituée de 10 isoenzymes codées par les gènes SAP1 à SAP10 (Monod et al., 1994; Monod & Borgvon, 2002; Stehr et al., 2000). Ces gènes codent des préenzymes qui sont clivées par Kex2 dans l'appareil de Golgi avant d'être N-glycosylées. Suite au clivage catalytique, les précurseurs deviennent des enzymes matures fonctionnelles (Hube & Naglik, 2002). Les Saps ont deux résidus d'acide aspartique conservés qui forment le site catalytique de leur fonction biologique. De plus, plusieurs Saps possèdent des résidus cystéine impliqués dans la formation de pont disulfure (Naglik et al., 2004).

Les protéinases extracellulaires permettent en premier lieu l'apport de nutriments à la cellule. Cependant les champignons pathogènes semblent avoir élargi leurs propriétés biochimiques aux fonctions de pathogénie. Par exemple, elles sont utilisées pour digérer et modifier les membranes de l'hôte pour faciliter l'invasion et l'adhérence ce qui a été démontré chez les plantes et les insectes, elles peuvent aussi endommager les cellules du système immunitaire pour éviter ou résister aux attaques antimicrobiennes de l'hôte (Salyers & Witt., 1994).

Les Saps confèrent à *C. albicans* un système protéolytique flexible et efficace qui pourrait être indispensable à la survie de ce pathogène opportuniste et pourrait partiellement expliquer pourquoi *C. albicans* est un pathogène si commun de l'homme (Naglik et al., 2004). La plupart des *Candida* sp pathogènes comme *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*, possèdent des Sap. Les espèces non pathogènes ou les moins pathogènes de *Candida* ne semblent pas produire une quantité significative de protéinases. La complexité de l'implication des Sap dans la virulence de *C. albicans* a été soulignée par le fait que les Sap interviendraient aussi dans la formation de l'hyphe, l'adhérence et la transition phénotypique.

Toutes les Saps ne sont pas secrétées à l'extérieur de la cellule. C'est le cas pour Sap9 et Sap10 qui sont localisées majoritairement dans la membrane via une ancre GPI même si on peut aussi les retrouver dans la paroi (Naglik et al., 2004).

A l'heure actuelle nous savons qu'elles sont impliquées dans :

La virulence : En modèle de candidose oral *in vitro* presque tous les gènes *SAP* sont exprimés. Les protéines Saps seraient impliquées dans la virulence dans un modèle de candidose vaginale (Schaller et al., 2005), et cutanée. Il a été montré que Sap4, Sap5, et Sap6 sont nécessaires aux candidoses profondes (Naglik et al., 2004). Des études utilisant des mutants knock-out ont montré que Sap1 à 3 étaient impliquées dans les infections des muqueuses mais pas dans les infections systémiques, et Sap 4 à 6 dans les infections systémiques mais pas dans les infections des muqueuses. Sap1 et Sap2 ont été montrées comme cofacteurs de virulence. Le double mutant *sap1, sap2* endommage moins les tissus et stimule moins bien l'expression des cytokines.

Adaptation à l'environnement : L'expression et la sécrétion des Saps dépendent du pH et sont spécifiques des tissus. Sap1, Sap2 et Sap3 sont produites entre pH2 et pH5 lors d'une infection superficielle tandis que Sap4, Sap5 et Sap6 sont secrétées entre pH3 et pH7 pendant une candidose invasive (Kretschmar et al., 1999; Schaller et al., 1999).

Utilisation de la ferritine : Contrairement à *S. cerevisiae*, *C. albicans* peut utiliser la ferritine comme seule source de fer même à pH physiologique. Mais quels sont les mécanismes ? Une première possibilité est que la ferritine soit dégradée par l'activité protéolytique extracellulaire notamment la famille des protéases aspartiques (Sap) à large spécificité de substrat (Naglik et al., 2004). Cependant il est apparu que la dégradation extracellulaire par les protéases fongiques n'était pas nécessaire à l'utilisation de la ferritine puisque les mutants *sap1-3* ou *sap4-6* sont toujours capables de croître. Donc une deuxième possibilité serait que *C. albicans* pourrait acidifier le milieu en sa faveur. Ce phénomène a été

décrit chez *S. aureus* : en carence en fer, ce pathogène opportuniste diminue le pH amenant la séparation du fer des ferritines (Friedman et al., 2006). Une autre hypothèse serait que *C. albicans* pourrait produire et sécréter des réducteurs capables de séquestrer le fer de la ferritine. Une dernière hypothèse émise par Almeida *et al.* serait que les réductases à la surface de *C. albicans* pourraient réduire le fer des ferritines et ce processus pourrait être facilité en milieu acide (Almeida *et al.*, 2009).

Sap et résistance aux antifongiques : Une étude de Costa *et al.* a montré que l'activité protéolytique de digestion de la serum albumine bovine était plus forte chez les isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux antifongiques et que cette activité semblait dépendre de la concentration en antifongiques. Les auteurs proposent que les mécanismes d'efflux de drogues puissent réguler le transport des Sap via des vésicules membranaires. Cependant, chez les isolats sensibles aux azolés, la corrélation inverse n'a pas été observée : l'activité protéasique augmente ou diminue en présence d'azolés selon la souche. Il y a donc d'autres facteurs qui interviennent dans la régulation. On notera que cette approche mesure une activité globale et que, si la présence des gènes *SAP1* à *SAP7* a bien été vérifiée dans tous les isolats, leurs niveaux individuels d'expression n'a pas été déterminé (Costa et al., 2010).

Pour résumer, faire un réseau complet de l'implication de chaque Sap dans une étape de pathogénie est difficile. En effet il n'y a pas d'études directement comparables puisque chaque auteur a utilisé un modèle, une technique ou un site d'infection différent. Il est probable que *C. albicans* s'adapte à différentes niches en utilisant des jeux différents de Sap (Naglik et al., 2004). Il n'est pas exclu que la délétion d'un gène *SAP* puisse être compensée par l'expression d'un autre gène *SAP*.

4.3. Les gènes *RBT*

Il existe 6 gènes *RBT* (Repressed by Tup1) : *RBT1*, *RBT2* (*FRE10*), *RBT 4*, *RBT5*, *RBT 7* et *RBT8*. Ils ont été caractérisés sur la base d'une recherche d'ARNm différentiellement exprimés dans une souche sauvage et dans un mutant *tup1*^{-/-} isogénique cultivés en milieu YPD. Dans ces conditions, le sauvage forme uniquement des blastospores et le mutant exclusivement des hyphes (Braun et al., 2000). La délétion des gènes *RBT* n'a induit aucun phénotype sur différents milieux de laboratoire. En particulier et bien qu'ils soient tous régulés par Tup1, aucun ne semble indispensable à la transition blastospore-hyphe. Tous ces gènes sont prédits pour coder des protéines secrétées, exceptées les protéines Rbt1 et Rbt5 qui présentent un ancrage GPI pariétal, comme Hwp1 et Wap1 deux autres protéines également réprimées par Tup1.

- ***RBT1*** : Ce gène possède 43% d'homologie avec *HWPI* et possède un signal d'ancrage GPI. Il possède deux allèles de tailles différentes. *HWPI* code une protéine pariétale spécifique de l'hyphe. Elle a un rôle dans l'adhérence aux tissus de l'hôte par liaison covalente (Staab et al., 1999). *RBT1* et *HWPI* ne sont pas exprimés dans la forme levure. Ils sont rapidement induits en milieu sérum, qui est connu pour induire la filamentation. *HWPI* est plus fortement exprimé mais *RBT1* est induit aussi rapidement, indiquant une réponse transcriptionnelle rapide à l'ajout de serum. Ces deux gènes sont déréprimés lorsque le répresseur transcriptionnel de la croissance hyphale Tup1 est inactivé (Braun et al., 2000). Le mutant *rbt1* montre une diminution de l'invasion de la cornée chez le lapin corrélée à un faible taux de multiplication. Ce comportement non invasif est très intéressant puisque ce mutant pousse normalement sur milieu de culture en laboratoire. L'infection systématique des souris donne le même résultat : ce mutant possède une aptitude très réduite à disséminer et envahir l'hôte. Le mutant

hétérozygote *rbt1/+* (pour chaque allèle) est moins virulent que le sauvage mais plus que le mutant homozygote, indiquant qu'il y a un effet du nombre de copies sur la pathogénie (Braun et al., 2000).

- ***RBT5*** : La protéine Rbt5 possède un signal d'ancrage GPI ainsi qu'une région de 115 acides aminés semblable à une région répétée 4 fois dans la séquence de Wap1 qui code un antigène de surface des hyphes et des bourgeons. On la retrouve également dans Pra1 qui est un antigène riche en proline situé à la surface du champignon pathogène *Coccidioides immitis* (Dugger et al., 1996). La délétion de *RBT5* ne semble pas affecter la virulence dans un modèle d'infection disséminée chez la souris (Braun & Johnson, 2000).

4.4 La famille *IFF*

Ces protéines ont un domaine conservé qui ne montre aucune homologie avec des protéines de fonction connue. La plupart des membres de cette famille portent les motifs de prédiction d'un ancrage GPI (Richard & Plaine, 2007). Dans cette revue, il apparaissait qu'Iff10 et Iff11 n'avaient pas de signal de liaison à une ancre GPI. De plus, Iff7 semble être localisée à la paroi (Bates *et al.*, 2007). Nous verrons dans la partie résultat qu'il en est autrement. Ces protéines ont un domaine conservé qui ne montre aucune homologie avec des protéines de fonction connue. La fonction de cette famille de gène est largement inconnue et seuls trois gènes ont fait jusqu'à présent l'objet de publications.

4.4.1 Le premier gène étudié : *HYRI*

Le gène *HYRI* fut le premier gène de la famille *IFF* à être étudié (Bailey *et al.*, 1996). Bailey *et al.* ont trouvé par des analyses de Northern blot que l'ARNm de *HYRI* était induit spécifiquement en réponse au développement de l'hyphe, lorsque la morphogénèse était stimulée indépendamment des conditions du milieu (soit par l'addition de sérum et une

élévation de température, soit en augmentant à la fois le pH et la température, soit en ajoutant de la N-acétylglucosamine). C'est aussi le cas des gènes *ECE1* qui code une protéine intracellulaire non essentielle (Birse *et al.*, 1993) et *HWPI* qui code une protéine de surface spécifique de l'hyphe (Staab *et al.*, 1996). D'autres gènes sont induits durant le développement de l'hyphe mais seulement sous certaines conditions. C'est le cas des gènes *PHR1* (gène régulé par la réponse au pH) (Saporito-Irwin *et al.*, 1995), *SAP2*, *SAP4*, *SAP5* et *SAP6* (gènes induits par le sérum, codant une aspartyl protéinase) (Hube *et al.*, 1994) et enfin *ALSI* (induit en milieu RPMI) (Hoyer *et al.*, 1995). De nombreux autres gènes sont également induits dans ces conditions. Ils codent des fonctions variées telle que la glycolyse (*ADH*), la synthèse et le repliement protéique (*TEF3*, *RPI10*) (Swoboda *et al.*, 1994a; Swoboda *et al.*, 1994b), la biosynthèse de la paroi ou la formation du cytosquelette (*ACT1*) (Delbruck & Ernst, 1993; Swoboda *et al.*, 1994a). En fait, si on a montré que quelques protéines de surface étaient exprimées différemment selon les conditions du milieu et selon la morphologie de la levure, ces études ont aussi montré qu'une petite fraction seulement de ces protéines étaient forme-spécifiques (Finney *et al.*, 1985).

Le mutant knock-out de *HYR1* a été réalisé par URA-Blaster et n'a pas de phénotype particulier (Bailey *et al.*, 1996). Il pousse normalement sur milieu à la caféine ou au calcofluor, la croissance des levures et des hyphes est normale et la cinétique des tubes germinatifs n'est pas non plus affectée. N'ayant observé aucun phénotype du mutant, ils ont changé de stratégie. L'expression forcée de *HYR1* dans la forme levure par une fusion *ADHI-HYR1* dans CAI4 n'a affecté ni la croissance, ni la morphologie de *C. albicans*. L'expression aberrante de *HYR1* ne stimule pas la formation de l'hyphe, ni la croissance pseudo hyphale chez *S. cerevisiae*. Chez *C. albicans*, *HYR1* a été récemment impliqué dans la résistance aux défenses de l'hôte. Il accroît l'action candidacide des macrophages *in vitro* et réduit la charge rénale des souris infectées (Luo *et al.*, 2010). En accord avec ces observations, ces derniers

auteurs ont montré qu'un anticorps polyclonal anti-Hyr1 accroît l'activité candidacide des neutrophiles *in vitro* et que la vaccination de souris avec Hyr1 les protégeait efficacement contre une candidose dans un modèle d'infection disséminée.

4 4.2 Etude par surexpression ou inactivation d'un gène *IFF*

Afin d'identifier de nouveaux gènes de virulence, Fu et collaborateurs ont construit des souches de surexpression/inactivation des gènes *HYR1*, *IFF2*, *IFF3* et *IFF4*. Un des allèles de ces gènes a été placé sous le contrôle d'un promoteur induit en absence de doxycycline dans le milieu, l'autre allèle ayant été invalidé (Fu *et al.*, 2002).

Une expérience combinant la cytométrie en flux et l'immunofluorescence a montré que dans ces mutants en condition de surexpression (sans doxycycline) ou de répression (avec doxycycline), l'accumulation de la protéine Als1 à la surface restait constante. Il n'y a donc pas de régulation croisée entre la protéine Als1 et les gènes *IFF* étudiés.

L'adhésion sur tube de plastique a également été testée en condition de surexpression et de répression. Seule la souche surexprimant *IFF4* a montré une plus grande adhérence sur plastique. La suite des expériences a donc été ciblée sur ce gène, et pour cela l'allèle sauvage *IFF4* a lui aussi été placé sous le contrôle du promoteur tetR. Pour éviter les artéfacts dus à une mauvaise expression du gène *URA3*, ce gène a été remplacé à son locus originel. La surexpression du gène *IFF4* entraîne une meilleure adhérence sur cellules épithéliales orale FaDu, alors que l'inactivation du gène *IFF4* entraîne une chute d'adhérence comparée à la souche témoin. Par contre, la surexpression ou l'inactivation du gène *IFF4* ne semblent affecter ni l'adhérence ni la destruction quand les souches sont testées sur cellules endothéliales. Le phénotype d'adhésion suite à la surexpression du gène *IFF4* semble avoir une incidence sur l'invasion d'un modèle *in vivo* de candidose vaginale chez la souris. La souche surexprimant *IFF4* est plus sensible aux neutrophiles et est moins virulente dans un

modèle *in vivo* de souris immunocompétente. Par ailleurs, les reins de la souris infectée sont significativement moins envahis par la levure. Cet effet n'est pas observé chez les souris neutropéniques. Au vu de ces expériences, il semblerait donc que le gène *IFF4* ne doive pas être exprimée pendant la phase de dissémination hématogène de *C. albicans* pour que l'invasion des tissus soit efficace.

M. Kempf (Kempf *et al.*, 2007) a elle aussi étudié la fonction de la protéine Iff4 en construisant un mutant Knock out. Ce mutant a été construit par la méthode d'intégration par double recombinaison homologue avec des produits de PCR. Ce mutant a montré une petite diminution de l'adhérence sur polystyrène, ainsi qu'une diminution de la mobilité électrophorétique de ses tubes germinatifs. Cette différence a été attribuée à une organisation structurale différente des mannoprotéines pariétales du mutant *iff4*^{-/-} et du sauvage. Néanmoins le processus d'adhérence est complexe et implique de nombreux phénomènes biologiques et biophysiques. C'est pourquoi l'étude a été poursuivie en montrant que le mutant adhérait également moins bien sur cathéter de silicone. Par ailleurs, ce mutant est moins virulent dans un modèle murin de candidose disséminée par rapport à la souche parentale BWP17. Étonnamment, si la virulence était fortement diminuée, l'aptitude à envahir les tissus restait inchangée et la charge rénale en levures était la même pour les deux souches.

Les études de Kempf *et al.* et Fu *et al.* ont montré de façon contradictoire que l'inactivation ou la surexpression de *IFF4* affectaient toutes deux l'infection disséminée dans un modèle souris. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la souche surexprimant *IFF4* est plus sensible aux neutrophiles et envahit moins facilement les tissus lors d'une infection disséminée, tandis que les souches invalidées pour *IFF4* sont affectées à une étape précoce de colonisation des tissus mais restent capables de les envahir quand elles sont installées. On notera aussi que les résultats obtenus sur les souches délétées pour *IFF4* ne sont pas strictement comparables dans les deux cas : Kempf *et al.* ont invalidé totalement l'expression

d'*IFF4*, tandis qu'une expression résiduelle en présence de doxycycline reste possible dans les souches utilisées par Fu *et al.*. Nous verrons que nous avons été confrontés à ce problème dans la partie Résultats. Le travail de Kempf *et al.* souligne par ailleurs que la surexpression d'une protéine peut incidemment affecter l'expression d'autres protéines pariétales ce qui amènerait à un phénotype qui ne serait pas lié à la protéine étudiée. Les études sur *IFF4* ont montré que son expression était dépendante du contexte anatomique et du modèle d'infection disséminée utilisé. *Iff4* serait impliquée directement ou indirectement dans l'infection par sa capacité à adhérer et donc à coloniser le matériel biologique. Il reste à tester l'adhérence sur des matériaux de nature chimique différente tels que le latex ou le polyuréthane et il serait bien de tester également la virulence dans un autre modèle comme un modèle de cathéter central chez le rat.

4.4.3 La protéine *Iff11* : une *Iff* secrétée

La protéine *Iff11* a été étudiée pour la première fois par (Bates *et al.*, 2007), en utilisant deux souches, interrompant ou surexprimant *IFF11*. Le mutant *iff11*^{-/-} a été réalisé par interruption de *IFF11* dans la souche CAI-4 par la méthode Ura Blaster, suivie de la réintégration du gène *URA3* au locus *RPS10*. La souche de surexpression exprime le gène *IFF11* sous le contrôle du promoteur de l'enolase *ENO1* et comprend un tag V5. Cette dernière souche a permis de localiser *Iff11*-V5 dans la fraction secrétée par Western blot. Cela n'exclut pas le fait qu'il y aurait quelques protéines en quantité indétectable présentes dans la paroi. La détection d'*Iff11*-V5 dans une souche exprimant le gène sous son propre promoteur n'a pas été possible. Cela montre que le gène *IFF11* est très peu exprimé dans les conditions de culture de laboratoire. Le mutant *iff11*^{-/-} a montré un retard de filamentation sur milieu spider, ainsi qu'une hypersensibilité en milieu liquide contenant soit du Calcofluor White, soit du SDS, soit du Rouge Congo. Ces défauts de paroi sont plutôt inattendus puisqu'*Iff11* est la

seule protéine Iff qui soit sécrétée. Le mutant a par ailleurs montré une virulence atténuée dans un modèle murin d'infection systémique, bien que l'invasion tissulaire soit restée comparable à celle d'une souche sauvage. Comme Iff4, cette protéine ne semblerait donc pas nécessaire une fois l'infection établie, mais plutôt lors des étapes initiant l'infection.

Projet de recherche

C. albicans est un pathogène très bien adapté à son environnement variable en terme par exemple de pH, température, potentiel redox ou d'agents enzymatiques divers (phagosomes), ce qui implique qu'au cours de son évolution il ait développé des mécanismes originaux pour coloniser son hôte. Ces fonctions originales pourraient éventuellement être portées par une ou plusieurs protéines de fonction inconnues. Les données sur le génome de *C. albicans* nous ont permis d'identifier un grand nombre de protéines à ancre GPI, pour la plupart de fonction inconnue et absentes chez la levure non pathogène *S. cerevisiae*. Leur localisation en surface leur confère potentiellement une place privilégiée pour interagir avec l'environnement et la cellule hôte. Dans l'introduction, j'ai rappelé que des protéines à ancre GPI avaient déjà été identifiées comme étant des facteurs de virulence (biogenèse de la paroi, formation de l'hyphe, adhésion et formation du biofilm, virulence et interaction avec le système immunitaire, ...).

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la plus grande famille de protéines à ancre GPI. Comme montré dans l'introduction, seules 3 protéines sur les 12 membres composant cette famille ont fait l'objet de publications depuis 1996. Deux de ces protéines sont importantes dans l'adhérence et dans la virulence en modèle d'infection systémique. Cette famille nous a donc paru intéressante.

Mon objectif premier était donc d'obtenir une banque complète de mutants *iff*^{-/-}. Dans un second temps, j'ai voulu réaliser un criblage de ces mutants dans divers modèles cellulaires ou animaux pour identifier de nouvelles protéines impliquées dans l'interaction avec l'hôte.

II Matériel et méthodes

1 Matériel

1.1-Matériel biologique

1.1.1-Les souches des différents microorganismes utilisés

La première étape de mon travail consistait en la construction des mutants *iff*^{-/-}, ces derniers sont décrits dans la partie Résultats (3.1). Le **tableau 2** liste les souches obtenues d'autres laboratoires et qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail.

Souches	Souche parentale	Description	Référence
<i>Escherichia coli</i> Top10		F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen
<i>Candida albicans</i> SC5314	Isolat clinique	Souche sauvage de <i>Candida albicans</i>	(Gillum <i>et al.</i> , 1984)
CAI4	CAI4	<i>iro-ura3Δ::λimm434/iro-ura3Δ::λimm434</i>	(Wilson <i>et al.</i> , 1999)
BWP17	CAI4	<i>iro-ura3Δ::λimm434/iro-ura3Δ::λimm434</i>	(Davis <i>et al.</i> , 2002)
DAY286	BWP17	<i>iro-ura3Δ::λimm434/iro-ura3Δ::λimm434</i> <i>his1::hisG/his1::hisG</i>	(Davis <i>et al.</i> , 2002)
CAI4+Clp10	CAI4	<i>iro-ura3Δ::λimm434/iro-ura3Δ::λimm434</i> , <i>RPS10::Clp10-URA3</i>	(Hobson <i>et al.</i> , 2004)
1843 (<i>als3</i> ^{-/-})	1779	<i>iro-ura3Δ::λimm434/iro-ura3Δ::λimm434</i> <i>als3laΔ/als3saΔ-URA3</i>	(Zhao <i>et al.</i> , 2004)
2322 (<i>als3/ALS3</i>)	2311	<i>iro-ura3Δ::λimm434/iro-ura3Δ::λimm434</i> <i>als3laΔ/als3saΔ-ALS3LA-URA3</i>	(Zhao <i>et al.</i> , 2006)
<i>hyr1</i> ^{-/-}	CAI4	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434</i> <i>hyr1::hisG/hyr1::hisG-URA3-hisG</i>	(Bailey <i>et al.</i> , 1996)

Tableau 2 : Souches utilisées dans cette étude

La souche de levure utilisée pour la construction des mutants est la souche BWP17 *ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG*. Celle-ci est issue de BWP17, elle même dérivée par quatre transformations de l'isolat clinique SC5314 (Wilson *et al.*, 1999).

Pour les clonages plasmidiques nous avons utilisé la souche *E. coli* Top10 *F-*, *mcrA*, (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), *80lacZM15*, *lacX74*, *recA1*, *ara139*, (*ara-leu*) 7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, (*StrR*,) *endA1*, *nupG* (Stratagene, CA).

1.1.2-Les cellules de mammifères

Les macrophages

La lignée cellulaire utilisée, J774.2, est issue d'une tumeur de souris BALB/c. Comme les macrophages humains, ce sont des cellules fortement motiles capables de chimiotaxie et de phagocytose (Lam *et al.*, 2009). Cependant elles n'expriment pas le récepteur spécifique du mannose (Fiani *et al.*, 1998).

Les cellules épithéliales vaginales

La lignée cellulaire utilisée, HeLa, est issue d'un prélèvement de métastase effectué sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus. Elle a été fournie par le laboratoire Sigma en relation avec l'ECACC (European Collection of Cell Culture).

1.2-Les enzymes

Les enzymes de restrictions ont été achetées chez New England Biolabs (Madison, USA). Pour les PCR, différentes enzymes ont été utilisées en fonction de ce à quoi était destiné le produit de PCR :

- pour les PCR sur colonies : HotMaster Taq DNA Polymerase (Prime 5)

- pour le clonage : Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)
- pour les autres PCR : GoTaq® DNA polymérase (Promega).

1.3-Les solutions

Solutions pour les E. coli compétentes :

-Milieu ϕ B : 5g/l de Bacto YE

20g/l de Bacto Tryptone

ajuster à pH 7,6 avec du KOH

+ 14g/l de Bacto Agar (Difco)

Au moment de l'utiliser, ajouter du $MgSO_4$ à 5g/l final

-Milieu ϕ A : milieu ϕ B sans agar

-RF1 : 30 mM potassium acétate

100 mM $RbCl_2$

10 mM $CaCl_2$

50 mM $MnCl_2$

+ glycérol 15% final (volume/volume)

Ajuster le pH à 5,8 avec 0,2 M d'acide acétique

-RF2 : 10 mM MOPS

75 mM $CaCl_2$

10 mM $RbCl_2$

+ glycérol 15% final (v/v)

Ajuster le pH à 6,5 avec du KOH

RF1 et RF2 seront stérilisés par filtrage et conservés à 4°C.

Tampon d'hybridation pour Southern blot :

Tampon Denhardt 50X (Ficoll400 1%, BSA 1%, polyvinylpyrrolidone 1%) : 5 ml

SSC 20X : 15 ml

SDS 20% : 1,25ml

ssDNA 10 µg/µl : 500 µl

H₂O : qsp 50 ml

1.4-Milieux de culture

Milieu de culture complet pour E. coli : LB

-10 g/l bacto tryptone,

-5 g/l extrait de levure,

-10 g/l NaCl

De l'ampicilline a été ajouté en fonction des plasmides utilisés à une concentration de 100 µg/ml.

Milieu complet de croissance des levures : YPD

-10 g/l bacto peptone,

-5 g/l extrait de levure,

-10 g/l glucose.

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

-1.7 g/l mélange d'acides aminés (*cf* liste ci-dessous),

- 1.7 g/l YNB (Yeast Nitrogen Base) sans sulfate d'ammonium ni acides aminés,
- 5 g/l sulfate d'ammonium,
- 20 g/l glucose.

Mélange d'acides aminés sans histidine, uridine, arginine utilisé pour le SC (décrit ci-dessus):

- 0.5 g adénine,
- 2 g inositol, proline, alanine, isoleucine, serine, cystéine, thréonine, glutamine, lysine, tryptophane, glycine, méthionine, tyrosine, phénylalanine, valine,
- 10 g leucine.

Suppléments pour complémentation d'auxotrophie (concentrations finales) :

- uridine 50 mg/l,
- histidine 2 mg/l,
- arginine 4 mg/l.

Milieux inducteurs de filamentation chez C. albicans :

Tous les milieux ont été complétés en Agar 20g/l pour les milieu solide.

- milieu Spider (1% « nutrient broth » (Difco, MD, Etats-Unis), 1% mannitol, 0.2% K₂HPO₄),
- milieu serum (5% de serum de veau foetal, eau).
- milieu de Lee :

- 5 g (NH₄)₂SO₄
- 0,2 g MgSO₄ 7H₂O
- 2,5 g K₂HPO₄ (anhydrous)

-5 g NaCl

-12,5 g glucose

-acides aminés (0,5 g alanine, 1,3 g leucine, 1 g lysine, 0,1 g méthionine, 0,0714 g ornithine, 0,5 g phénylalanine, 0,5 g proline, 0,5 g thréonine, 0,001 g biotine (filtrée) dans 1 l d'H₂O)

Milieu de culture de cellules mammifères :

- Les macrophages J774 sont cultivés en flacon de 75 cm² dans un milieu D10 composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + GlutaMAXTM supplémenté de 10% de serum de veau fœtal (Gibco), 100 µg/ml de streptomycine – pénicilline.

- Les cellules HeLa sont cultivées en flacon de 75 cm² dans un milieu H10 composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de 10% de serum de veau fœtal (Gibco), de 100mM d'acides aminés non essentiels, de 100 µg/ml de streptomycine et 100µg/ml de pénicilline.

Milieus de conservation :

- les microorganismes sont conservés à -80°C dans du YPD + 25% glycérol.

- les cellules HeLa sont conservées dans leur milieu de culture + 20% DMSO et les macrophages J774 sont conservés dans leur milieu de culture. Les cellules sont congelées d'abord à -80°C un jour puis sont transférées dans l'azote liquide.

2 Méthodes

2.1 Techniques de base en biologie moléculaire

2.1.1.- Préparation des acides nucléiques.

ADN plasmidique d'E. coli

L'ADN plasmidique des bactéries recombinantes a été préparé en utilisant le Kit «Wizard Plus Minipreps DNA Purification System» (Promega). L'extraction d'ADN se fait par lyse alcaline et la purification des plasmides s'effectue sur colonnes d'affinité en utilisant le kit « Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System » (Promega).

ADN génomique de C. albicans

L'ADN génomique de *C. albicans* a été extrait en suivant un protocole légèrement modifié de celui mis au point par Querol (Querol *et al.*, 1992). La souche d'intérêt est cultivée la nuit dans 5 ml de YPD à 30°C. Après centrifugation, le culot cellulaire est lavé puis repris dans 500 µl de la solution d'extraction T1 (sorbitol 1 M ; EDTA 0,1 M pH 8) auxquels sont ajoutés 100 µg de zymolyase 100 T (Seikagaku) afin de former des protoplastes par digestion enzymatique de la paroi. Après une heure d'incubation à 37°C, le mélange est centrifugé, le culot est resuspendu dans une solution T2 (Tris/HCl 50 mM pH 7,5 ; EDTA 20 mM) pour bloquer l'activité enzymatique. L'ajout de 50 µl de SDS 10% est suivi d'une étape d'incubation de 30 minutes à 65°C pour inactiver les nucléases libérées lors de la lyse cellulaire. L'ajout de 200 µl de K-acétate 5 M est suivi d'une étape d'incubation d'au moins 30 minutes à 0 °C afin de précipiter les protéines. Elles seront éliminées par centrifugation. L'ADN génomique est précipité par ajout de 700 µl d'isopropanol, puis dilué dans 400 µl d'eau. Il sera précipité en présence de 40 µl de d'acétate de sodium 2,5 M pH 5,2 et de 1 ml

d'éthanol 100 %, puis lavé dans 1 ml d'éthanol 70%. Le culot sec est resuspendu dans 100 µl d'eau puis traité à la RNase (100 µg/ml final) à 37°C pendant 15 minutes.

ARN totaux de *C. albicans*.

Les cellules ont été congelées dans l'azote liquide sous forme de billes, puis conservées à -80°C.

Pour le broyage avec des billes, nous avons utilisé soit une bille de tungstène couplée à l'utilisation du Micro-Dismembrator de Sartorius Stedim (2 minutes à 2600 rpm), soit des microbilles de verre couplées à l'utilisation du FastPrep de Q-Biogene (3 cycles d'une minute à la vitesse 6,5).

Les ARN sont purifiés à l'aide du kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) puis sont traités à la TURBO DNA-free™ (Ambion) et conservés à -20°C.

Estimation de la concentration en ARN ou ADN.

La concentration des acides nucléiques est mesurée au NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific).

2.1.2. – Amplification des séquences par PCR et qPCR

Amplification d'ADN par PCR

Toutes les amplifications d'ADN génomique et/ou plasmidique ont été réalisées dans le thermocycler Eppendorf Mastercycler Gradient. Les cycles utilisés sont décrits plus loin au fur et à mesure en fonction des applications. Les oligonucléotides utilisés sont décrits en annexes 1 à 5.

Quantification des transcrits par qPCR

L'ADN complémentaire est obtenu à la suite d'une réaction de transcription inverse sur 1 µg d'ARN en utilisant le kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) et en suivant les instructions du fabricant.

L'expression des gènes a été déterminée par PCR quantitative en temps réel en utilisant le thermocycler LightCycler® (Roche Molecular Biochemicals). Les oligonucléotides ont été choisis avec le LightCycler® Probe Design Software 1.0 et permettent l'amplification d'une centaine de paires de bases.

L'ADNc est dilué au 1/100ème. 20 µL du produit de PCR contenant 4 mM MgCl₂, 0.5 µM de chaque oligonucléotide et 2 µL du fluorophore LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I pour 5 µL de matrice (ADNc). La réaction débute par 8 minutes à 95°C, suivies par 45 cycles à 95 °C pendant 10 secondes, 55 °C pendant 7 secondes et 72 °C pendant 10 secondes. Le contrôle négatif est de l'eau. Le premier cycle est déterminé comme le cycle pour lequel le signal fluorescent atteint un seuil détectable par la machine. Toutes les mesures sont réalisées en duplicat (répliquats techniques) et sur des échantillons provenant de deux expérimentations indépendantes. Le niveau d'expression des gènes est exprimé de façon relative par rapport à l'expression de l'actine.

2.1.3. - Vérification des séquences *IFF1* et *IFF10*

Amplification des séquences

Les fragments destinés au séquençage ont été amplifiés avec la Taq polymérase « high fidelity ». La matrice utilisée est l'ADN génomique de BWP17 pour le séquençage de *IFF1* et *IFF10*, et le plasmide pCAU pour le séquençage de tetR.

Etape	température	temps	
Dénaturation	94°C	2'	
Dénaturation	94°C	15''	} 10 cycles
Hybridation	50°C	30''	
Elongation	72°C	2'	
Dénaturation	94°C	15''	} 20 cycles
Hybridation	50°C	30''	
Elongation	72°C	2' + 5'' à chaque cycle	
Elongation	72°C	5'	

Séquençage de l'ADN

Les fragments à séquencer ont été transmis à une entreprise commerciale (Cogenics) avec les oligonucléotides nécessaires. La méthode de séquençage utilisée est celle de Sanger. L'analyse des traces et des fichiers fasta fournis en retour a été effectuée comme décrit en 2.3.2.

2. 2- Construction des souches

2.2.1. Techniques de transformation

2.2.1.1. Transformation d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* Top10 compétentes ont été transformées par choc thermique suivant un protocole publié (Hanahan, 1983). Quelques colonies d'une culture de nuit à 37°C sur milieu ϕ B sont inoculés à 5ml de ϕ A puis incubés 2h à 37°C pour obtenir une $DO_{550} \cong 0,3$. A partir de cette préculture, 100ml de ϕ A (préchauffés à 37°C) sont inoculés pour une $DO_{550} \cong 0,02$ maximum. La culture est incubée à 37°C jusqu'à $DO_{550} \cong 0,48$. Elle est ensuite

refroidie dans la glace et 30ml sont centrifugés pendant 5min à 6000 rpm, à 4°C. Les cellules sont reprises dans le tampon RF1, à raison de 2/5 du volume de départ. Les cellules sont incubées pendant 5min sur la glace puis centrifugées 5min à 4°C, 6000 rpm. Le culot est repris dans le tampon RF2, à raison de 1/25 du volume de départ et incubé 5 minutes au moins dans la glace. Les cellules sont aliquotées dans des eppendorfs prérefroidis dans la glace puis congelées dans un mélange carboglace + EtOH et stockée à -80°C.

2.2.1.2. Transformation de *C. albicans*

La transformation s'est faite selon la méthode de transformation de levures de R.D. Gietz(2002). *C. albicans* est une levure strictement diploïde et nécessite donc deux transformations successives pour remplacer les deux allèles. La première étape est la transformation de la souche BWP17, souche auxotrophe pour trois acides aminés (His- Ura- Arg-) (**Figure 7**). 20µl du produit de PCR seront utilisés pour la transformation. On intègre la cassette de prototrophie pour l'Arginine, ainsi on obtient des clones [His- Ura- Arg+].

La seconde étape consiste à transformer ces mutants hétérozygotes par la cassette de prototrophie pour l'Uracile. Les clones [His-] sont vérifiés par PCR. On recherche alors les gènes marqueurs et on vérifie la perte du gène sauvage.

2.2.2. Disruption de gènes *IFF* chez *C. albicans*

Les cassettes de disruption ont été construites comme suit:

Le plasmide pGEM-T portant le marqueur de sélection *ARG4* (**Figure 8**) ou celui portant *URA3* sont utilisés comme matrice. Les amorces utilisées portent 100 pb d'homologie avec l'ORF *IFF*. Les séquences des gènes *IFF* ont été extraites du site d'annotation du génome de *Candida albicans*: <http://www.candidagenome.org/>. Les amorces ont été dessinées de façon à enlever l'ORF en entier, donc l'amorce sens est positionnée avant l'ATG

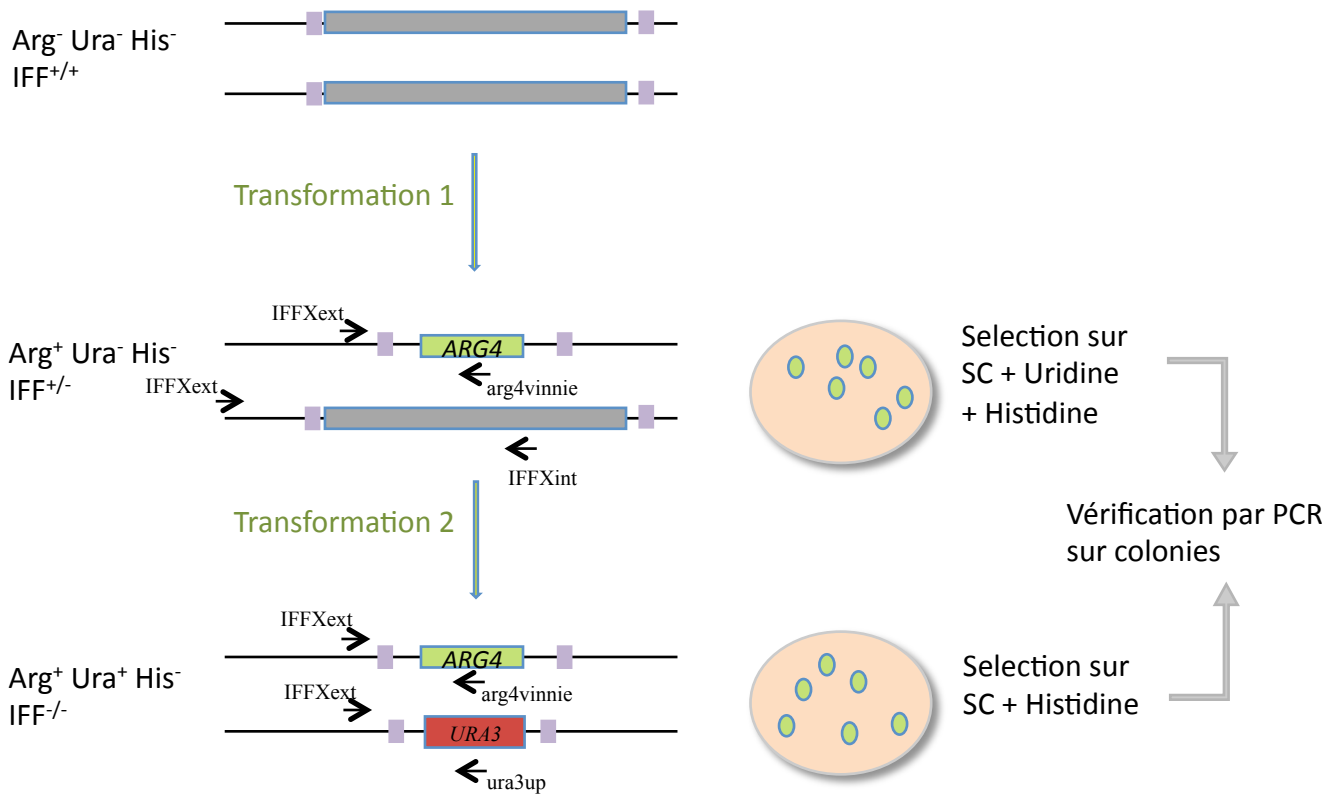


Figure 7 : Principe de la méthode de disruption PCR Jumbo. Les régions d'homologie portées par les cassettes pour la double recombinaison homologue sont en bleu. L'ORF du gène sauvage est en gris et sera successivement remplacée par les cassettes de disruption pour obtenir l'hétérozygote $IFF^{+/-}$ puis l'homozygote $iff^{-/-}$.

