



**HAL**  
open science

# Les protéines à ancre GPI de *Candida albicans* dans l'interaction avec l'hôte : de l'étude de domaines solubles à la caractérisation de la protéine Rbt1

Céline Monniot

► **To cite this version:**

Céline Monniot. Les protéines à ancre GPI de *Candida albicans* dans l'interaction avec l'hôte : de l'étude de domaines solubles à la caractérisation de la protéine Rbt1. Sciences agricoles. AgroParis-Tech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0075 . pastel-00925684

**HAL Id: pastel-00925684**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00925684>**

Submitted on 8 Jan 2014

**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*

**Céline MONNIOT**

le 29 novembre 2012

## **Les protéines à ancre GPI de *Candida albicans* dans l'interaction avec l'hôte : de l'étude de domaines solubles à la caractérisation de la protéine Rbt1**

Directrice de thèse : **Anita BOISRAME**

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

### **Jury**

**M. Claude GAILLARDIN**, Pr, UMR1319 Institut MICALIS, INRA

**Mme Anne BEAUVAIS**, CR, Unité des Aspergillus, Institut Pasteur

**M. Jean-Marie FRANCOIS**, Pr, Unité Physiologie et Métabolisme Microbien, INSA

**Mme Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE**, Pr, Unité Bioadhésion-Biofilms et Hygiène des matériaux, INRA

**M. Christophe d'ENFERT**, DR, Unité de Biologie et Pathogénicité fongiques, Institut Pasteur

**M. Claude GAILLARDIN**, Pr, UMR1319 Institut MICALIS, INRA

**Mme Anita BOISRAME**, MC, UMR1319 Institut MICALIS, INRA

**Président du jury**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Examineur**

**Examineur**

**Directrice de thèse**

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier conjointement Stéphane Aymerich et Jean-Marie Beckerich pour m'avoir accueillie dans leur Unité depuis mon arrivée en 2009.*

*Je voudrais adresser un grand merci à Anita et à Mathias qui m'ont encadrée durant ces trois années de thèse avec enthousiasme en me faisant bénéficier de leurs compétences et de leurs nombreux conseils. Anita, ce fut un réel plaisir de travailler à tes côtés et d'avoir partagé avec toi de nombreuses discussions tant sur le plan scientifique que sur des sujets plus personnels. Mathias, je n'oublie pas que c'est en partie grâce à toi que je suis aujourd'hui en train d'écrire ces quelques mots car tu es venu me proposer ce sujet au moment où j'avais enfin décidé de me lancer dans l'aventure d'une thèse et je pense que tu n'as pas eu tort !!*

*Je voudrais adresser mes remerciements à Anne Beauvais, Jean-Marie François qui ont accepté de juger ce travail de thèse, mais également aux membres de mon comité de thèse Christophe d'Enfert, Dumàima Granet et Nalini Rama Rao pour leurs conseils avisés. Je remercie Claude Gaillardin, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine et Christophe d'Enfert pour avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineurs.*

*Merci à Grégory, pour sa bonne humeur constante et pour ses petits coups de mains notamment pour la culture cellulaire. Travailler à tes côtés était vraiment agréable.*

*Je tiens à remercier Josef pour m'avoir accueillie pour mon stage de master et à qui j'avais dit : "Non non non, pas la peine de me chercher un financement, je ne souhaite pas poursuivre en thèse...". Et au final, après quelques mois, j'étais tellement dans mon élément que je changeais d'avis mais trop tard...*

*Je remercie très chaleureusement Eliane qui est en grande partie responsable de mon parcours car c'est elle qui m'a donné envie de chercher, d'expérimenter, de tester des hypothèses... Eliane, on a passé des très bons moments ensemble depuis maintenant presque 4 ans : le badminton du mercredi, les pots du jeudi, et les très nombreuses discussions de tous les jours. Tout ça va bien me manquer mais ce n'est que partie remise !!*

*Un grand merci à Matthieu pour son écoute attentive, ses nombreux conseils et le reste : le badminton du mercredi annulé, les pots du jeudi manqués... Bon évidemment tu avais toujours une bonne raison mais on trouvera d'autres occasions je n'en doute pas.*