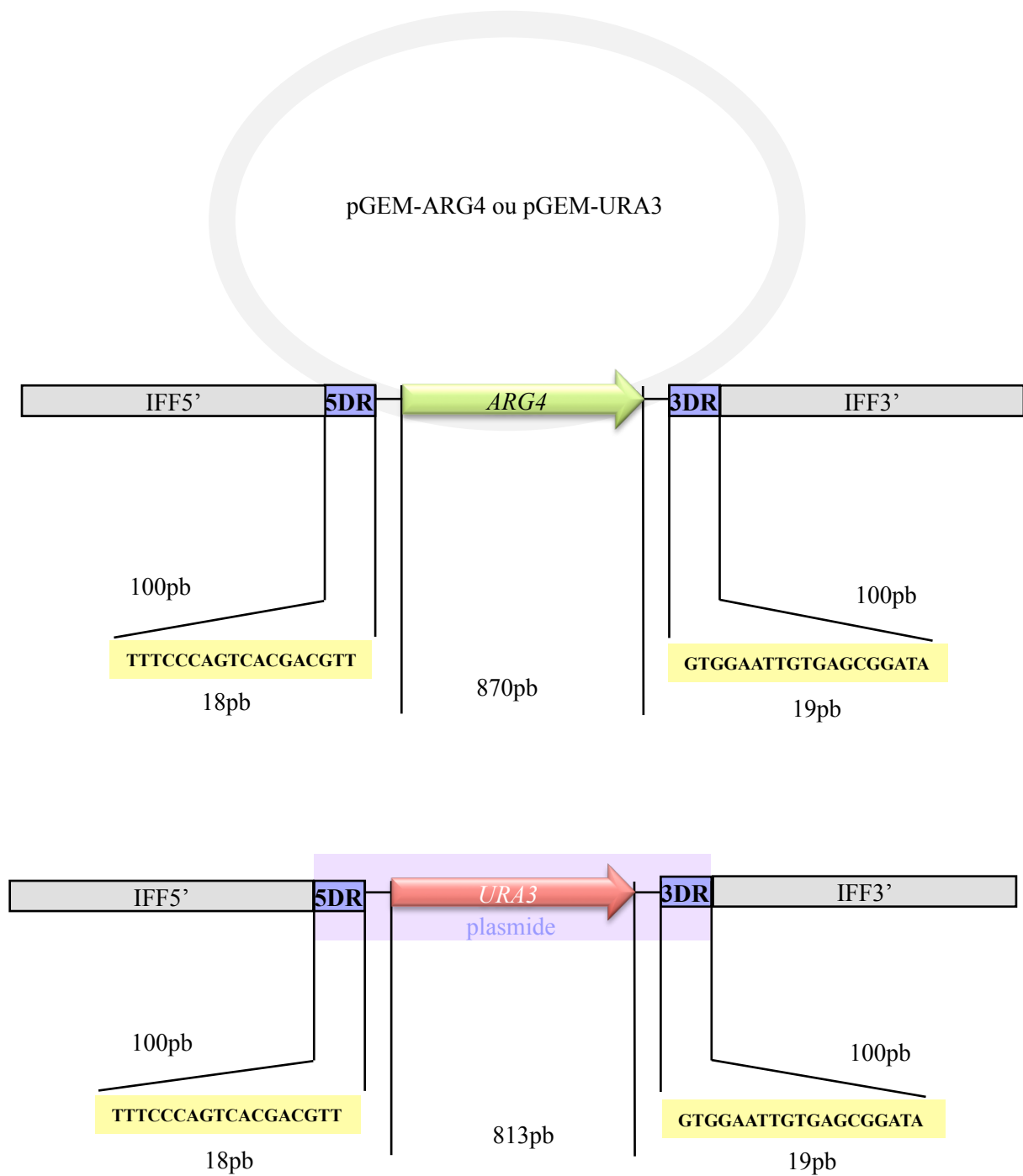


Figure 8 : Fabrication des cassettes d'interruption pour la transformation de BWP17. Les amorces utilisées pour l'amplification des marqueurs *URA3* ou *ARG4* portent 100 nucléotides d'homologie avec la région amont ou aval de l'ORF à interrompre + 20 nt homologue à la région plasmidique appelé 5DR ou 3DR. Le même couple d'oligonucléotides est utilisé pour amplifier les deux cassettes en vue de l'interruption d'un gène *IFF* donné.

et l'amorce anti-sens est positionnée juste après le codon stop. Une seule paire d'amorces est utilisée pour amplifier les deux cassettes servant à l'interruption des deux allèles d'un même gène (**Figure 8**) car une vingtaine de nucléotides en 3' des amorces va reconnaître les zones 5DR et 3DR communes aux deux plasmides.

Etape	température	temps
Dénaturation	94°C	5'
Dénaturation	94°C	45''
Hybridation	50°C	1'
Elongation	72°C	3'
Elongation	72°C	8'

2.2.3. Surexpression des gènes *IFF*.

- Plasmide d'expression du gène *tetR*.

Le fragment d'ADN portant le gène *tetR* a été amplifié par PCR avec les oligonucléotides PCAENO1F et XNRbis à partir du plasmide pCAITHE5 (don de S. Rupp) (**Figure 9**). Ce fragment porte le promoteur *CaENO1* du gène de l'énolase pour diriger l'expression du gène *tetR* en fusion avec le domaine d'activation transcriptionnelle du gène *ScHAP4* (aa 330 à 554), suivi de trois copies de l'épitope HA de l'hémagglutinine, et du terminateur du gène *ScWHII*.

Après vérification par séquençage, le produit de PCR est ensuite digéré par les enzymes *ClaI* et *AvrII* et inséré dans le plasmide CIp10 portant le marqueur *URA3*. On obtient un plasmide de 6737 pb. Ce plasmide est linéarisé en coupant le gène *RPS10* par *StuI*, puis intégré au niveau du locus *RPS10* dans l'hétérozygote *iff3*^{+/-} ou *iff9*^{+/-} [*His1*⁻, *Arg4*⁺, *Ura3*⁻] par simple recombinaison homologue. Les clones sont sélectionnés sur milieu SC + Histidine.

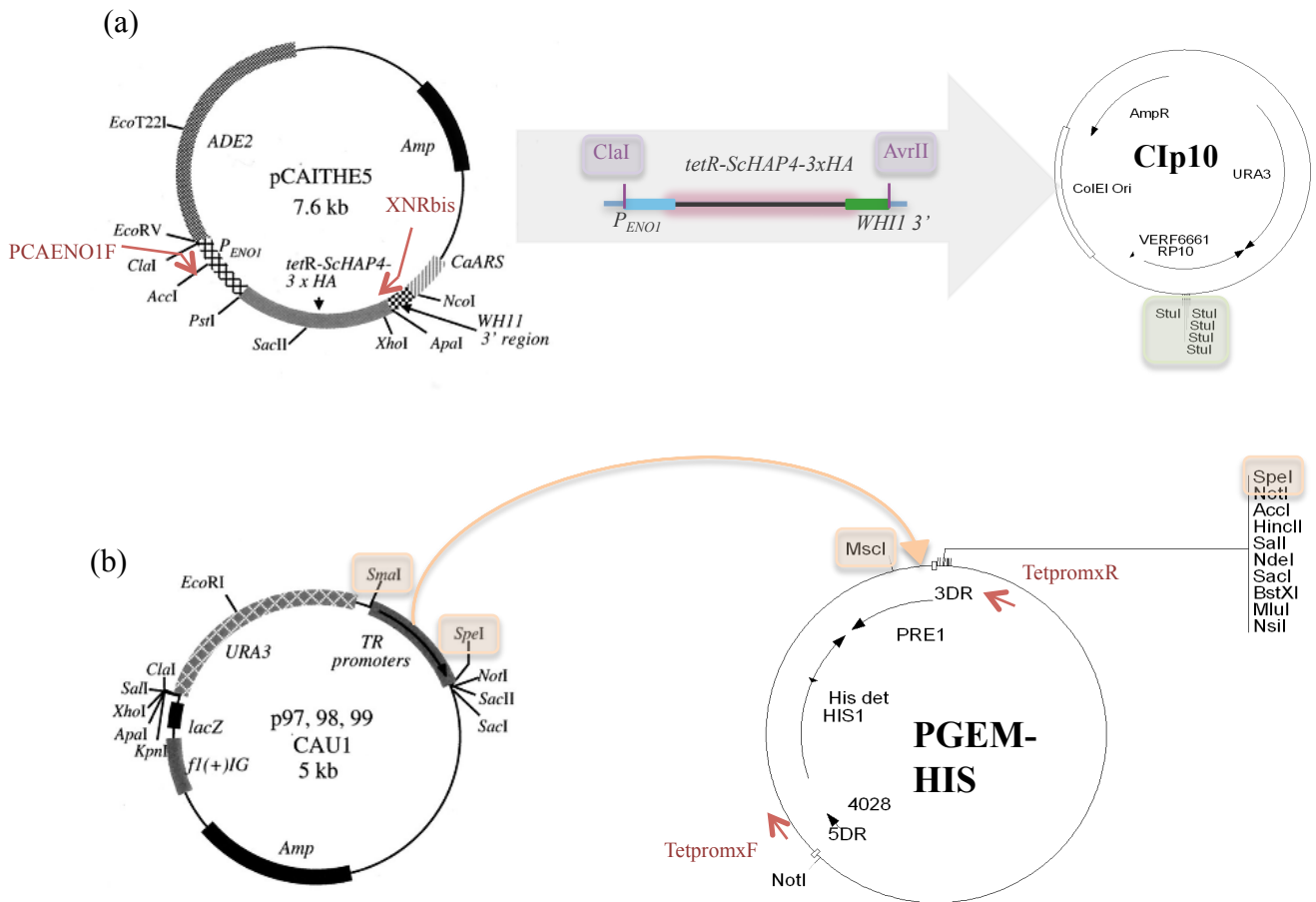


Figure 9 : Clonage du système Tet-Off en deux étapes (Nakayama *et al.*, 2000). (a) Le plasmide donneur fournit le gène codant l'activateur transcriptionnel qui est extrait par PCR avec les oligonucléotides PCAENO1F et XNRbis, puis séquencé et inséré dans le plasmide receveur par restriction enzymatique et ligature. Le plasmide formé portant le marqueur *URA3* est ensuite ouvert par *StuI* au niveau du gène *RP10* et inséré par recombinaison homologue par simple crossing-over au niveau de ce locus dans le génome de *iff3*^{+/-} ou *iff9*^{+/-}. (b) Le plasmide donneur fournit le promoteur TR qui est extrait par restriction puis inséré dans le plasmide receveur portant le marqueur *HIS1*. L'ensemble marqueur *HIS1* et promoteur TR est extrait de ce plasmide receveur par amplification avec les amorces tetpromxF et tetpromxR puis inséré dans le génome par double recombinaison homologue. Le criblage est réalisé par PCR sur colonies avec les amorces : IF9.4354F et Hisdet ou IF3.4380F et Hisdet.

L'intégration est vérifiée par PCR sur colonies et l'expression de la fusion *tetR-ScHAP4-3xHA-ScWHII* a été vérifiée par Western blotting grâce au tag HA présent sur le fragment (résultats non montrés). La réintégration du gène *URA3* au locus *RPS10* permet de rétablir une expression suffisante pour les tests de filamentation et de virulence *in vivo* comme démontré par ailleurs (Brand *et al.*, 2004).

- Construction de la cassette portant le promoteur TR.

Le plasmide p99 CAU1 (don de S. Rupp) fournit le promoteur TR qui est extrait par restriction avec les enzymes *SmaI* et *SpeI* puis inséré dans le plasmide receveur pGEM-His (**Figure 9**) portant le marqueur *HIS1*. Le plasmide obtenu est utilisé comme matrice pour extraire l'ensemble marqueur *HIS1* et promoteur TR par PCR avec les couples d'amorces tetprom3F/tetprom3R ou tetprom9F/tetprom9R. Ces amorces Jumbo portent des zones d'homologie pour une insertion devant l'ORF *IFF3* ou *IFF9* sauvage. Le produit d'amplification a été vérifié par séquençage, puis inséré dans le génome par double recombinaison homologue lors d'une étape de transformation de *C. albicans*. Lorsque cela était possible, l'ensemble de la région promotrice originelle a été remplacé (**Figure 10**). Ainsi pour *IFF9*, la région allant du codon stop de l'orf19.4358 en amont de *IFF9* jusqu'au 3^{ème} nucléotide avant l'ATG d'*IFF9* a été remplacée. La région en amont du gène *IFF3* présentait un autre gène, l'orf19.4380.1, orienté dans le sens inverse ce qui ne permettait pas d'enlever le promoteur de *IFF3* sans risquer d'enlever le promoteur de l'orf19.4380.1. Ici, le promoteur TR a donc été ajouté 3 nucléotides avant le codon d'initiation de la transcription d'*IFF3*.

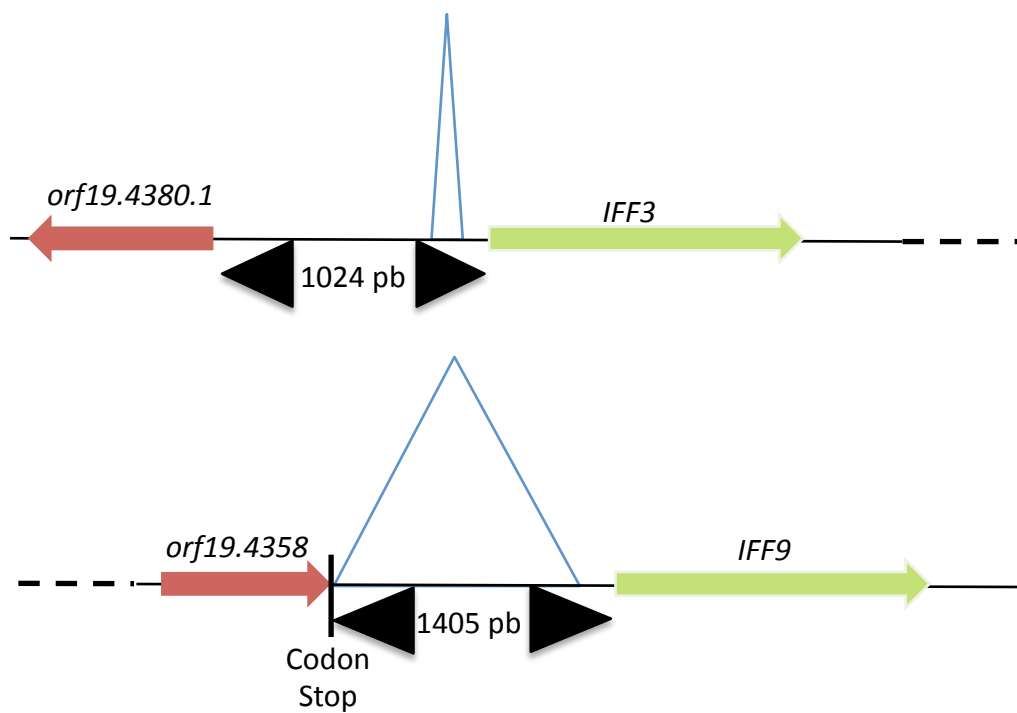


Figure 10 : Schématisation de la région promotrice remplacée par le promoteur TR. Les gènes *IFF3* et *IFF9* sont portés par le chromosome R. Le triangle bleu représente la zone remplacée. Elle se situe 3 nucléotides avant l'ATG du gène d'intérêt.

2.2.4. Construction des souches de surexpression des gènes *IFF* portant un tag V5.

Pour cette construction, il a été utilisé un vecteur d'expression (**Figure 11**) contenant le promoteur *ACT1*, la séquence signal de PGA59 suivie de l'épitope V5 en phase et les sites *AvrII* et *PmlI* permettant le clonage des séquences codant les *IFF*. En aval se trouvent le codon STOP et le terminateur de PGA59.

2.2.5. - Vérification des clones hétérozygotes ou homozygotes

2.2.5.1. Criblage des transformants par PCR.

Lorsque cela était possible, environ 32 clones ont été vérifiés par PCR sur colonies en utilisant une amorce « forward » située en amont de l'ORF à interrompre, une amorce « reverse » interne à l'ORF à interrompre et une deuxième amorce « reverse » interne au gène *URA3* ou *ARG4*. Pour cette PCR, on utilise la Go Taq Flexi (Promega) et le tampon du kit HotMaster Taq DNA Polymerase (Prime 5) et le programme suivant :

Etape	température	temps	
Dénaturation	94°C	5'	
Hold	94°C	Ajout de la Taq polymérase (Promega)	
Dénaturation	94°C	20''	} 35 cycles
Hybridation	55°C	20''	
Elongation	65°C	1' par kb à amplifier	
Elongation	72°C	15'	

Ceci a permis de vérifier la présence d'un allèle du gène sauvage et la présence de la cassette chez les mutants hétérozygotes obtenus après la première transformation, ou

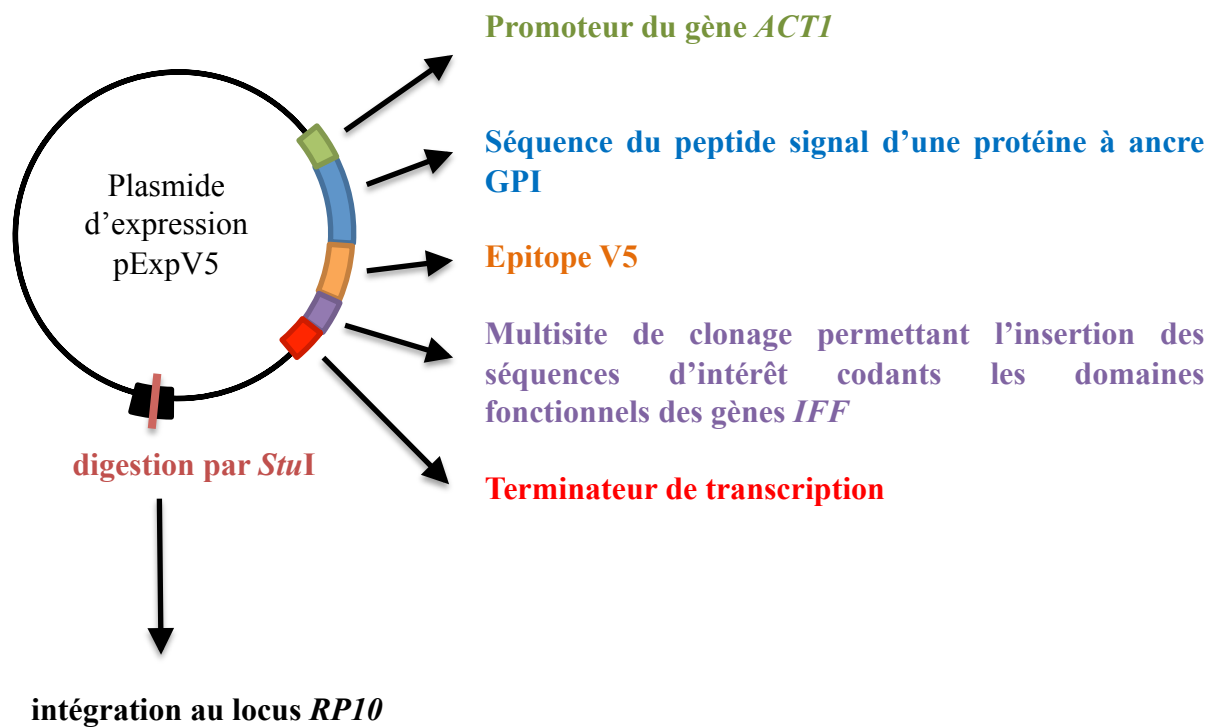


Figure 11 : Vecteur d'expression utilisé pour la construction des souches de surexpression des gènes *IFF* portant un tag V5.

l'absence du gène sauvage entier et la présence d'une deuxième cassette chez les mutants homozygotes (**Figure 7**). Ainsi au moins deux mutants provenant de deux transformations indépendantes ont été conservés.

2.2.5.2. Confirmation de la structure par Southern-blot.

La structure des transformants retenus par PCR a été confirmée par Southern blot en suivant les protocoles de Southern (Southern, 1975 et Sambrook J.E., 1989).

Pour cela, 20 à 30 μ l d'ADN génomique sont digérés par une enzyme de restriction pendant une nuit. Après migration à 100 volts dans un gel d'agarose de 0,6 à 0,8 % selon la taille des fragments attendus, le gel est incubé dans un bain de HCl 0,25N pendant 15 minutes. Après rinçage à l'eau, le gel est transféré dans un bain de NaOH 0,4N pendant 15 minutes. Puis il est incorporé dans le montage suivant : un pont de papier Whatman imbibé de NaOH 0,4N, le gel, la membrane de nylon N⁺ (Amersham, Little Chalfont, UK) et trois papiers Whatman et une plaque de verre. La soude va monter par capillarité, entraînant ainsi l'ADN dénaturé pour permettre son transfert sur la membrane.

La membrane est ensuite rincée trois fois avec du SCC 2X, puis fixée aux UV. Pour l'étape de préhybridation la membrane est plaquée contre les parois d'un tube à hybridation en présence de tampon d'hybridation et incubée une nuit dans un four à hybridation à 65°C.

Une seule sonde est utilisée pour distinguer les 3 allèles (**Figure 12**). Elle est créée par PCR selon un programme classique avec un T_m de 50°C et un temps d'élongation de 2 minutes. Les amorces utilisées sont décrites en annexe. Le marquage est réalisé comme suit. 5 μ l du produit de PCR, préalablement purifié sur colonne avec le kit « Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System » (Promega), sont dénaturés 5 minutes à 100°C puis incubés 10 minutes à température ambiante. Le produit de PCR est ensuite ajouté au réactif du kit « Amersham MegaprimeTM DNA Labelling System (GE Healthcare) », puis 3 μ l (30 μ Ci) de

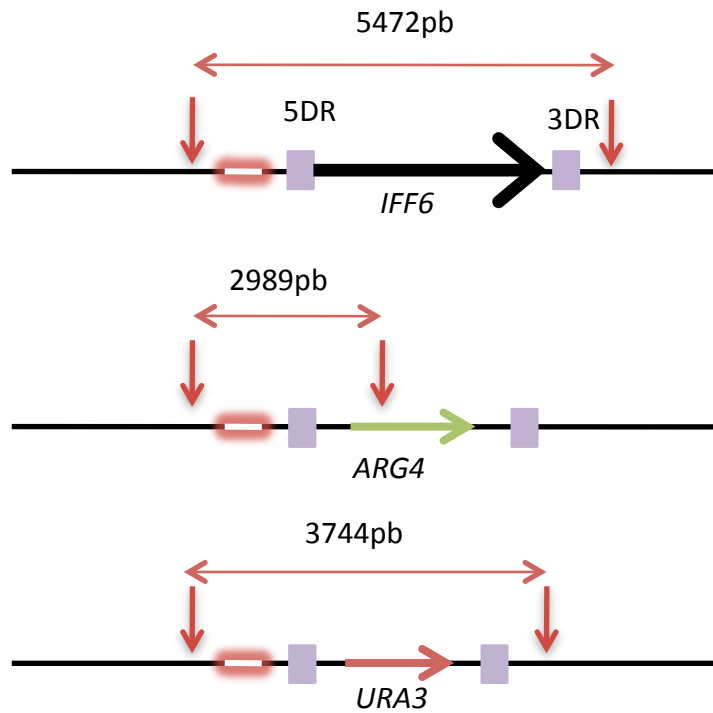


Figure 12 : Carte de digestion de l'ADN génomique pour le Southern-blot du mutant *iff6*^{-/-}. Le trait rouge correspond à l'emplacement de la sonde qui mesure environ 400 paires de base. Les flèches rouges correspondent au site de restriction de ClnI.

$\alpha^{32}\text{PdCTP}$ (Perkin Elmer) sont ajoutés à la réaction. Cette dernière est incubée 30 minutes à 37°C. La sonde est finalement dénaturée 5 minutes à 100°C avant d'être mélangée au tampon d'hybridation en présence de la membrane. L'hybridation s'effectue la nuit à 65°C.

La membrane est lavée dans un four à hybridation à 55°C 2 fois 15 minutes avec du SSC 2X (solution stock 20X 3.0 M NaCl, 0.3 M citrate de sodium, pH7) 0,1 % SDS et 2 fois 10 minutes avec du SSC 0,2X 0,1 %SDS. La membrane est ensuite séchée puis révélée d'abord à l'aide du Phosphorimager et du film Fujifilm® FLA-7000 Storm (GE Healthcare) puis par autoradiographie à -80°C sur film Kodak® X-Omat AR Film.

2.3- Technique de bioinformatique

2.3.1- Banque de donnée

Les données issues du séquençage du génome de *C. albicans*, sont disponibles sur le site de la faculté de médecine de Stanford (<http://www.candidagenome.org/>).

L'interrogation des banques de données pour la recherche d'homologies au sein des génomes des champignons séquencées a été réalisée au sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

2.3.2- Analyse des séquences

Après séquençage les fichiers de séquences sont analysés à l'aide de la suite GCG (GCG Wisconsin Package (Accelrys Inc., San Diego, CA) utilisée en environnement Unix (interface Cygwin).

2.3.3- Réalisation des arbres phylogénétiques

-Evolution des Iffs

Deux méthodes ont été choisies pour le nettoyage des alignements. Pour le premier arbre, l'alignement a été réalisé dans ClustalX. Cet alignement a été nettoyé manuellement sur GenDoc. Cela a généré une séquence de 322 positions alignées. Pour le deuxième arbre, l'alignement a été réalisé avec Muscle et les corrections ont été réalisées sous GBlocks. Cela a généré 294 acides aminés en 12 blocs (en choisissant 8 acides aminés comme taille minimale pour les blocks). Les arbres ont été réalisés dans ClustalX en choisissant la méthode du Neighbour Joining avec bootstraps et sont visualisés sur NJplot.

-Répartition des Iffs chez les champignons

Les homologues d'*IFF2* ont été recherchés dans NCBI. Puis l'alignement a été traité comme précédemment.

2.3.4- Recherche de modifications post-traductionnelles

Toutes les prédictions ont été réalisées grâce aux sites d'analyse consultables sur ExPaSy. Différents logiciels sont disponibles à différentes adresses selon la prédiction souhaitée:

Prédiction de la séquence signal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

Prédiction du domaine transmembranaire (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)

Prédiction des N-glycosylations (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)

Prédiction O-glycosylation (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)

Prédiction d'une ancre GPI (http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) et (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>)

2.3.5- Analyses statistiques

Les données biologiques obtenues après les tests phénotypiques sont analysées par un test de Student avec un risque d'erreur de 5% pour vérifier la significativité des résultats. Ce test est réalisé à l'aide du logiciel R.

2.4- Analyses phénotypiques

2.4.1 Test en gouttes.

Tous les mutants *iff*^{-/-} ont été criblés pour leur sensibilité aux agents perturbant la paroi, leur sensibilité à différents stress et leur capacité à filamenter en utilisant un test en gouttes sur milieu solide. Auparavant, la concentration inhibant la croissance du sauvage a été déterminée en testant 12, 24 et 36 µg/ml de Caspofungin ; 1,5, 3 et 5 mM d'H₂O₂ ; 30, 50 et 74 µg/ml de CFW et 0,005%, 0,010% et 0,025% de SDS.

Deux clones indépendants de chacun des mutants ont été testés et leur croissance sur différents milieux a été comparée à celle de la souche de référence DAY286.

Les souches sont cultivées une nuit à 30°C dans 3 ml de YPD et diluées dans du YPD à une DO_{600nm} = 1. On dépose 5 µl (3 µl suffisent sur le milieu SDS) d'une série de six dilutions en cascade au dixième sur les milieux suivant :

- SC His (milieu de référence),
- SC His pH 3, pH 10 ou H₂O₂ 7,5 mM (inducteurs de stress),
- SC His SDS 0.001%, CFW 75 µg/ml ou Caspofungin 12 µg/ml (agent perturbant la paroi),
- milieu sérum 5% ou spider (inducteurs de filamentation).

Les boîtes sont incubées à 37°C et observées après 24 et 48h, sauf pour le milieu Spider où il faut attendre 4 à 6 jours.

2.4.2 Test de croissance en milieu liquide.

- Résistance à une forte température

Ce test a été réalisé en microplaque de 96 puits dans 150 μ l de YPDensemencé à une DO_{600} initiale de 0,1. La croissance s'effectue à 37°C, 44°C, et 45°C pendant 16h de culture sous agitation continue. La lecture de la DO_{600} est faite directement dans le Biotek® toutes les 15 minutes puis analysée avec le logiciel d'acquisition Gen5.

- Résistance à des agents perturbant la paroi

Ces tests ont été réalisés selon le protocole présenté dans la publication de Bates (Bates *et al.*, 2007). Ce test est réalisé en plaque de 96 puits. Les levures sont ensemencées dans chaque puits à une DO initiale de 0,01 dans 95 μ l de YPD (**Figure 13**). A cela est ajouté 5 μ l de SDS, CFW ou Congo Red en dilutions décroissantes dans chaque puits. Les plaques sont hermétiquement fermées avec de Parafilm M® (Laboratory Barrier Film), puis incubées à 30°C sous agitation constante pendant 16 heures. La lecture de la DO est ensuite effectuée sur le Biotek® décrit plus haut.

2.4.3 Test de survie des levures après phagocytose.

Nous avons utilisé la technique du « end point dilution » (**Figure 14**) qui est un test à moyen débit réalisé en microplaque (Marcil *et al.*, 2002). Précédemment à l'expérimentation, 10^5 macrophages sont inoculés dans 150 μ l de D10 et ce une ligne sur deux (la ligne sans macrophage correspond au témoin d'inoculation des levures) dans une microplaque de 96 puits. Puis la plaque est incubée à 37°C et 5% CO_2 pendant 24 heures. Les souches de levures sont cultivées une nuit à 30°C dans 3ml de YPD et le lendemain, les levures sont lavées et resuspendues dans du D10. $5 \cdot 10^3$ levures sont ensuite ajoutées aux 50 μ l de D10 contenu dans chaque premiers puits de la microplaque, soit un facteur de MOI (Multiplicity Of Infection) de 1:20. Ensuite, par dilution en cascade sur les puits suivant on réalise une succession de

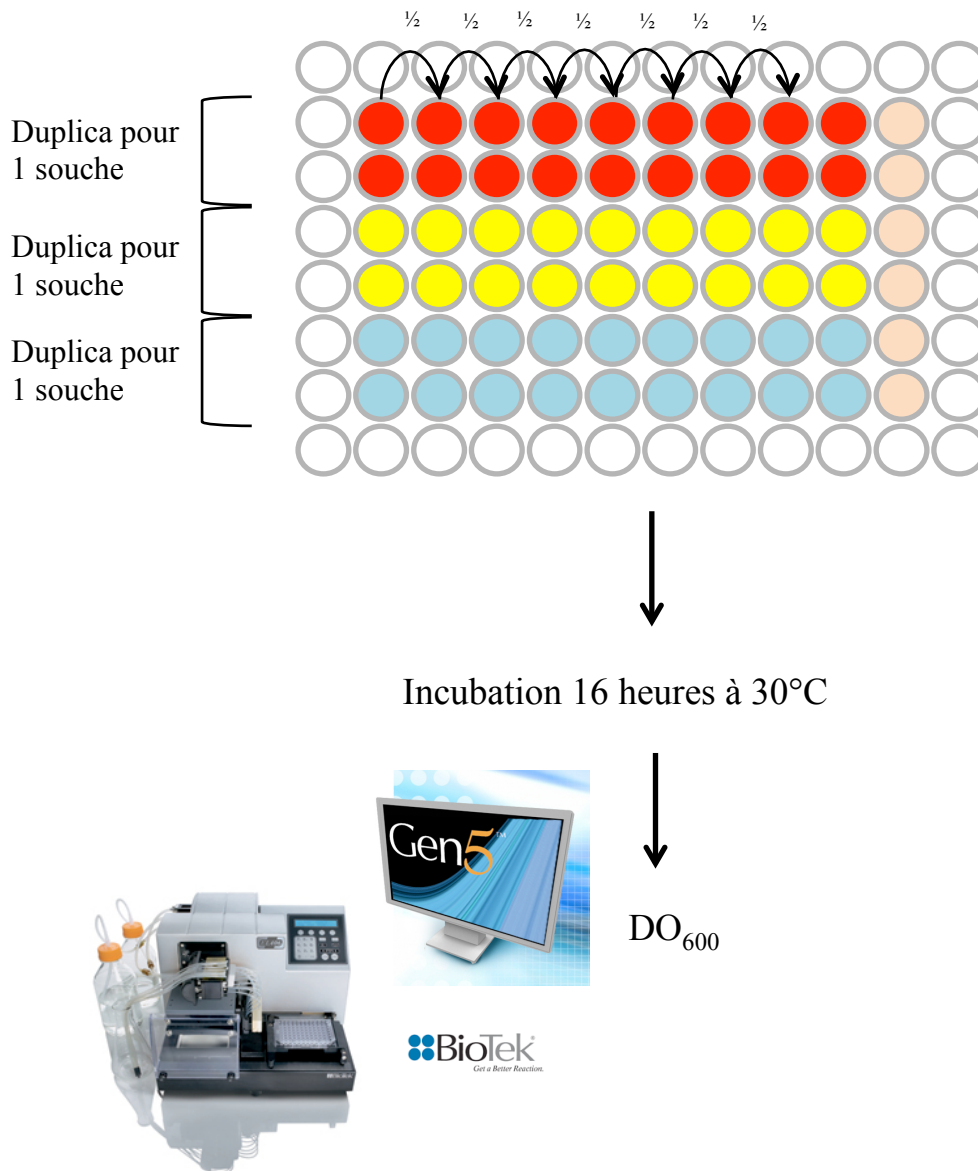


Figure 13 : Test liquide de résistance aux agents perturbants la paroi. Le Congo Red à une concentration initiale de 500 µg/ml (en rouge), le CFW à $C_i = 500$ µg/ml (en jaune) et le SDS 1%(en bleu). Les levures sont inoculées dans chaque puits à une DO initiale de 0,01 dans 95 µl de YPD. Les agents sont ajoutés en dilution décroissante d'un facteur 2 entre chaque puits. La plaque est incubée à 30°C pendant 16 heures puis la DO₆₀₀ est lue par le système Biotek. Le blanc est relevé dans l'avant dernière ligne qui contient 100 µl des agents seuls, puis soustrait aux données. Un duplicat technique est réalisé pour chaque souche.

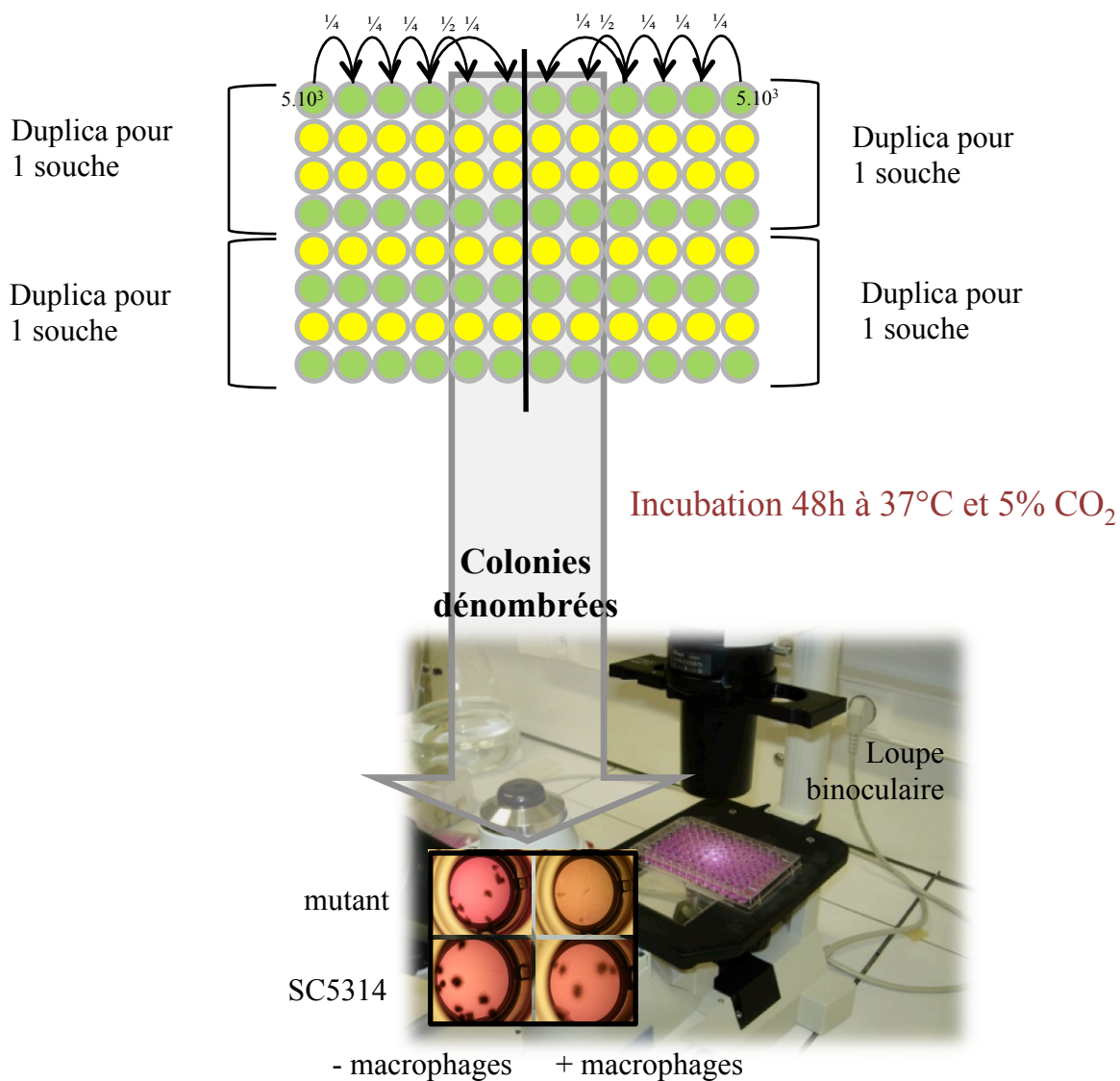


Figure 14 : Test de résistance à la phagocytose par les macrophages J774.2. Les puits en vert correspondent aux levures seules. Les puits en jaune correspondent aux cocultures levures + macrophages (MOI initiale = 1:20). Chaque puits contient 150 μ l de milieu D10 seul ou avec 10^5 macrophages. Puis 50 μ l de cellules de *C. albicans* sont ajoutés dans tous les puits selon une concentration décroissante. Un dupliquât technique est réalisé pour chaque souche.

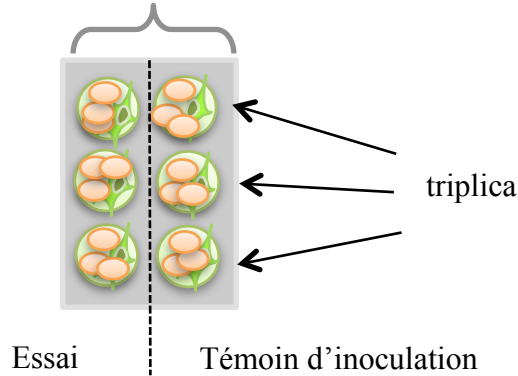
concentrations en levures décroissantes d'un facteur 4 entre chaque puits. L'expérimentation est réalisée en duplicat pour chaque souche. Nous avons opté pour le dénombrement des colonies ayant échappé à la coculture avec les macrophages. La co-culture est donc incubée 48h à 37°C avec 5% de CO₂. Le dénombrement des colonies se fait sous le microscope optique. Les colonies sont isolées malgré la filamentation importante des levures induite par les conditions de culture. On compte deux dilutions successives dans les puits où il est possible de discriminer les colonies. Les puits sans macrophages correspondant aux mêmes dilutions sont les témoins d'inoculation. Les résultats sont présentés en nombre de colonies en présence de macrophages rapporté au nombre de colonies sans macrophages x100.