*Un merci plein d'affection à Anne et Guy qui ont occupé, et qui occuperont, une place très importante à mes côtés. Merci pour votre bonne humeur, votre soutien sans faille (d'ailleurs Guy tu m'as promis un petit feu pour fêter l'impression du manuscrit ! ne l'oublie pas...), vos paroles réconfortantes quand j'en avais besoin, nos fous rires...*

*En ce moment, je pense plus particulièrement à Guillaume bien sûr, et à Olivier avec qui j'ai passé trois merveilleuses années en thèse. On a vraiment formé une bonne équipe de thésards et on peut dire que la préparation du repas de Noël en début de première année de thèse y a bien contribué. Bon courage pour la dernière ligne droite de la rédaction... Allez, allez, je vous soutiens !!!*

*Merci à tous les membres du laboratoire encore présents et à ceux qui sont partis, vous m'avez tous apporté à votre manière, un petit quelque chose à mon passage dans le laboratoire (désolée, je ne vais pas tous vous citer car vous êtes trop nombreux et je risque d'en oublier, c'est certain!).*

*Pour terminer, je voudrais remercier mon homme, ma famille et mes amis proches pour tout ce que vous m'apportez dans ma vie au quotidien. Vous savez tous que vous occupez une place privilégiée dans mon cœur. En pensant à ces trois dernières années, j'ai forcément une pensée émue pour mon grand-père et pour le papa de Guillaume parti trop tôt. Alors Mman, je ne te demanderai qu'une chose : "Ne te laisse pas faire et exterminer moi cette cochonnerie !! Nan mais ok !!"*

*Je vous souhaite à tous une bonne lecture,*

## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

### PUBLICATIONS

---

**Monniot, C.,** Da Costa, G., Chauvel, M., Sautour, M., Bellon-Fontaine, M.N., d'Enfert, C., Dalle, F., L. Richard, M. and Boisramé, A. Distinct Rbt1 domains govern adhesion of *Candida albicans* hyphae through amyloid-forming sequence and hydrophobicity. *Article envoyé aux co-auteurs avant soumission.*

### COMMUNICATIONS ORALES

---

**Monniot, C. 2012.** Role of the *Candida albicans* Rbt1 protein in adhesion, biofilm formation and flocculation. V<sup>th</sup> International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis, Primošten, Croatie. *Communication orale sélectionnée à partir du résumé.*

**Monniot, C. 2011.** Role of the *Candida albicans* protein Rbt1 in adhesion. Journée Doc'J MICALIS, Jouy en Josas.

**Monniot, C. 2010.** Peptides derived from GPI-anchored proteins of *Candida albicans* and their functions in the interaction with the host. Séminaire interne, Thiverval-Grignon.

### POSTERS

---

**Monniot, C.,** Da Costa G., Kos, I., Bellon-Fontaine, M.N., d'Enfert, C., L. Richard M., Boisramé, A. **2012.** Role of the *Candida albicans* Rbt1 protein in adhesion, biofilm formation and flocculation. V<sup>th</sup> International Conference on Molecular Mechanisms of Fungal Cell Wall Biogenesis, Primošten, Croatie.

**Monniot, C.,** Boisramé, A., L. Richard, M. **2011.** Polypeptides issus de protéines à ancre GPI de *Candida albicans* et leurs fonctions dans l'interaction avec l'hôte. Journées ABIES, Paris, France.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>7</b>
<b>A/ <i>Candida albicans</i> : un pathogène opportuniste .....</b>	<b>9</b>
I. De commensal à pathogène.....	9
I. 1 A l'état de commensal .....	9
I. 2 Les candidoses superficielles.....	10
I. 3 Les candidoses invasives .....	10
I. 4 Etat des lieux des candidoses .....	11
II. Traitements antifongiques et résistances.....	12
II. 1 Les polyènes : Amphotéricine B.....	13
II. 2 Les dérivés azolés : Fluconazole .....	13
II. 3 Les dérivés pyrimidiques : 5-Fluorocytosine .....	13
II. 4 Les échinocandines : Caspofungine .....	14
<b>B/ <i>Candida albicans</i> : présentation générale .....</b>	<b>15</b>
I. Taxonomie.....	15
II. Génome.....	16
III. Morphologie .....	18
IV. Dimorphisme .....	20
<b>C/ La paroi de <i>Candida albicans</i>.....</b>	<b>21</b>
I. Organisation architecturale générale.....	21
II. Composition détaillée .....	22
II. 1 La chitine .....	22
II. 2 Les glucanes.....	23
II. 3 Les lipides.....	23
II. 4 Les protéines .....	24
III. Les protéines à ancre GPI .....	26
III. 1 L'ancre GPI .....	26
III. 2 Caractéristiques des protéines à ancre GPI.....	28
<b>D/ Le rôle des protéines à ancre GPI dans le processus infectieux de</b>	
<b><i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>31</b>
I. Le processus infectieux de <i>C. albicans</i> .....	31
II. Contribution de la forme hyphé dans la virulence de <i>C. albicans</i> .....	33
III. Adhérence de <i>C. albicans</i> .....	34
III. 1 Adhérence aux cellules épithéliales et endothéliales .....	34
III. 2 Adhérence aux protéines de l'hôte.....	35
III. 3 Adhérence aux substrats abiotiques.....	35
III. 4 Rôle de l'hydrophobicité de surface dans l'adhésion .....	35
III. 5 Rôle de la glycosylation dans l'adhésion.....	36
III. 6 Les principales adhésines caractérisées chez <i>C. albicans</i> .....	36
IV. Les protéines à ancre GPI impliquées dans l'invasion des cellules de l'hôte .....	40
IV. 1 Endocytose .....	41
IV. 2 Pénétration active .....	41