2.4.4 Test d'adhérence des levures sur cellules HeLa.

Cette expérience a été mise au point à partir d'un protocole expérimental utilisé dans l'équipe de M. Gil et D. Gozalbo à Valencia (**Figure 15**). Pour cette expérience nous avons utilisé des plaques 6 puits pour avoir une surface par puits suffisante pour avoir un échantillon de levures significatif. Les levures sont cultivées une nuit dans du YPD à 30°C. Le lendemain elles sont diluées à une DO₆₀₀ de 0,2 dans 5 ml de SC, puis incubées 5 heures pour atteindre la phase exponentielle (DO₆₀₀ = 0,8). 4.10⁵ cellules HeLa sont ajoutées à 3 ml de D10 dans chaque puits pour obtenir des cellules à confluence deux jours plus tard. Le milieu est alors enlevé et 1 ml d'une suspension à 10⁴ levures/ml de D10 est inoculé dans les 6 puits. Après 45 minutes d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, les puits d'essai sont lavés 3 fois avec 5 ml de Phosphate-Buffered Saline (PBS) 7.2 (1X) (Invitrogen) tempéré à 37°C. Ensuite, 1 ml de PBS est ajouté et l'ensemble des cellules est décollé à l'aide d'un grattoir. Les puits d'essai seront dilués au cinquième alors que les puits témoin seront dilués au dixième. 100 µl de chaque dilution est étalé sur milieu gélosé YPD. Après 48 heures d'incubation à 30°C, les cellules

Coculture

10^4 levures + HeLa à confluence



45 minutes à 37°C

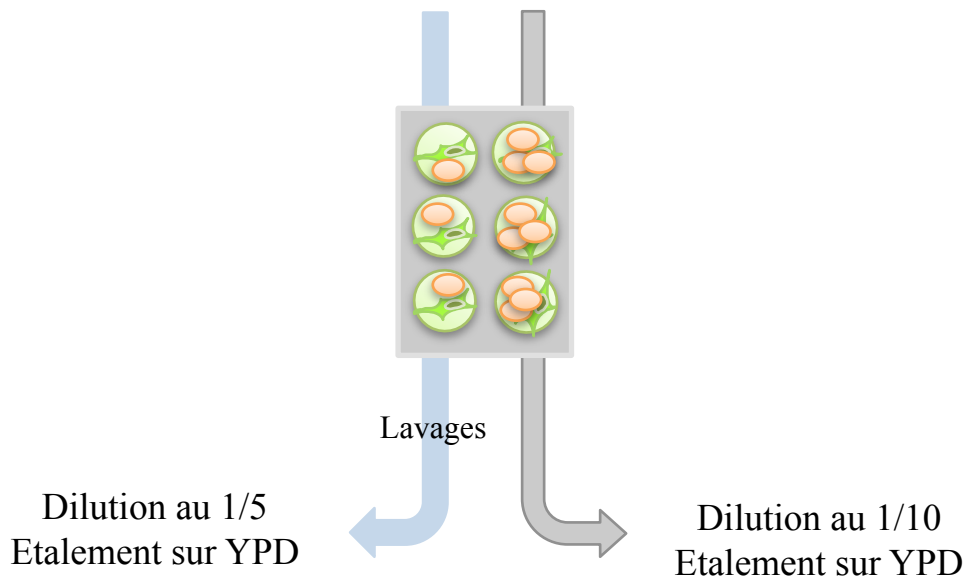


Figure 15 : Test d'adhérence sur cellules HeLa. 10^4 levures sont inoculées à un tapis de cellules HeLa à confluence et cela dans chaque puits. Une plaque accueille une seule souche testée en triplicat technique. Trois puits seront lavés après une incubation de 45 minutes à 37°C, 5% CO₂, puis lavés 3 fois avec du PBS puis l'ensemble des cellules seront récupérées par grattage et une dilution au 1/5ème sera étalée sur boîte YPD pour le dénombrement. Ce résultat est exprimé en pourcentage de l'inoculum de départ qui est produit par les trois puits restant qui subiront le même traitement exceptée l'étape de lavage.

sont dénombrées. Le nombre de cellules ayant adhéré est exprimé en fonction du nombre de cellules inoculées.

2.5- Techniques de biochimie

2.5.1- Préparation des fractions

Le culot cellulaire d'une culture de la nuit (100 ml de culture en YNB N₅₀₀₀ à DO₆₀₀ = 8-10) est repris, après lavage en TE, dans 2 ml de tampon de lyse (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Les cellules sont broyées en présence de billes à froid 4 x 20 secondes au Fastprep®-24 (MP Biomedicals) puissance 6. Les billes et les débris sont ensuite éliminés par centrifugation à 800 rpm, le surnageant est récolté et les billes sont rincées avec 0,5 ml de Tampon de lyse. Le lysat est ensuite centrifugé 10 minutes à 4000 rpm à froid. On obtient deux fractions (**Figure 16**) :

- le surnageant = S₄₀₀₀ est composé des protéines cytoplasmiques et des petits organelles,
- le culot = C₄₀₀₀ comprend la fraction de la membrane plasmique, la paroi et les plus gros organelles.

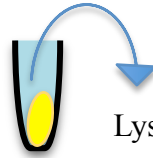
La fraction C₄₀₀₀ est lavée en NaCl 1 M (3 x 5 ml) puis repris en 2 fois dans 0,5 ml de Tampon d'extraction (50 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM EDTA, 2% SDS, 40 mM β-mercapto-éthanol), porté 5 minutes à 100 °C. Le mélange est alors centrifugé 4 minutes à 4000 rpm, pour donner deux sous fractions :

- le surnageant qui correspond à la fraction SDS et qui contient les protéines membranaires ,
- le culot qui correspond à la fraction pariétale.

Ce dernier est lavé 3 fois dans 10 ml d'eau et le culot est repris dans 500 ml de tampon NaAc 20 mM pH 4,5. Il sera digéré en présence de 100 ml de beta-1,6-glucanase (produite au

1-Lyse cellulaire

Culture d'une nuit + Tampon de lyse



Lysat



centrifugation
à 4000rpm

2-Isolation du cytoplasme et des petits organelles



S4000 : protéines cytoplasmiques et petits organelles



C4000 : membrane plasmique et paroi



SDS +

centrifugation
à 4000rpm

3-Isolation de la membrane



fraction SDS : protéines membranaires



fraction pariétale : solubilisation par la β -(1,6)-glucanase

Figure 16 : Préparation des cellules en vue du Western blot. Cette préparation nécessite 3 étapes où se feront la séparation fractionnelle des différents constituants de la cellule.

laboratoire, Boisramé *et al.* 2009) pendant 3 heures à 37°C puis centrifuger 4 minutes à 4000 rpm. Le surnageant est concentré sur Microcon et la moitié sera traitée par une endoglycosidase H pour éliminer les sucres de la N-glycosylation.

2.5.2- Analyse par Western-blotting

Après migration sur gel d'acrylamide à 10% en conditions dénaturantes, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond, GE Healthcare). Le transfert s'effectue dans un appareil de transfert à 400 mA pendant une heure dans un tampon de transfert (Towbin *et al.*, 1979). La membrane est ensuite bloquée dans 10 ml de TBS Tween (0,05%) EDTA (0,186%) + lait (5%) pendant une heure. L'anticorps primaire est ajouté suivant la dilution appropriée dans le tampon TBS Tween (0,05%) EDTA (0,184%) + Lait Réglait (5%) puis incubé sous agitation pendant une heure. La membrane est ensuite lavée trois fois par du TBS Tween EDTA. L'anticorps secondaire, conjugué avec la peroxydase, (IgG anti-lapin, GE Healthcare), est ajouté à la membrane, dilué au 1/10000ème dans du TBS Tween (0,05%) EDTA (0,184%) + Lait Réglait (5%). La révélation s'effectue par chimioluminescence à l'aide du kit ECL (ECL Western Blotting reagents, GE Healthcare) suivant les instructions du fabricant et de films autoradiographiques (Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

2.5.3- Localisation par immunofluorescence

Les cellules ont été fixées dans 1/8e 37% formaldéhyde pendant 40 minutes et après lavages en PBS, elles sont ajoutées à des lames recouvertes de poly-lysine puis bloquées dans du PBS + 0,5% de BSA et incubées en présence d'anticorps monoclonaux anti-V5 couplés au

Cy3 (Sigma) 4 μ g/ml dans du PBS + 0,5% BSA pendant 1 heure dans le noir. Après des lavages dans le PBS, le DAPI est ajouté puis rincé avant l'étape de montage.

III. Résultats

Chapitre 1 : Analyse génétique de la famille *IFF* chez *Candida albicans*

1.1- Introduction

La première étape de ce travail de thèse portait sur une analyse des séquences protéiques des Iffs. Nous verrons dans une première partie que cette étude nous a amenés dans un premier temps à séquencer deux gènes : *IFF1* et *IFF10*. Nous avons vérifié *in silico* la prédiction d'un ancrage GPI pour ces nouvelles séquences, puis nous avons localisé certaines protéines Iffs. Enfin, nous avons étudié la conservation de ces Iffs dans d'autres génomes de levures hémiascomycètes.

1.2- Séquençage des gènes *IFF1* et *IFF10*

Les gènes de la famille IFF sont tous annotés dans la base de données en ligne CGD www.candidagenome.org. Dans la version 19, la famille comprend 12 membres, les gènes *IFF1* à *IFF11* et le gène *HYR1*, précédemment décrit comme induit par la morphogenèse en hyphe.

Deux de ces séquences nous ont pourtant interpellés. Cela nous a amenés à les séquencer à partir de notre souche de référence BWP17 (**Figure 17**).

Pour *IFF1* (orf19.5124), la version 19 de CGD avait fusionné deux contigs provenant du génome de la souche WO-1 (isolat clinique sans rapport avec SC5314 utilisée pour le reste

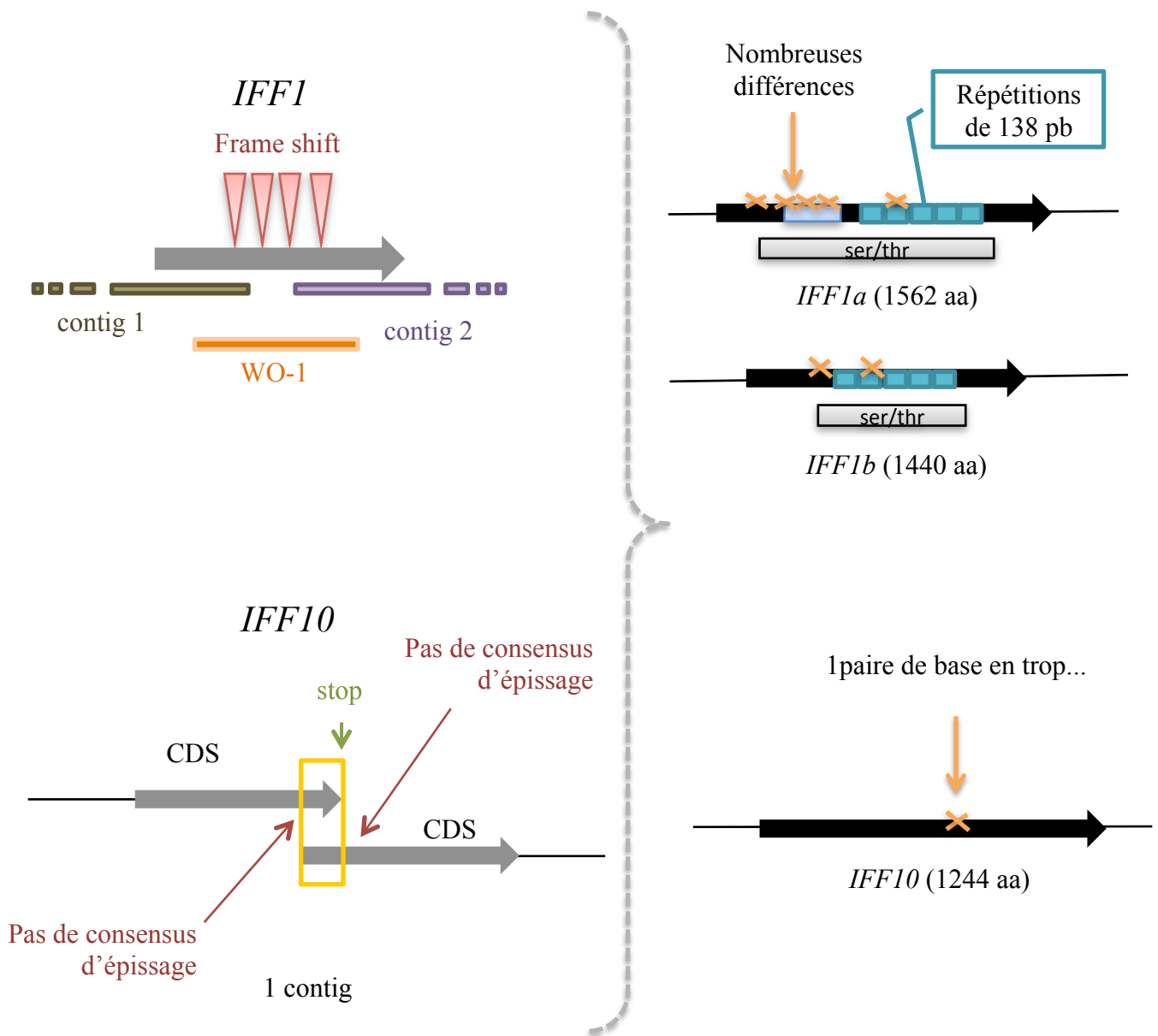


Figure 17 : Séquençage des gènes *IFF1* et *IFF10*. La nouvelle séquence du gène *IFF10* ajoute une thymine qui supprime le codon stop et rétablit la phase de lecture avec l'ORF en aval. Cela nous donne une séquence pour *IFF10* qui est plus longue et qui sera prédite pour coder une protéine à ancre GPI. Le gène *IFF1* possède quant à lui deux allèles de tailles différentes ce qui a posé des problèmes de séquençage dans <http://www.candidagenomedatabase.org/>.

du séquençage). A cet endroit, plusieurs « frame shifts » avaient été introduits pour décaler le cadre de lecture et ainsi conserver la phase. Le séquençage a révélé une ORF continue et plusieurs substitutions. Nous avons trouvé des séquences répétées d'environ 138 pb au centre de l'ORF. Nous avons de plus établi qu'il existait deux allèles de tailles différentes avec une différence de 366 nucléotides au niveau de la région riche en sérine et thréonine.

Quant à *IFF10* qui correspondait à une petite orf19.5404 de la version 19, le séquençage a inséré une base Thymine qui a permis de changer la phase de lecture, et ainsi d'éliminer le codon stop de l'orf19.5404. Celle-ci a alors été fusionnée en phase avec l'orf19.5401 chevauchante en aval, rétablissant ainsi pour *IFF10* une séquence longue avec une région riche en sérine et thréonine plus importante. Nous verrons plus loin que cette nouvelle séquence porte les motifs de prédiction d'un ancrage GPI.

1.3- Alignement des séquences protéiques des Iffs.

Les protéines Iffs ont pour caractéristique la ressemblance avec le produit du gène *HYR1*, à l'origine de cette famille et le premier à avoir été décrit. Nous avons réalisé un alignement de la séquence en acides aminés des 12 protéines Iffs. Sur ces séquences nous avons positionné les zones riches en sérine, thréonine, glycine et asparagine grâce au logiciel de prédiction de glycosylations disponible sur le site ExPASy (<http://www.expasy.org/prosite/>).

En analysant cet alignement protéique (**Figure 18**) on remarque une zone d'environ 350 acides aminés N-terminaux fortement conservée qui définit la famille *IFF* (**Figure 19**). Cette région conservée ne présente aucune homologie avec des domaines fonctionnels connus et pourrait donc être à l'origine d'une spécificité protéique chez *C. albicans*. Cette zone précède une région peu conservée et de longueur variable, riche en sérines et thréonines. Ces acides aminés prédisent une forte O-glycosylation de ces protéines. La séquence se termine par une région C-terminale courte et de longueur variable entre les Iffs, prédite dans la littérature pour porter le plus souvent (sauf dans le cas d'Iff7 – mais voir plus bas) un motif



Figure 18 : Alignement de la séquence protéique des Iffs avec prédiction des zones de glycosylation (Sérine ou Thréonine). La partie N-terminale (aa 340 – 350) est très conservée (voir Figure 19) et suivie d'une zone riche en sérine (en violet) et thréonine (orange) de longueur variable. La protéine se termine par une courte séquence C-terminale de longueur variable (d'après Scan Prosite : <http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>).

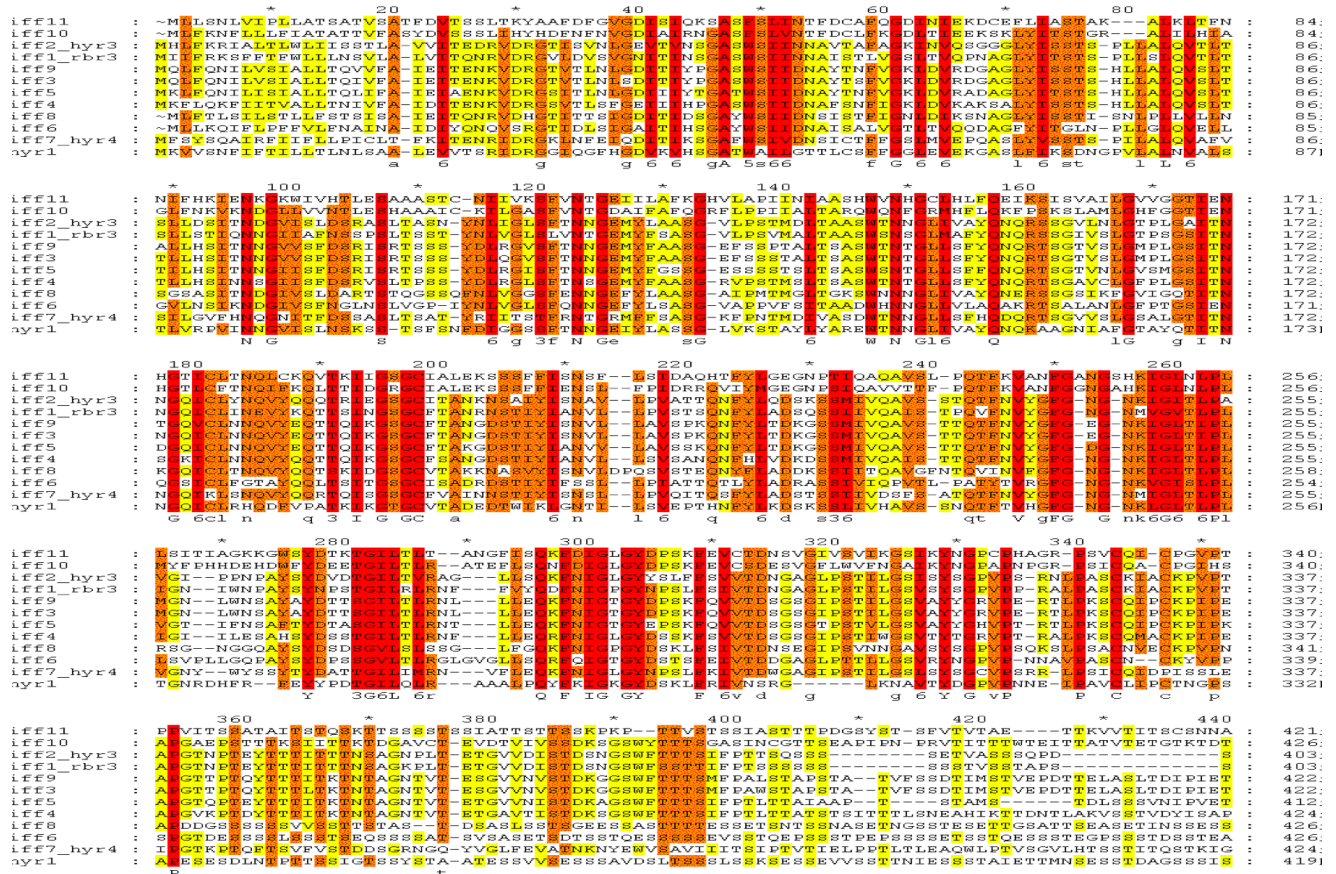


Figure 19 : Alignement de la zone de similarité des Iffs. Voici un alignement des 440 premiers acides aminés de la séquence des Iffs réalisé avec GenDoc. Les 350 premiers acides aminés montrent une très forte conservation entre eux. C’est la base de la famille Iff. Le pourcentage d’homologie est marqué par un gradient de couleur : rouge (100%), orange (80%) et jaune (60%). le consensus est noté par des chiffres : 1 (DN), 2 (EQ), 3 (ST), 4 (KR), 5 (FYW) et 6 (LIVM).

d'attachement d'ancre GPI. Pour aligner les Iffs entre elles, nous avons réalisé des alignements qui ont été nettoyés de deux façons différentes. L'un manuellement (**Figure 20a**) avec GeneDoc et l'autre automatiquement (**Figure 20b**) avec GBlocks. Cela a généré dans le premier cas 322 positions alignées et dans l'autre 294 positions. Les arbres (NJ plot) ont le même profil et suggèrent des relations de proximité relativement sûres et d'autres incertaines. Tout d'abord nous pouvons conclure que des duplications successives ont mené aux gènes Iff4, puis Iff5 puis Iff3 et Iff9. Cependant il reste une incertitude concernant leur ancêtre ainsi que celui des gènes Iff1, Iff2, Iff6 et Iff8. Les valeurs de bootstrap sont si faibles que nous ne pouvons ordonner ces Iffs les uns par rapport aux autres. Ces arbres nous suggèrent fortement que l'évènement le plus ancien au sein de la famille concerne Iff10 et Iff11 : celles-ci semblent avoir divergé les premières par rapport au reste de la famille, lors d'un premier évènement de duplication survenu chez leur ancêtre commun.

Nous avons ensuite voulu savoir si cette famille était présente chez d'autres champignons, et dans quelle mesure elle était conservée.

1.4- Répartition des IFF chez quelques champignons.

La recherche d'orthologues des gènes *IFF* chez tous les eucaryotes a produit l'arbre présenté **figure 21**. Deux principales conclusions peuvent découler de son examen. Tout d'abord, les seuls eucaryotes qui possèdent des orthologues des *IFF* dans leur génome sont les espèces très proches de *C. albicans*, c'est à dire *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* et *Lodderomyces elongisporus* (non représentées ici). La présence d'orthologues chez *Pichia stipitis* montre que cette famille peut aussi être présente chez des espèces non pathogènes pour l'homme. On ne retrouve pas par contre d'orthologues dans les génomes de *Debaryomyces hansenii* ou de *Pichia farinosa*, suggérant que cette famille a été perdue par certaines espèces du clade des levures CTG (**Figure 22**).

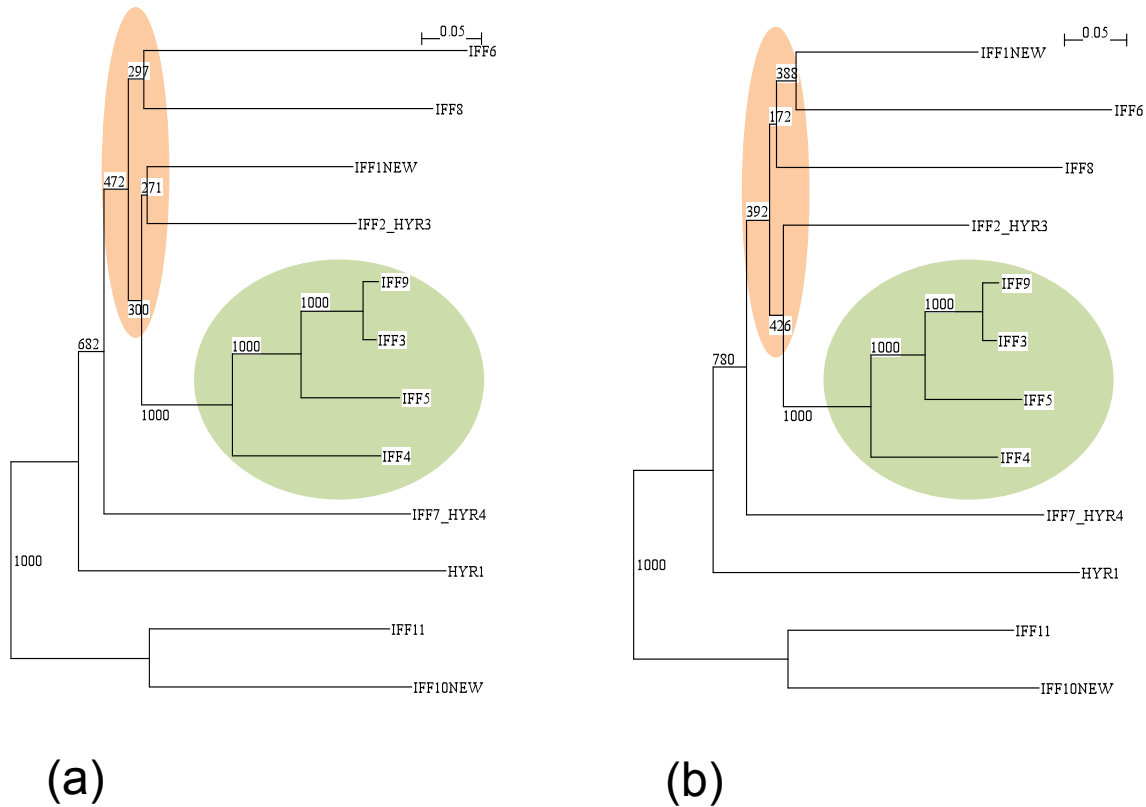


Figure 20 : Evolution des Iffs. Les arbres ont été réalisés à partir d'alignements nettoyés à l'aide de deux logiciels différents. (a) Alignement réalisé avec Clustal X puis correction manuelle des gaps avec GeneDoc aboutissant à 322 aa. (b) Alignement automatique réalisé avec Muscle puis correction des gaps avec Gblocks (taille minimale des blocs de 8) générant 294 aa. Les arbres sont réalisés par CLustalX avec NJplot + 1000 permutations. Comme démontré par ces deux arbres qui ont le même profil, l'origine des protéines Iff4, Iff5, Iff3 et Iff9 semble probable. Par contre il existe une très forte incertitude concernant l'évolution des protéines Iff1, Iff2, Iff6 et Iff8 (valeurs de bootstrap faibles entourées en orange).

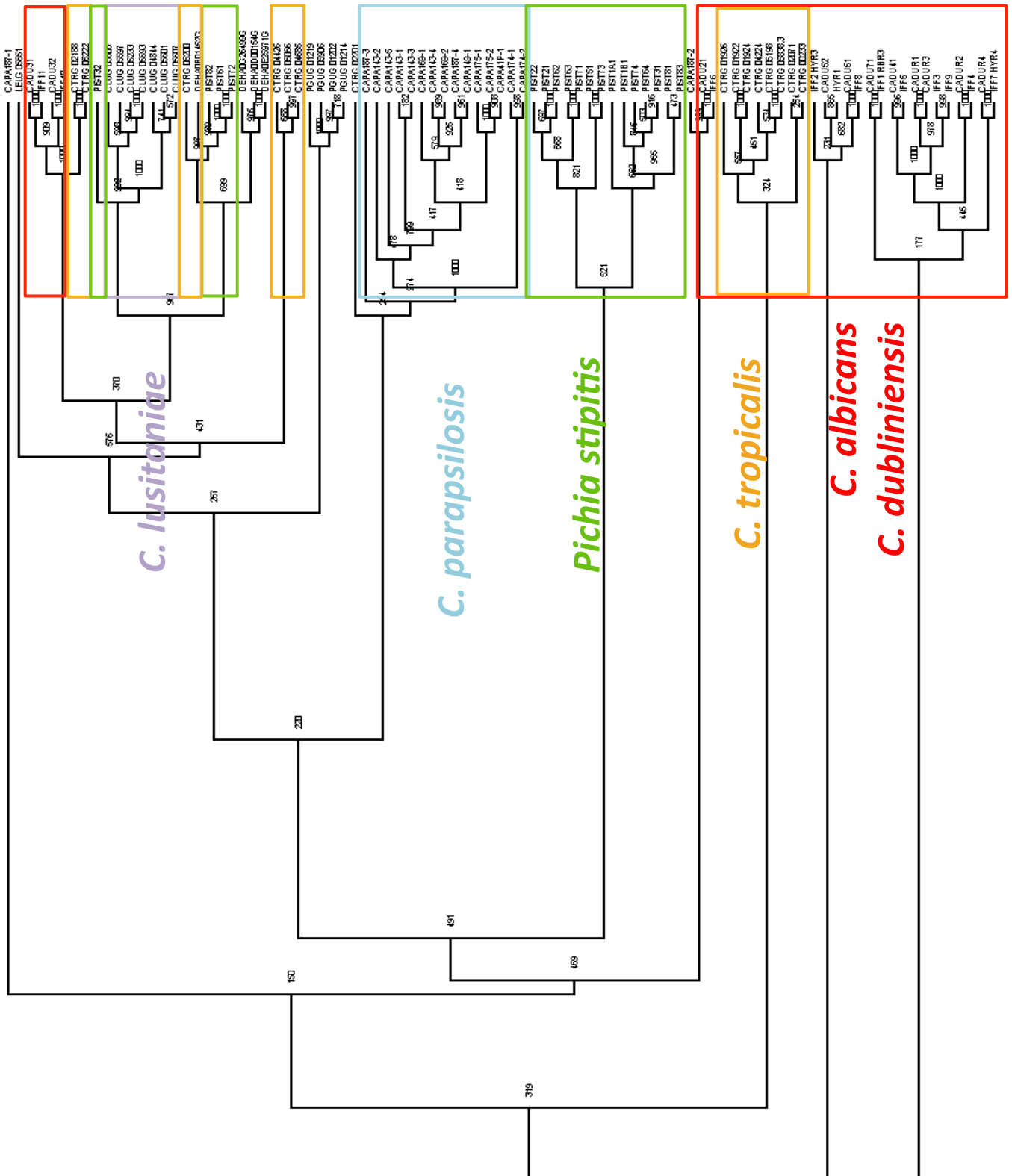


Figure 21 : Arbre phylogénétique représentant la répartition des orthologues des *IFF* chez les eucaryotes. On en trouve uniquement chez les espèces proches phylogénétiquement de *C. albicans*.

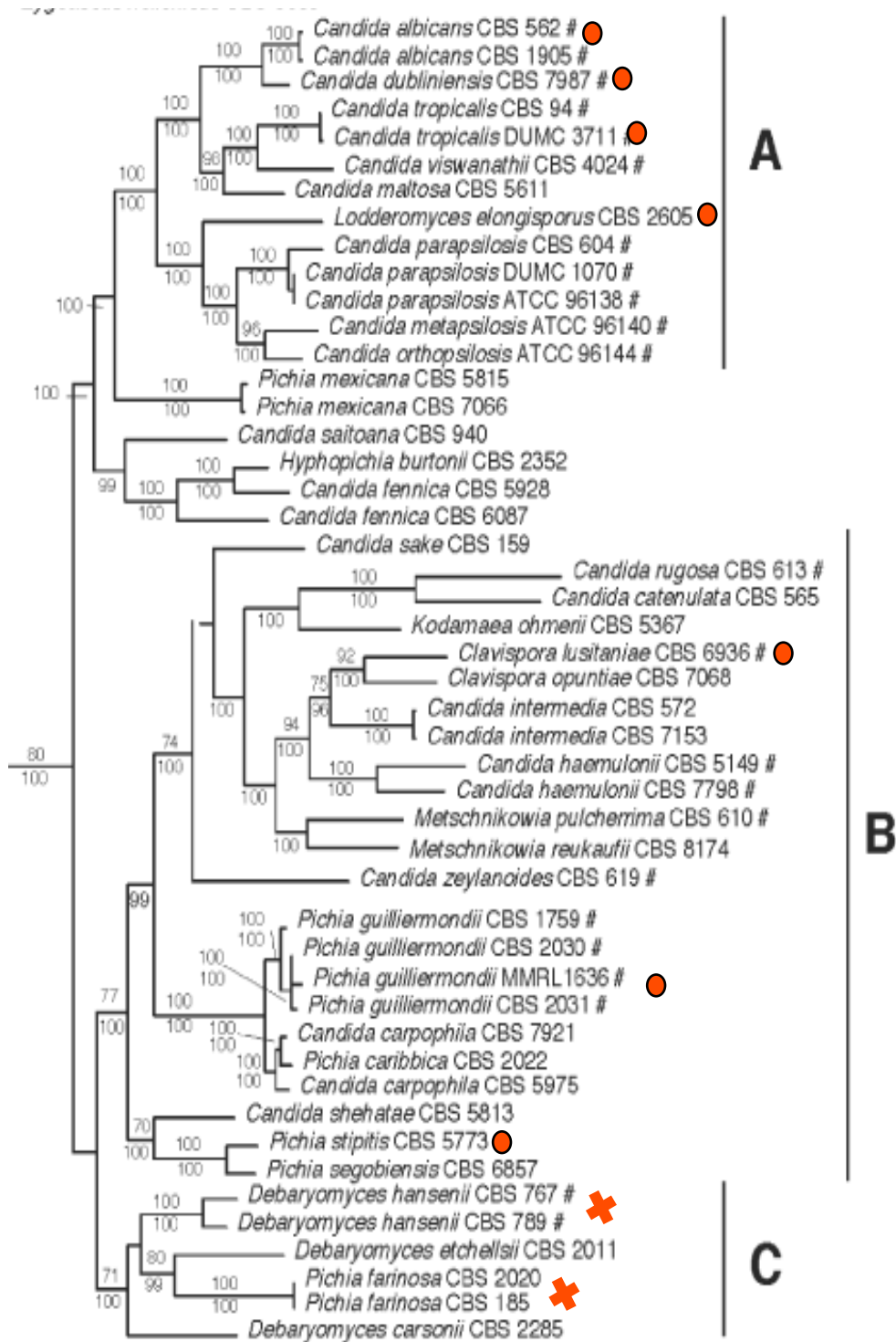


Figure 22 : Distribution des familles de gènes *IFF* parmi les espèces du clade CTG.

Chez les espèces dont nous avons la séquence, la présence de la famille *IFF* est indiquée par une pastille rouge, l'absence par une croix rouge. L'arbre des levures du clade CTG est extrait de la publication Tsui *et al.*, 2008.

Deuxièmement, en regardant plus en détail, on remarque que les gènes *IFF* d'une même espèce sont regroupés. On aurait en effet pu avoir un regroupement des gènes par type d'Iff mais ce n'est pas le cas. Cela suggère donc que la famille aurait évolué après la spéciation, sauf dans le cas du couple *C. albicans/C. dubliniensis* qui a divergé récemment.

1.5- Prédiction in silico de l'ancrage GPI

Les études de prédiction de l'ancrage GPI et de localisation des protéines Iffs ont été réalisées grâce à une collaboration avec Anita Boisramé.

Suite à l'obtention de leurs nouvelles séquences, nous voulions savoir si les deux protéines Iff1 et Iff10 pouvaient porter un motif d'ancrage GPI et aussi visualiser les signaux d'adressage et d'ancrage des autres Iffs prédits par la littérature. Cette étude *in silico* a été réalisée en regroupant plusieurs informations données par différents logiciels disponibles dans différents sites notamment sur un site danois proposé dans ExPASy ou sur des sites comme GPI-SOM, big-PI et PredGPI pour la prédiction de l'ancre et du site Omega :

- Prédiction de la séquence signal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Cette séquence signal amino-terminale est commune aux bactéries et aux eucaryotes et permet chez ces derniers l'envoi de la protéine au réticulum endoplasmique, première étape de la voie de sécrétion.
- Prédiction de domaines transmembranaires (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> et <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>). Ce domaine constitue un segment transmembranaire hydrophobe permettant à la protéine de s'ancrer dans la membrane du réticulum. Il mesure au minimum 20 acides aminés mais, lorsqu'il ne mesure que 15 acides aminés et qu'il n'est pas très hydrophobe, il peut faire partie du signal d'ancrage GPI et être clivé pour permettre l'attachement de la protéine sur l'ancre.

- Prédiction des sites de N-glycosylations (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).
On recherche des motifs Asn-X-Thr/Ser, car la N-glycosylation s'effectue sur l'Asn.
- Prédiction des sites de O-glycosylation (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) :
On recherche des régions riches en sérines et thréonines car elles sont le lieu des O-glycosylation.
- Prédiction d'une ancre GPI par GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>) ou par big-PI (http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html). Ces logiciels prédisent une ancre GPI par des méthodes différentes.

Protéine	Peptide signal	N-glycosyl.	O-glycosyl.	Domaine hydrophobe	Site ω	Taille totale (aa)
Iff1	+(20-21)	3/8 sites	200	? 1541-1561	1539	1562
Iff2	+(20-21)	11/40 sites	160	? 1228-1248	1224	1249
Iff3	+(20-21)	1/5 sites	32	Non (12)	? 918	941
Iff4	+(20-21)	0/3 sites	4	? 1506-1525	1501	1526
Iff5	+(20-21)	1/10 sites	31	? 1287-1307	? 1286	1308
Iff6	+(19-20)	7/21 sites	181	? 1065-1085	? 1064	1086
Iff7	+(20-21)	2/12 sites	6	+ 1202-1224	Pas de GPI	1225
Iff8	+(19-20)	2/6 sites	134	Non (6)	? 688	714
Iff9	+(20-21)	0/9	34	Non (12)	? 918	941
Iff10	+(19-20)	2/8 sites	66	? 1223-1243	? 1219	1244
Iff11	+(19-20)	1/1 site	48	Non	Pas de GPI	511
HYR1	+(20-21)	9/13 sites	53	? 899-918	895	919

Tableau 3 : Prédiction *in silico* d'un ancrage GPI.

Le site danois (CBS) a permis de rechercher la séquence signal, les sites de glycosylation et le domaine hydrophobe. Le site Oméga a été recherché sur PredGPI. Les « ? » indiquent que tous les programmes cités dans ce paragraphe ne prédisent pas tous la même chose. Le site de clivage du peptide signal s'il est présent (+) est indiqué dans la colonne "Peptide Signal" et la position du site de coupure du précurseur est indiquée entre parenthèses. Deux chiffres sont donnés pour les sites de N-glycosylation : le 1^{er} correspond aux sites à très forte probabilité, le second aux sites possibles. On a indiqué dans la colonne « Domaine hydrophobe » la prédiction pour un domaine transmembranaire (« ? » Si peu probable, « Non » si <20 acides aminés avec entre parenthèse le nombre d'acides aminés hydrophobes, « + » si présent) et la position de la séquence hydrophobe C-terminal quand elle existe.

Toutes les protéines sont prédites pour être dirigées sur la voie de sécrétion. Iff4 et 7 sont prédites pour être plus faiblement glycosylées que les autres protéines de la famille. Seules Hyr1, Iff1, Iff2 et Iff4 rassemblent clairement toutes les caractéristiques attendues pour une protéine à ancre GPI. Iff7 est prédite pour comporter un domaine transmembranaire (c'est le seul qui soit validé par TMHMM) et pourrait donc être ancrée directement dans la membrane par ce domaine, malgré la prédiction d'un ancrage GPI par big-PI et GPI-SOM, mais non retenu par PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>) décrit comme un bon prédicteur (Pierleoni, 2008). Iff5, 6 et 10 semblent elles aussi de bonnes candidates pour porter une ancre GPI, bien que big-PI les classe en-dessous du seuil de validation pour le site Omega ; elles sont cependant retenues par GPI-SOM et par PredGPI. L'absence de domaine hydrophobe terminal dans le cas d'Iff3, 8 et 9, associée à une probabilité de présence du site Omega faible pour big-PI mais forte pour PredGPI (>99%) suggère que la localisation de ces protéines (sécrétées ou solubles) doit être confirmée expérimentalement. Enfin GPI-

SOM, big-PI et PredGPI ne prédisent pas l'existence d'un site Omega, ce qui est en accord avec les résultats publiés indiquant qu'Iff1 est une protéine sécrétée (Bates, 2007).

1.6- Localisation in vitro des protéines Iffs.

Nous avons localisé ces protéines chez des souches exprimant chaque Iff sous contrôle du promoteur fort *pACT1* et en fusion avec une étiquette V5 pour la détection par Western-blot (voir Matériel et Méthodes). Ces souches surexpriment les protéines Iffs sans quoi on ne pourrait pas les visualiser puisque elles sont exprimées à un niveau indétectable dans nos conditions (voir Chapitre 4).

Des préparations de paroi de ces différentes souches ont été traitées au SDS en présence de β -mercaptoéthanol et à 100°C pour les débarrasser des protéines non attachées de façon covalente et des protéines membranaires. Après digestion par une β -(1,6)-glucanase (extrait les protéines liées aux β -(1,6)-glucanes) ou à la fois par une β -(1,6)-glucanase et une endoglycosidase-H (élimine les N-glycosylations), les protéines libérées sont séparées sur gel et mises en évidence par un anticorps anti-V5. Les résultats présentés sur la **Figure 23** indiquent que les protéines Iff3, Iff5, Iff6 et Iff8 se retrouvent dans la fraction pariétale digérée par la β -(1,6)-glucanase et bien que ce test ne soit pas quantitatif, on peut constater un changement de poids après un traitement par l'endoglycosydase H. Ce sont donc toutes des protéines pariétales.