V.	Formation de biofilm par <i>C. albicans</i> .....	42
V. 1	Les biofilms à <i>C. albicans</i> .....	42
V. 2	Les biofilms mixtes <i>C. albicans</i> -bactéries.....	44
VI.	Induction de la réponse immunitaire en réponse à <i>C. albicans</i> .....	45
VI. 1	Les mécanismes de défense de l'hôte.....	45
VI. 2	Macrophages.....	46
VI. 3	Neutrophiles.....	47
<b>E/</b>	<b>Les nouveaux moyens de lutte contre les infections à <i>Candida albicans</i>.....</b>	<b>48</b>
I.	Problématique.....	48
II.	L'immunisation passive.....	48
III.	L'immunisation active.....	49
III. 1	Les vaccins synthétiques chez la souris.....	49
III. 2	Les vaccins vivants atténués chez la souris.....	50
III. 3	Les vaccins en cours d'étude chez l'homme.....	51

## **RESULTATS..... 53**

### **PROJET 1 : Etude des protéines à ancre GPI à travers leurs domaines fonctionnels.....55**

#### **A/ Objectif de ce projet.....56**

#### **B/ Le choix des protéines à ancre GPI candidates.....58**

I.	Premier critère de sélection : les protéines à ancre GPI déjà caractérisées.....	59
II.	Analyse bioinformatique des protéines à ancre GPI non caractérisées.....	60
II. 1	Défaut d'annotation dans la séquence protéique de PGA31.....	61
II. 2	Deuxième critère de sélection : les protéines à ancre GPI mal prédites.....	62
II. 3	Troisième critère de sélection : les protéines à ancre GPI avec peu ou pas de sites de O-glycosylation.....	64
II. 4	Quatrième critère de sélection : les protéines à ancre GPI sans domaine fonctionnel distinct.....	65
II. 5	Cinquième critère de sélection : les protéines à ancre GPI avec un domaine fonctionnel trop court.....	65
II. 6	Sixième critère de sélection : le regroupement en famille des protéines à ancre GPI présentant un domaine fonctionnel putatif distant du domaine riche en S/T O-glycosylées.....	66
III.	Les protéines à ancre GPI retenues.....	68
III. 1	Les protéines à ancre GPI inconnues.....	68
III. 2	Les protéines témoins.....	69

#### **C/ La construction de la banque de surexpression et de sécrétion des domaines fonctionnels putatifs issus des protéines à ancre GPI.....70**

I.	Stratégie de clonage et d'obtention de la banque de surexpression et de sécrétion.....	70
II.	Immunodétection des polypeptides étiquetés V5 produits par les souches de surexpression dans le milieu de culture.....	72
II. 1	Vérification de la production et de la sécrétion.....	72
II. 2	Vérification du profil de glycosylation.....	74
III.	Purification des polypeptides.....	75
IV.	Validation de la stratégie d'étude des polypeptides : dosage de l'activité enzymatique du domaine N-terminal de la protéine Cht2.....	77

<b>D/ Le criblage d'activité des domaines fonctionnels putatifs.....</b>	<b>79</b>
I. Etude du rôle des domaines fonctionnels putatifs dans le maintien de l'intégrité de la paroi.....	79
II. Etude du rôle des domaines fonctionnels putatifs dans la reconnaissance par les cellules hôtes et l'activation de voies de signalisation.....	80
III. Etude du rôle des domaines fonctionnels putatifs dans l'activation de la réponse immunitaire .....	82
IV. Etude du rôle des domaines fonctionnels putatifs dans l'immunité protectrice .....	83
<b>E/ Bilan .....</b>	<b>86</b>
<b>PROJET 2 : Caractérisation du rôle de la protéine à ancre GPI Rbt1.....</b>	<b>87</b>
<b>A/ Objectif de ce projet.....</b>	<b>88</b>
<b>B/ Description de la protéine Rbt1 .....</b>	<b>89</b>
I. Variation allélique du gène <i>RBT1</i> chez <i>C. albicans</i> .....	89
II. Motif T <sup>V</sup> /I <sup>V</sup> /T <sup>V</sup> /TSCX <sub>4</sub> CX <sub>4</sub> VTTGVVVVTX <sub>5</sub> YTF <sup>C</sup> PL et séquence à fort potentiel de β-agrégation.....	91
III. Homologies de la protéine Rbt1 .....	93
III. 1 Avec Flo11 .....	93
III. 2 Avec Hwp1.....	93
IV. Régulation de l'expression de <i>RBT1</i> par <i>TUP1</i> .....	94
V. Implication du gène <i>RBT1</i> dans la virulence .....	95
VI. Vision générale des séquences protéiques de Rbt1.....	96
<b>C/ Modèle d'expression hétérologue chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>97</b>
I. Le système d'expression.....	97
II. La construction des souches d'expression hétérologue .....	98
II. 1 Clonage des séquences codantes dans <i>S. cerevisiae</i> .....	98
II. 2 Vérification de l'exposition en surface des protéines par immunofluorescence.....	99
III. Rôle de Rbt1 dans l'adhésion au polystyrène .....	99
III. 1 Adhésion des souches exprimant les deux formes de Rbt1 .....	100
III. 2 Rôle du domaine N-terminal de Rbt1 .....	100
IV. Rôle de Rbt1 dans la formation de biofilm .....	101
V. Expression de Rbt1 et propriétés de surface .....	102
V. 1 Hydrophobicité de surface .....	102
V. 2 Corrélacion entre adhésion et hydrophobicité de surface .....	102
<b>D/ Modèle de surexpression chez <i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>104</b>
I. La surexpression de Rbt1 dans <i>C. albicans</i> .....	104
II. Surexpression de <i>RBT1</i> indépendante de la forme hyphe.....	104
III. Croissance des souches de surexpression .....	105
IV. Rbt1 et filamentation .....	106
IV. 1 Sur milieu Spider.....	106
IV. 2 En milieu semi-solide .....	107
V. Rbt1 et adhésion cellulaire .....	108
V. 1 Cellules HeLa .....	108
V. 2 Cellules Caco-2 .....	108
VI. Rbt1 et cytotoxicité.....	109
VII. Rbt1 et formation de biofilm .....	110
VII. 1 Thermanox <sup>TM</sup> .....	110



VII. 2	Silicone.....	111
VIII.	Rbt1 et agrégation cellulaire.....	112
VIII. 1	Agrégation.....	112
VIII. 2	Floculation.....	113
VIII. 3	Hydrophobicité de surface.....	113
VIII. 4	Propriétés des séquences à fort potentiel de $\beta$ -agrégation.....	114
<b>E/</b>	<b>Localisation de Rbt1 .....</b>	<b>116</b>
I.	Construction des souches Rbt1SL et Rbt1FL étiquetées V5.....	116
II.	Cinétique d'expression de Rbt1 .....	116
III.	Exposition en surface de Rbt1 .....	117
IV.	Localisation de Rbt1.....	118
<b>F/</b>	<b>Bilan .....</b>	<b>119</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>121</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>		<b>145</b>
<b>A/</b>	<b>Matériels biologiques.....</b>	<b>147</b>
I.	Souches utilisées.....	147
I. 1	Liste des souches utilisées.....	147
I. 2	Liste des amorces utilisées.....	148
II.	Cellules de mammifères utilisées.....	150
II. 1	Cellules HeLa .....	150
II. 2	Macrophages.....	151
<b>B/</b>	<b>Méthodes de biologie moléculaire.....</b>	<b>151</b>
I.	Construction des souches de la banque de surexpression et de sécrétion .....	151
II.	Construction des souches pour l'étude de la protéine Rbt1.....	153
II. 1	Construction des souches d'expression hétérologue .....	153
II. 2	Construction des souches de surexpression.....	155
II. 3	Construction des souches étiquetées V5 .....	155
III.	Séquençage.....	157
IV.	RT-qPCR.....	157
IV. 1	Préparation des cellules.....	157
IV. 2	Dosage par qPCR.....	157
<b>C/</b>	<b>Outils bioinformatiques .....</b>	<b>158</b>
<b>D/</b>	<b>Méthodes de biochimie .....</b>	<b>159</b>
I.	Purification de protéines .....	159
II.	Immunodétection .....	159
II. 1	Traitement à l'acide periodique .....	159
II. 2	Western-blot .....	159
II. 3	Dot blot .....	160
II. 4	Immunofluorescence.....	160
III.	Préparation des fractions cellulaires.....	161