La protéine Iff2 a quant à elle été localisée dans la membrane (**Figure 24**). Pourtant la localisation par immunomarquage sans étape de perméabilisation de la paroi nous permet tout de même de la localiser à la surface. Une hypothèse pour expliquer cela serait que sa conformation serait liée à sa forte glycosylation qui l'étirerait jusqu'en surface. Cette expérience réalisée sur Iff2 sera par la suite étendue à toutes les protéines Iffs de cette étude.

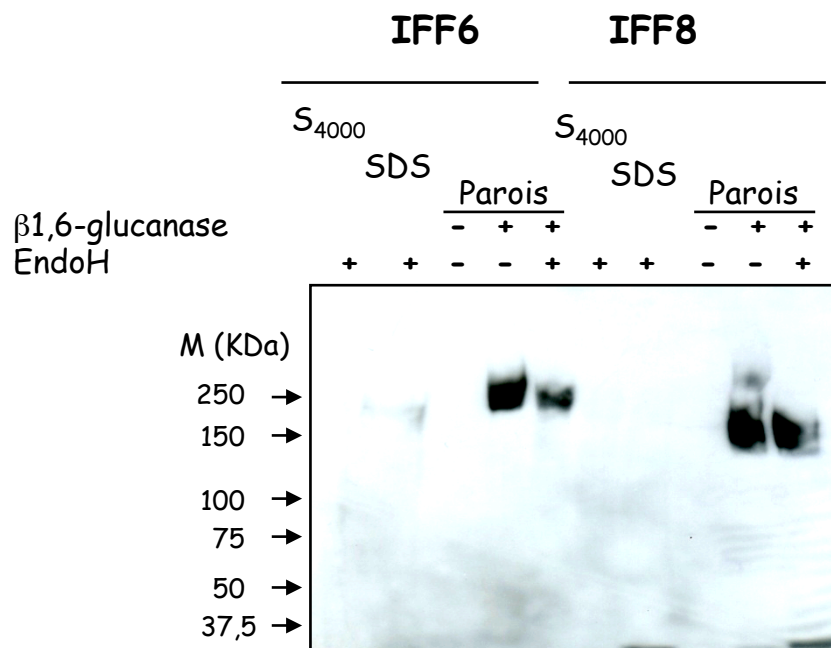
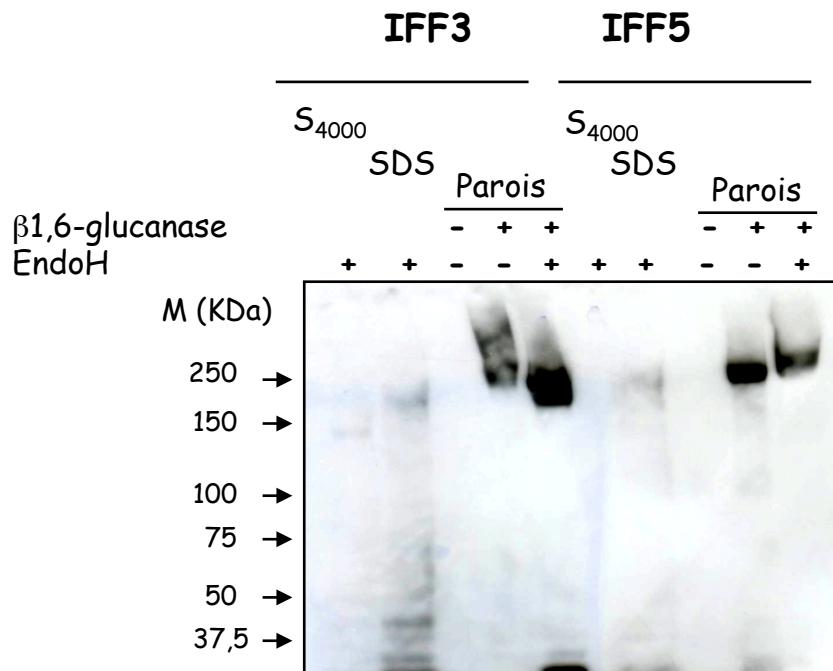
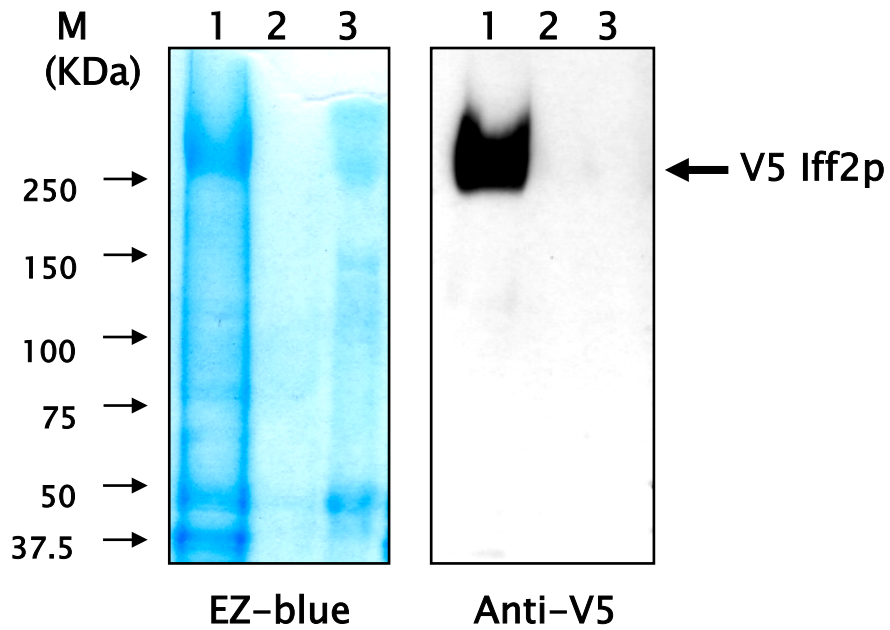
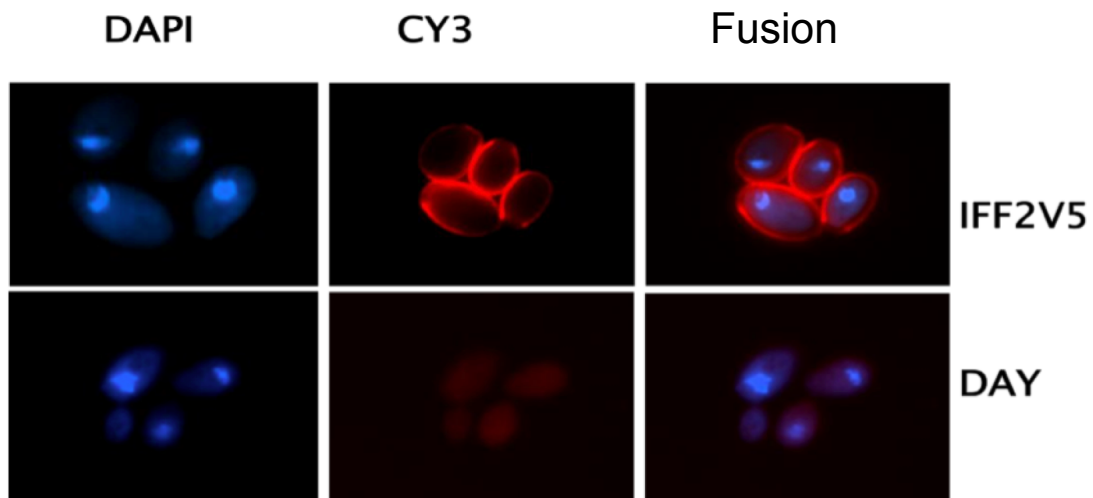


Figure 23 : Western blot des souches de surexpression d'*IFF3*, *IFF5*, *IFF6* et *IFF8*. Dans les puits se trouvent de gauche à droite, la fraction S4000 (protéines cytoplasmiques et petits organelles), la fraction SDS (protéines membranaires), la fraction Paroi seule, la fraction paroi digérée par la β-1,6-glucanase (protéines à ancre GPI) et la fraction paroi digérée par l'endoglycosydase H (élimination de la N-glycosylation).



(a)



(b)

Figure 24 : Localisation de la protéine Iff2 portant un tag V5. (a) Western blot de la souche de surexpression d'IFF2. Dans les puits se trouvent de gauche à droite, la fraction S4000 (protéines membranaires et pariétales attachées par des liaisons non-covalentes), la fraction Paroi seule et la fraction paroi digérée par la β -1,6-glucanase (protéines à ancre GPI). (b) Immunofluorescence des cellules surexprimant la protéine Iff2 portant un tag V5. Aucun traitement préalable de perméabilisation de la paroi n'a eu lieu. Donc ici nous visualisons en rouge les protéines localisées en surface.

Conclusion

Les prédictions phylogénétiques ne permettent pas d'enraciner l'arbre. Par contre, elles nous montrent qu'*IFF10* et *IFF11* sont ceux qui ont le moins subi d'événement de duplication, et que d'un autre côté *IFF4*, *IFF5*, *IFF3* et *IFF9* sont issus d'un ancêtre commun. Cette famille génique se retrouve chez les espèces proches de *C. albicans* et semble être plutôt spécifique des espèces pathogènes, ce qui justifie que nous approfondissions son étude.

La somme des prédictions *in silico* nous donne une information qui n'est pas fiable à 100%. Il était donc nécessaire d'effectuer des tests biochimiques. Nous avons donc confirmé que les protéines Iff3, Iff5, Iff6 et Iff8 sont pariétales, alors qu'Iff2 est membranaire (**Figure 25**). Ces observations directes de localisation sont systématiquement en accord avec les prédictions de PredGPI ce qui nous permet de penser que c'est un logiciel de prédiction plus fiable que GPI-SOM ou big-PI. Les tests de localisation par immunofluorescence ont par ailleurs permis de préciser que bien qu'étant membranaire, *IFF2* était accessible par l'anticorps anti-V5 en surface, comme montré par le témoin Iff2-V5 Δ sans sa partie centrale, cela semble être lié à sa glycosylation. Les sucres feraient un espace autour de la protéine, permettant l'accès de l'anticorps anti-V5 jusqu'à la partie N-terminale portant le tag V5. Pour compléter cette étude il reste à cloner et localiser les protéines Iff1, Iff4, Iff7, Iff9 et Iff10.

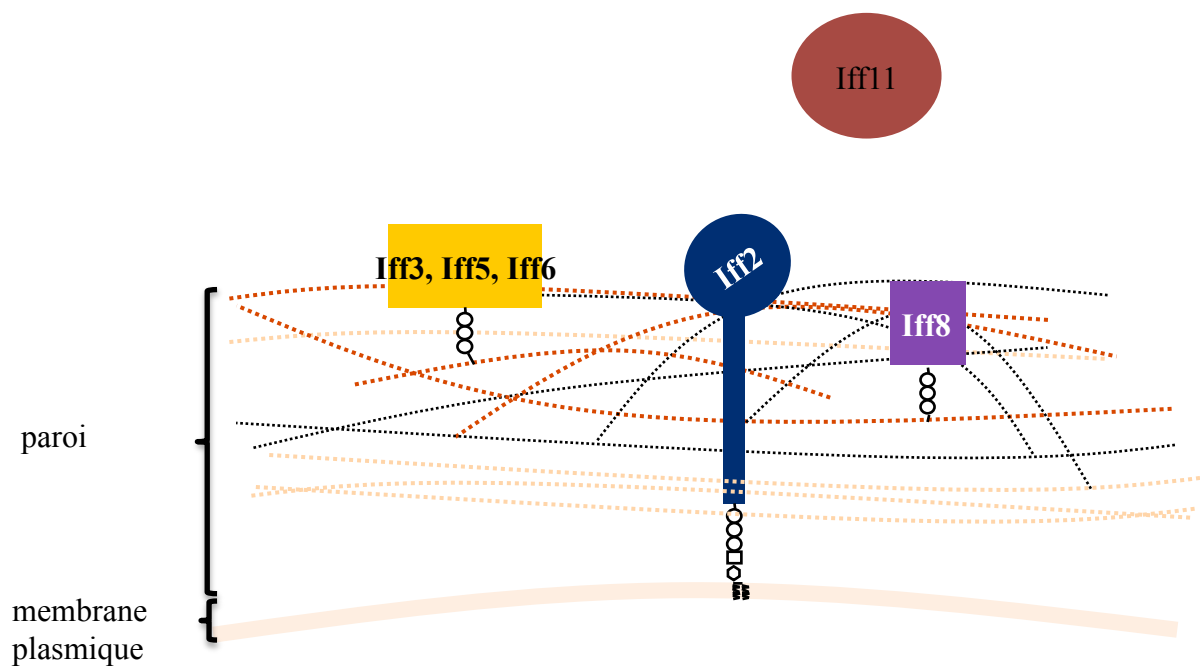


Figure 25 : Schéma récapitulatif de la localisation des protéines Iffs : 3 cas possibles.

La localisation d'Iff11 provient de la publication Bates *et al.* (Bates *et al.*, 2007). Les protéines Iff2, Iff3, Iff5, Iff6 et Iff8 ont été localisé par Western blot lors de cette étude. Iff3, Iff5 et Iff6 sont des protéines pariétales. Iff8 est une protéine pariétale qui n'affleure pas la surface cellulaire tandis que la protéine Iff2 est membranaire mais cependant sa structure lui permet d'affleurer la surface.

Chapitre 2: Création des mutants *iff*^{-/-}

2.1 Introduction

La deuxième partie de ce travail consistait à obtenir la banque complète de mutants homozygotes *iff*^{-/-} chez le diploïde strict *C. albicans*.

Alors que la manipulation génétique chez *S. cerevisiae* est aisée, l'absence de cycle sexuel complet chez *C. albicans*, la diploïdie, les faibles fréquences de transformation et l'existence d'un code génétique alternatif compliquent l'utilisation des outils moléculaires.

- Une méthode d'interruption par « Ura-blaster », basée sur l'utilisation d'une cassette recyclable *URA3*, a été développée il y a une quinzaine d'année pour permettre la transformation séquentielle d'une souche auxotrophe pour l'uracile (Fonzi & Irwin, 1993). Si cette méthode présente l'avantage de permettre la création de mutants multiples, elle nécessite toutefois la régénération de son marqueur en ajoutant dans le milieu de l'acide 5-Fluoroorotique (5-FOA). Ce dernier est transformé en 5-Fluorouracile qui est toxique pour les cellules exprimant le gène *URA3* et permet donc de sélectionner des révertants Ura⁻.

- Une autre méthode plus rapide a été développée par la suite. Elle repose sur l'utilisation d'une cassette UAU1. Cette cassette apporte potentiellement deux marqueurs de sélection (*ARG4* et *URA3*) puisqu'elle porte le gène *ARG4* entouré des régions 3' et 5' du gène *URA3*. Elle est insérée par double recombinaison homologue à la place d'un allèle en sélectionnant le phénotype Arg⁺, puis l'hétérozygote obtenu pourra devenir homozygote pour le gène cible par homogénéisation de l'allèle marqué par la cassette UAU1. L'excision de *ARG4* d'un des deux allèles permet alors de restaurer un phénotype Ura⁺ et de sélectionner l'inactivation du

second allèle, après une seule étape de transformation de *C. albicans* (Enloe *et al.*, 2000). Le problème de cette méthode est que nous ne maîtrisons pas complètement les événements de recombinaison. En effet elle sélectionne les transformants pour lesquels une conversion de gène, un double crossing-over ou une erreur de ségrégation lors de la mitose a rendu la souche homozygote pour la cassette de disruption.

- Pour éviter les mutations aléatoires obtenues avec le système précédent, un système de transformation basé sur la PCR a été développé sur le modèle de ce qui se fait chez *S. cerevisiae*. L'utilisation de la souche triple auxotrophe BWP17 [*ura3*⁻, *his1*⁻, *arg4*⁻] permet de générer des doubles mutants simplement après deux étapes de transformations successives, sans passer par l'étape de régénération d'un marqueur de sélection unique. Nous avons donc choisi d'utiliser cette dernière méthode que nous décrivons plus en détail dans la partie Matériel et Méthodes.

Un problème commun à toutes ces techniques apparaît cependant lors de l'utilisation *in vivo* de ces mutants puisque l'auxotrophie pour l'uracile affecte l'adhérence de *C. albicans* sur tissus humains, ainsi que sa virulence dans un modèle d'infection systémique chez la souris (Bain *et al.*, 2001; Lay *et al.*, 1998). La mauvaise expression du gène *URA3* à un locus ectopique ou dans un environnement défavorable (Sharkey, 2005) pose donc un problème pour les méthodes de disruption utilisant *URA3* comme marqueur de sélection. Cela peut toutefois facilement être résolu par l'ajout d'Uridine dans le milieu ou par la réintégration du gène *URA3* au locus *RPS10* qui permet une forte expression d'*URA3* (Brand, 2004).

2.2 Transformation basée sur un produit de PCR Jumbo.

Les cassettes d'interruption ont été construites par PCR Jumbo comme détaillé dans la partie Matériel et Méthodes. Parfois, plusieurs transformations ont été nécessaires avant d'obtenir des clones positifs. Lorsque cela était possible, 32 clones ont été réisolés puis vérifiés après chaque étape (transformation par la cassette *ARG* et sélection pour la cassette

URA) par PCR sur colonies. Au moins 3 clones positifs en PCR ont été conservés à -80°C. Pour chaque gène, nous avons construit des homozygotes (**Tableau 4**) à partir de deux hétérozygotes distincts pour pouvoir comparer par la suite deux mutants indépendants.

Mutants	chromosome	génotype	Origine
<i>iff1</i> -/-	Chr 7	Homozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17
<i>iff2</i> -/-	Chr 5	Homozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17
<i>iff3</i> -/+	Chr R	Hétérozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17 système Tet-Off
<i>iff4</i> -/-	Chr R	Homozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17
<i>Iff5</i> -/-	Chr4	Homozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17
<i>iff6</i> -/-	Chr 2	Homozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17
<i>iff7</i> -/-	Chr R	Homozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17
<i>iff8</i> -/-	Chr 5	Homozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17
<i>iff9</i> -/+	Chr R	Hétérozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17 système Tet-Off
<i>iff10</i> -/-	Chr 3	Homozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17
<i>iff11</i> -/-	Chr 3	Homozygote [His-, Arg+, Ura+]	BWP17

Tableau 4 : banque des mutants *iff*-/- construits pour ce travail.

On notera que les disruptants homozygotes d'*IFF1* ont été obtenus sans difficulté, infirmant ainsi l'annotation de CGD: "possibly an essential gene, disruptants not obtained by UAU1 method" (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=IFF1>).

2.3 Analyse des mutants

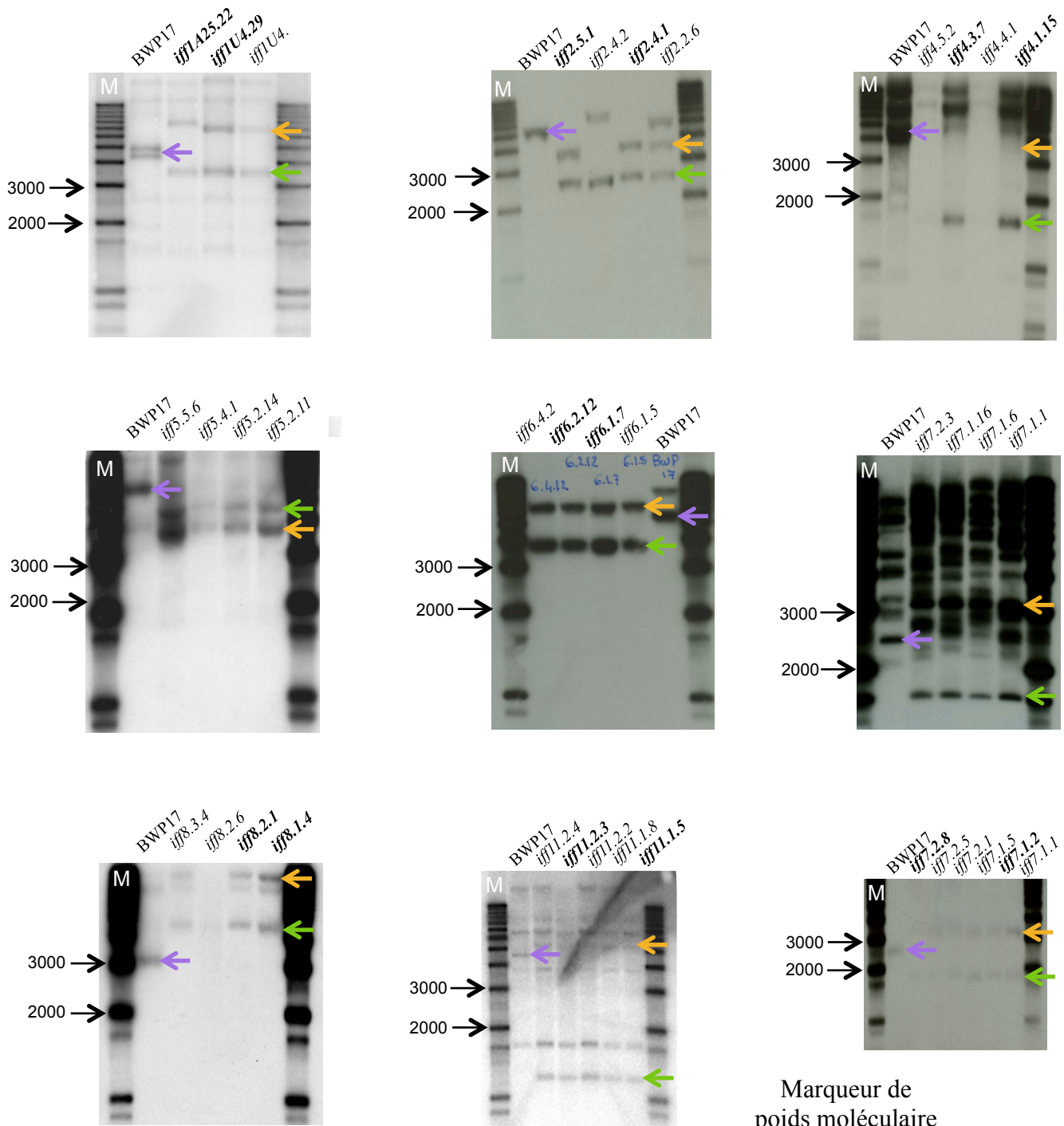
2.3.1. Vérification du génotype par Southern blot

Nous avons ensuite vérifié par Southern blot entre 4 et 5 mutants homozygotes pour chaque gène. Les enzymes utilisées lors de la digestion d'ADN génomique ainsi que la taille des bandes attendues après révélation du Southern blot sont présentées dans le **tableau 5** et les gels sont dans la **figure 26**.

mutant	enzyme de restriction	allèle sauvage	allèle <i>ARG4</i>	allèle <i>URA3</i>
<i>iff1</i> ^{-/-}	<i>HindIII</i>	2901 ou 3270 pb	2246 pb	5271 pb
<i>iff2</i> ^{-/-}	<i>HindIII</i>	5841 pb	2598 pb	3863 pb
<i>iff4</i> ^{-/-}	<i>HindIII</i>	5090 pb	1574 pb	7219 pb
<i>Iff5</i> ^{-/-}	<i>StyI</i>	6629 pb	5076 pb	3929 pb
<i>iff6</i> ^{-/-}	<i>ClaI</i>	5472 pb	2989 pb	3744 pb
<i>iff7</i> ^{-/-}	<i>BstXI</i>	2528 pb	1685 pb	3112 pb
<i>iff8</i> ^{-/-}	<i>HindIII</i>	3180 pb	4654 pb	11531 pb
<i>iff10</i> ^{-/-}	<i>HpaI</i>	1941 pb	1661 pb	2795 pb
<i>iff11</i> ^{-/-}	<i>XbaI</i>	4668 pb	1243 pb	5360 pb

Tableau 5 : Taille attendue dans l'analyse par Southern blot des mutants *iff*^{-/-}. Le gène *IFF1* a deux allèles de tailles différentes, cela ne donne qu'une taille attendue lorsqu'il est interrompu par *ARG4* ou *URA3*.

Cette technique étant assez lourde à mettre en place pour tous ces mutants, nous avons allégé un peu l'expérimentation en utilisant une seule enzyme de restriction et une seule sonde par mutant pour discriminer les trois types d'allèles (voir Matériel et Méthode). Bien que les sondes aient été purifiées sur gel, le Southern-blot des clones *iff7*^{-/-} présente de nombreuses bandes aspécifiques. La membrane a subi une deuxième série de lavage en SSC 2X 1.0% SDS



Marqueur de poids moléculaire

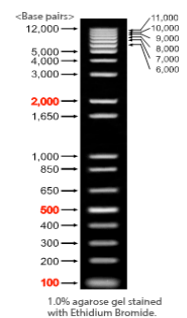


Figure 26 : Vérification du génotype des mutants par Southern-blot. Une seule enzyme de restriction et une seule sonde permettent de discriminer les trois allèles attendus. Cette figure représente les bandes attendues du gène sauvage (violet), remplacé par le marqueur *URA3* (orange) ou par *ARG4* (vert). Les mutants utilisés dans cette étude sont en gras.

mais cela n'a pas enlevé les bandes parasites. Dans certains cas, il a donc fallu recommencer le Southern-blot. Nous avons également commandé de nouvelles sondes, 100 pb plus grandes. Cela a amélioré la qualité des révélations.

Sauf dans le cas des gènes *IFF3* et *IFF9* qui sont détaillés plus loin, des homozygotes mutants ont donc bien été obtenus pour tous les gènes et une première analyse phénotypique de ces souches a été réalisée.

2.3.2. Etude des phénotypes par des tests en gouttes et des tests en milieux liquides

Tests en gouttes

Excepté Iff11 qui est sécrétée (Bates, 2007), Iff2 qui est membranaire et Iff7 qui l'est sans doute aussi d'après les prédictions *in silico*, les autres protéines Iffs sont potentiellement transférables de leur ancre GPI membranaire à la paroi. Elles pourraient donc jouer un rôle dans l'architecture et l'intégrité de la paroi dans ces deux localisations. Pour tester cette hypothèse, la sensibilité des mutants *iff*^{-/-} de *C. albicans* à différents agents perturbant la paroi a été testée en milieu gélosé.

Nous avons utilisé le test en gouttes pour détecter les modifications de la paroi, les réponses aux stress, et les défauts de morphogénèse.

La morphogénèse a été testée sur milieux solides Spider et sérum (5%) à 37°C; les observations ont été effectuées à 2 ou 3 jours.

Les modifications de la paroi ont été testées sur milieu YPD + SDS, YPD + Calcofluor White et YPD + Caspofungine. Ces trois composants permettent de visualiser différents défauts pariétaux. Le SDS pénètre plus facilement une paroi défectueuse, désorganise la membrane plasmique et entraîne la mort de la cellule par fuite des électrolytes. Le CFW est un colorant qui permet de visualiser les levures ayant une anomalie de structure de leur paroi car il entre en compétition avec les β -(1,3)-glucanes pour l'attachement de la chitine ce qui induit la mort cellulaire par choc osmotique. Une souche dont la paroi est défectueuse compense souvent ce

défaut par une augmentation de son taux de chitine pariétale : ces mutants seront donc plus sensibles au CFW. La Caspofungine est un antifongique qui agit en inhibant la fonction de la β -(1,3)-glucane synthase. Si une protéine est impliquée dans la biosynthèse de la paroi, l'absence de cette protéine pourrait désorganiser la paroi provoquant ainsi des effets indirects chez ce mutant comme une plus grande sensibilité à la Caspofungine et à certains stress.

La réponse des mutants à différents stress environnementaux a également été testée, tels que les stress pH (pH3 et pH10) ou le stress oxydatif (sensibilité à H₂O₂).

Les tests en gouttes ont été répétés deux fois sur deux mutants indépendants. Les résultats de l'étude globale des mutants *iff*^{-/-} chez *C. albicans* montrent que les protéines Iffs ne sont impliquées ni dans la morphogénèse, ni dans les réponses aux stress testés, ni dans l'intégrité de la paroi. Par ailleurs des tests de filamentation en milieu liquide de Lee n'ont montré aucun retard, ni hyperfilamentation, ni même d'agrégation des cellules entre elles.

Parfois les clones homozygotes retenus ont montré un phénotype différent. Le mutant *iff8.3.4*^{-/-} a montré une hypersensibilité pour la Caspofungine et le Calcofluor White (**Figure 27**). Les autres clones testés n'ayant pas le même phénotype, il est peu probable qu'une mutation ait pu rétablir le phénotype sauvage chez tous les autres clones. Ces résultats tendent à indiquer que la sensibilité du mutant *iff8.3.4* n'est pas due à l'inactivation du gène *IFF8* mais résulterait d'un effet secondaire de la transformation, comme par exemple l'induction de mutations ou de remaniements chromosomiques lors de la transformation. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en montrant que la complémentation d'*iff8.3.4*^{-/-} par l'allèle sauvage ne modifie pas la sensibilité à la Caspofungine et au Calcofluor White.

Les clones *iff5.2.11*, *iff5.2.14*, *iff5.4.1* et *iff5.5.6* ne présentent pas un phénotype homogène lors des tests en gouttes (**Figure 28**). Dans le doute et par manque de temps, nous avons préféré écarter ce gène et les mutants correspondants de la suite de notre étude.

Tests en milieux liquides

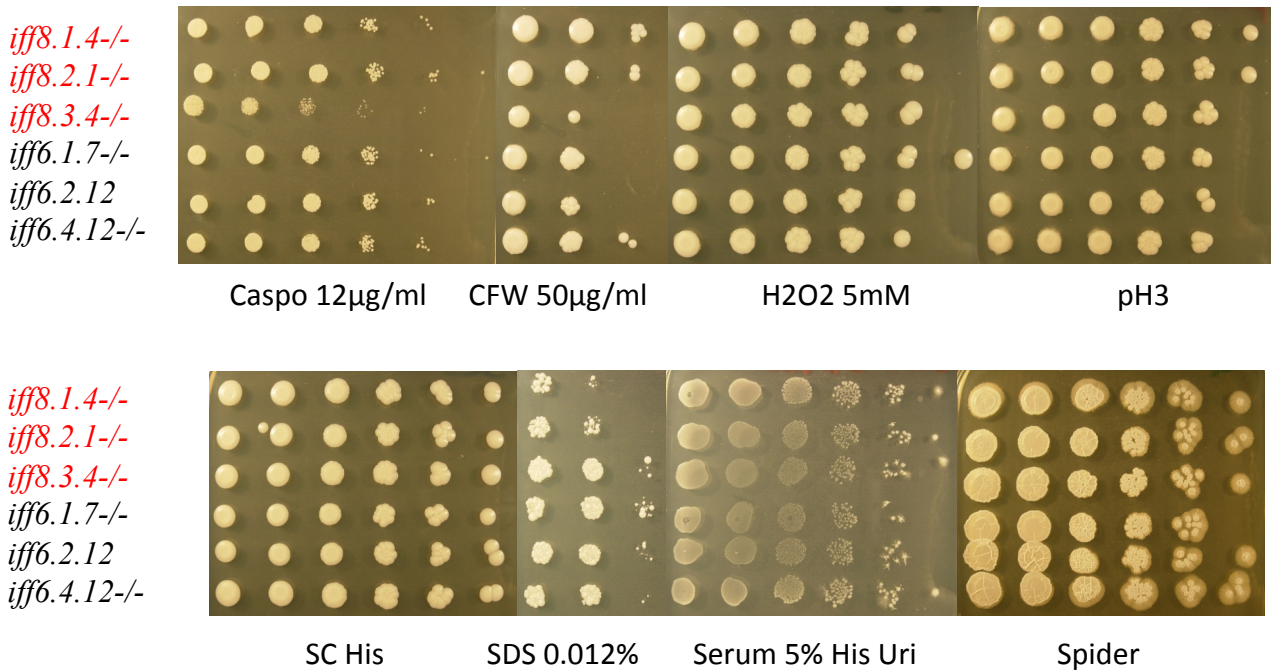


Figure 27 : Analyse du mutant *iff8*^{-/-}. Tous les mutants *iff*^{-/-} ont été analysés en tests en gouttes. Le clone *iff8.3.4*^{-/-} a montré un phénotype sur Caspofungin et Calcofluor White (CFW). Les mutants *iff8.1.4*^{-/-} et *iff8.2.1*^{-/-} semblent être légèrement sensible au SDS concentré à 0.012%.

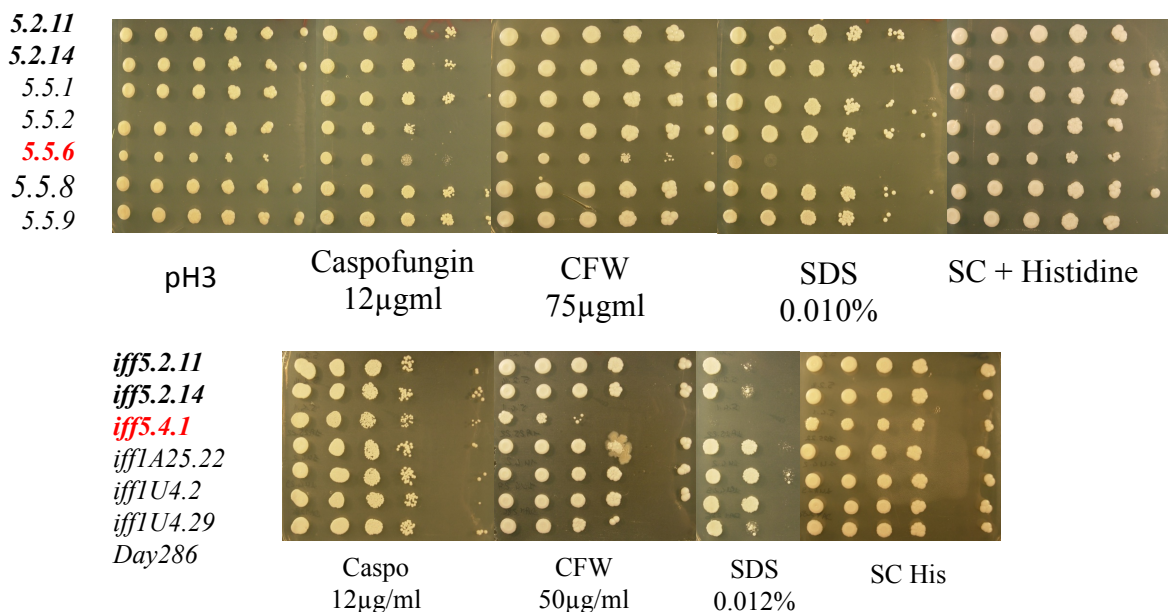


Figure 28 : Analyse du mutant *iff5*^{-/-}. Deux phénotypes différents sont observables en tests en gouttes sur milieu Caspofungin, Calcofluor White (CFW) et Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Les mutants vérifiés en Southern-blot sont en gras, et les mutants présentant une hypersensibilité de la paroi sont en rouge. Il semblerait qu'un retard de croissance soit aussi observable sur le milieu minimum témoin.

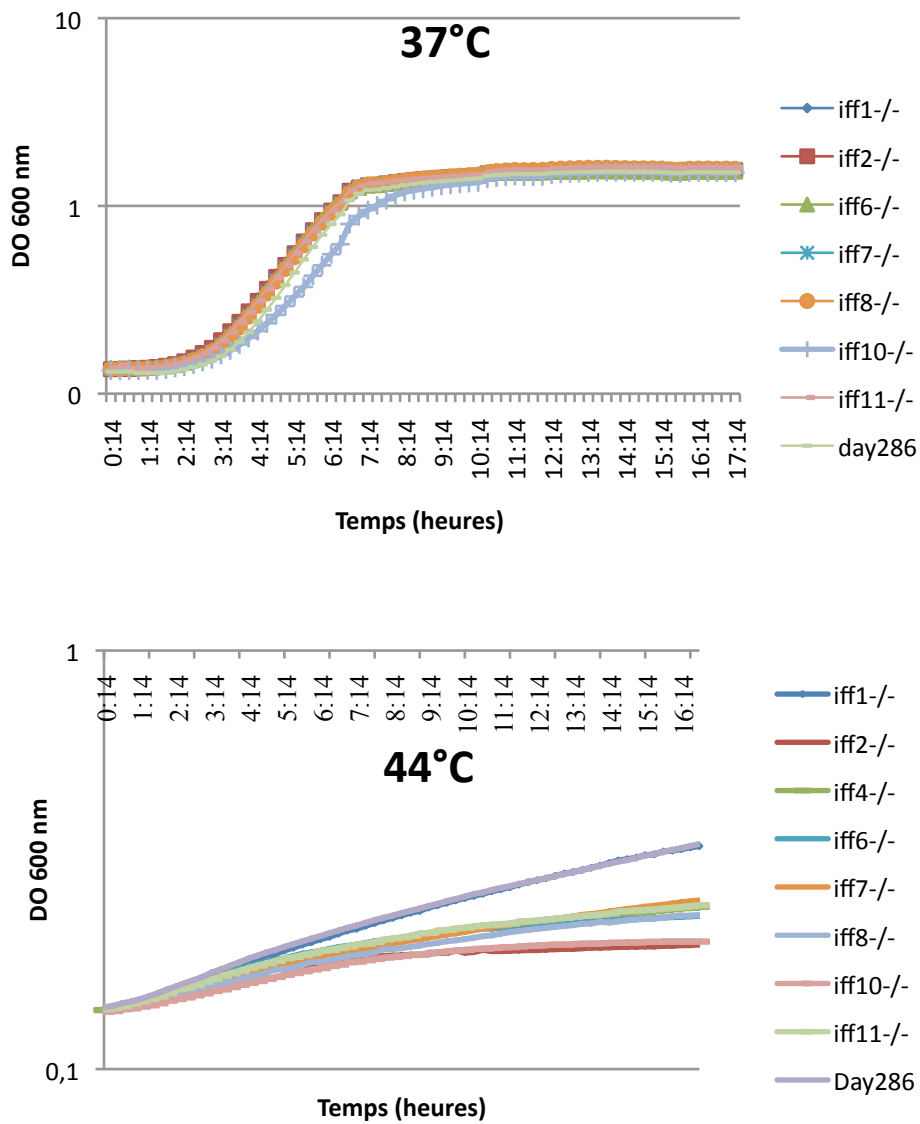


Figure 29 : Tests de résistance des mutants à de fortes températures. Croissance des souches en milieu liquide YPD à 37°C et 44°C pendant 16h.

La croissance des mutants en milieu riche a été testée en suivant la cinétique de croissance sur 16h à 37°C dans du YPD. Toutes les souches poussent de façon égale et homogène (**Figure 29**). L'adaptation à une forte température a été testée par une culture de nuit en milieu riche. Tout d'abord nous avons testé une température de 44°C. A cette température la souche sauvage arrive à une DO₆₀₀ de 0.5. Les mutants semblent avoir atteint un plateau un peu avant. Par ce test de simple lecture de la densité optique, nous n'avons aucune information sur la viabilité, donc nous aurions pu faire un dénombrement sur boîte à la sortie du test avec un inoculum de départ comme référence.

Notre mutant *iff11*^{-/-} n'avait jusque là montré aucun phénotype alors qu'il a été publié par le groupe d'Aberdeen (Bates *et al.*, 2007) une étude montrant des phénotypes en milieu liquide pour trois agents perturbant la paroi : le SDS, le Calcofluor White et le Rouge Congo (**Figure 30**). Deux types d'hypothèses peuvent rendre compte de la différence de nos résultats et des siens. Premièrement, nous n'avons pas testé les deux premiers agents cités exactement dans les mêmes conditions que Bates *et al.*. Nous avons en particulier réalisé les tests en milieux solides. En admettant que la protéine Iff11 soit sécrétée, elle a peut-être une action spécifique en milieu liquide. La deuxième hypothèse repose sur l'existence éventuelle de différences dans le fond génétique des souches utilisées pour construire le mutant et dans la manière de les construire. S. Bates *et al.* ont construit leur mutant *iff11*^{-/-} par Ura-blaster dans la souche CAI-4, parente de la souche BWP17 que nous avons transformée par la technique des PCR Jumbo. Nous sommes donc partis de deux souches parentales différentes, même si BWP17 est directement dérivée de CAI-4 par deux transformations successives. Par ailleurs, nous n'avons pas eu recours à la même technique d'interruption de gènes.

Nous avons donc reproduit l'expérience décrite dans la publication de Bates *et al.*, en utilisant leurs souches mutante et complétée. Bien qu'il n'ait pas été mentionné de résultats concernant les tests d'intégrité de la paroi sur les souches mutantes pour le gène

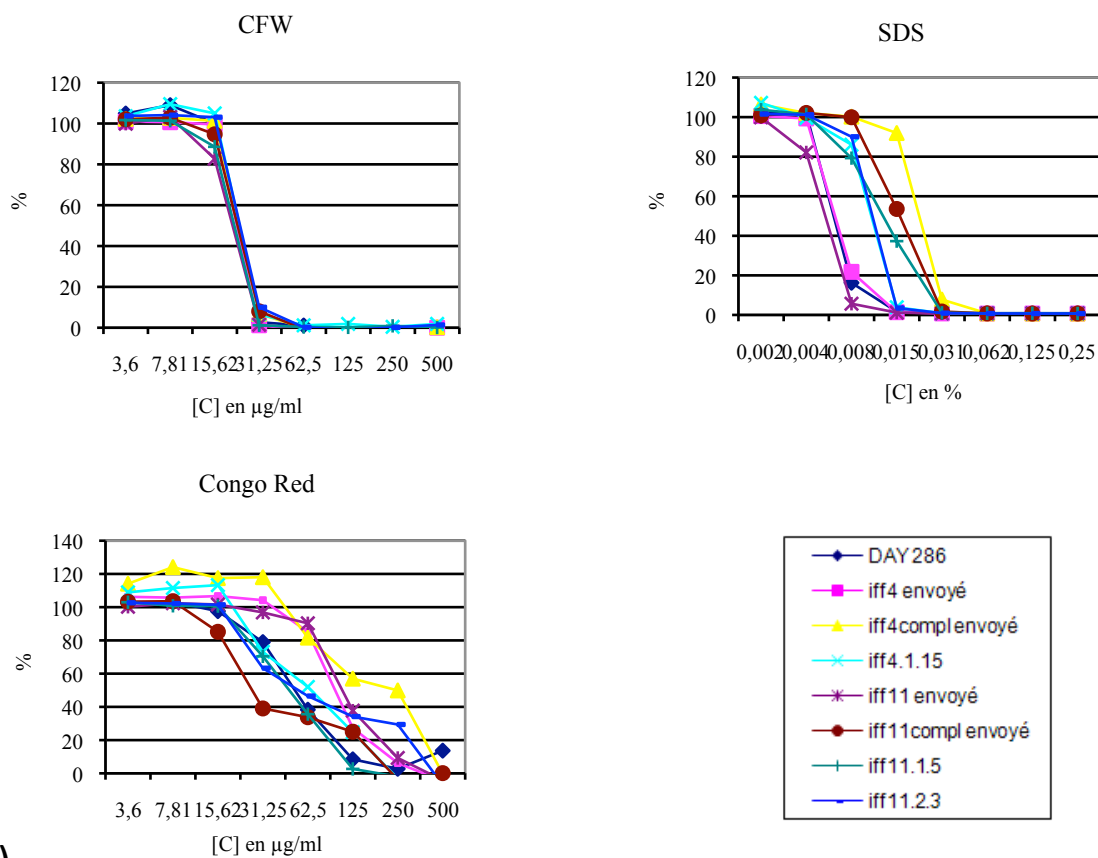
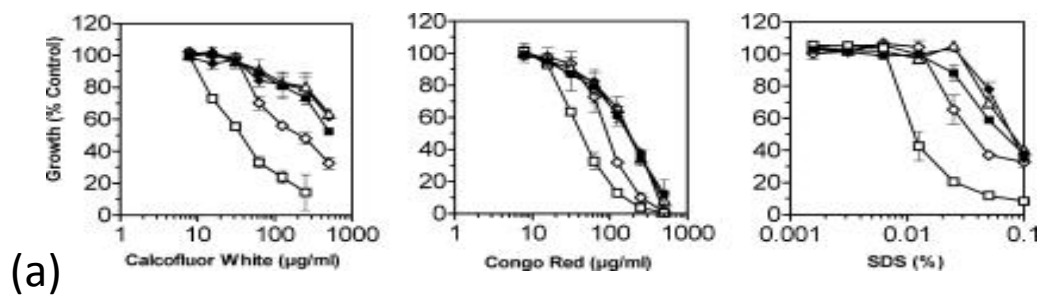


Figure 30 : Comparaison de phénotypes de sensibilité de différents mutants *iff11*^{-/-}. (a) Résultats de test de sensibilité du mutant *iff11*^{-/-} pour différents agents perturbant la paroi obtenus par Bates. wild type (□ noir), *iff11*Δ (□), reintegrant (Δ), *iff11*Δ-surexprimant *IFF11* (Δ noir) et *iff11*Δ-surexprimant *IFF11*-V5 (◦). (Bates) (b) Résultats obtenus au laboratoire avec les souches *iff11* de Bates et *iff4* Kempf et avec nos mutants. L'expérience a été répétée deux fois.

IFF4, nous avons également testé dans ces mêmes conditions le mutant *iff4*^{-/-} utilisé dans la publication de Kempf *et al.*, ainsi que leurs souches complémentées et notre mutant *iff11*^{-/-}. Les résultats obtenus par Bates *et al.* n'ont pas pu être reproduits dans nos conditions avec leur mutant, pas plus qu'avec notre mutant *iff11*^{-/-} (**Figure 30**). Le mutant *iff4*^{-/-} utilisé par Kempf *et al.* n'a lui non plus montré de phénotype dans ces conditions. Il semblerait donc qu'il y ait d'autres paramètres à prendre en compte, reflétant peut être la qualité des composants utilisés pour les milieux ou les tampons qui sont parfois inconstants en fonction du lot. Il faudrait sans doute tester un nouveau mutant *iff11*^{-/-} afin de s'assurer que le résultat observé est reproductible, indépendamment de la souche ou de variabilités liées au laboratoire, pour être certain que le phénotype observé est bien lié au couple « inactivation du gène cible-effet ».

Conclusion

Dans cette étude nous avons recherché à mettre en évidence une contribution des protéines pariétales Iffs à la morphogénèse, à la réponse aux stress, et à la biogénèse de la paroi. Nos travaux montrent qu'aucun des produits des gènes *IFF1*, *IFF2*, *IFF4*, *IFF6*, *IFF7*, *IFF8*, *IFF10* et *IFF11* pris indépendamment n'a d'effet majeur sur ces trois processus. Le fait qu'Hyr1 soit induit en condition de filamentation pouvait suggérer qu'un autre membre de sa famille puisse être impliqué dans la morphogénèse. Mais, de même qu'un défaut d'Hyr1 ne bloque pas la morphogénèse (Bailey *et al.*, 1996), un défaut dans l'une des protéines Iff testées n'a pas d'incidence sur la morphogénèse. Des résultats de puces avaient montré que *IFF1* et *IFF7* étaient régulés par Rim101, régulateur transcriptionnel impliqué dans la réponse au stress pH (<http://www.candidagenome.org/>) : cela suggérait que les mutants auraient pu être sensibles au pH, ce qui n'est pas le cas. Enfin, même s'il était *a priori* étonnant qu'Iff11, en tant que seule protéine sécrétée de la famille, soit importante pour la structure de la paroi

(Bates *et al.*, 2007), cela nous laissait espérer que d'autres membres de sa famille pouvaient être impliqués eux aussi dans la résistance aux agents perturbant la paroi. Nous n'avons observé aucun des phénotypes habituellement associés à un défaut de biogenèse de la paroi, y compris dans le cas du mutant *iff11*^{-/-}.

Cette absence de phénotype résulte peut-être de la stratégie que nous avons choisie, à savoir interrompre un seul gène à la fois. Il a été souligné dans l'introduction que l'observation d'un phénotype dû à l'absence d'une protéine pouvait être trompeur lorsque l'on étudie une famille de gènes où on s'attend à avoir des redondances fonctionnelles. Par ailleurs *C. albicans* a montré qu'elle était un organisme très résistant et qui s'adapte très facilement à différents environnements. Il n'est donc sans doute pas étonnant que l'absence d'une protéine parmi plusieurs affecte peu l'organisme, sauf si cette protéine avait acquis une fonction non compensable par l'une des autres. Cela ne semble pas être le cas.

Chapitre 3 : Cas particulier des gènes *IFF3* et *IFF9*

3.1 Introduction

Lors de la création de la banque de mutant *iff*^{-/-} nous avons parfois été obligés de répéter les transformations plusieurs fois jusqu'à obtenir des clones positifs. Cela a toujours abouti à l'obtention des mutants désirés, sauf lors de la construction des homozygotes *iff3*^{-/-} et *iff9*^{-/-}. Nous avons donc émis deux hypothèses : soit la technique de disruption utilisée n'était pas adaptée à ces gènes, soit ces gènes étaient essentiels à la viabilité de cette levure. Dans ce chapitre, je détaillerai les approches complémentaires que j'ai testées pour étudier l'effet d'une inactivation de ces deux gènes particuliers.

3.2 Similarité des gènes *IFF3* et *IFF9*

L'alignement de ces deux séquences a montré 99% d'identité nucléotidique entre ces deux ORFs. Cela complique évidemment le dessin d'amorces discriminantes (*cf* annexe).

3.3 Disruption par la méthode classique de PCR jumbo.

Si les hétérozygotes ont été obtenus bien que difficilement, puisqu'après 6 transformations 3 clones seulement ont été obtenus pour chacun des gènes, les homozygotes n'ont jamais pu être obtenus par la méthode de disruption utilisée pour les autres gènes *IFF*. L'obtention de clones visiblement prototrophes pour l'arginine ou l'uracile nous laissait penser que la cassette d'interruption s'insérait préférentiellement à un mauvais locus. Pour s'affranchir de l'homologie entre les deux locus et encourager la disruption du second allèle, nous avons amplifié la cassette de disruption à partir du génome de la souche hétérozygote, Par exemple pour inactiver l'allèle sauvage d'un mutant hétérozygote *iff3*^{+/-} [Arg⁺, Ura⁻, His⁻

], nous avons amplifié la région *URA3* d'un mutant *iff3*^{+/-} [Arg⁻, Ura⁺, His⁻] pour créer une grande cassette qui devait s'insérer au locus, et donc remplacer l'allèle sauvage restant dans la souche *IFF3*^{+/-}. Cette variante ne permettant toujours pas d'obtenir les homozygotes, nous avons décidé de créer un mutant conditionnel en plaçant l'allèle sauvage restant sous contrôle d'un promoteur répressible, le promoteur Tet-Off avec l'hypothèse de travail que ces 2 gènes pouvaient être essentiels pour la levure.

3.4 Stratégie Tet-Off

Cette stratégie est généralement choisie pour étudier des gènes essentiels (Nicholls *et al.*, 2009). Elle permet de placer le gène sous le contrôle d'un promoteur fort et répressible en présence de doxycycline. Cela devait nous permettre de vérifier si l'absence de la protéine Iff3 ou Iff9 était létale pour *C. albicans*. Ce système présente le double avantage de permettre l'étude de la protéine surexprimée ou non exprimée (**Figure 31**). Il est dérivé du système Tet-On, l'activateur transcriptionnel tetR-ScHap4 a été modifié pour être inactif en présence de doxycycline (Nakayama, 2000).

3.4.1 Construction des souches.

Pour cette construction deux plasmides sont nécessaires, l'un apportant l'activateur tetR-ScHap4 de l'ARN polymérase, et l'autre le site opérateur TR du promoteur de la tétracycline à placer en amont des gènes à étudier. La construction des plasmides utilisés est décrite dans les Matériel et Méthodes.

Un premier plasmide portant *URA3* et exprimant *tetR-ScHap4* sous contrôle du promoteur *CaENO1* du gène de l'énolase a été intégré au niveau du locus *RPS10* des hétérozygotes *iff3*^{+/-} ou *iff9*^{+/-} [His1⁻, Arg4⁺, Ura3⁻]. Les clones ont été sélectionnés sur milieu SC + Histidine. L'intégration a été vérifiée par PCR sur colonies et l'expression de la fusion *tetR-ScHAP4-3xHA-ScWHII* a été vérifiée par Western-blot grâce au tag HA associé à

Etape 1 : clonage du transactivateur

- Linéarisation du plasmide par *StuI*
- Intégration au locus *RPS10*

Etape 2: clonage de l'opérateur

- Amplification de la cassette avec les amorces Jumbo
- Intégration 3 nucléotides avant l'ATG

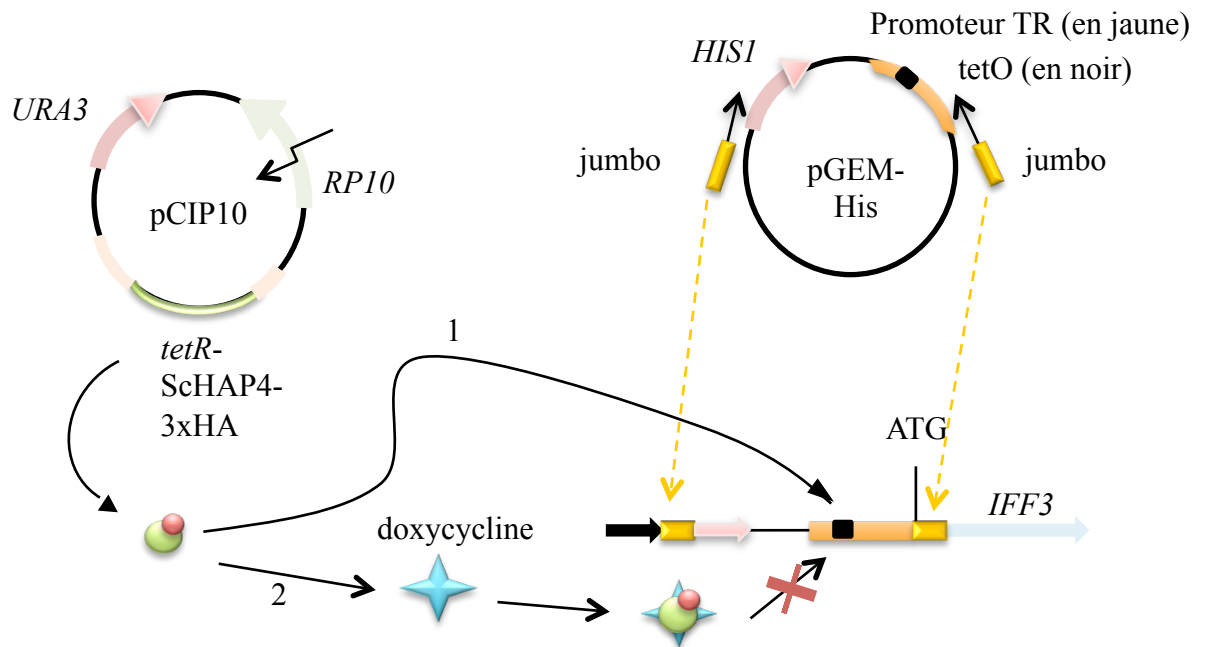


Figure 31 : Schématisation du fonctionnement de la transcription d'un gène *IFF* sous contrôle du système Tet-Off.

1 : Sans doxycycline, l'activateur transcriptionnel va se fixer sur la région opératrice du promoteur TR et activer la polymérase.

2 : La doxycycline va se fixer sur l'activateur transcriptionnel et modifier sa conformation, l'empêchant de se fixer sur la région opératrice et inhibant ainsi la fixation de la polymérase et donc la transcription du gène cible.

l'activateur tetR-ScHap4 (résultats non montrés). La réintégration du gène *URA3* au locus *RPS10* permet de rétablir une expression suffisante pour les tests de filamentation et de virulence *in vivo* comme démontré par ailleurs (Brand *et al.*, 2004).

L'ensemble promoteur TR et gène *HIS1* a en parallèle été amplifié à l'aide d'amorces Jumbo portant des zones d'homologie pour une insertion devant l'ORF *IFF3* ou *IFF9* sauvage. Les clones transformés par cette construction ont été vérifiés par PCR sur colonies. Les transformants obtenus, prototrophes pour l'histidine, ont pu être facilement sélectionnés (cf Matériel et Méthodes).

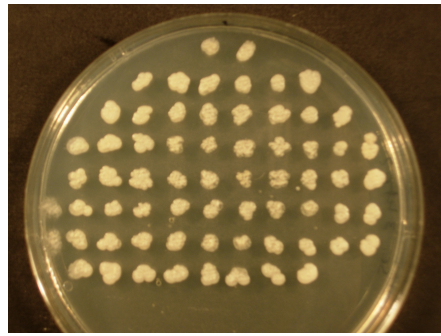
3.4.2 Analyse des souches exprimant les constructions TR:IFF.

3.4.2.1 Phénotype de croissance sur boîte.

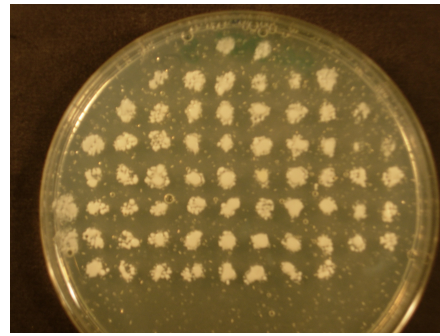
Nous avons testé les transformants sur milieu gélosé contenant de la doxycycline aux concentrations 10 µg/ml, 25 µg/ml et 50 µg/ml (**Figure 32**). Nakayama *et al.* ont montré que jusqu'à cette concentration la doxycycline n'avait pas d'effet sur la croissance de *C. albicans* et que par ailleurs *ACT1* s'exprimait au même niveau avec ou sans doxycycline (Nakayama *et al.*, 2000). Les clones ont poussé sur toutes les concentrations de doxycycline, donc la répression des gènes cibles ne semble pas létale ou est insuffisante pour l'être.

3.4.2.1 Expression des gènes *IFF3* et *IFF9* sauvages ou sous contrôle de TR.

Nous avons donc voulu vérifier ensuite le niveau d'expression de ces gènes en présence ou non de doxycycline dans le milieu. Une culture de nuit dans 3 ml de SC complémenté a été réalisée puis elle a été diluée à une DO de 0,7 dans 50 ml de SC avec ou sans doxycycline (50 µg/ml). Nous avons quantifié l'expression après 3 heures et 6 heures de culture à 30°C (**Figure 32**). Le témoin utilisé pour la PCR quantitative est le gène de ménage *ACT1* servant à normaliser les résultats.

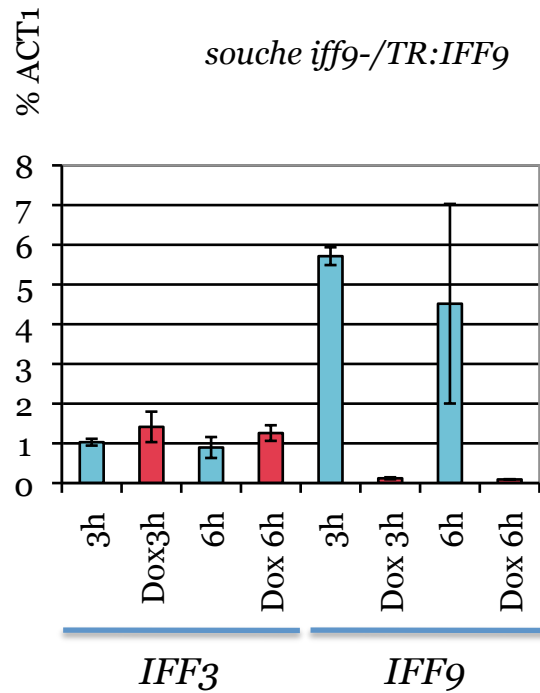
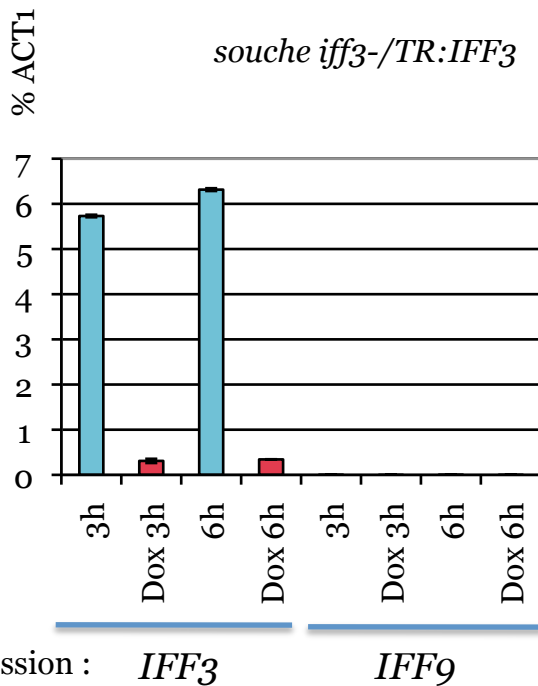


SC



SC + doxycycline 50µg/ml

(a)



(b)

Figure 32 : Analyse des souches *iff3-/TR:IFF3* et *iff9-/TR:IFF9*. (a) Croissance des souches portant la fusion tetR sur milieu SC et SC + Doxycycline (50 µg/ml). (b) Quantification de l'expression des gènes *IFF3* et *IFF9* dans les souches *iff3-/TR:IFF3* (à gauche) et *iff9-/TR:IFF9* (à droite) après 3 et 6 heures de culture en SC avec ou sans Doxycycline (50 µg/ml). L'expression est représentée par rapport à l'expression de l'actine.

En l'absence de doxycycline, l'expression des fusions *TR:IFF3* (panneau de gauche) ou *TR:IFF9* (panneau de droite) augmente très significativement par rapport au niveau de base observable dans la souche sauvage pour le gène (expression *d'IFF9* dans la souche *iff3-/TR:IFF3* et expression *d'IFF3* dans la souche *iff9-/TR:IFF9*). L'activateur *tetR-ScHAP4-3xHA-ScWHII* permet donc bien la surexpression du gène, la construction semble validée. La surexpression d'un des gènes ne semble pas affecter l'expression de l'autre gène. En présence de doxycycline, l'expression des gènes sous contrôle de TR est bien réprimée comme attendu, mais d'un facteur deux donc pas totalement. En conséquence bien que le système ne soit pas capable d'éteindre à 100% l'expression, il fonctionne correctement et permet la surexpression/répression du gène. Nous ne pouvons donc pas exclure que la viabilité d'une souche *iff3-/TR:IFF3* ou *iff9/TR:IFF9*, observée sur boîte ou en milieu liquide supplémenté en doxycycline, puisse s'expliquer par une fuite de transcription du promoteur TR à un niveau suffisant pour permettre la survie de la cellule. A ce stade de l'étude nous ne sommes donc pas en mesure de répondre quant à l'essentialité de ces deux gènes.

Conclusion

Cette étude n'a pas été poursuivie par manque de temps. Ce résultat est pourtant intéressant et mérite plus d'attention car il amène à se demander pourquoi la cellule a dupliqué un gène sur le chromosome R et quelle fonction porte ces gènes pour qu'ils soient conservés si fortement. De plus, on s'attend généralement à rencontrer des fonctions redondantes dans une famille de gènes, sans pour autant être face à des gènes de séquences si semblables. La région de 1kb en amont des gènes *IFF3* et *IFF9* est très similaire donc il semblerait que nous pouvons exclure une régulation spécifique de ces gènes en fonction de

l'environnement qui permettraient d'en conserver la fonction dans des circonstances différentes.

La similarité de ces gènes jusque dans leur promoteur a compliqué cette étude et nous avons été ralentis par des problèmes techniques. Par ailleurs, au vu des erreurs publiées pour les séquences des gènes *IFF1* et *IFF10*, on peut se demander si les différences de séquence entre *IFF3* et *IFF9* sont véritablement présentes dans les souches étudiées. Enfin, comme nous sommes en présence de 4 allèles hautement similaires, il serait judicieux de vérifier les souches obtenues après insertion des cassettes pour éliminer les doutes sur le gène interrompu. Ayant la même taille et la même séquence, la PCR est peu fiable, par contre il serait possible de vérifier ces constructions par Southern blot.

Chapitre 4 : Analyse fonctionnelle de la famille IFF

4.1 Introduction

L'objectif de ce travail était d'avoir une première idée de la fonction des protéines Iffs lors de l'interaction de *C. albicans* avec les cellules de l'hôte.

Connaître la régulation des gènes *IFF* permettrait de proposer des hypothèses *a priori* sur leurs fonctions, cependant l'expression de ces gènes restait encore méconnue. Nous avons tout d'abord voulu vérifier le niveau d'expression des gènes *IFF* dans nos conditions de laboratoire. Comme l'expression des gènes *IFF* avait été précédemment détectée lors d'études de transcriptomique faites en conditions d'interaction avec l'hôte, nous avons réalisé des essais dans un modèle murin d'infection *in vivo*. Aucun résultat n'avait été publié jusqu'alors en modèle d'interaction avec des cellules épithéliales humaines c'est pourquoi nous avons également réalisé des tests sur cellules HeLa. Afin d'identifier d'éventuelles redondances fonctionnelles entre ces gènes, nous avons étudié leur expression dans des souches où chacun des gènes *IFF* avait été inactivé.

Pour compléter ces études et détecter un rôle éventuel de ces gènes pendant l'interaction avec l'hôte, la banque de mutant mutants précédemment obtenue a été criblée pour la sensibilité à la phagocytose par les macrophages. Cette étude faisait suite aux travaux de Mathias L. Richard qui durant sa thèse a identifié le mutant *gpi7* comme étant affecté dans sa survie après phagocytose par les macrophages en utilisant un test de dénombrement par étalement des levures survivantes (Richard *et al.*, 2002), résultats confirmés dans sa thèse par Armel Plaine. Ce mutant entraîne une désorganisation de l'ensemble des protéines à ancre GPI. Le test utilisé par M. L. Richard étant peu reproductible d'après A. Plaine, nous avons

utilisé un test reposant sur le même principe mais différent dans sa mise en œuvre (test dit "End Point Dilution", voir Matériel et Méthodes).

4.2 Etude transcriptomique des gènes IFF dans un contexte sauvage ou mutant.

4.2.1 Conditions d'expression des gènes IFF.

Le gène *HYR1* a été décrit pour être exprimé en condition de filamentation. Une étude préliminaire menée par Mathias L. Richard (communication personnelle) a montré que les gènes *IFF3*, *IFF5* et *IFF10* étaient légèrement exprimés (<5% de l'actine) en milieu SC non tamponné après 3 heures d'incubation à 30°C. L'expression des autres gènes, y compris celle de *HYR1*, était indétectable. La transition à pH7 et 37°C, induisant la croissance en hyphe, a montré une très forte induction de *HYR1* seulement. L'expérience a été répétée chez le mutant *hyr1-/-* cultivé à 30 et 37°C, pour révéler d'éventuelles régulations au sein de la famille *IFF*. Le profil d'expression est resté le même, très faible pour tous les gènes comme dans la souche sauvage SC5314. Il semble donc qu'aucun gène *IFF* ne soit surexprimé pour compenser l'inactivation de *HYR1*.

Par ailleurs, si nous n'avons détecté qu'une expression très faible, voire indétectable, des gènes *IFF* exprimés en milieu minimum après 3 heures de culture de SC5314, après 16 heures de culture, *IFF2* est fortement induit (60% de l'expression de l'actine) en milieu minimum (SC et NGY) et phase stationnaire dans la souche sauvage CAI4+CIp10 (**Figure 33**). Il est également induit en phase stationnaire et milieu riche (YPD) mais beaucoup moins. Le graphique représente la moyenne de deux expériences indépendantes. Plusieurs gènes *IFF* semblent être légèrement induits en phase stationnaire, mais les niveaux d'expression atteints restent très faibles. La dérèglement en phase stationnaire d'*IFF2* sur milieu NGY a été

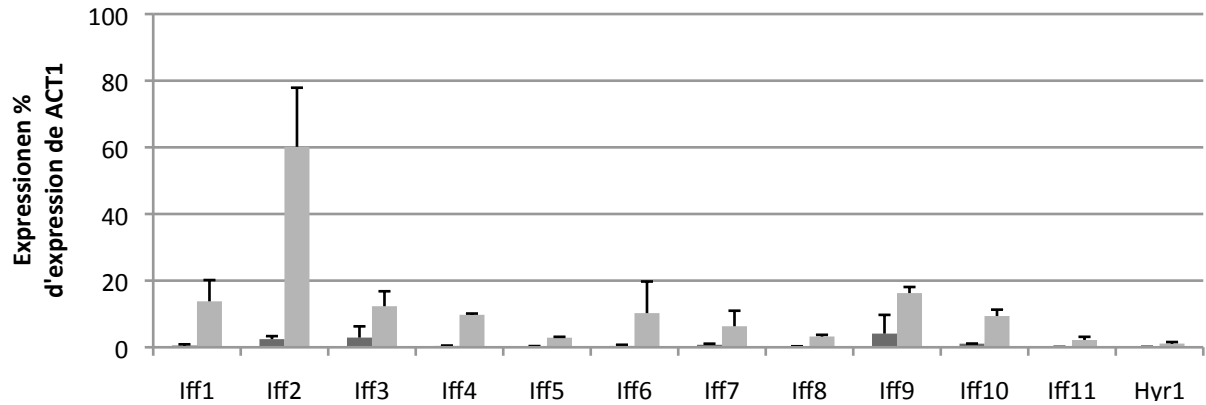


Figure 33 : Induction de *IFF2* pendant la phase stationnaire. La PCR quantitative a été réalisée sur des cultures de CAI4+Cip10 à 30°C en NGY après 5 heures (gris foncé) et 16 heures (gris clair). Les moyennes ont été réalisées sur 2 expérimentations indépendantes.

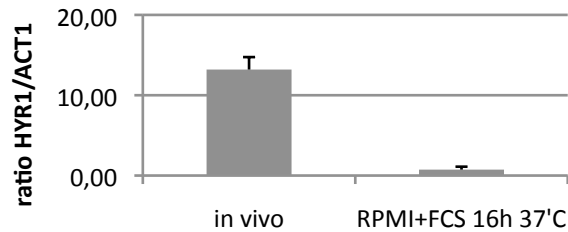


Figure 34 : Expression de *HYR1* dans un modèle murin d'infection *in vivo*. La PCR quantitative a été réalisée sur un demi rein après 3 jours d'infection d'une souris BALB/C par CAI4+Cip10. Les moyennes ont été réalisées sur 6 mesures du même échantillon. L'expression est exprimée par rapport à l'expression du gène de l'actine.

Cette expérimentation a été réalisée lors d'un stage de collaboration avec le l'équipe de C. Munro de l'IMS, Aberdeen.

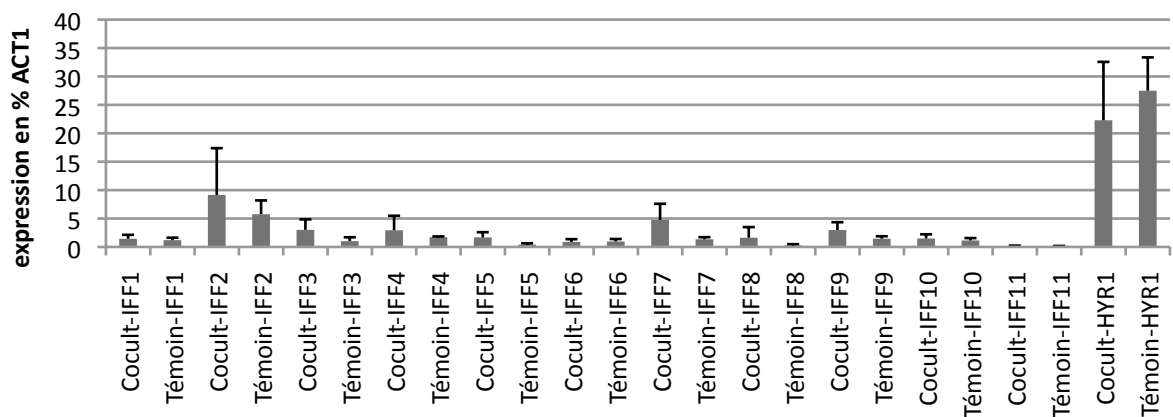


Figure 35 : Expression des gènes *IFF* lors d'une interaction avec les cellules épithéliales HeLa. La PCR quantitative a été réalisée sur des cocultures SC5314-HeLa à confluence de 2 heures à 37°C, 5% CO₂. Pour le témoin, la même expérience a été réalisée en flask sans HeLa. Les moyennes ont été réalisées sur 4 valeurs correspondant à deux mesures faites sur deux cultures indépendantes.

reproduite dans les mêmes conditions dans le laboratoire de C. Munro. Les autres gènes par contre n'ont pas vu leur expression significativement modifiée.

Sauf *IFF2* et *HYR1*, les gènes *IFF* ne sont donc pas exprimés à un niveau significatif dans nos conditions de laboratoires. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature mentionnant une expression préférentielle en condition d'interaction avec l'hôte, le plus souvent en foie de souris ou de porc, ou lors d'une incubation en présence de sang ou de plasma. En collaboration avec l'équipe de C. Munro à Aberdeen nous nous sommes intéressés à l'expression des *IFF* dans un modèle murin d'infection *in vivo* (**Figure 34**). Après 3 jours d'infection, seul *HYR1* est exprimé en rein de souris.

Il semblait qu'aucune étude transcriptomique n'avait été réalisée en interaction avec des cellules humaines. Nous avons donc effectué les tests suivants sur des levures en interaction avec des cellules humaines (**Figure 35**). Seul *HYR1* est significativement induit dans ces conditions, avec ou sans cellules HeLa, probablement parce que l'apport de sérum dans le milieu et la température de 37°C favorisent la croissance en hyphe.

4.2.2 Régulation des gènes *IFF* par un autre membre de la famille.

Suite à l'absence de phénotype sur cellules HeLa, nous nous sommes demandés si l'inactivation d'un gène *IFF* avait un effet sur l'expression d'un autre gène de la famille ayant une fonction redondante : sa surexpression pourrait masquer le phénotype chez le mutant. L'expression des gènes *IFF* a été quantifiée dans les mutants *iff*^{-/-} après un test d'adhérence de deux heures en flasque de 75cm² (voir matériel et méthode). Le témoin a été réalisé de la même manière mais sans les cellules HeLa. Les résultats sont présentés **Figure 36**. Les résultats présentés sont préliminaires et demandent à être confirmés.

Seuls les gènes *IFF3*, *IFF9* et *HYR1* montrent des variations importantes d'expression. Les gènes *IFF3* et *IFF9* semblent fortement surexprimés dans les mutants *iff2*^{-/-}, *iff6*^{-/-}, *iff7*^{-/-} et *iff8*^{-/-} (**Figure 37**). Ce résultat est indépendant de la présence de cellule HeLa. Il semble

(a)

	IFF1		IFF2		IFF3		IFF4		IFF5		IFF6		IFF7		IFF8		IFF9		IFF10		IFF11		HYR 1	
	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD
ds SC5314	1,2	0,4	5,8	2,4	1,0	0,7	1,7	0,1	0,4	0,2	1,0	0,4	1,3	0,4	0,3	0,2	1,5	0,4	1,1	0,4	0,1	0,0	27,5	5,9
dans iff1			4,0	0,6	2,7	2,1	0,9	0,2	0,6	0,5	0,7	0,4	1,2	0,7	0,2	0,1	3,8	3,1	1,4	0,5	0,1	0,1	16,2	9,7
dans iff2	1,7	0,7			16,4	14,9	1,4	0,3	0,5	0,1	1,3	0,6	1,3	0,6	0,4	0,2	22,7	20,6	1,4	0,4	0,2	0,0	25,6	5,5
dans iff4	1,6	0,2	6,1	0,5	0,6	0,4			0,4	0,1	1,6	0,1	1,0	0,4	0,2	0,1	4,1	1,3	1,0	0,2	0,1	0,0	9,3	0,8
dans iff5	1,4	0,1	5,4	0,3	1,3	0,5	1,4	0,1			1,3	0,1	1,2	0,1	0,2	0,0	3,7	2,1	1,2	0,1	0,1	0,0	11,1	0,0
dans iff6	2,0	0,6	8,2	3,3	19,1	9,2	1,0	0,5	0,8	0,4			1,9	0,9	0,9	1,0	21,7	9,8	3,1	1,2	0,1	0,0	28,4	13,7
dans iff7	1,1	0,8	5,1	1,1	12,3	8,4	1,6	0,2	0,4	0,2	1,1	0,3			0,4	0,3	12,4	7,9	1,4	0,7	0,2	0,1	25,2	4,5
dans iff8	1,2	0,3	5,3	0,1	11,4	11,7	0,8	0,1	0,3	0,1	0,5	0,2	1,3	0,2			13,9	15,7	1,2	0,1	0,1	0,0	38,7	5,0
dans iff10	0,5	0,4	5,2	0,8	2,3	1,6	0,9	0,3	0,2	0,1	0,5	0,3	1,9	0,5	0,2	0,1	3,5	2,3			0,1	0,1	18,6	7,2

(b)

	IFF1		IFF2		IFF3		IFF4		IFF5		IFF6		IFF7		IFF8		IFF9		IFF10		IFF11		HYR 1	
	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD	m	±SD
ds SC5314	1,4	0,7	9,2	8,2	3,0	1,8	2,9	2,5	1,7	0,9	0,9	0,5	4,7	2,9	1,6	1,9	3,0	1,4	1,5	0,7	0,1	0,1	22,3	10,3
dans iff1			3,7	0,8	2,4	1,9	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,5	1,5	0,2	0,2	0,1	2,7	1,0	1,1	0,7	0,1	0,1	22,7	2,3
dans iff2	2,7	1,8			8,5	9,9	3,1	1,7	1,7	1,2	2,2	1,1	5,5	3,2	3,6	2,4	15,9	20,4	3,6	2,5	2,5	1,1	22,2	3,3
dans iff4	2,0	0,2	6,5	0,3	0,4	0,0			0,8	0,1	1,4	0,2	4,2	0,8	0,7	0,0	3,7	0,0	1,6	0,2	0,5	0,1	14,6	0,2
dans iff5	4,8	0,2	9,1	0,7	1,7	0,9	5,6	0,4			4,3	0,1	12,1	1,5	5,0	0,6	6,5	3,3	4,5	1,6	3,6	0,2	21,0	1,4
dans iff6	1,4	1,0	4,6	3,0	7,0	5,2	1,0	0,7	1,3	1,1			2,7	1,9	1,2	1,4	9,4	7,3	1,5	1,1	0,3	0,2	20,0	13,7
dans iff7	1,7	0,4	7,5	1,3	7,1	6,4	2,1	0,3	0,8	0,3	2,4	1,9			0,7	0,4	11,2	9,4	1,8	0,6	0,6	0,4	23,3	2,8
dans iff8	2,6	1,0	7,3	1,6	16,1	13,8	2,5	2,6	1,8	2,1	1,8	1,8	5,6	2,9			11,7	6,3	3,2	1,4	1,4	1,1	13,6	6,1
dans iff10	1,0	0,2	7,4	1,6	3,1	1,8	1,1	0,4	0,5	0,1	0,7	0,3	3,0	0,9	1,0	0,8	5,5	2,9			0,4	0,3	18,2	8,0
dans iff11	1,2	0,8	5,8	2,9	2,8	0,8	1,0	1,0	0,4	0,1	0,7	0,2	2,6	1,4	0,3	0,1	3,0	1,4	2,4	1,4			15,4	4,8

Figure 36 : Expression des gènes *IFF* en condition d'adhérence dans les différents mutants *iff*^{-/-}: (a) Adhérence sur polystyrène. (b) Adhérence sur cellules HeLa à confluence. Une culture de 2 heures en flasque 75cm² dans du H10 à 37°C, 5% CO₂ a été réalisée pour l'essai (b) comme pour le témoin (a). Le gène quantifié est représenté en haut de chaque colonne et la souche utilisée en début de chaque ligne. Chaque tableau représente les moyennes de l'expression de deux mutants indépendants pour chaque gène, chaque extrait ayant été testé une ou deux fois.

donc que les gènes *IFF3* et *IFF9* pourraient avoir une fonction redondante avec celle des gènes *IFF2*, *IFF6*, *IFF7* et *IFF8* dans ces conditions. Si cette fonction est liée à un phénotype d'adhérence, il faudrait créer un mutant multiple pour vérifier cette hypothèse. Étrangement, l'inactivation des gènes *IFF2*, *IFF6*, *IFF7* ou *IFF8* ne modifie pas l'expression de ce groupe de gènes. Le gène *HYR1* semble quant à lui réprimé dans le mutant *iff4*^{-/-} avec ou sans cellules HeLa et dans les mutants *iff5*^{-/-} sans cellules HeLa. Les variations d'expression des autres gènes ne sont pas significatives.