<b>E/ Méthodes d'analyses phénotypiques.....</b>	<b>161</b>
I. Dosage d'activité chitinase .....	161
II. Tests en gouttes.....	162
III. Test de survie au macrophage .....	162
IV. Expériences d'adhésion et de formation de biofilm .....	163
IV. 1 Cellules HeLa .....	163
IV. 2 Surfaces abiotiques.....	164
V. Détermination de l'hydrophobicité de surface.....	166
VI. Test de filamentation .....	166
VI. 1 En milieu semi-solide .....	166
VI. 2 Sur milieu Spider.....	166
VII. Expériences d'agrégation .....	167
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>169</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>193</b>



# ***INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE***



## A/ *Candida albicans* : un pathogène opportuniste

### I. De commensal à pathogène...



*Candida albicans* est un microorganisme pathogène opportuniste. Habituellement commensale, chez l'Homme, des muqueuses buccales, digestives, urogénitales et/ou de la peau, cette levure est susceptible de devenir pathogène et d'envahir les tissus superficiels ou profonds chez certains hôtes lorsque leur statut immunitaire ou physiologique est altéré. Un déséquilibre alimentaire (malnutrition chronique) ou endocrinien (grossesse, diabète, traitement par corticoïdes), un traitement par des antibiotiques (en particulier ceux du type Tétracycline et Pénicilline), un traitement par chimiothérapie ou radiothérapie (cancer des organes profonds), un déséquilibre hématologique (SIDA, leucémie, neutropénie), la pose de matériel invasif (cathéter, sonde urinaire, prothèse) ou une opération de chirurgie profonde viscérale sont autant de facteurs favorisant les infections à *C. albicans* (Bassetti et al., 2011; Chi et al., 2011 ; Fraisse et al., 2011; Muskett et al., 2011; Ortega et al., 2011). De plus, les nouveau-nés présentent également un terrain favorable aux infections à *C. albicans* du fait de la combinaison de l'immaturation de leur système immunitaire associé au développement encore incomplet de leur flore microbienne (Montagna et al., 2010; Spiliopoulou et al., 2012). Le passage de l'état commensal à l'état pathogène est donc le plus souvent lié à une défaillance des systèmes de défense de l'hôte.

#### I. 1 A l'état de commensal

A l'état commensal, *C. albicans* peut coloniser les muqueuses du tractus gastro-intestinal (bouche, œsophage, intestin), les muqueuses urogénitales et la peau. Des études ont montré que la fréquence du portage oral de *C. albicans* variait en fonction de l'âge et de l'environnement (Kleinegger et al., 1996). En effet, près de 96 % des nouveau-nés âgés de 1 mois sont colonisés au niveau de la cavité buccale par *C. albicans* tandis que seulement 7 % l'étaient le jour de leur naissance (Lay and Russel, 1977). Puis à l'âge d'un an, 50 % des enfants sont porteurs de *C. albicans* au niveau des muqueuses orales (Lay and Russel, 1977). Par ailleurs, une étude réalisée sur un groupe de 52 femmes en bonne santé montre que 73 % d'entre elles sont porteuses de *C. albicans* après analyse des prélèvements effectués à 17 localisations du corps (Soll et al., 1991). Les endroits les plus fréquemment colonisés sont les muqueuses orales (56 %), les muqueuses vulvovaginales (40 %) et les muqueuses anorectales (24 %) (Soll et al., 1991).

## I. 2 Les candidoses superficielles

Les candidoses superficielles sont les manifestations les plus communes et sont très variées. Les endroits les plus fréquemment atteints sont les surfaces épidermiques humides (plis), les ongles, les muqueuses du tractus digestif (cavité buccale, pharynx, œsophage, intestins), les muqueuses du système urinaire et les muqueuses vaginales (Figure 1). Ces formes d'infections cutanéomuqueuses sont le plus souvent bénignes. Cependant des formes graves, chroniques ou récidivantes peuvent être observées. En effet, près de 70 % des femmes dans le monde font au moins un épisode de vaginite causée par *Candida* spp. et 20 % d'entre elles présentent des candidoses récurrentes (Kirkpatrick, 1994). De plus, les candidoses oropharyngées touchent environ 70 % des patients atteints par le SIDA, représentant ainsi la cause d'infection opportuniste la plus commune chez les sujets immunodéficients (Hamza et al., 2008).

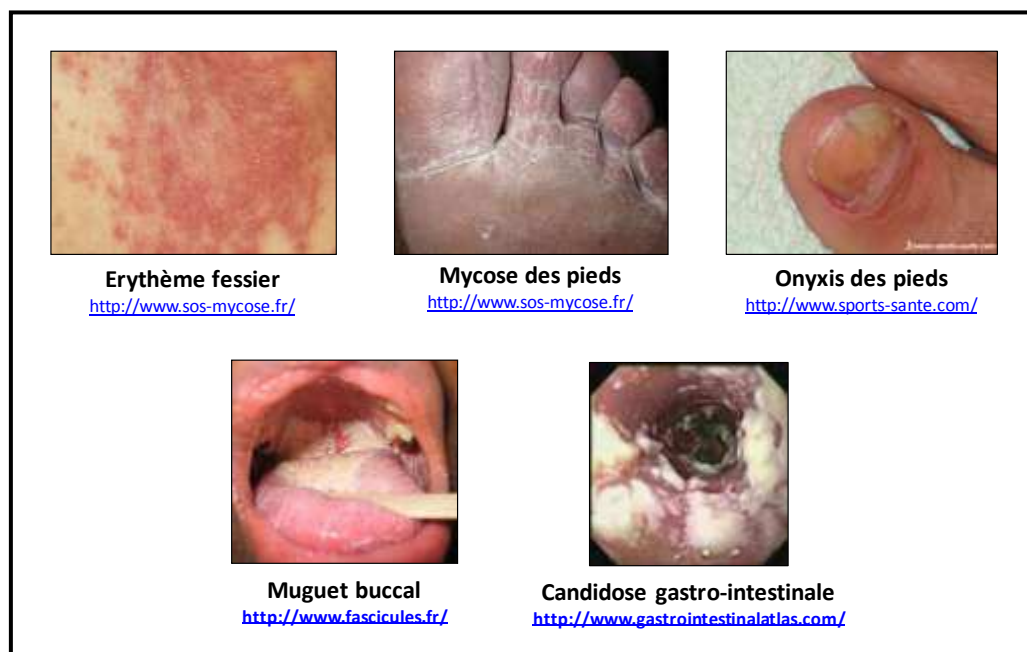


Figure 1 : Photos de candidoses superficielles

## I. 3 Les candidoses invasives

On parle de candidoses invasives lorsqu'il se produit un passage de *Candida* à travers la barrière cutanéomuqueuse. Ceci se traduit par une candidémie ou une septicémie qui conduit à la dissémination, par voie hématogène, des levures à travers l'organisme jusqu'à atteindre les organes profonds (Maartens and Wood, 1991; Thom and Forrest, 2006) (Figure 2). Du fait de leur survenue au cours du traitement de pathologies lourdes chez des patients fragiles ou immunodéprimés, les

candidoses profondes se déclarent dans la majorité des cas (96 %) à l'hôpital et sont donc considérées comme des infections nosocomiales (Ortega et al., 2011). Parmi les patients d'unité de soins intensifs, c'est la troisième cause de mortalité (Wisplinghoff et al., 2004). La mortalité globale varie entre 30 % et 50 %, cependant elle est difficile à évaluer compte tenu de la gravité des pathologies associées et du portage par une grande partie de la population.