Quantitativement, l'expression des gènes a montré des variations importantes d'un mutant à l'autre, ce qui explique les forts écarts types obtenus. Cependant, les variations d'expression observées pour les gènes *IFF3* et *IFF9* semblent clairement présenter une tendance reproductible. La surexpression observée dans certains mutants est intéressante et mérite d'être étudiée plus en détail. S'il semble actuellement impossible de créer un double mutant *iff3*^{-/-},*iff9*^{-/-}, le mutant multiple *iff2*^{-/-},*iff6*^{-/-},*iff7*^{-/-},*iff8*^{-/-} peut théoriquement être réalisé par Ura blaster.

4.3 Rôle des Iffs dans l'interaction avec les cellules de l'hôte

4.3.1 Criblage de la banque pour l'adhérence à des cellules épithéliales

Nous voulions savoir si les protéines Iffs étaient impliquées dans l'adhérence aux cellules de l'épithélium. Pour cela nous avons réalisé des tests d'adhérence des mutants *iff*^{-/-} sur cellules de la lignée HeLa (voir Matériel et Méthodes). Nous avons utilisé comme témoin de non adhérence une souche mutée pour le gène *ALS3* codant une adhésine de la famille Als. Ce mutant est connu pour adhérer beaucoup moins sur cellules humaines (Oh *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004).

L'adhérence de toutes les souches était d'environ 50% (**Figure 38**), ce qui correspond à l'adhérence moyenne de la souche de référence Day286. Le test statistique de Student (p-

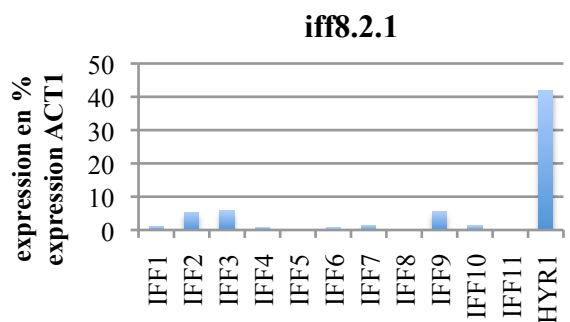
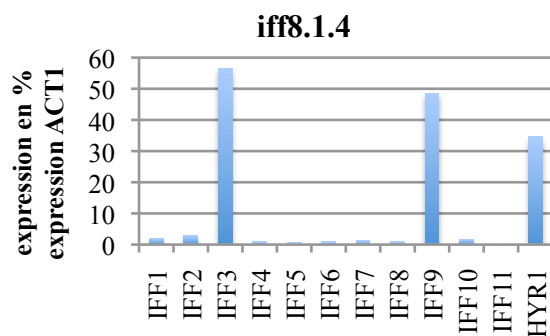
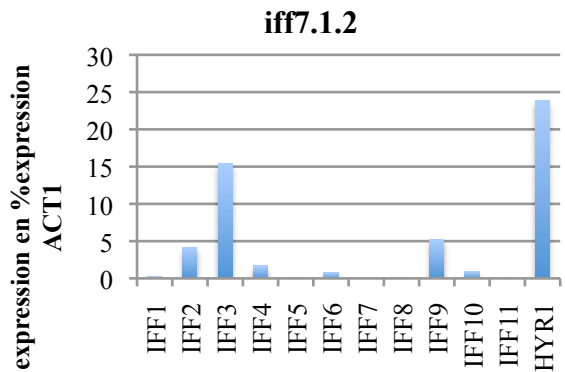
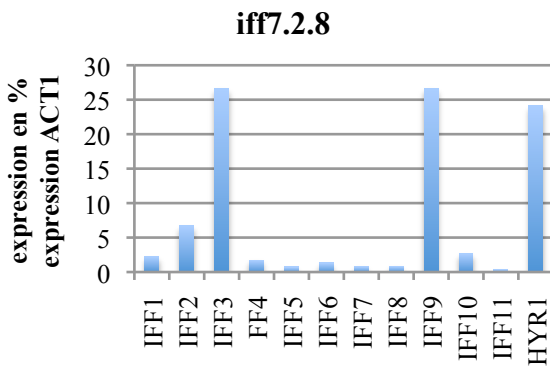
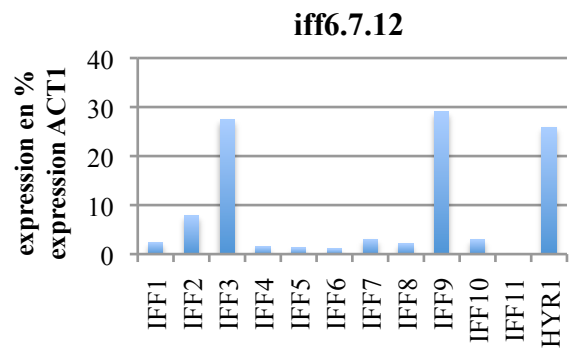
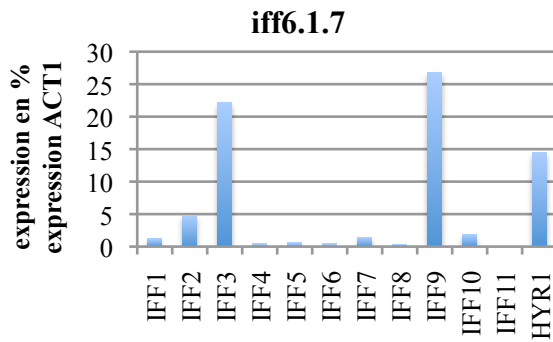
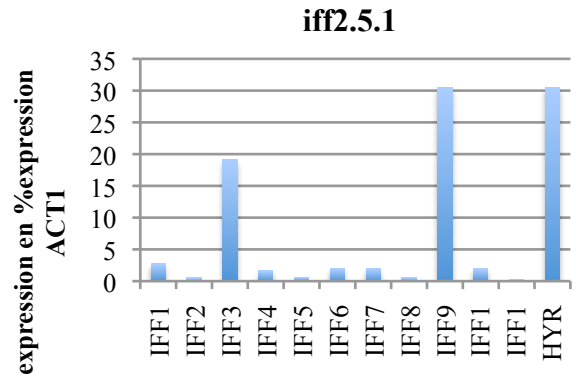
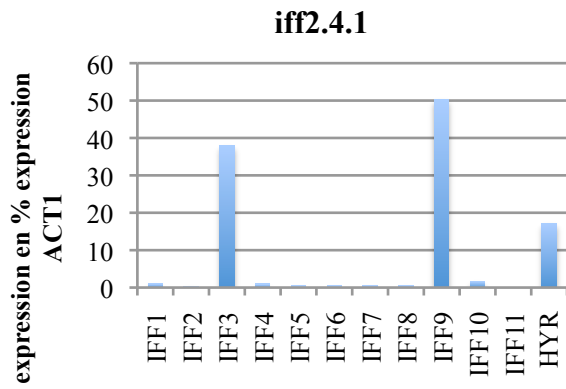


Figure 37 : Dérépression des gènes *IFF3* et *IFF9* dans les mutants *iff2*^{-/-}, *iff6*^{-/-}, *iff7*^{-/-} et *iff8*^{-/-} après une coculture de 2 heures dans du H10 à 37°C et 5% CO₂

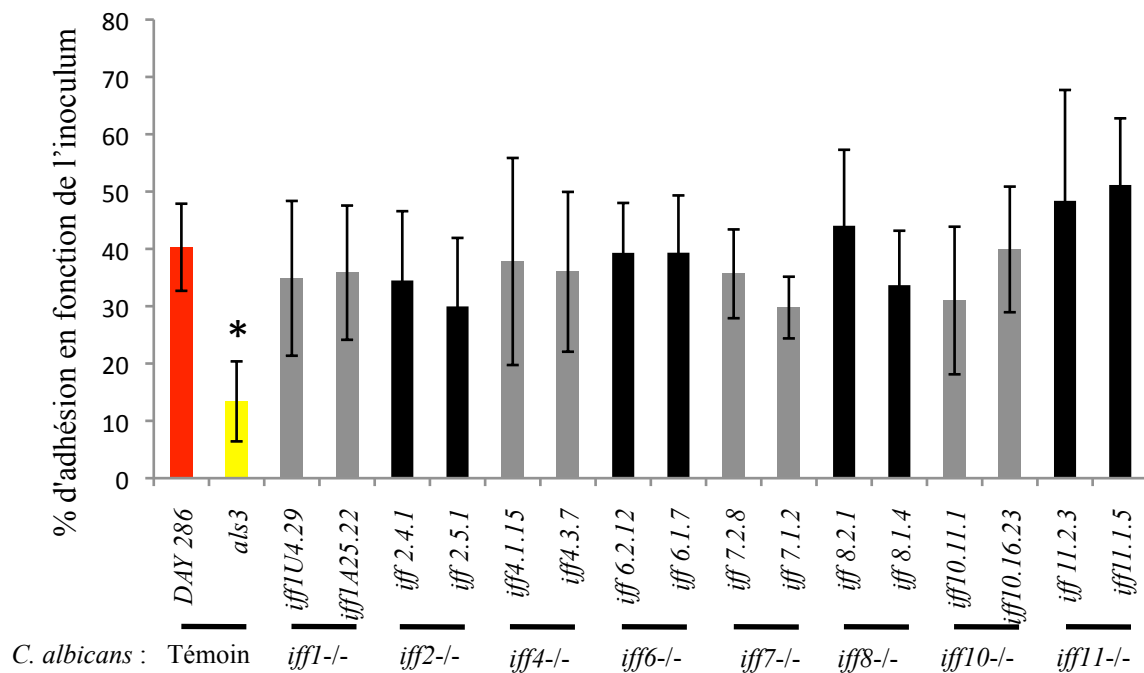


Figure 38 : Taux d'adhérence des souches de *C. albicans* sous forme levure après une coculture de 45 minutes à 37°C sur des cellules HeLa dans du H10. Les barres d'erreurs ont été réalisées sur 9 expériences. Deux mutants indépendants ont été testés. Les souches sont toutes auxotrophes pour l'histidine. L'étoile représente la valeur significativement différente de celle de la souche de référence, DAY286.

value<0.05) a été réalisé sur 3 expériences indépendantes correspondant chacune à trois déterminations. Seul le mutant *als3*^{-/-} a un taux d'adhésion significativement inférieur à celui de DAY286. L'absence d'une protéine Iff n'a donc pas modifié l'adhérence de *C. albicans* sur le type cellulaire testé.

4.3.2 Criblage de la banque pour la sensibilité à la phagocytose

Nous voulions identifier les protéines Iffs potentiellement impliquées dans l'interaction avec la première ligne de défense de l'hôte, majoritairement représentée par les neutrophiles et les macrophages qui ingèrent et éliminent les cellules fongiques. Pour cela nous avons réalisé un crible *in vitro* de la sensibilité des mutants *iff*^{-/-} à la phagocytose par les macrophages murins de la lignée J774. Nous avons réalisé¹ un test d'end point dilution qui est un test à moyen débit de survie des levures après la phagocytose. D'autres tests sont un peu plus rapides car ils utilisent un colorant permettant alors la lecture directe des cellules phagocytées ou non et évitent l'étape d'incubation de 48 heures. Il existe un test à très haut débit permettant un dénombrement instantané par fluorimétrie des cellules phagocytée, mais il nécessite de travailler avec la souche de *C. albicans* 1386 (DSMZ, Germany) marquée à l'aide d'une sonde fluorescente FUN1. Après la co-culture, les macrophages sont lavés et la fluorescence des levures phagocytée est quantifiée (McKenzie *et al.*, 2010). Nous n'avions malheureusement pas accès à cette technologie.

Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 39**. Nous avons utilisé comme témoin le mutant du gène *PGA35* qui code une protéine à ancre GPI et semble impliqué dans la morphogénèse. Ce mutant présente une résistance accrue à la phagocytose dans le test d'end point dilution (M. L. Richard, pers. commun.). Dans ces conditions et pour chacun des mutants, le taux de survie observé est environ de 60%, comme celui de la souche de référence Day286, sauf *pga35*^{-/-} comme attendu. On a réalisé un test de Student (p-value<0.05) sur 4

¹ Ces expériences ont été réalisées par Grégory Da Costa.

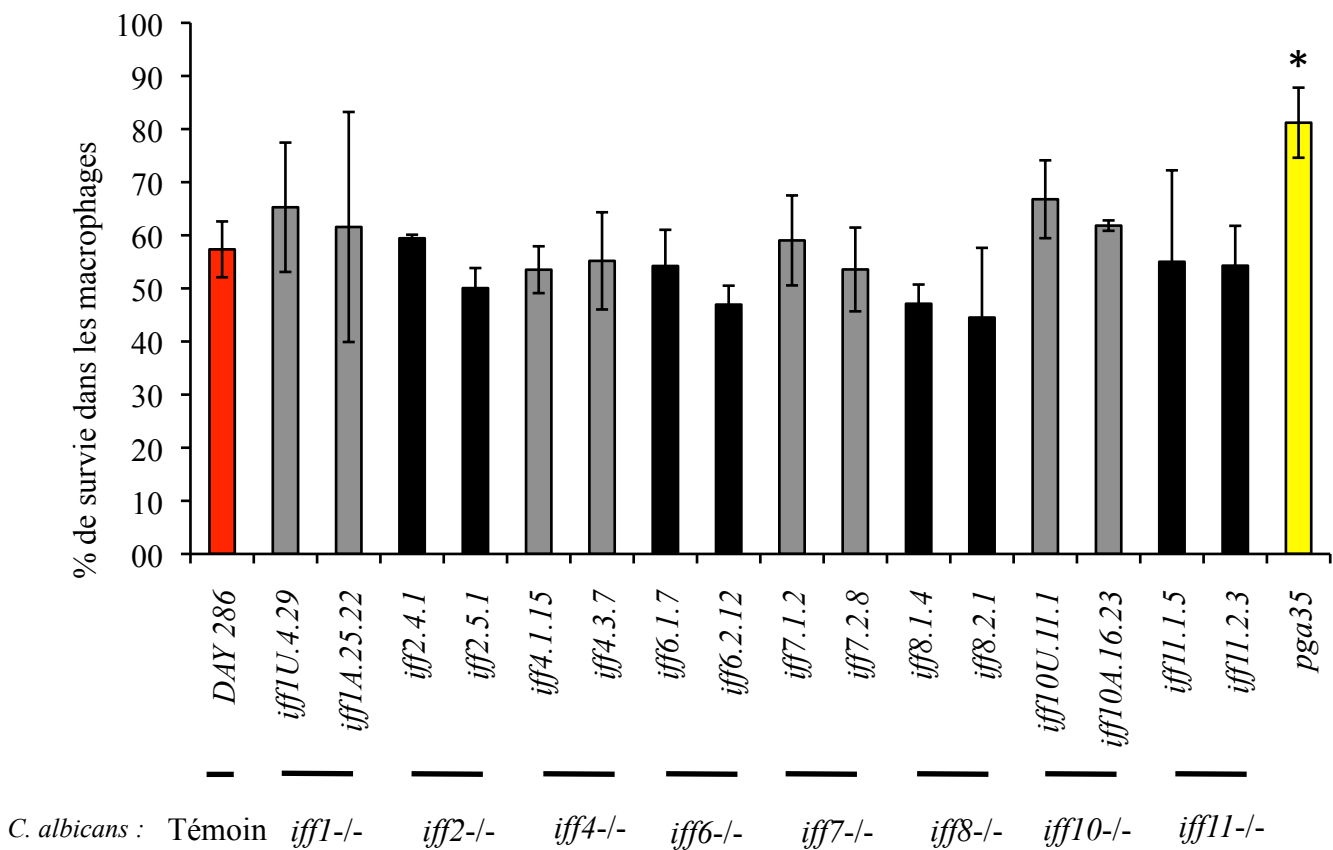


Figure 39 : Taux de survie des souches de *C. albicans* après phagocytose par les macrophages J774. Les barres d'erreurs ont été réalisées à partir des résultats de quatre expériences. Deux mutants indépendants ont été testés. Les souches sont toutes auxotrophes pour l'histidine. L'étoile représente la valeur significativement différente de celle de la souche de référence, DAY286.

échantillons correspondant à deux expérimentations indépendantes effectuées en double. Il semblerait par conséquent que, dans nos conditions, le produit des gènes *IFF* dont nous avons pu tester les mutants ne soit pas impliqué dans le mécanisme d'échappement après la phagocytose par les macrophages, ou que leur fonction soit redondante.

Conclusion

Le criblage que nous avons réalisé a montré que les gènes *IFF1*, *IFF2*, *IFF4*, *IFF6*, *IFF7*, *IFF8*, *IFF10* et *IFF11* ne sont impliqués ni dans l'adhérence sur cellules épithéliales HeLa, ni dans l'échappement aux macrophages J774, ou du moins qu'aucun d'entre eux n'est individuellement essentiel à ces interactions. Les études de transcriptomique lors de l'interaction avec les cellules HeLa ont suggéré une surexpression des gènes *IFF3* et *IFF9* chez les mutants *iff2*, *iff6*, *iff7* et *iff8*. Si ces gènes *IFF3* et *IFF9* avaient une fonction dans l'adhérence redondante avec celle des gènes *IFF2*, *IFF6*, *IFF7* et *IFF8*, cela pourrait expliquer l'absence de phénotypes chez ces mutants. Cependant si cela peut être une explication, elle n'est pas valable pour le reste des mutants. Des études plus poussées permettraient d'expliquer la surexpression des gènes *IFF3* et *IFF9*. Il faudrait savoir dans quelles conditions cela se produit puisque cette induction semble visiblement indépendante de l'interaction avec les cellules HeLa, et aussi savoir si d'autres gènes sont impliqués dans cette régulation. Les puces seraient un moyen simple de cribler un grand panel de gènes, notamment tous ceux connus pour être impliqués dans les interactions avec l'hôte, la formation du biofilm et la filamentation. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps de conduire ces expériences. L'étude des mutants *iff3*^{-/-} et *iff9*^{-/-}, bien que techniquement difficiles à construire, nous donnera des informations sur leur fonction et les gènes qui entrent dans leur système de régulation, tels que *IFF2*, *IFF6*, *IFF7* et *IFF8*.

L'absence de phénotype d'interaction avec les macrophages génère les mêmes questions. Les expérimentations de PCR quantitatives ont été menées mais une contamination par de l'ARN de macrophages en ont rendu l'interprétation impossible. Nous n'avons donc à l'heure actuelle aucune réponse concernant l'expression des gènes *IFF* en présence de macrophages. Le phénotype observé pour *gpi7*^{-/-} peut provenir de facteurs multiples et variés puisque la mutation a touché l'ensemble des protéines à ancre GPI.

Ne connaissant pas les conditions d'expression de ces gènes, l'étude phénotypique est plutôt difficile et hasardeuse. L'étude transcriptomique que nous avons commencée avec cette thèse nous a montré que les *IFF* n'étaient pas impliquées à 3 jours de l'infection systémique en modèle murin. Cependant, les tests en milieu minimum et en phase stationnaire nous ont montré de façon reproductible que le gène *IFF2* était fortement induit dans ces conditions. Il semblerait donc qu'un des gènes de la famille *IFF* soit plutôt impliqué dans une réaction de stress provoqué par la phase stationnaire et la carence.

IV. Conclusion et perspectives

Récapitulatif des résultats et remarques

Cette étude avait pour but d'identifier des gènes *IFF* impliqués dans l'interaction avec l'hôte. Nous avons donc choisi une approche simple quoique fastidieuse, et utilisant préférentiellement des techniques maîtrisées par notre équipe. Le défi de ce projet était que nous ne possédions que très peu d'indications sur la famille *IFF*. Deux publications sur *IFF4* ont montré qu'il était impliqué dans l'adhérence sur polystyrène et cellules épithéliales orales FaDu, mais aussi dans l'invasion tissulaire et la sensibilité aux neutrophiles. Une publication sur *IFF11* a montré qu'il était impliqué dans la biosynthèse de la paroi et dans la virulence en modèle murin d'infection systémique. Enfin la publication la plus ancienne montrait que le gène *HYR1* était induit par la morphogénèse en hyphe. Tout récemment il a été montré que *HYR1* était un facteur de virulence intervenant dans l'échappement à la phagocytose et constituait un potentiel candidat pour la création d'un vaccin (Luo *et al.*, 2010). Tout cela ajouté à des résultats de puces données dans CGD nous indiquait que cette famille était fortement impliquée avec l'hôte. Parallèlement ces données bibliographiques, les prédictions *in silico* localisaient ces protéines majoritairement en surface. Nous avons donc réalisé un criblage sur des mutants monogéniques grâce à différents tests permettant d'étudier l'impact de ces délétions sur la biosynthèse de la paroi, la filamentation, la résistance à différents stress, l'adhérence sur cellules épithéliales HeLa et la survie après une co-culture avec des macrophages J774.

Au cours de ce travail nous avons tout d'abord montré que les protéines Iffs semblaient caractéristiques des levures CTG, à quelques exceptions près. La présence de ces protéines chez *Pichia stipitis* et leur perte chez *Debaryomyces hansenii* nous montre qu'elles ont été perdues chez ce deuxième clade (Tsui *et al.*, 2008). Cette famille a été amplifiée, dans certains cas après la spéciation chez des pathogènes opportunistes humains pour la plupart (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *L. elongisporus*...). L'étude phylogénétique de cette famille nous a montré que les membres Iff10 et Iff11 étaient probablement les plus anciens, puis un autre groupe plus récent est apparu comprenant les protéines Iff4, Iff5, Iff3 et Iff9. Aucune protéine ne semble relié à Hyr1 qui est la protéine la mieux décrite à l'heure actuelle. Ces données phylogénétiques ne nous ont cependant donné aucune information sur la fonction de ces protéines.

Nous avons ensuite voulu confirmer la localisation des protéines grâce à un système synthétique permettant leur surexpression sous contrôle du promoteur *ACT1* et apportant un Tag V5. D'après le logiciel PredGPI, Iff3, Iff5, Iff6 et Iff8 sont des protéines à ancre GPI. L'immunofluorescence a montré qu'elles étaient pariétales. Iff2 est quant à elle membranaire, et semblerait néanmoins accessible aux anticorps en surface des cellules. Cette localisation leurs donne une place privilégiée pour interagir avec l'hôte. Dans le cas d'Iff7, nous n'avons pas pu visualiser la protéine. Une hypothèse serait que la traduction de cette protéine est particulièrement inefficace dû à un biais de codon défavorable (<0,2). Une étude récente menée par mon équipe a permis de localiser une chimère Iff5-Iff7, comportant la région codante d'Iff5 et les régions amino et carboxy- terminales d'Iff7. En réalisant les mêmes chimères pour Iff1, Iff4 et Iff10 ces protéines ont été localisées par western blot (**Figure 40**). Iff1 et Iff4 sont des protéines pariétales tandis que Iff10 est membranaire. Iff7 est un cas particulier puisqu'elle est identifiable aussi bien dans la fraction pariétale que membranaire.

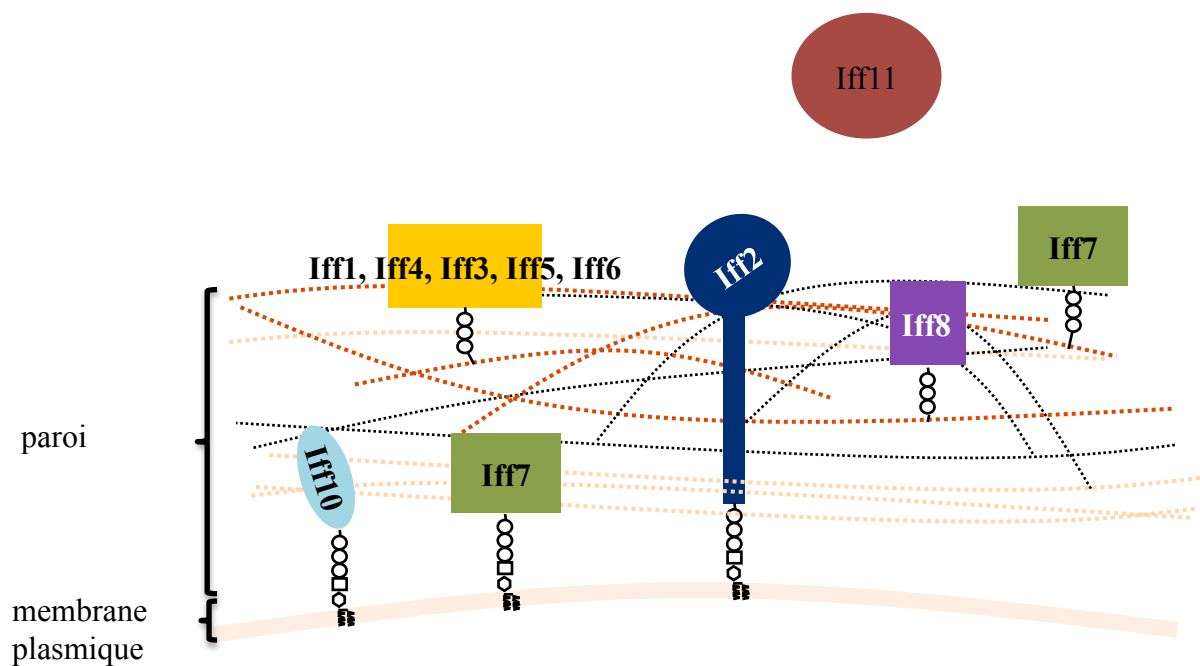


Figure 40 : Schéma récapitulatif de la localisation actualisée des protéines Iffs.

Suite à ce qu'il a «été montré dans la figure 24 de la partie résultat, les protéines Iff1, Iff4, Iff7 et Iff10 ont été localisé récemment par notre équipe. Cette localisation montre que ce sont toutes des protéines à ancre GPI, ce qui va à l'encontre de la prédiction *in silico* pour Iff7. Tandis qu' Iff7 est aussi bien membranaire que pariétale, Iff1 et Iff4 sont pariétales alors qu' Iff10 est membranaire.

Ce mécanisme est probablement dû à son ancre GPI, ce qui irait à l'encontre des prédictions *in silico* faite sur *Iff7*. Nous n'avons pas encore étudié la localisation d'*Iff9*.

Nous avons ensuite pu inactiver huit des 11 gènes *IFF* : *IFF1*, *IFF2*, *IFF4*, *IFF6*, *IFF7*, *IFF8*, *IFF10* et *IFF11*. Les mutants nuls du gène *IFF5* ont bien été obtenus mais comme ils ont présenté des phénotypes hétérogènes sur boîtes, nous n'avons pu conclure sur un éventuel effet phénotypique de leur absence. Les gènes *IFF3* et *IFF9* semblent essentiels et les mutants homozygotes n'ont pas pu être obtenus malgré des essais répétés. Un test a été effectué, pour confirmer cette hypothèse, en plaçant un allèle du mutant hétérozygote sous le contrôle du promoteur Tet-Off répressible par la Doxycycline. Malheureusement le niveau réprimé est resté égal au niveau d'expression dans la souche sauvage. Nous avons également essayé de construire des doubles mutants *iff8* et *iff2* ainsi que les doubles mutants *iff10* et *iff11*. Nous comptons sur le fait que ces deux gènes étaient contigus. Nous n'avons jamais réussi à obtenir de doubles mutants homozygotes après 3 essais. Il serait intéressant de vérifier que la double délétion n'est pas létale.

Nous nous attendions à ce que l'absence de certaines protéines Iff produise un phénotype à l'instar de ce qui avait été publié pour un *Hyr1*, *Iff11* ou *Iff4*, reflétant une redondance fonctionnelle au moins partielle, ce qui est souvent le cas familles protéiques. Cela est par exemple le cas pour la famille *ALS*. Nous avons donc réalisé des tests phénotypiques en milieux liquides et solides afin de tester l'intégrité de la paroi, la résistance aux stress pH, stress oxydatif, la résistance à de forte température et la filamentation, mais n'avons observé aucun phénotype, y compris dans le cas des mutants *iff4*^{-/-} et *iff11*^{-/-}. Concernant les expériences contradictoires publiées sur *IFF11*, nous n'avons pas d'explication. Cela souligne que ces tests ne sont pas très reproductibles. Par ailleurs, nous

n'avons pas non plus observé de défaut d'adhérence sur les cellules épithéliales HeLa ni de survie dans les macrophages J774. Nous avons choisi d'utiliser une approche par inactivation individuelle des gènes de la famille. On ne peut donc pas exclure la possibilité que dans les conditions testées, ces gènes n'aient pas de fonction particulière ou qu'un autre gène ait une fonction redondante et suffise à restaurer la fonction de sorte à cacher le phénotype du gène étudié (Selmecki *et al.*, 2005; Wellington & Rustchenko, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

L'absence de phénotype particulier observé avec nos mutants en interaction avec les macrophages ou les cellules HeLa semblait cependant contradictoire avec les résultats publiés montrant une expression différentielle des gènes *IFF* dans les modèles d'infection *in vivo*. C'est pourquoi nous avons cherché à suivre l'expression des gènes *IFF* en interaction avec des cellules mammifères.

Nous avons pu observer que *HYRI* était bien induit comme attendu en condition de filamentation et dans le rein après 3 jours d'infection d'une souris. Nous avons aussi confirmé que les gènes *IFF* étaient peu ou pas exprimés dans des milieux de laboratoire, à l'exception d'*IFF2* qui a montré une forte expression en phase stationnaire quel que soit le milieu de culture dans plusieurs expériences indépendantes.

En interaction avec des cellules HeLa, nous avons observé qu'une mutation dans un des gènes *IFF* (particulièrement *IFF2*, *IFF6*, *IFF7* et *IFF8*) semblait entraîner une dérégulation des deux gènes, *IFF3* et *IFF9*. Cela pourrait indiquer l'existence de corégulations entre les membres de cette famille, peut-être lors de l'étape d'adhésion aux cellules épithéliales. Même si on ne connaît pas encore les mécanismes, les inducteurs ou les fonctions codées par ces gènes, cela nous donne une piste dans le choix des gènes à combiner dans un mutant multiple. Les résultats obtenus sont cependant très préliminaires et donc à prendre avec précaution même si des tendances peuvent être extraites de l'analyse de ces premiers résultats. Il faudrait

valider les résultats obtenus par plus d'expériences ainsi que compléter les mutants pour vérifier que les effets obtenus sont bien dus à l'inactivation des gènes *IFF*. Le travail de création et de vérification de la banque ayant pris beaucoup de temps, nous avons fait le choix de ne pas créer les souches complémentées de nos mutants en l'absence d'effet phénotypique à tester. Il serait maintenant utile d'en disposer.

Pour faciliter un suivi d'expression des gènes *IFF*, une banque d'expression de fusions *PGA59:gLUC* sous contrôle des promoteurs *IFF* et insérée au locus *RPI10* a été créée au cours de ma thèse. Cette banque devait permettre de tester rapidement différentes conditions et différents modèles d'interaction pour l'expression des gènes *IFF* (Enjalbert *et al.*, 2009). Elle repose sur l'utilisation du gène de la Gaussia Luciferase (gLUC) comme gène rapporteur flanqué des régions amino et carboxy-terminales de *PGA59* pour permettre l'ancrage GPI pariétal de la protéine rapporteur. L'expression du promoteur *HYR1* était détectable en condition de filamentation, ce qui a validé le bon fonctionnement de ces constructions. Cependant, l'expression des autres promoteurs n'a pas été détectée, probablement parce que le niveau d'expression est trop faible. Nous n'avons donc pas poussé plus avant l'utilisation de ce rapporteur.

Perspectives

Plusieurs perspectives sont envisageables suite à ce travail de thèse :

- Confirmer la localisation des protéines.
- Confirmer l'essentialité des gènes *IFF3* et *IFF9*.
- Diversifier les tests phénotypiques.
- Interrompre ou surexprimer une ou plusieurs protéines.

Concernant les gènes *IFF3* et *IFF9*, leur essentialité n'a pas encore été prouvée. Des méthodes comme la technique des hétérocaryons utilisée par exemple chez *Aspergillus nidulans* (Osmani *et al.*, 2006) ne sont pas applicables à *C. albicans* qui ne forme ni hétérocaryons ni microconidies. Une technique couramment utilisée chez *S. cerevisiae* pourrait par contre être transposée. Elle consiste, après avoir créé le mutant hétérozygote, à apporter un allèle sauvage sur un vecteur répliatif portant le marqueur de sélection *URA3*, puis à inactiver ensuite le deuxième allèle à son locus et enfin à sélectionner des clones *Ura⁻* après passage sur 5FOA : l'obtention des clones *Ura⁻* indique que le gène n'est pas essentiel, tandis que l'impossibilité de les obtenir indique que la présence de l'allèle sauvage est essentielle. Chez *C. albicans*, les plasmides répliatifs ont tendance à s'intégrer au chromosome : on pourrait donc insérer à un locus ectopique l'allèle sauvage couplé à un marqueur *URA3* entre deux séquences répétées (type séquences *HisG*), afin de l'exciser après obtention de l'homozygote mutant.

Concernant les tests phénotypiques, il en existe de plus élaborés que ceux utilisés dans le travail de criblage effectué durant ma thèse. La littérature a montré qu'une protéine Als par exemple pouvait adhérer de façon spécifique à un type cellulaire mais pas à un autre (Allsopp *et al.*, 1998; Loza *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004). Il serait donc possible de tester d'autres types cellulaires tels que les cellules intestinales Caco2 ou les cellules endothéliales, ou un modèle de fractions sanguines. Pour étudier plus spécifiquement l'interaction avec les cellules épithéliales, les auteurs utilisent des tissus reconstitués qui permettent de suivre la production de cytokines (Schaller *et al.*, 2005), ainsi que les différentes étapes d'adhérence, pénétration et destruction cellulaire (Zhao *et al.*, 2005).

Pour étudier de façon globale ce qui se passe *in vivo* et l'infection systémique en général, il est possible d'utiliser un modèle insecte qui est plus facile à utiliser, moins coûteux

et éthiquement plus acceptable que le modèle murin, tout en possédant un système d'immunité acquise ressemblant pour partie à celui des vertébrés. Au cours de ma thèse nous avons commencé à mettre en place une expérimentation d'infection systémique sur modèle insecte. En effet, la larve de *Galleria mellonella* peut être utilisée comme modèle d'infection systémique chez *C. albicans* (Bergin *et al.*, 2006; Brenan, 2002; Mowlds *et al.*, 2010). Nous avons bien observé un effet létal sur les larves de *G. mellonella*, avec la souche sauvage SC5314 inoculée à raison de 10^6 cellules par chenille soit la même concentration que celle utilisée dans la littérature. Cependant à cette dose les souches réputées moins virulentes que nous avons testées, tuaient aussi efficacement. Nous n'avons pas eu le temps de tester une gamme de doses. Cependant les modèles ne sont pas parfaits entre autre parce qu'ils ne possèdent pas de système d'immunité acquise comparable à celui des vertébrés, et aussi parce qu'il faut administrer de fortes doses d'inoculum pour créer la maladie puisque contrairement au lapin par exemple, ces modèles ne sont pas des hôtes naturels de *C. albicans*.

Nous envisageons également d'analyser le rôle des protéines Iffs dans la reconnaissance de *C. albicans* par le système immunitaire. Nous avons pensé utiliser le modèle de S. Rupp qui permet de visualiser à haut débit l'interaction protéine/TLR et de différencier les PAMPs de *C. albicans* via le TLR avec qui ils interagissent. Pour cela, le récepteur TLR4 et son corécepteur CD14 (par exemple) sont exprimés dans des fibroblastes NIH-3T3 contenant un gène rapporteur. L'induction de TLR4 entraîne une cascade de signaux qui vont activer le facteur de transcription NF- κ B qui régule l'expression du gène rapporteur, une phosphatase alcaline sécrétée. On a alors formation d'un précipité bleu détectable à l'œil nu ou par un test à haut débit par analyse photométrique. Nos mutants (et leurs témoins complémentés) pourraient facilement être testés dans ce modèle en utilisant la fraction pariétale soit en utilisant la protéine purifiée extraite d'une souche de surexpression.

Si ces différentes approches phénotypiques ne permettent toujours pas d'observer un phénotype chez les mutants *iff*^{-/-}, on pourrait envisager d'utiliser une approche plus lourde qui serait une étude de transcriptomique globale à l'aide de puces ou de RNAseq et cela en condition de laboratoire classique ou d'interaction avec l'hôte (mêmes conditions que celles utilisées plus haut pour les tests phénotypes). Connaître l'expression des gènes *IFF* nous donnerait en effet une première estimation de leurs conditions d'expression et peut-être une première piste pour une étude fonctionnelle plus ciblée.

Maintenant nous pourrions envisager aussi des approches complètement différentes pour étudier cette famille de gènes. Plusieurs alternatives existent.

Nous avons choisi d'inactiver un à un les gènes *IFF*. Cette approche a été utilisée avec succès dans le cas des gènes *ALS*, mais habituellement il est plus simple de faire l'inverse c'est à dire d'inactiver tous les gènes puis de les réintroduire un par un. En effet, cela permet d'étudier plusieurs combinaisons. Pour créer des mutants multiples tels que les doubles mutants *iff2* et *iff8* ou *iff10* et *iff11*, il faudrait utiliser une technique de délétion qui utilise un marqueur de sélection recyclable.

Une autre possibilité serait d'exprimer ou de surexprimer ces protéines chez une souche non adhérente. Nous pourrions utiliser un mutant *als3*^{-/-}, qui a été décrit comme non adhérent pour étudier l'adhérence sur différents supports après surexpression de différentes *IFF*. Une autre possibilité serait d'utiliser *S. cerevisiae*, espèce non adhérente et non virulente, ce qui nous permettrait de tester la restauration de deux phénotypes. Nous avons réalisé une expression hétérologue chez *S. cerevisiae* des protéines Iff4, Eap1 et Als3. Ces deux dernières protéines de *C. albicans* étant connues pour conférer l'adhérence à *S. cerevisiae*. Les témoins positifs d'adhérence Eap1, Als3 ont adhéré sur cellules HeLa, mucine, et polystyrène, mais pas Iff4. Cela peut vouloir dire que soit la protéine Iff4 seule ne suffit par pour permettre

l'adhérence, soit que la protéine est mal repliée ou mal localisée ce qui ne donne pas le phénotype attendu. Néanmoins, il pourrait être intéressant de tester les autres protéines Iffs de cette manière et aussi dans d'autres conditions.

Une autre approche serait de rester dans le même organisme mais de surexprimer la protéine d'intérêt. Le problème de cette méthode est que l'on peut en effet amplifier un phénotype tout comme on peut provoquer une localisation incorrecte de la protéine, ou rencontrer un problème de toxicité de la protéine en surnombre. Enfin il se peut que nous n'arrivions pas à obtenir une surexpression massive de la protéine comme nous l'avons observé dans le cas d'Iff7. Cependant dans ce dernier cas, si on ne peut pas les identifier en Western blot, elles sont probablement bien surexprimées et on peut malgré tout s'attendre à observer un phénotype différent de celui de la souche sauvage.

Références Bibliographiques

Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I. & other authors (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* 281, 688-694.

Alby, K., Schaefer, D. & Bennett, R. J. (2009). Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* 460, 890-893.

Allsopp, C. E., Nicholls, S. J. & Langhorne, J. (1998). A flow cytometric method to assess antigen-specific proliferative responses of different subpopulations of fresh and cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 214, 175-186.

Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E., Filler, S. G. & Hube, B. (2008). The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog* 4, e1000217.

Andes, D., Lepak, A., Pitula, A., Marchillo, K. & Clark, J. (2005). A simple approach for estimating gene expression in *Candida albicans* directly from a systemic infection site. *J Infect Dis* 192, 893-900.

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

Bain, J. M., Stubberfield, C. & Gow, N. A. (2001). Ura-status-dependent adhesion of *Candida albicans* mutants. *FEMS Microbiol Lett* 204, 323-328.

Bates, S., MacCallum, D. M., Bertram, G., Munro, C. A., Hughes, H. B., Buurman, E. T., Brown, A. J., Odds, F. C. & Gow, N. A. (2005). *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem* 280, 23408-23415.

Bates, S., Hughes, H. B., Munro, C. A. & other authors (2006). Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 281, 90-98.

Bates, S., de la Rosa, J. M., MacCallum, D. M., Brown, A. J., Gow, N. A. & Odds, F. C. (2007). *Candida albicans* Iff11, a secreted protein required for cell wall structure and virulence. *Infect Immun* 75, 2922-2928.