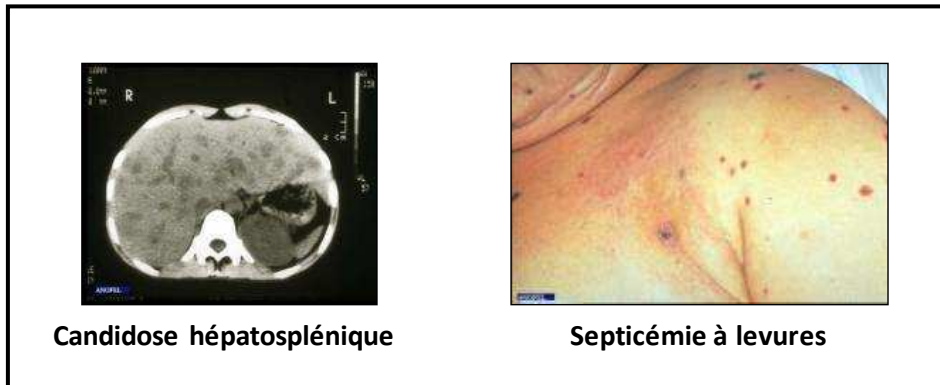


Figure 2 : Photos de candidoses invasives (Source ANOFEL)

#### I. 4 Etat des lieux des candidoses

*Candida sp.* est retrouvé dans 9 % des prélèvements sanguins réalisés lors d'infections nosocomiales d'après une étude effectuée sur un total de 24179 prélèvements entre Mars 1995 et Septembre 2002 dans 49 hôpitaux aux Etats Unis (Wisplinghoff et al., 2004). Cette étude place *Candida sp* à la quatrième place des microorganismes les plus fréquemment isolés dans ces prélèvements derrière les Staphylocoques à coagulase négative (31,3 % des isolats), *Staphylococcus aureus* (20,2 %) et *Enterococcus sp.* (9,4 %) (Wisplinghoff et al., 2004). Les trois premiers microorganismes étant d'origine bactérienne, *Candida sp* est donc le premier microorganisme d'origine fongique identifié lors d'infections nosocomiales. La distribution des espèces isolées lors de candidémies place *C. albicans* en première position (environ 41 %) devant *C. parapsilosis* (environ 32 %), *C. glabrata* (environ 15 %), *C. tropicalis* (environ 6 %) et *C. krusei* (environ 1 %) selon une étude portant sur la période 2005-2009 en Espagne (Fortun et al., 2012). Depuis une vingtaine d'années, le ratio *C. albicans* versus *Candida non-albicans* semble s'être stabilisé mais des variations au sein même des *Candida non-albicans* ont été observées (Fortun et al., 2012; Fournier et al., 2011; Ortega et al., 2011; Sendid et al., 2006). Cependant depuis ces dix dernières années, l'incidence des candidémies a fortement augmenté passant de 0,57 cas pour 1000 admissions en 2000 à 1,52 cas pour 1000 admissions en 2009 (Fortun et al., 2012).



## II. Traitements antifongiques et résistances

Les moyens thérapeutiques disponibles dans la lutte contre les infections à *C. albicans* sont restreints. Contrairement au grand nombre d'antibiotiques accessibles pour la lutte contre les infections bactériennes, la quantité d'antifongiques disponibles pour cibler les mycoses médicales reste limitée à un petit nombre malgré les avancés de la recherche. En effet, il n'existe à ce jour que quatre classes d'antifongiques : les polyènes (Amphotéricine B), les dérivés azolés (Fluconazole), les dérivés pyrimidiques (5' Fluorocytosine) et les échinocandines (Caspofungine) (Figure 3).