Bergin, D., Murphy, L., Keenan, J., Clynes, M. & Kavanagh, K. (2006). Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by

- Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes Infect* 8, 2105-2112.
- Bernhardt J, Herman D, Sheridan M, Calderone R. (2001). Adherence and invasion studies of *Candida albicans* strains, using in vitro models of esophageal candidiasis. *J Infect Dis*. 184(9):1170-5.
- Birse, C. E., Irwin, M. Y., Fonzi, W. A. & Sypherd, P. S. (1993). Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* 61, 3648-3655.
- Boisramé A. & Gaillardin C. (2009) .Heterologous expression and characterization of a α -1,6-glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:663–669
- Boone, C., Sdicu, A., Laroche, M. & Bussey, H. (1991). Isolation from *Candida albicans* of a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* KRE1 gene, which is involved in cell wall beta-glucan synthesis. *J Bacteriol* 173, 6859-6864.
- Brand, A., MacCallum, D. M., Brown, A. J., Gow, N. A. & Odds, F. C. (2004). Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus. *Eukaryot Cell* 3, 900-909.
- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X. & Johnson, A. D. (2000). Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* 156, 31-44.
- Braun, B. R. & Johnson, A. D. (2000). TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* 155, 57-67.
- Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, Mylonakis E. 2007. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog.* Feb;3(2):e18.
- Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. (2002). Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 34(2):153-7
- Brown, A. J., Odds, F. C. & Gow, N. A. (2007). Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 10, 307-313.
- Brown, G. D. & Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413, 36-37.
- Brown, G. D. & Gordon, S. (2005). Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol* 7, 471-479.
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F. & other authors (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459, 657-662.

- Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L. & Gil, C. (2009). Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics* 9, 4770-4786.
- Calderone, R. A. (1993). Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol* 1, 55-58.
- Cambi, A., Netea, M. G., Mora-Montes, H. M. & other authors (2008). Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J Biol Chem* 283, 20590-20599.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. (2001). Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* 184, 337-344.
- Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 495-544.
- Chunchanur, S. K., Nadgir, S. D., Halesh, L. H., Patil, B. S., Kausar, Y. & Chandrasekhar, M. R. (2009). Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida dubliniensis* from human immunodeficiency virus-infected patients. *Indian J Pathol Microbiol* 52, 501-504.
- Clemons, K. V., Espiritu, M., Parmar, R. & Stevens, D. A. (2006). Assessment of the paradoxical effect of caspofungin in therapy of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1293-1297.
- Concia, E., Azzini, A. M. & Conti, M. (2009). Epidemiology, incidence and risk factors for invasive candidiasis in high-risk patients. *Drugs* 69 Suppl 1, 5-14.
- Coronado, J. E., Epstein, S. L., Qiu, W. G. & Lipke, P. N. (2007). Discovery of Recurrent Sequence Motifs in *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Proteins. *Match (Mulh)* 58, 281-299.
- Costa, C. R., Jesuino, R. S., de Aquino Lemos, J., de Fatima Lisboa Fernandes, O., Hasimoto e Souza, L. K., Passos, X. S. & do Rosario Rodrigues Silva, M. (2010). Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. *Mycopathologia* 169, 91-98.
- Cowen, L. E. (2001). Predicting the emergence of resistance to antifungal drugs. *FEMS Microbiol Lett* 204, 1-7.
- Cowen, L. E., Kohn, L. M. & Anderson, J. B. (2001). Divergence in fitness and evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 183, 2971-2978.
- Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruère C, Bonnin A, Hube B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 12(2):248-71.

- Davis, D., R. B. Wilson and A. P. Mitchell, (2000) RIM101-dependent and -independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 971–978.
- Davis, D.A., Bruno, V.M., Loza, L., Filler, S.G., and Mitchell, A.P. (2002) *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* 162: 1573–1581.
- d'Enfert, C. (2009). Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr Opin Microbiol* 12, 358-364.
- De Groot, P. W., Hellingwerf, K. J. & Klis, F. M. (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20, 781-796.
- de Groot, P. W., de Boer, A. D., Cunningham, J., Dekker, H. L., de Jong, L., Hellingwerf, K. J., de Koster, C. & Klis, F. M. (2004). Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* 3, 955-965.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. & Klis, F. M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* 146 (Pt 9), 2121-2132.
- Dean, N. (1999). Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim Biophys Acta* 1426, 309-322.
- Delbruck, S. & Ernst, J. F. (1993). Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 10, 859-866.
- Dranginis, A. M., Rauceo, J. M., Coronado, J. E. & Lipke, P. N. (2007). A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 282-294.
- Dromer, F., Chevalier, R., Sendid, B., Improvisi, L., Jouault, T., Robert, R., Mallet, J. M. & Poulain, D. (2002). Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3869-3876.
- Dugger, K. O., Villareal, K. M., Ngyuen, A., Zimmermann, C. R., Law, J. H. & Galgiani, J. N. (1996). Cloning and sequence analysis of the cDNA for a protein from *Coccidioides immitis* with immunogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 218, 485-489.
- Ecker, M., Mrsa, V., Hagen, I., Deutzmann, R., Strahl, S. & Tanner, W. (2003). O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep* 4, 628-632.

- Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrsa, V. & Tanner, W. (2006). Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* 281, 11523-11529.
- Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M. & Eisenhaber, F. (2004). A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* 337, 243-253.
- Ellis, R. J., Vertocnik, A., Kim, E. & other authors (2003). Four-year biochemical outcome after radioimmunoguided transperineal brachytherapy for patients with prostate adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57, 362-370.
- Enjalbert B, Rachini A, Vedyappan G, Pietrella D, Spaccapelo R, Vecchiarelli A, Brown AJ, d'Enfert C. (2009). A multifunctional, synthetic *Gaussia princeps* luciferase reporter for live imaging of *Candida albicans* infections. *Infect Immun*. 77(11):4847-58.
- Enloe, B., Diamond, A. & Mitchell, A. P. (2000). A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J Bacteriol* 182, 5730-5736.
- Ernst, J. F. & Prill, S. K. (2001). O-glycosylation. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 67-74.
- Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2, 820-832.
- Fiani M. L., Beitz J., Turvy D., Blum J. S., Stahl P. D. 1998. Regulation of mannose receptor synthesis and turnover in mouse J774 macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 64, 85-91
- Fidel, P. L., Jr. (2002). The protective immune response against vaginal candidiasis: lessons learned from clinical studies and animal models. *Int Rev Immunol* 21, 515-548.
- Finney, R., Langtimm, C. J. & Soll, D. R. (1985). The programs of protein synthesis accompanying the establishment of alternative phenotypes in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 91, 3-15.
- Fonzi, W. A. & Irwin, M. Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717-728.
- Fradin, C., Poulain, D. & Jouault, T. (2000). beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* 68, 4391-4398.
- Fradin, C. & Hube, B. (2003). Tissue infection and site-specific gene expression in *Candida albicans*. *Adv Appl Microbiol* 53, 271-290.

- Fradin, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Gaillardin, C., d'Enfert, C. & Hube, B. (2003). Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 47, 1523-1543.
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C. & Hube, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* 56, 397-415.
- Frank CF, Hostetter MK. (2007). Cleavage of E-cadherin: a mechanism for disruption of the intestinal epithelial barrier by *Candida albicans*. *Transl Res.* 149(4):211-22.
- Franzusoff, A. & Schekman, R. (1989). Functional compartments of the yeast Golgi apparatus are defined by the *sec7* mutation. *EMBO J* 8, 2695-2702.
- Friedman, A., Galazka-Friedman, J., Bauminger, E. R. & Kozirowski, D. (2006). Iron and ferritin in hippocampal cortex and substantia nigra in human brain--implications for the possible role of iron in dementia. *J Neurol Sci* 248, 31-34.
- Frieman MB, Cormack BP. (2003). The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol Microbiol.* 50(3):883-96.
- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W. A., Belanger, P. H., Edwards, J. E., Jr. & Filler, S. G. (1998). Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* 66, 1783-1786.
- Fu, Y., Ibrahim, A. S., Sheppard, D. C., Chen, Y. C., French, S. W., Cutler, J. E., Filler, S. G. & Edwards, J. E., Jr. (2002). *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* 44, 61-72.
- Fu, Y., Luo, G., Spellberg, B. J., Edwards, J. E., Jr. & Ibrahim, A. S. (2008). Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 7, 483-492.
- Garaizar, J., Brena, S., Bikandi, J., Rementeria, A. & Ponton, J. (2006). Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 6, 987-998.
- Garcera, A., Martinez, A. I., Castillo, L., Elorza, M. V., Sentandreu, R. & Valentin, E. (2003). Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiology* 149, 2137-2145.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M. & d'Enfert, C. (2004). *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* 3, 536-545.

- Gatti, E., Popolo, L., Vai, M., Rota, N. & Alberghina, L. (1994). O-linked oligosaccharides in yeast glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein gp115 are clustered in a serine-rich region not essential for its function. *J Biol Chem* 269, 19695-19700.
- Gaur, N. K., Klotz, S. A. & Henderson, R. L. (1999). Overexpression of the *Candida albicans* ALA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. *Infect Immun* 67, 6040-6047.
- Gaur, N. K., Smith, R. L. & Klotz, S. A. (2002). *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* expressing ALA1/ALS5 adhere to accessible threonine, serine, or alanine patches. *Cell Commun Adhes* 9, 45-57.
- Gaur, N. K. & Klotz, S. A. (2004). Accessibility of the peptide backbone of protein ligands is a key specificity determinant in *Candida albicans* SRS adherence. *Microbiology* 150, 277-284.
- Gietz RD, Woods RA. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350:87-96.
- Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5 -phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198:179-182.
- Gow, N. A., Netea, M. G., Munro, C. A. & other authors (2007). Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis* 196, 1565-1571.
- Green, C. B., Zhao, X., Yeater, K. M. & Hoyer, L. L. (2005). Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells. *Microbiology* 151, 1051-1060.
- Green, C. B., Marretta, S. M., Cheng, G., Faddoul, F. F., Ehrhart, E. J. & Hoyer, L. L. (2006). RT-PCR analysis of *Candida albicans* ALS gene expression in a hyposalivatory rat model of oral candidiasis and in HIV-positive human patients. *Med Mycol* 44, 103-111.
- Grimme, S. J., Colussi, P. A., Taron, C. H. & Orlean, P. (2004). Deficiencies in the essential Smp3 mannosyltransferase block glycosylphosphatidylinositol assembly and lead to defects in growth and cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology* 150, 3115-3128.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M. & Kitada, K. (1998). Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 258, 53-59.
- Hamza, O. J., Matee, M. I., Moshi, M. J. & other authors (2008). Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-

infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. *BMC Microbiol* 8, 135.

Han, Y., Kanbe, T., Cherniak, R. & Cutler, J. E. (1997). Biochemical characterization of *Candida albicans* epitopes that can elicit protective and nonprotective antibodies. *Infect Immun* 65, 4100-4107.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.*166(4):557-80.

Hasenclever, H. F. (1971). The consistent formation of chlamydospores by *Candida tropicalis*. *Sabouraudia* 9, 164-166.

Hayette, M. P., Strecker, G., Faille, C., Dive, D., Camus, D., Mackenzie, D. W. & Poulain, D. (1992). Presence of human antibodies reacting with *Candida albicans* O-linked oligomannosides revealed by using an enzyme-linked immunosorbent assay and neoglycolipids. *J Clin Microbiol* 30, 411-417.

Heitman, J. (2009). Microbial genetics: Love the one you're with. *Nature* 460, 807-808.

Hernandez R, Rupp S. (2009). Human epithelial model systems for the study of *Candida* infections in vitro: part II. Histologic methods for studying fungal invasion. *Methods Mol Biol.* 470:105-23.

Herrero, A. B., Uccelletti, D., Hirschberg, C. B., Dominguez, A. & Abeijon, C. (2002). The Golgi GDPase of the fungal pathogen *Candida albicans* affects morphogenesis, glycosylation, and cell wall properties. *Eukaryot Cell* 1, 420-431.

Holz, R. W. (1974). The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. *Ann N Y Acad Sci* 235, 469-479.

Hoyer, L. L., Scherer, S., Shatzman, A. R. & Livi, G. P. (1995). *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol* 15, 39-54.

Hoyer, L. L., Payne, T. L., Bell, M., Myers, A. M. & Scherer, S. (1998). *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet* 33, 451-459.

Hoyer, L. L. (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9, 176-180.

Hoyer, L. L., Fundyga, R., Hecht, J. E., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. & Arnold, J. (2001). Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics* 157, 1555-1567.

Hoyer, L. L., Green, C. B., Oh, S. H. & Zhao, X. (2008). Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* 46, 1-15.

- Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. & Gow, N. A. (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 14, 87-99.
- Hube, B. & Naglik, J. (2002). Extracellular hydrolases. In *Candida and Candidiasis*, pp. 107-121. Edited by R. A. Calderone. Washington: ASM Press.
- Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P. A., Poulain, D. & Jouault, T. (2003a). *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* 278, 13086-13093.
- Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P. A., Poulain, D. & Jouault, T. (2003b). Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 573-576.
- Ikezawa, H., Yamanegi, M., Taguchi, R., Miyashita, T. & Ohyabu, T. (1976). Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. I. purification, properties and phosphatase-releasing activity. *Biochim Biophys Acta* 450, 154-164.
- Ilgoutz, S. C., Zawadzki, J. L., Ralton, J. E. & McConville, M. J. (1999). Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*. *EMBO J* 18, 2746-2755.
- Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15, 291-294.
- Jigami, Y. & Odani, T. (1999). Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim Biophys Acta* 1426, 335-345.
- Jouault, T., Fradin, C., Trinel, P. A., Bernigaud, A. & Poulain, D. (1998). Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. *J Infect Dis* 178, 792-802.
- Jouault T, El Abed-El Behi M, Martínez-Esparza M, Breuilh L, Trinel PA, Chamailard M, Trottein F, Poulain D. (2006). Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol*. 177(7):4679-87
- Kamai, Y., Kubota, M., Hosokawa, T., Fukuoka, T. & Filler, S. G. (2002). Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 70, 5256-5258.
- Kang, J. Y., Hong, Y., Ashida, H., Shishioh, N., Murakami, Y., Morita, Y. S., Maeda, Y. & Kinoshita, T. (2005). PIG-V involved in transferring the second mannose in glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* 280, 9489-9497.

- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G. J., Van den Ende, H. & Klis, F. M. (1995). Covalent association of beta-1,3-glucan with beta-1,6-glycosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 177, 3788-3792.
- Kapteyn, J. C., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M. & Klis, F. M. (1999). The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol* 31, 1835-1844.
- Kawagoe, K., Kitamura, D., Okabe, M., Taniuchi, I., Ikawa, M., Watanabe, T., Kinoshita, T. & Takeda, J. (1996). Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87, 3600-3606.
- Kempf, M., Apaire-Marchais, V., Saulnier, P., Licznar, P., Lefrançois, C., Robert, R. & Cottin, J. (2007). Disruption of *Candida albicans* IFF4 gene involves modifications of the cell electrical surface properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 58, 250-255.
- Kempf M, Cottin J, Licznar P, Lefrançois C, Robert R, Apaire-Marchais V. (2009). Disruption of the GPI protein-encoding gene IFF4 of *Candida albicans* results in decreased adherence and virulence. *Mycopathologia*. 168(2):73-7. Epub 2009 Apr 5.
- Kery, V., Krepinsky, J. J., Warren, C. D., Capek, P. & Stahl, P. D. (1992). Ligand recognition by purified human mannose receptor. *Arch Biochem Biophys* 298, 49-55.
- Klis, F. M., de Groot, P. & Hellingwerf, K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 1-8.
- Klis, F. M., Boorsma, A. & De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185-202.
- Klotz, S. A., Gaur, N. K., Lake, D. F., Chan, V., Rauceo, J. & Lipke, P. N. (2004a). Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infect Immun* 72, 2029-2034.
- Klotz, S. A., Gaur, N. K., Rauceo, J., Lake, D. F., Park, Y., Hahm, K. S. & Lipke, P. N. (2004b). Inhibition of adherence and killing of *Candida albicans* with a 23-Mer peptide (Fn/23) with dual antifungal properties. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4337-4341.
- Klotz, S. A., Gaur, N. K., De Armond, R., Sheppard, D., Khardori, N., Edwards, J. E., Jr., Lipke, P. N. & El-Azizi, M. (2007). *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Med Mycol* 45, 363-370.
- Kohatsu, L., Hsu, D. K., Jegalian, A. G., Liu, F. T. & Baum, L. G. (2006). Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* 177, 4718-4726.
- Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. & Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall.

Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* 272, 17762-17775.

Kretschmar, M., Hube, B., Bertsch, T., Sanglard, D., Merker, R., Schroder, M., Hof, H. & Nichterlein, T. (1999). Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun* 67, 6637-6642.

Kumamoto, C. A. & Vines, M. D. (2005). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 7, 1546-1554.

Lam, J., Herant, M., Dembo, M. & Heinrich, V. (2009). Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. *Biophys J* 96, 248-254.

Lay, J., Henry, L. K., Clifford, J., Koltin, Y., Bulawa, C. E. & Becker, J. M. (1998). Altered expression of selectable marker URA3 in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* 66, 5301-5306.

Leidich, S. D., Drapp, D. A. & Orlean, P. (1994). A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem* 269, 10193-10196.

Lenardon, M. D., Whitton, R. K., Munro, C. A., Marshall, D. & Gow, N. A. (2007). Individual chitin synthase enzymes synthesize microfibrils of differing structure at specific locations in the *Candida albicans* cell wall. *Mol Microbiol* 66, 1164-1173.

Lesage, G. & Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 317-343.

Levin, D. (2005). Cell wall signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 262-291.

Levitz SM. (2010) Innate recognition of fungal cell walls. [PLoS Pathog.](#) 6(4):e1000758.

Lohse, M. B. & Johnson, A. D. (2008). Differential phagocytosis of white versus opaque *Candida albicans* by *Drosophila* and mouse phagocytes. *PLoS One* 3, e1473.

Lott, T. J., Holloway, B. P., Logan, D. A., Fundyga, R. & Arnold, J. (1999). Towards understanding the evolution of the human commensal yeast *Candida albicans*. *Microbiology* 145 (Pt 5), 1137-1143.

Loza, L., Fu, Y., Ibrahim, A. S., Sheppard, D. C., Filler, S. G. & Edwards, J. E., Jr. (2004). Functional analysis of the *Candida albicans* ALS1 gene product. *Yeast* 21, 473-482.

Luo, G., Ibrahim, A. S., Spellberg, B., Nobile, C. J., Mitchell, A. P. & Fu, Y. (2010). *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. *J Infect Dis* 201, 1718-1728.

- Marcil, A., Harcus, D., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (2002). *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect Immun* 70, 6319-6329.
- Marcil, A., Gadoury, C., Ash, J., Zhang, J., Nantel, A. & Whiteway, M. (2008). Analysis of PRA1 and its relationship to *Candida albicans*- macrophage interactions. *Infect Immun* 76, 4345-4358.
- Marodi, L., Forehand, J. R. & Johnston, R. B., Jr. (1991). Mechanisms of host defense against *Candida* species. II. Biochemical basis for the killing of *Candida* by mononuclear phagocytes. *J Immunol* 146, 2790-2794.
- Mathews, H. L. & Witek-Janusek, L. (2002). Host defense against oral, esophageal, and gastrointestinal candidiasis. ASM Press, Washington, DC, 179-192.
- Mazan, M., Mazanova, K. & Farkas, V. (2008). Phenotype analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with deletions in Pir cell wall glycoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 335-342.
- McKenzie, C. G., Koser, U., Lewis, L. E., Bain, J. M., Mora-Montes, H. M., Barker, R. N., Gow, N. A. & Erwig, L. P. (2010). Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun* 78, 1650-1658.
- Mean, M., Marchetti, O. & Calandra, T. (2008). Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care* 12, 204.
- Mille, C., Bobrowicz, P., Trinel, P. A. & other authors (2008). Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J Biol Chem* 283, 9724-9736.
- Monod, M., Togni, G., Hube, B. & Sanglard, D. (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* 13, 357-368.
- Monod, M. & Borg-von, Z. M. (2002). Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biol Chem* 383, 1087-1093.
- Mora-Montes, H. M., Bates, S., Netea, M. G. & other authors (2007). Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryot Cell* 6, 2184-2193.
- Mora-Montes, H. M., Ponce-Noyola, P., Villagomez-Castro, J. C., Gow, N. A., Flores-Carreón, A. & Lopez-Romero, E. (2009). Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiol* 4, 1167-1183.
- Morschhauser, J. (2010). Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 47, 94-106.

- Moura, G. R., Carreto, L. C. & Santos, M. A. (2009). Genetic code ambiguity: an unexpected source of proteome innovation and phenotypic diversity. *Curr Opin Microbiol* 12, 631-637.
- Mowlds, P., Coates, C., Renwick, J. & Kavanagh, K. (2010). Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. *Microbes Infect* 12, 146-153.
- Mrsa, V. & Tanner, W. (1999). Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* 15, 813-820.
- Munro, C. A., Bates, S., Buurman, E. T. & other authors (2005). Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem* 280, 1051-1060.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377-388.
- Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O. & Hube, B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6, 915-926.
- Nakayama, H., Mio, T., Nagahashi, S., Kokado, M., Arisawa, M. & Aoki, Y. (2000). Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* 68, 6712-6719.
- Nathan, C. (2006a). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173-182.
- Nathan, C. (2006b). Role of iNOS in human host defense. *Science* 312, 1874-1875; author reply 1874-1875.
- Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. (2004). Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol.* 75(5):749-55.
- Netea, M. G., Gow, N. A., Munro, C. A. & other authors (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 116, 1642-1650.
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J. & Gow, N. A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6, 67-78.
- Nicholls, S., Leach, M. D., Priest, C. L. & Brown, A. J. (2009). Role of the heat shock transcription factor, Hsf1, in a major fungal pathogen that is obligately associated with warm-blooded animals. *Mol Microbiol* 74, 844-861.

- Nitz, M., Ling, C. C., Otter, A., Cutler, J. E. & Bundle, D. R. (2002). The unique solution structure and immunochemistry of the *Candida albicans* beta -1,2-mannopyranan cell wall antigens. *J Biol Chem* 277, 3440-3446.
- Nobile, C. J. & Mitchell, A. P. (2006). Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol* 8, 1382-1391.
- Nobile, C. J., Nett, J. E., Andes, D. R. & Mitchell, A. P. (2006). Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* 5, 1604-1610.
- Nobile, C. J., Schneider, H. A., Nett, J. E., Sheppard, D. C., Filler, S. G., Andes, D. R. & Mitchell, A. P. (2008). Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol* 18, 1017-1024.
- Obayashi, T., Yoshida, M., Mori, T. & other authors (1995). Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 345, 17-20.
- Odani, T., Shimma, Y., Wang, X. H. & Jigami, Y. (1997). Mannosylphosphate transfer to cell wall mannan is regulated by the transcriptional level of the MNN4 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 420, 186-190.
- Odds, F. C. (2009). In *Candida albicans*, resistance to flucytosine and terbinafine is linked to MAT locus homozygosity and multilocus sequence typing clade 1. *FEMS Yeast Res* 9, 1091-1101.
- Odds, F. C. (2010). Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. *Future Microbiol* 5, 67-79.
- Oh, S. H., Cheng, G., Nuessen, J. A., Jajko, R., Yeater, K. M., Zhao, X., Pujol, C., Soll, D. R. & Hoyer, L. L. (2005). Functional specificity of *Candida albicans* Als3p proteins and clade specificity of ALS3 alleles discriminated by the number of copies of the tandem repeat sequence in the central domain. *Microbiology* 151, 673-681.
- Osmani AH, Oakley BR, Osmani SA. (2006). Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nat Protoc.* 5:2517-26.
- Otoo, H. N., Lee, K. G., Qiu, W. & Lipke, P. N. (2008). *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell* 7, 776-782.
- Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A. & Wormald, M. R. (2004). Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology* 14, 103-114.
- Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20, 133-163.
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E., Jr. & Filler, S. G. (2007). Als3 is a *Candida albicans*

invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* 5, e64.

Pierleoni, A., Martelli, P. L. & Casadio, R. (2008). PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 9, 392.

Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H. M., McKinnon, A., Gow, N. A., Gaillardin, C., Munro, C. A. & Richard, M. L. (2008). Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: Roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet Biol*.

Poulain, D., Slomianny, C., Jouault, T., Gomez, J. M. & Trinel, P. A. (2002). Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun* 70, 4323-4328.

Prill, S. K., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C. A., Schroppel, K. & Ernst, J. F. (2005). PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* 55, 546-560.

Proszynski, T. J., Simons, K. & Bagnat, M. (2004). O-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell* 15, 1533-1543.

Pujol, C., Pfaller, M. & Soll, D. R. (2002). Ca3 fingerprinting of *Candida albicans* bloodstream isolates from the United States, Canada, South America, and Europe reveals a European clade. *J Clin Microbiol* 40, 2729-2740.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. & Ramon, D. (1992). Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Appl Environ Microbiol* 58, 2948-2953.

Rajendran, L. & Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118, 1099-1102.

Rauceo, J. M., De Armond, R., Otoo, H., Kahn, P. C., Klotz, S. A., Gaur, N. K. & Lipke, P. N. (2006). Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p. *Eukaryot Cell* 5, 1664-1673.

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

Richard, M. L. & Plaine, A. (2007). Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 6, 119-133.

Rouabhia M, Schaller M, Corbucci C, Vecchiarelli A, Prill SK, Giasson L, Ernst JF. (2007). Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect Immun*. 73(8):4571-80.

- Rubin-Bejerano, I., Abeijon, C., Magnelli, P., Grisafi, P. & Fink, G. R. (2007). Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* 2, 55-67.
- Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E. & Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* 6, 14-29.
- Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J. & Makarow, M. (1992). A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3671-3675.
- Saegusa S, Totsuka M, Kaminogawa S, Hosoi T. (2004). *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* induce interleukin-8 production from intestinal epithelial-like Caco-2 cells in the presence of butyric acid. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 41(3):227-35.
- Salyers, A. & Witt., D. (1994). Virulence factors that promote colonization. In *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*, pp. 30-46. Edited by W. ASM Press, D.C.: Salyers and D. Witt (ed.).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold
- Santos, M. A. & Tuite, M. F. (1995). The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* 23, 1481-1486.
- Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. & Fonzi, W. A. (1995). PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* 15, 601-613.
- Sarazin A, Poulain D, Jouault T. (2010). In vitro pro- and anti-inflammatory responses to viable *Candida albicans* yeasts by a murine macrophage cell line. *Med Mycol*.
- Schaller, M., Hube, B., Ollert, M. W., Schafer, W., Borg-von Zepelin, M., Thoma-Greber, E. & Korting, H. C. (1999). In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol* 112, 383-386.
- Schaller, M., Korting, H. C., Borelli, C., Hamm, G. & Hube, B. (2005). *Candida albicans*-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. *Infect Immun* 73, 2758-2765.
- Selmecki, A., Bergmann, S. & Berman, J. (2005). Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol Microbiol* 55, 1553-1565.

Sendid, B., Jouault, T., Vitse, A., Fradin, C., Colombel, J. F. & Poulain, D. (2009). [Anti-glycan antibodies establish an unexpected link between *C. albicans* and Crohn disease]. *Med Sci (Paris)* 25, 473-481.

Brand A, MacCallum DM, Brown AJ, Gow NA, Odds FC. (2005). Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus. *Eukaryot Cell*. 4:900-9.

Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H. & other authors (2004). Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 279, 30480-30489.

Shibata, N., Ichikawa, T., Tojo, M., Takahashi, M., Ito, N., Okubo, Y. & Suzuki, S. (1985). Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch Biochem Biophys* 243, 338-348.

Shibata, N., Arai, M., Haga, E., Kikuchi, T., Najima, M., Satoh, T., Kobayashi, H. & Suzuki, S. (1992). Structural identification of an epitope of antigenic factor 5 in mannans of *Candida albicans* NIH B-792 (serotype B) and J-1012 (serotype A) as beta-1,2-linked oligomannosyl residues. *Infect Immun* 60, 4100-4110.

Simons, K. & Gruenberg, J. (2000). Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends Cell Biol* 10, 459-462.

Sobel, J. D. (2006). The Emergence of Non-*albicans* *Candida* Species as Causes of Invasive Candidiasis and Candidemia. *Curr Infect Dis Rep* 8, 427-433.

Soll, D. R. & Pujol, C. (2003). *Candida albicans* clades. *FEMS Immunol Med Microbiol* 39, 1-7.

Soll, D. R., Pujol, C. & Srikantha, T. (2009). Sex: deviant mating in yeast. *Curr Biol* 19, R509-511.

Soong, D. & Einarson, A. (2009). Vaginal yeast infections during pregnancy. *Can Fam Physician* 55, 255-256.

Southern, E., "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis," *J Mol Biol*, 98:503, 1975.

Staab, J. F., Ferrer, C. A. & Sundstrom, P. (1996). Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 271, 6298-6305.

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

- Stehr, F., Felk, A., Kretschmar, M., Schaller, M., Schafer, W. & Hube, B. (2000). [Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections]. *Mycoses* 43 Suppl 2, 17-21.
- Stevens, D. A., White, T. C., Perlin, D. S. & Selitrennikoff, C. P. (2005). Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51, 173-178.
- Stevens, D. A., Ichinomiya, M., Koshi, Y. & Horiuchi, H. (2006). Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3160-3161.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentsch, M. & Tanner, W. (1999). Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426, 297-307.
- Strahl-Bolsinger, S. & Scheinost, A. (1999). Transmembrane topology of *pmt1p*, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem* 274, 9068-9075.
- Sudbery, P., Gow, N. & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12, 317-324.
- Sumita, T., Yoko-o, T., Shimma, Y. & Jigami, Y. (2005). Comparison of cell wall localization among Pir family proteins and functional dissection of the region required for cell wall binding and bud scar recruitment of *Pir1p*. *Eukaryot Cell* 4, 1872-1881.
- Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* 4, 461-469.
- Suzuki, A., Takata, Y., Oshie, A., Tezuka, A., Shibata, N., Kobayashi, H., Okawa, Y. & Suzuki, S. (1995). Detection of beta-1,2-mannosyltransferase in *Candida albicans* cells. *FEBS Lett* 373, 275-279.
- Suzuki, S. (2002). Serological differences between the different *Candida* spp. Washington: ASM Press.
- Swoboda, R. K., Bertram, G., Colthurst, D. R., Tuite, M. F., Gow, N. A., Gooday, G. W. & Brown, A. J. (1994a). Regulation of the gene encoding translation elongation factor 3 during growth and morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology* 140 (Pt 10), 2611-2616.
- Swoboda, R. K., Bertram, G., Delbruck, S., Ernst, J. F., Gow, N. A., Gooday, G. W. & Brown, A. J. (1994b). Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism. *Mol Microbiol* 13, 663-672.
- Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H. & other authors (2002). *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* 46, 503-512.

- Tavanti, A., Davidson, A. D., Fordyce, M. J., Gow, N. A., Maiden, M. C. & Odds, F. C. (2005). Population structure and properties of *Candida albicans*, as determined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 43, 5601-5613.
- Thewes, S., Kretschmar, M., Park, H., Schaller, M., Filler, S. G. & Hube, B. (2007). In vivo and ex vivo comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Mol Microbiol* 63, 1606-1628.
- Thom, K. & Forrest, G. (2006). Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. *Curr Opin Gastroenterol* 22, 18-23.
- Tongchusak S, Brusich V, Chaiyaroj SC. (2008). Promiscuous T cell epitope prediction of *Candida albicans* secretory aspartyl protease family of proteins. *Infect Genet Evol.* 4:467-73. Epub 2007 Sep 25.
- Towbin, H. et. al. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9):4350-4.
- Tran, D., Tran, P. A., Tang, Y. Q., Yuan, J., Cole, T. & Selsted, M. E. (2002). Homodimeric theta-defensins from rhesus macaque leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities, and bacterial binding properties of the cyclic peptides. *J Biol Chem* 277, 3079-3084.
- Trinel, P. A., Borg-von-Zepelin, M., Lepage, G., Jouault, T., Mackenzie, D. & Poulain, D. (1993). Isolation and preliminary characterization of the 14- to 18-kilodalton *Candida albicans* antigen as a phospholipomannan containing beta-1,2-linked oligomannosides. *Infect Immun* 61, 4398-4405.
- Trinel, P. A., Lepage, G., Jouault, T., Strecker, G. & Poulain, D. (1997). Definitive chemical evidence for the constitutive ability of *Candida albicans* serotype A strains to synthesize beta-1,2 linked oligomannosides containing up to 14 mannose residues. *FEBS Lett* 416, 203-206.
- Trinel, P. A., Maes, E., Zanetta, J. P., Delplace, F., Coddeville, B., Jouault, T., Strecker, G. & Poulain, D. (2002). *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* 277, 37260-37271.
- Trinel, P. A., Delplace, F., Maes, E., Zanetta, J. P., Mille, C., Coddeville, B., Jouault, T., Strecker, G. & Poulain, D. (2005). *Candida albicans* serotype B strains synthesize a serotype-specific phospholipomannan overexpressing a beta-1,2-linked mannotriose. *Mol Microbiol* 58, 984-998.
- Tse, A. G., Barclay, A. N., Watts, A. & Williams, A. F. (1985). A glycopospholipid tail at the carboxyl terminus of the Thy-1 glycoprotein of neurons and thymocytes. *Science* 230, 1003-1008.

- Tsui, C. K., Daniel, H. M., Robert, V. & Meyer, W. (2008). Re-examining the phylogeny of clinically relevant *Candida* species and allied genera based on multigene analyses. *FEMS Yeast Res* 8, 651-659.
- Umeyama, T., Kaneko, A., Watanabe, H., Hirai, A., Uehara, Y., Niimi, M. & Azuma, M. (2006). Deletion of the *CaBIG1* gene reduces beta-1,6-glucan synthesis, filamentation, adhesion, and virulence in *Candida albicans*. *Infect Immun* 74, 2373-2381.
- van der Graaf, C. A., Netea, M. G., Verschueren, I., van der Meer, J. W. & Kullberg, B. J. (2005). Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* 73, 7458-7464.
- Vinogradov, E., Petersen, B. O. & Duus, J. O. (2000). Isolation and characterization of non-labeled and ¹³C-labeled mannans from *Pichia pastoris* yeast. *Carbohydr Res* 325, 216-221.
- Wang, Y., Li, S. P., Moser, S. A., Bost, K. L. & Domer, J. E. (1998). Cytokine involvement in immunomodulatory activity affected by *Candida albicans* mannan. *Infect Immun* 66, 1384-1391.
- Wellington, M. & Rustchenko, E. (2005). 5-Fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. *Yeast* 22, 57-70.
- Wileman, T. E., Lennartz, M. R. & Stahl, P. D. (1986). Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2501-2505.
- Williams AF, Tse AG. (1985). A glycopospholipid covalently attached to the C-terminus of the Thy-1 glycoprotein. *Biosci Rep.* 10-11:999-1005.
- Wilson, R. B., Davis, D. & Mitchell, A. P. (1999). Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* 181, 1868-1874.
- Witzel, A. L., Silveira, F. R., Pires Mde, F. & Lotufo, M. A. (2008). Oral candidiasis in HIV+ patients under treatment with protease inhibitors. *Braz Oral Res* 22, 371-377.
- Xin, H., Dziadek, S., Bundle, D. R. & Cutler, J. E. (2008). Synthetic glycopeptide vaccines combining beta-mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13526-13531.
- Yamada-Okabe, T., Shimmi, O., Doi, R., Mizumoto, K., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (1996). Isolation of the mRNA-capping enzyme and ferric-reductase-related genes from *Candida albicans*. *Microbiology* 142 (Pt 9), 2515-2523.
- Yesland, K. & Fonzi, W. A. (2000). Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles. *Microbiology* 146 (Pt 9), 2097-2104.

Young, L. Y., Hull, C. M. & Heitman, J. (2003). Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2717-2724.

Zakikhany, K., Thewes, S., Wilson, D., Martin, R., Albrecht, A. & Hube, B. (2008). From attachment to invasion: infection associated genes of *Candida albicans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 49, 245-251.

Zhang, N., Harrex, A. L., Holland, B. R., Fenton, L. E., Cannon, R. D. & Schmid, J. (2003). Sixty alleles of the ALS7 open reading frame in *Candida albicans*: ALS7 is a hypermutable contingency locus. *Genome Res* 13, 2005-2017.

Zhao, X., Oh, S. H., Cheng, G., Green, C. B., Nuessen, J. A., Yeater, K., Leng, R. P., Brown, A. J. & Hoyer, L. L. (2004). ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* 150, 2415-2428.

Zhao, X., Oh, S. H., Yeater, K. M. & Hoyer, L. L. (2005). Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology* 151, 1619-1630.

Zhao X, Daniels KJ, Oh SH, Green CB, Yeater KM, Soll DR, Hoyer LL. (2006). *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology*. 152, 2287-99.

Zhao, X., S. H. Oh, and L. L. Hoyer. (2007). Deletion of *ALS5*, *ALS6* or *ALS7* increases adhesion of *Candida albicans* to human vascular endothelial and buccal epithelial cells. *Med. Mycol.* 45:429-434.

Annexe 1 : Oligonucléotides utilisées pour la fabrication des cassettes de disruption

Nom	Séquence
Iff1b5DR	ACGTTAGTGTGGAAATATCACCATCAATTCTGGAGCTTCTTGGTCAATTATCAACAATGCTATATCAACCCTTGT TGAAGTTTAACTGTTACGCCAAttcccagtcacgacgtt
Iff1b3DR	CTGCTTGACAGCATTACTTTAAATTAATAATCAATGAAAGTTGTCAAATGATAGCAATAAACGCAGAT TTGCCACTGAAAATTTAGATCCAgtggaattgtgagcggata
IFF2J5DR	CCGAAGACGAAGGTAGAAATATAGCTAAAACCTTCAAATTTTTTCATTAATATCATACCCGAATAAAAGCAAAA CCACAATGCATTTGTTCAAAGAATttcccagtcacgacgtt
IFF2J3DR	GTAAGTACTTTCCATTAAGTAATTTACCAGAGCCATTGGTATTGGAATAACCATAGCCGACGCGGAGCTAGTT GAGCCGAGTCCAGCACTTGGTGATGgtggaattgtgagcggata
IFF3b5DR	CCTTCTCATGTCTAACTGCACCTATACATTTCTTGGGAATATATGCATTAGTGACAGCCTCTCCAAAGCAC TACTGACAAACACTTAGACACATCttcccagtcacgacgtt
IFF3b3DR	TATAATGATTCAAAGCGAAGCCTAAATGAAATTCACGACTAATTTAGCTTCTTCTCAAATGATTATTAGGA AAATTCATACGCTATGGAAGTTGgtggaattgtgagcggata
IFF4J5DR	AGCCAAACAAGATGATATGAAAACTATAAATTCATTTGTTATCTTCTGTTTTGACAGTTCGGTTTTCTT TCACGTCAACTTCAAACAACAATttcccagtcacgacgtt
IFF4J3DR	ATATTTGTTGATCCATTTCAAAGGGATAGCTGTAAAGACGACAGCCAGTTTCAATGGTTTGTGAAAAATC GCCTGATGATTTGATCCAGTAGTAGGAGTATTAGC gtggaattgtgagcggata
IFF5J5DR	TTTCTAGATTAATCTTTCCATCATTAAACCAATCATCATCCGAATATGAAATTGTTCCAGAAATATCTTATTT CAATCGCTTTACTCACTCAATttcccagtcacgacgtt
IFF5J3DR	TTAGATCCATTTTCATATGGCAAAGTACCAACAATAGAAGTAGCAGGTGATCCAGTTTCAGAAATTTTATTAGGA ATAGTTGATGGAGATACGAAATTTGgtggaattgtgagcggata
IFF6J5DR	CCATACCCAACCCAGAGAATATAAATACATGTCTGAATGTCTTCAAATTTATGATCAGTATTATCTTTTACTTCT CTTAAAGTCTTGTTTTTATttcccagtcacgacgtt
IFF6J3DR	AGGAGAAGCAAGTAATCCTCGTATATGTCAATGTGTATAACGACTAGGGTGTGAAATAAGAAATATTATAAGTCC ATGATATATTCTTCTACATGAAAACAATTGAAACgtggaattgtgagcggata
IFF7J5DR	GAATGGTTTATCAGCAATTTGAGTTGGAAATTAACAAGCAAATTAATAACAATATGCAACCCTTGTTGTGG ACATGTTTATGGTTGGCCTTTATAATTTACAACAttcccagtcacgacgtt
IFF7J3DR	AAGGTCGCCACCACCTAAAAATAGCACTGTTGTTGAACACATTAGGAAACTACACCAAATTTGATCCACCTC ATAACATTATAACCACACAAATAGCCgtggaattgtgagcggata
Iff8b5DR	TGATCACGGTACAATTACCACCAGTATTGGTGATATCACCATGATTCCGGTGCTTATTGGTCAATCATTGATAATT CAATCTCAACATTTATTGGTAATttcccagtcacgacgtt
Iff8b3DR	ATGTTCCAGTTGTCAAAGAAGATACTTGAGATGAATCACAGATAATGGGGTTGATGAAGATGAAGCTGTTCT GAAGTGATGGAATCAGTAGAAGCGTgtggaattgtgagcggata
IFF9J5DR	TTTAGTAGGCAATTTTGTAATAGTCATATAATTAGAATGTGATTTTCCATTCAACTAATAATATCTAATTTCAA ATACTTTCAGTTAATGTGTGttcccagtcacgacgtt
IFF9J3DR	GAACATAATATATTTGGATGAAATCTTCGAATAAAATATATGATGTCTTTGGTTACGAAGTTGGATAAAAATACC AACCCTAGTATAAGCAAGTTTGgtggaattgtgagcggata
IFF10b5DR	ATCATAAAAAGTTTTATCCCAATGTGTTTAAAGAACTTTCTTTTGCTATTATTGCAACAGCAACTACTGTGT TGCTAGTTATGATGTTTCTAGCTttcccagtcacgacgtt
IFF10b3DR	CATTCTAAATAATTAACCATGATAGCTGCAACGGCACACAAGAGTTCAATACTGCTGTAGACGGAGTTAATG GCACCAGCGTTTTTGAAGATTGAACgtggaattgtgagcggata
Iff11b5DR	ATGTTATTGTCAAACCTTGTATTCCCTTATTAGCTACCAAGTCTACTGTGTGACTACATTTGATGCTACTTCTC ATTAACCAAATATGCTGCATTTGttcccagtcacgacgtt
Iff11b3DR	AGTAGTAGCAACTTGAAGTGGATGAGGAACTAGTAGTTTTTATTGGGTGCTTGTGATAGCGGTGGCACTT GATGTAATAACTGGAGGATTGGAACgtggaattgtgagcggata

Oligonucléotide	Séquence
5404F	AAGACACAGACACGGTTGGTT
5401R	ACGGTGCTCATAAAATTGGG
IFF10sq1	ATGCTATGGTTACCAGTT
IFF10sq2	CCTCAAATTACTGTTACA

Annexe 2 : Oligonucléotides utilisées pour le séquençage d'*IFF10*

Oligonucléotide	Séquence
IFF1vF	CAGCCTAGTAATACTCTCCCA
IFF1vR	AAGTGGCAAATCTCAAACC
IFF1seq1	GTGTTATGGCTCTTACTG
IFF1seq2	ATTCTGACTGATAGTAAC
IFF1seq3	CCTCGACAGCTGAGTCTT
IFF1seq4	ACCAACCTCATCTAGTGT
IFF1seq5	ATACACCACTACCTGGAC
IFF1seq6	TGACCACTTTATTCACCA
IFF1seq7	GGTGCTGGTGGTGTGTTGTT
IFF1seqA	AACAAAATGGGTATAGGT
IFF1seqB	TAGCAGTTATAGCAGTTG
IFF1seqC	ACCGGACTCAGTAAAGAC
IFF1seqD	AGTCCAGGTGGTGGTGTA
IFF1seqE	AACAGATCCATCACTATT
IFF1seqF	GCTTTGAGCAGAAAATGA
IFF1seqG	CCCGACCATATACCATTA
IFF1seqH	GAATTAAGCAAAGCCAA

Annexe 3 : Oligonucléotides utilisées pour le séquençage d'*IFF1*

Oligonucléotide	Séquence
IFF6ext	CCCGTAAACGTAAATTGGAAC
IFF6int	GGCTGGAAGCTGCATTATTTG
IFF5ext	CACGCACTAGCCGAAAACCTTC
IFF5int	CCATTAACAGAGGATTCGCC
IFF4ext	TGTAGTTGGTGGTGTGGCG
IFF3ext	TTCCCCAAGCACTATTGACA
IFF3int	CAGATTCCTTGCAAGCCAATA
IFF2ext	ATCCACACCACACACCAAAT
IFF2 int	AAGATTCAGTGGCCGATGAT
Iff1bext	TGTTTGGGGCTATTGCAAAC
Iff1bint	TGAAGCCGAGTTAGTTGACGAA
IFF7ext	GAATGGTTCTTAACGCCTTTC
IFF7int	CAGAATCGTCGGTTGAAACA
IFF8 ext	GCAGCCTTTTCCTGTTGTTA
IFF8int	TTGACCACCATTACCACTTCT
IFF10ext	TGGCGCTAGTATCAACTGTGG
IFF10Bext	TCACCTTCCAGACCATAGGTT
IFF10int ??	
IFF10Bint	AGTGGTCGTCAAACAAGAGGT
IFF11ext	TTCCTGTAACCGTCAAGGAGA
IFF11int	TAGCACCAAATTGGCAACC

Annexe 4 : Oligonucléotides utilisées pour la vérification des clones par PCR sur colonie

Oligonucléotide	Séquence
IFF1sF	GTCTTCGGTATCTCTGACTC
IFF1sR	CATCACTGTTGGTTACTTCC
IFF2sFb	TCACATCCCTCAGAAAGACTG
IFF2sR	CGAAAGCAACAAACATGAAC
IFF4sFter	CAGCTTCACCGTATTTCTTG
IFF4sRter	GATATGTGGAAATTA ACTGTG
IFF5sF	GGAGGAGGAAGAGATCAACAA
IFF5sRb	CTGGCAATTGATTTCCCAC
IFF6sF	TAAACCGTATGCAAGGTCCCA
IFF6sRb	CCAGATTCTGCGAGATACATG
IFF7sF	TCCAGGTTCTCCAAGAAGTTT
IFF7sR	TCGCACGTTAATGAGAATACA
IFF8sFter	GTCGTCGACTACTTCTATAG
IFF8sRter	CTTTGTAATGCAAATACTAAAAAG
IFF10sF	TCTTCCCAAGCAAGTATTCA
IFF10sR	AATGCAGCCTTTACCTCCA
IFF11sF	TTCCTGTAACCGTCAAGGAGA
IFF11SR	TGTTGACGAACAAGATCACTT

Annexe 5 : Oligonucléotides utilisés pour les sondes de Southern blot

Annexe 6 : Alignement des ORFs *IFF3* et *IFF9* et position des oligonucléotides utilisés pour leurs études.

```

iff3      TCTCTTTCATCAAATATATTCTTTGTTCAATTTACAATCATATCAATAGTAATCTTTTGA 60
iff9      -----

iff3      CAATAGGTGAGTGTATATTTAGTCAATTGTATGTACAAGATTATATATATATATCACATC 120
iff9      -----

iff3      CACTGTTGTTTTCTTTTTTCAAACCTTGATACCTAAAAATGATTGGCCATCTGGTTTACC 180
iff9      -----ATTAACCT--CATCTTGGGCAAT 21
                * * * * * * * * * *

iff3      CGTATAGCTTGCAACATCAGCAGCTTGCTTTTCCAAATCCAAATCTTTTTATTAGACGT 240
iff9      TATCAAATGGGTAATAAGTATAGCTT--TAGCTAAACTAGGATTTGTAGGATTTAATGA 78
                * * * * * * * * * *

iff3      TTCAATTTCTGTGATACATAATCGATTCTGCCATCTACTTTACCAATCTGTAGATCTT 300
iff9      CACCAATTTA-ATGGCAATTCTTAAATCTTTTTGAATTAATGACGACGATGTTTACGAT 137
                * * * * * * * * * *

iff3      CTCCAATTCCTCTCCAATTTCTGAATCTTGGCTACCTCAAGCGATATCAACCGTCCAAT 360
iff9      CTTTAATCTTTGTCCTCTGGAGAATCAGAG-----GAGCAGTTAAACTGTCAAGT 191
                ** * * * * * * * * * *

iff3      ATACTCAGTCTCATACAACTTCCAAATTCGCAAGTCGCTAAT-GATATTGGCAAACGCTG 419
iff9      ATAAT--GTAGCAATTTCAATTATAAATATATGCTGCATCAGTTAACATATTCATCG--- 246
                *** * * * * * * * * * *

iff3      CTTTAAACAATGGTCTACCAGTAGATATTTTATCCAACACCCCTTATCAGCTTCAAAG 479
iff9      -TTCAAACATT--TCTCCAATTTTAATGTATCCA-GTATATTCATCAC---TTAATG 299
                * * * * * * * * * *

iff3      ATATCAAATCGTACTTTTCTAATGTCGTCAAAACTCTCTAACGTTTCTTCGATACTTTGA 539
iff9      G-ATCTAATCCAATTTTCATT-----CGCATGCTCTAATGCTGTGAAATAATATTTCA 350
                *** * * * * * * * * * *

iff3      ACAATGGCAGTTTCACCAACTCACTATAATTAATGGTGTACATTGACACAACAACCTTCA 599
iff9      ATGCTAATGATAATCAAATTCACCAAGT-----CACTTCTGCCATAATCCCT 401
                * * * * * * * * * *

iff3      TAATGAGCCACACCTGCGATGGATCCCAGTTGC-TATCACCAGCACCAAAATTTGTGATGA 658
iff9      TA-CGTAAAAATTTGGCAATTGAACTTGAAAAGTATGTTTAGGCCACCACATATAATAA 460
                ** * * * * * * * * * *

iff3      CTGTTCAAGAAAAATGTGTTTATCAACTCAGCAGCCTGGGAAATCATCTCGTTGATTGCC 718
iff9      ACATACCCAGAAATAATACCTAGCCCCAATGTTGCATATACAAGTTTCTTCAAATGG- 519
                * * * * * * * * * *

iff3      TGTGTGGGCTTTCTCCTGACTTGATACGCTGTATAAACGACTGCAAGTCCAACATTCTA 778
iff9      TGTTTTGGTTGGTTGTAAGCAGCATAAGTTTGAT-----TATAATTATATTTGTGAGA 572
                **** * * * * * * * * * *

iff3      CCTCCAAAGGCTCAAGGCATTCGTCCAAAGTGCTAGTATCTTTGACCTTAAGTACATCA 838
iff9      CATGCCGACGAGATATAAAGTTGGCAGGAGTTGCTGATATGTTGTAGT--ATTTCTGTTG 630
                * * * * * * * * * *

iff3      CAGACATACTGTCTTGAGCTGGACATGGAGGCATCGGAAAGTGAATGTCTTGAACACC 898
iff9      TCTAAACAATACCCTACTATGGTTCGTAATAAAT--ATCGTGAGTTCATATAGAAGTTT 688
                * * * * * * * * * *

iff3      TGTTGGGCAAGGCATCATTTCAAGAGCTGGAGCGACCCAACTGCTGTCAAAAATATC 958
iff9      TAATT--GTTAGGTATAACCTAGGTG---GGTCTCTATTTGTAACCTTTT---TTTC 738
                * * * * * * * * * *

iff3      ACATGTGCCGTGTTGTTCTGCACCAACCCAGACGCCCAATCTGCAACTAATGGAGGAATA 1018
iff9      AATCGCTCTCTTTTTTATATACCTATT----GTTGATTTGCCCTTAA-----ATA 786
                * * * * * * * * * *

iff3      AAATCATTCAGCAGCACATCTGCACGACGGCTGTACTTGTTCACACAATGATTGGTTTA 1078
iff9      AA-----TGAAAGTCGTGTCTGATGTA-ACCATCGCTTGTCTA 823
                ** * * * * * * * * * *

```

```

iff3      GCTTCGGGGTGCTGTTGCAAGAATTGTTCTTCTTTGAGGACTTCGATTTTCTCATCGTCC 1138
iff9      ACCT-----GTTGCTGCAGAAATAATAAGTTCGGAACGTTCTG--TTTCTTTTTTTTT 875
          * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      TTCAATCTCTTGTCTTCTCTCAACACTCTTGACATATTTGTTGTACTCATTTGGTTGTG 1198
iff9      TTAGATTGATCCCGCTATACGACATCACAAAAAC-CACCCACT-TCTTCTTATTCTCA 933
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      ATTTTCCGAATGGCTTGGGTGCGCAACAGAAACATGTTCTTGATTGCGTCTCCTTGCTC 1258
iff9      ATCTCATCTAAGG--TGTATCACCTA---ATACATAT-CACACTCCATTTAGCCATAGAC 987
          * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      TCGCTTAAACCTGATTTCTGTCCGGTAAATCCCTGAACTCCCAAATCAACAAAACGT-GA 1317
iff9      TT-CCAAATTTTACATCATGTCTAATATATTATC-AGTATTCAATCCACCACCTTCTCGT 1045
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      CACCGTGTGTTGTCATGTGAAAACCTGGGAAATACCCCAACTGCGATGCAGTTCGTGTTAT 1377
iff9      CCCTACCACCATCACCGACGAATGCAATCAGAATGTTTACCATGCACCTGCCATCAA 1105
          * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      CAAATTGTTGCTGACCGTGCTTTGCCCAACTGGTCACACTCAAGCACAAAACCTTTCTT 1437
iff9      TCAATTGTTGCC--ATCGG-----CGGTGGATTATATCTAAGTTC----ACCGAATC 1151
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      ATTTAACCGTTCGTCTGACCCCAAACTGTGCTCTAACCAAACTCCTCTTTACCAGACC 1497
iff9      AATTCAAAGATAAAACGACGGGGAATAATCGACGTTACGAAAACCCCTTTGGTGG---- 1207
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
          Iff3/9ext
iff3      TTGGGGCCCTTGACAATGATAAATGTATTGGCGTTCCTCATAATCCATAACTGGAGTTG 1557
iff9      -CAACGATCAGTGAGAGGGGCGAGGATAATTTTGTGTTGATTGGGTGCTTATCGTGCTG 1265
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      CTTTGACTTTTTCGTACCTTTCTATCCAAAACATGTTGCTTTCATCTTTGAGGTACGAA 1617
iff9      GTGAAGTCGTTCAAATATTA-TATAGAAAGAGATTTGGTTAAATAAATAGTG---GTAG 1320
          *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      CGATTGCCCATCAACAATGTTTGTAGCCGTGCTGCTGTCATCCTCCTCAGAGCAACTCAG 1677
iff9      TGATTG-----GCAGAATCAAGGAATTAGTTAGAAAATAGCAAGTTATATTAGTAAAG 1373
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      CCCGGTAACTCCTGGATTGACTGT-CAATGTAGTCGTAACACTATAACCCATCCA- 1735
iff9      ---GATAA-----GGATTGAATTGTTCAAGGTAACAGTATTAATTCATGTCCTGTTAA 1424
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      GTGATGGTTCTGT---ATGGAATGTAGAGATACTTGAACCATCTGCTCTCCTTAAACTGG 1792
iff9      GAGACTTGTCAAGTTAATGATATATGAATATCCCTTGATAGT--ACTTTCCACTAATTT 1482
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      TCAAACGATTTCCGTGTTGAGAGAAAT-CTTGACTCAATAAACCATTTCTCGAATAGGATC 1851
iff9      TTAAT--ACCAGTTAGCAAGAGAGAGTGTGTTTGTATTAGTAGGTCAAATTTGTAATAGTC 1540
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      AAAAAACAACACAGCAAATGTGGCCAAAAGCGCAATCAACACTGGGATGGCAATCTTAGT 1911
iff9      ATATAATTAGAATGTGATTTTCC-----ATTCAACTAATAATATC-----TAATATCAA 1591
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      GTGGTTCGAGATCAACAGAACCAAGAAATTCGATCTCTTAATGGCAACAAATGGAATGTG 1971
iff9      ATACTTTCAGTTTAATGT-----GTGCTTCGTTTTCTAGATTG-----GTTTTAAT--- 1637
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      AAGCGTGGTCTTGCCCCATTCACACCATGCCTGTGATACAATGTTTAGCACTGATTCG 2031
iff9      AACCAATATGTTTCACGAACCTTGAATTCCT----TGAT-TATTGTATGTTTCTGGTCAC 1691
          * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      CGCTCTCGTGCTATGGAATATATAAACGCTTCAGTGGCACCAGGTTCAATCTCATAAT 2091
iff9      TATTCCAATACTATTGTAATAACTAATCAATTTGCACTTTGACAAC--AGATAGT 1749
          * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      CAAGCCGTATCGACGGAACAACATACAAATCTTCTTCCGGTCAACGGATCACCTTCGAA 2151
iff9      TAACAAATAATATCCGATTAAGGGCGTAATGTTATT---GTATATTGACAA---TTAAG 1803
          * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

iff3      TTTGACTGAGAGTTTGGGACTGGGGAACCGGCGAAGTCTCAATCCATGGTGTACCTTT 2211
iff9      TATGAT---AACTCTA----CAGTGAACAAATAAAAAACAA-GATCTA----GCATCTTC 1851
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

iff3      TACGGAGTACACCTTTGGCACATTTCCGACAGATCTGGTGGTAGAGTCTTGTGAGTATGTT 2271
iff9      GATAAAGTAT--CTTGACCAAGAATGGTTAAACTCTATAGTAATGAAA-ATGAATAAGAG 1908
          *   ****   ***   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      GCTGTTTACTCTTCTTGTTCATTTCTCTCAACGTTCTCTCGTATTTCTTCAATGAATTG 2331
iff9      TTTAAACATCAACCGCGCGCGTACTACCACCAATTATT--TACCATTACACTGT-CTC 1965
          *       **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      GGTGGCAGGGACTTCTGGCGGATACTTGAATTGACAAACGCCAGAACTCTCTCCTTAG 2391
iff9      GTTAGTAACGGCTTT-----AAATCGGAATTTAGCAAACCTT---GATACTTCTCATGT 2015
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          Iff3Flgb

iff3      CGGACAAACTCAGTGATTTTGGCAGTTGTTGCCAATGGCGAAGACAAGTCCCATACTTT 2451
iff9      CTAACACACCTAATG-TATTTGCTTTTGGAACTATATGCCA----TAGTGCAGAGCCTT 2070
          *       *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      CTGCTTCAATTTCTCATTGTCTAGGCGGTGCTCCAGGTTAACTGAATCGAGACAAATA 2511
iff9      T--CCCCAAGCACT-ATTGACAAACAC-----TTAGACACATCCAAAAGAAATGGTTC 2121
          *   ***   **   ****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      CTG-TTTAACAACATTTCTGGATGTTGTAATGGGTATATGTGGTTCGTAATACACAACA 2570
iff9      CCGATTTTGTAGAATTTCTTTTTTCAATTTGAATATCTCTAGCTAGTAACACAAAAA-- 2179
          *   *   ***   *   ****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      CTTCTGTTGTGTTTTATCAATAACCCCTGTGGCGGATGCCGAGTTATCGGACTCGGTGG 2630
iff9      CTTTGT-TGTTTCTAATACGGAATATCGGCTTCTCTGTTGCAATATCTATCTCGCCAA 2238
          ***   ***   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      TGCAGATTCCTTTTTCAATTTCTCAAGATCAGTTGAGTAGTACCGACATGGCGGGGATA 2690
iff9      G---AGCTATGTTAGTAGTTTCAATTTCTACACTCAA--AGGACAAATCTATCTAGGAAC 2293
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      TGTAACTGGTTTTGGCAATCGCAATTGCAGTCTCAATGTTTCAATGATCATTGATAGAT 2750
iff9      CGGTTATT--TTTTTGCACC-----TATGATTTTTTTTTTCTATTATTTTT-----C 2340
          *       *   *   ****   ****   *       *   *   *   *   *   *

iff3      GGTATAGTAATGTGTGCTATGTGGTTGAAAAGAAAGTTAGGACAGCAAT-CAAAAAATT 2809
iff9      GCGAAGCAAATCCGGTGACAACAGTGGTGAA---TCTTGAACAAGATGCTTCTATTT 2396
          **   *   ****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      AGGCCATCCGCACACAAAAATCAAATGCTCTTGTATTAAACCCGCGAGACTTCTATTTC 2869
iff9      TCTTTTTCTGGTTACT--TTAGGTG-----ACTAGATGG-ACGGGACTTC--TCC 2443
          *   *   *   ****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
          Iff3bext

iff3      AGAACAACAACAATATCGATATTGGTCACATGCGGGCATTGGAGTATGTTTCATAGTAATA 2929
iff9      CGAATAA-----ACGTATCTTCTTATATTGACTTGTTCAGGAGTGTCAAAAAAGAA 2496
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      ATTTTATGTGATTTGTGATATATCCCATAAAATGATTAAGCATCAACCGCGCGGTGAC 2989
iff9      ATTTTTCGGGGCAGAT--CCCCCTACACACTCTCTAGAACATCAAGAAAAAGAAAACC 2554
          *****   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      TACCACCAATTTTACCATTACACTGTCTCGTTAATAACGACTTTAAATTTGGAATTTAG 3049
iff9      AAACCCATTTTGAACCTGGTTACTATATC-TTCATTACAGAAACAAATCTAATCTA- 2612
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      CAAACTTGATCTTCTCATGTCTAACTGCACCTATACATTTTCTTTGGGAAGTATATGCA 3109
iff9      -----TACACCCAGAAACTATAAATTCACCCA-ACATCCTCTCCAG---TTTTTTTA 2662
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      TTAGTGCAGAGCCTCTCCAAAGCACTACTGACAAACACTTAGACACATCCATGCAACTA 3169
iff9      CAATTTCAATTTCTTTTC--ATCACTACAACCAATCTCAATCTCCACATGCAACTA 2719
          *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      TTCAGAATATTCTTGTTCATCGCTTTGCTCACACAGATAGTTTTTGTATTGAGATC 3229
iff9      TTCAGAATATTCTTGTTCATCGCTTTGCTCACACAGATAGTTTTTGTATTGAGATC 2779
          *****   *****   *****   *****   *****

iff3      ACCGAAAACAAGGTCGATCGAGGCACAGTCACCTTGAACCTGGGGCAGATTACCATTAC 3289
iff9      ACCGAAAACAAGGTCGATCGAGGCACAGTCACCTTGAACCTGGGGCAGATTACCATTAC 2839
          *****

iff3      CCTGGGGCTTCTGGTCTATTATCGACAATGCTTACACCAACTTCGTTGGTAAGTTAGAC 3349
iff9      CCTGGGGCTTCTGGTCTATTATCGACAATGCTTACACCAACTTCGTTGGTAAGTTAGAC 2899
          *****   **   *****

iff3      GTCAGAGATGGTGGGGTGTATATCTCCCTGACCTCTCATCTTTGGCCCTTCAAGTC 3409

```

```

iff9      GTCAGAGATGGTGC GGGGTTGTATATCTCCCTGACCTCTCATCTTTTGGCCCTTCAAGTC 2959
*****

iff3      AGTTTAAACAACATTGCTCCACTCCATCACCACAACGGAGTCGTCTCCTTTGACTCGCGT 3469
iff9      AGTTTAAACAACGTTGCTCCACTCCATCACCACAACGGAGTCGTCTCCTTTGACTCGCGT 3019
*****

iff3      ATTTCCAGAACCTCGTCTCCTATGACTTGCGAGGCGTCTCCTTACCACAACGGGGAA 3529
iff9      ATTTCCAGAACCTCGTCTCCTATGACTTGCAAGGCGTCTCCTTACCACAACGGGGAA 3079
*****

iff3      ATGTACTTTGCTGCTTCCGGTGAGTTCTCCAGCTCCACCGCACTCACTTCTGCCCTGTGG 3589
iff9      ATGTACTTTGCTGCTTCCGGTGAGTTCTCCAGCTCCACTGCACTCACTTCTGCCCTGTGG 3139
*****

iff3      ACCAACACCGGTTATTGCTGTTTTACCAAAATCAAAGAACCTCCGGCACCGTAAGTCTT 3649
iff9      ACCAACACCGGTTATTGCTGTTTTACCGAAATCAAAGAACCCCGGCACCGTAAGTCTT 3199
*****

iff3      GGTATGCCCTTGGGATCCATCACCACAACCGGTGAGTCTGTTTGAATAACAGGTCTAC 3709
iff9      GGTATGCCCTTGGGATCCATCACCACAACCGGTCAAGTCTGTTTGAATAACAGGTCTAC 3259
*****

iff3      GAACAACAACCCAAATTAAGGGTTCGGGTTGTTTCACTGCCAACGGCGACTCCACCATT 3769
iff9      GAACAACAACCCAAATTAAGGGTTCGGGTTGTTTCACTGCCAACGGCGACTCCACCATT 3319
*****

iff3      TACATCTCCAACGTTTTGTTAGCTGTTTCCCCAAACAGAACTTTACTTGACCGACAAG 3829
iff9      TACATCTCCAACGTTTTGTTAGCTGTTTCCCCAAACAGAACTTTACTTGACCGACAAA 3379
*****

iff3      GGTTCCTCCATGATTGTCCAAGCGTATCTACCACACAAACATTCAACGTCTATGGTTTT 3889
iff9      GGTTCCTCCATGATTGTCCAAGCGTATCTACCACACAAACATTCAACGTCTATGGTTTC 3439
*****

iff3      GGGGAAGGTAACAAAATTGGGTTGACTATTCATTGATGGGAAATCTCTGGAATTCAGCA 3949
iff9      GGTGAAGGTAACAAAATTGGGTTGACTATTCATTGATGGGAAATCTCTGGAATTCAGCA 3499
** *****

iff3      TACGCTTATGACACCCTTCTGGTATCTTGACCTTGAGAAATCTTTGCTGTAACAAAAA 4009
iff9      TACGCTTATGACACCCTTCTGGTATCTTGACCTTGAGAAATCTTTGCTGTAACAAAAA 3559
*****

iff3      TTTAACATCGGTACAGGGTACGATCCATCAAATTCCAAGTGGTCACTGATTCAAGTTCT 4069
iff9      TTTAACATCGGTACAGGGTACGATCCATCAAAGTTCCAAGTGGTCACTGATTCAAGTTCT 3619
*****

iff3      GGTATCCATCCACCATTTAGGGTCTGTGCATATTACGGGCGTGTCCAGAAAGAACC 4129
iff9      GGTATCCATCCACCATTTAGGGTCTGTGCATATTACGGGCGTGTCCAGAAAGAACC 3679
*****

iff3      TTACCAAAGTCTTGT CAGATTCCCTGCAAGCCAATA CCAGAGGCTCCAGGAACAACCCA 4189
iff9      TTACCAAAGTCTTGT CAGATTCCCTGCAAGCCAATA ACCAGAGGCTCCAGGAACAACCCA 3739
*****
Iff3int
iff3      ACACAATACACTACTACCATCACA AAAAACAACACTGCCGGCAACACCGTCAACGAAAGT 4249
iff9      ACACAATACACTACTACCATCACA AAAAACAACACTGCCGGCAACACCGTCAACGAAAGT 3799
*****

iff3      GGTGTTGTTAACGTTCTGACAGATAAAGGCGGCTCATGGTTCACCACCACCTCAATGTT 4309
iff9      GGTGTTGTTAACGTTCTGACAGATAAAGGCGGCTCATGGTTCACCACCACCTCAATGTT 3859
*****

iff3      CCAGCATTGTCCACTGCCCATCCACCGCAACTGTTTCTCTAGTGACACCATTATGTCA 4369
iff9      CCAGCATTGTCCACTGCCCATCCACTGCAACTGTTTCTCTAGTGACACCATTATGTCA 3919
*****

iff3      ACAGTTGAACCTGATAACACAGAATTGGCTCACTCACAGATATCCCTATCGAAACATCA 4429
iff9      ACAGTTGAACCTAATACCACAGAATTGGCTCACTCACAGATATCCCTATCGAAACATCA 3979
*****

iff3      TCAGTTGAAGAGTTGTTAAGTGTATGTCTAATTGGGAAATATCTTCTGCTCCAACCTTA 4489
iff9      TCAGTTGAAGAGTTGTTAAGTGTATGTCTAATTGGGAAATATCTTCTGCTCCAACCTTA 4039
*****

iff3      TCCATTGAAACACCTGTCTCAAGTCAACTCTTCTATGCAACATTCATCCTTTGAATCT 4549
iff9      TCCATTGAAACACCTGTCTCAAGTCAACTCTTCTATGCAACATTCATCCTTTGAATCT 4099

```

```

*****
iff3 TCTGCTGATATCAATACCGTATTTTCCAGCGAGTCTGCATTTGAAACAGCCAGTGACTAT 4609
iff9 TCTGCTGATATCAATACCGTATTTTCCAGCGAGTCTGCATTTGAAACAGCCAGTGACTAT 4159
*****

iff3 ATTGTTTCCAGCCTTCACTGATTTACATTCACCATGGTACCTCAATCGTCTGTTTCT 4669
iff9 ATTGTTTCCAGCCTTCACTGATTTACATTCACCATGGTACCTCAATCGTCTGTTTCT 4219
*****

iff3 GCCTTGTCCGTTGTTAGTGAGTCTGCTCGCTTCTGCTGAGCCATCATTGTGCTCCCAAGT 4729
iff9 GCCTTGTCCGTTGTTAGTGAGTCTGCTCGCTTCTGCTGAGCCATCATTGTGCTCCCAAGT 4279
*****

iff3 GAATCATTTCATCTTCAGTGCATCTTCTGCTGCCCCCAACCATCTAGCAGTACTTATTCA 4789
iff9 GAATCATTTCATCTTCAGTGCATCTTCTGCTGCCCCCAACCATCTAGCAGTACTTATTCA 4339
*****

iff3 GTCTCATTACCACACAATTTGAAACCCCATCTTCTGCTGGTCCCTCATGGTTACTTCT 4849
iff9 GTCTCATTACCACACAATTTGAAACCCCATCTTCTGCTGGTCCCTCATGGTTACTTCT 4399
*****

iff3 GTTGAATCAAATACTGAACCTTATTTTCATCTGCCACTCAATCCAGTGATATACAACTGAG 4909
iff9 GTTGAATCAAATACTGAACCTTATTTTCATCTGCCACTCAATCCAGTGATATACAACTGAG 4459
*****

iff3 TTCACTTCCACTTGGACTACTACCAATTCTGATGGTCTGTTGTTACTGAATCAGGTATC 4969
iff9 TTCACTTCCACTTGGACTACTACCAATTCTGATGGTCTGTTGTTACTGAATCAGGTATC 4519
*****

iff3 ATAAGCCAATCAGGTACTTCATTAACCACCTTGACAACCTTCCAGCCAGCCACTTCATTA 5029
iff9 ATAAGCCAATCAGGTACTTCATTAACCACCTTGACAACCTTCCAGCCAGCCACTTCATTA 4579
*****

iff3 GTTGTTCACCATATAGTGTCAATGAAACTGAGTTTACATCAACTGGACCACCACAAAC 5089
iff9 GTTGTTCACCATATAGTGTCAATGAAACTGAGTTTACATCAACTGGACCACCACAAAC 4639
*****

iff3 TCAGACAGCTCAGTGGCTACTGAATCTGGTGTGGTTAGTCAATCAGACACTTTATTAACA 5149
iff9 TCAGACAGCTCCGTGGCTACTGAATCTGGTGTGGTTAGTCAATCAGACACTTTATTAACA 4699
*****

iff3 ACCGTGACTACTTTCCCTCCTGCACCATCTGCTATTGTACCTGAATTCACATCACCTTGG 5209
iff9 ACCGTGACTACTTTCCCTCCTGCACCATCTGCTATTGTACCTGAATTCACATCACCTTGG 4759
*****

iff3 AAAATCAACACTTCAATTGAGTCTAGTGAAACATTAAGTGTAGTCCAGCTCCTATGAG 5269
iff9 AAAATCAACACTTCAATTGAGTCTAGTGAAACATTAAGTGTAGTCCAGCTCCTATGAG 4819
*****

iff3 ACAGTGGGTGAATCATTTGGCTGCTGCTACCTCATCATACTTGTCTTCTGCTACTGTTGTT 5329
iff9 ACAGTGGGTGAATCATTTGGCTGCTGCTACCTCATCATACTTGTCTTCTGCTACTGTTGTT 4879
*****

iff3 GTTGTCTCCCTCAGAATCTGAAATCAATACTAGCAGCTCAATATTGAATAATGAAGAGATT 5389
iff9 GTTGTCTCCCTCAGAATCTGAAATCAATACTAGCAGCTCAATATTGAATAATGAAGAGATT 4939
*****

iff3 GCTTCTGCTCCAGTCTCCGACACAACGCTCTATTGCTGAACACCATGATGGCTCATTATCC 5449
iff9 GCTTCTGCTCCAGTCTCCGACACAACGCTCTATTGCTGAACACCATGATGGCTCATTATCC 4999
*****

iff3 ATGACCACAACCTGAATTTGTGAACAGCAATCCCTTCCATCATCTCATCTGATTGTC 5509
iff9 ATGACCACAACCTGAATTTGTGAACAGCAATCCCTTCCATCATC---TCATCTGATTGTC 5056
*****

iff3 ACTGCCACCATCACCAGTTGCAACAAATCCAAGTGTCTGAAAGTGTGTTACCTATGTC 5569
iff9 ACTGCCACCATCACCAGTTGTAACAAATCCAAGTGTCTGAAAGTGTGTTACCTATGTC 5116
*****

iff3 TCAAGCGTTTCCCTGTGCCACTATTACTGTGGGGGATTCCGAGAAAAATATTTCCACTGTT 5629
iff9 TCAAGCGTTTCCCTGTGCCACTATTACTGTGGGGGATTCCGAGAAAAATATTTCCACTGTT 5176
*****

iff3 GGTAAATAATGTCAGTAGTATCGTGGGTGACGATGTTTCCAACACACAAGCCATCACAATG 5689
iff9 GGTAAATAATGTCAGTAGTATCGTGGGTGACGATGTTTCCAACACACAAGCCATCACAATG 5236
*****

```



```

iff3      GCAACTTCCACAGAAGGTGCTACTACCCTCACAGTGTTCAGGTGCTAAACCATCAGTT 5749
iff9      GCAACTTCCACAGAAGGTGCTACTACCCTCACAGTGTTCAGGTGCTAAACCATCAGTT 5296
*****

iff3      GCTAACAAATGCCACTAACAGTGTGCACACCCTGATTATACTACTGCCACTCCTGGTGT 5809
iff9      GCTAACGATGCCACTAACAGTGTGCACACCCTGATTATACTACTGCCACTACTGGCGTC 5356
*****

iff3      CAAAATGGTCCAGTTTGTCAATTCATCAGACGTCCCCATTGAAATTTCTGTCATCACA 5869
iff9      CAAAATGGTCCAGTTTGTCAATTCATCAGACATCCCCATTGAAATTTCTGTCATCACA 5416
*****

iff3      CCGACTAATTCTTCTCTC--CAACTTCCATAGCGTATTGAATTTT-CCTAATAATACA 5926
iff9      CCGACTAATTCTTCTCTCGGCAATTACCATTCCATATGAAAACGGATCCAATAAAGAA 5476
*****

iff3      TTGAGAAGAAGAAGCTAAATTAGTCGTGAATTTCAATTTAGGCTTCGCTTTGAATCATT 5986
iff9      CT---GATTGAAATATCAAACTTGGCATTGGTAGTTT----TCGGATTGA-TGAT 5527
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      ATACCATCTTCAAACGGTATAAGGATCTTCGAAGAAGCCAGGACACACAGAAAACAATAC 6046
iff9      TTTATGTGATCAATATATATAATCACTCCACAATTTTTTGT---TGTTAT 5577
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Iff3bextR

iff3      TTTTCTGAACTTTGGAAATAAACAAGAAATATTACATGGTTGTAGATGATACTTCTAAT 6106
iff9      TTTTGTGTGTGTGTGTGTATAGACTATAGATTA---ATTATAGATTATCTTTATCAT 5633
*****

iff3      A-TGTATATATATTCACAAATGTATACACATGATTCTCTTTGAGATTTGATAGATAGGAT 6165
iff9      AATATATCAATTTTATATCCATTATCGACTGTTGTTGTAAAGACATTAATAACT-T 5692
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      TATTAANAATGTTAAAAGGAAATACATATATGTGAGTGAAAAATTTTTCTTAACATTTT 6225
iff9      TACTGAACTGGATTGGTTACTGTATAT-TATGACATAATATATTGGATGAAATTCI 5751
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      GATATTTTCTCTTGACGTTAGATCTGTTCGTAGTATGTTGCTTGAATATTTACACGCAC 6285
iff9      TCGAATAAAAATT---ATATGATGCTTTGGTTACGAAGTTGGATAAAAATCCAAC---C 5804
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      TACAAAACAATTAGGGCTTGCTGATACTAATCTTTTACGTTTTTAAACACTACAATAGTGG 6345
iff9      CCTAGTATAAGTCAAGTTTGGGGT---AATTTTTCAAAGAGAAAGTCCAATGCCCTCTT 5861
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      ATC-AATGACGGCTTACATCAATTATAAATAAATAAATCTAATTACAAGAGTGTAAATT 6404
iff9      TTTCTGGTAGGTGGTTAT-CTAACAGTACCTGT---TTTTTGGAAATACCACGGTCAATT 5917
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      AAATAACAACCTAGTGATGTTTTTGTTTTCTTAATCTAGAGCAACACTTGGCAAAAATGTCAC 6464
iff9      GAATATCACATGCTATAATGCAGGTAACCAAA-TAAAATTAAGCACACAACAATAAAGACC 5976
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      CATTCACAGTCCCGAGTTTTTTGTAAGTCCAGTGTCCCTAATGGTTCGAACAGGTAAGT 6524
iff9      TGTTTAAAAAACC---TTCCAAGCTACAATGGTTGTAATAAAACGCGATTGGCATA 6031
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Iff9extR

iff3      CATCATTTTCATCTCGACTCAACTCCCCTCTGTAGTTATAGTTTCTTTAATGTATT 6584
iff9      GATTGGTTAGGACTCGATGGTTTAAAGCTGAACCTAAAAAGTAAAACCATGCTAGTGGCTT 6091
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

iff3      CCCTCACAGGCAAAAATGGCAGCTTCACGACACAATCTCTCAAGTCAGAACCCTAAAAC 6644
iff9      TAAGCATAAAAAAAGGGC----- 6110
*   *   *   *   *

iff3      CTCTTGTGTTGGCAACAATATACTCCAAATCGAAATCGTTTTTCATCTAATTTTGCATCCT 6704
iff9      -----

iff3      TCAAAATTTTATCAAGATTGCGGTTCTTTGCGACCCATTGGTTACCAATGCAAAAAG 6764
iff9      -----

Iff3R1gb

iff3      TTTTGGCATTCTTCTCAAAAATGCTTCATCAATGTCAATTTTTCTATTAGTAGACCCCA 6824
iff9      -----

```

iff3 AGACCATTATTTGACCATTTGATTTTAAACCATCCATAACGTCATAAATTCTGCTTTAA 6884
 iff9 -----

iff3 GCATGGCACTAACTTCATGGTCATTGGAAGACCTGTCTCTCAAAAACGAATCTATTTTCAT 6944
 iff9 -----

iff3 CAATAAATATGATACAAGGTTGCAATTTATTAGCCAATGAGAAAATTGCATCAGTTATTT 7004
 iff9 -----

iff3 TGTTTGATTCTCCATACCATTTTATCCATAATACTTGACATTCTGATCAGCAAGAAAAGG 7064
 iff9 -----

iff3 CACCACTTTCTTTGGCGATTGCCTTGGCCAACATTGTCTTCCCACATCCGGGTGGACCGT 7124
 iff9 -----

iff3 AGAATAATACCCCTTTGGAGATTGAATTAAACTCAGGTGAGCAGCAAACAATTCGGGTT 7184
 iff9 -----

iff3 CAGTTAAGGGCAAAAATTACAGCTTCTCTTAATTCATCAATGATATCTGATAACCCACCAA 7244
 iff9 -----

iff3 TATCATCAAATGTAAGTCTATTTCTTCTGGTGTCACTAATGAATTCAATAATGCCTTTT 7304
 iff9 -----

iff3 CATATTGATTAATGACAAGTTCTTTAAATGAGGATTGGCAGCTGAATTTTCTTTAATA 7364
 iff9 -----

iff3 TTCCACTTCCCTTCTTCTCGTTTTCTTTATTTTGGACTGTGTTGTCTAAATAATCATTTA 7424
 iff9 -----

iff3 GTATTGTGTTCAAAATATAATAAACTGATAATCCTGCCCCAGCTAATACAAATAAATCTC 7484
 iff9 -----

iff3 CCAAAGTTTCAAATCAATCTTGAATTTTCCAAAATCTATTTTCAATTTATTAATCATT 7544
 iff9 -----

iff3 TATAATTTGTGAATATTATGGTTATTTATCAGTTATCGATAGAGTCAGTAATATTTATGT 7604
 iff9 -----

iff3 AGTGAAAGTTGATTGTCGTATCAATGTGGGTATTATGGGAAAAGGTTAAGATTGGGTTT 7664
 iff9 -----

iff3 TCTCTT 7670
 iff9 -----