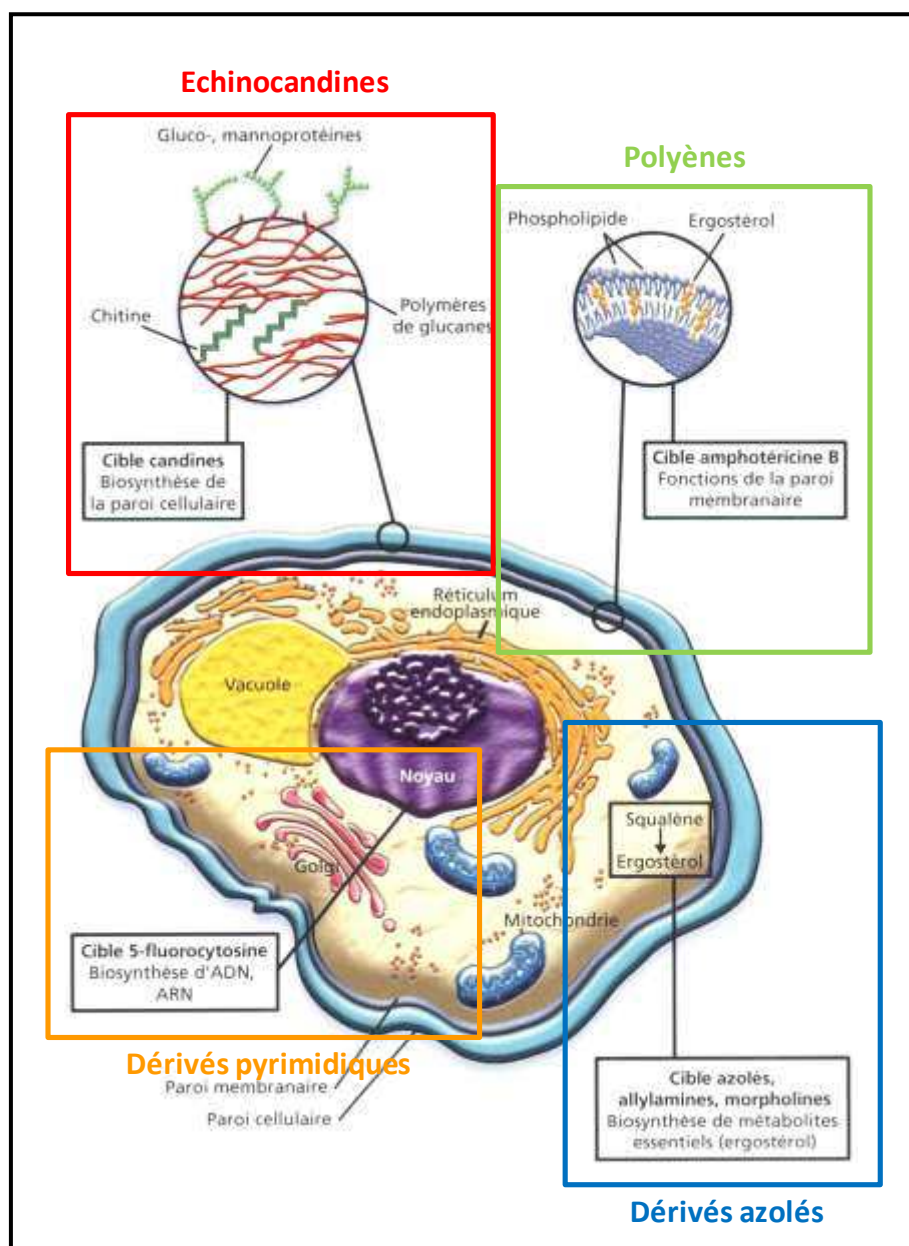


Figure 3 : Cibles des antifongiques (d'après (Lortholary, 2002))

## II. 1 Les polyènes : Amphotéricine B

Les polyènes, principalement représentés par l'amphotéricine B, sont fongicides et présentent le spectre d'activité le plus large de tous les antifongiques. L'amphotéricine B a été le premier antifongique développé dans les années 50 et pratiquement le seul utilisé pendant 30 ans. Elle agit mécaniquement sur le principal stérol membranaire des champignons : l'ergostérol. Elle s'y fixe grâce à des liaisons hydrophobes et forme des pores par l'association d'homo-multimères dans la membrane (Holz, 1974). La membrane devient perméable, notamment aux cations comme le potassium, et cette fuite ionique entraîne la mort cellulaire.

De rares résistances de *C. albicans* à l'amphotéricine B ont été décrites (Chiu et al., 2006; Yang et al., 2005). La résistance à l'amphotéricine B est associée à des mutations sur la voie de synthèse de l'ergostérol affectant, entre autres, le gène *ERG3* (Haynes et al., 1996; Young et al., 2003).

## II. 2 Les dérivés azolés : Fluconazole

Les dérivés azolés sont, avec l'amphotéricine B et les échinocandines, les antifongiques les plus utilisés aujourd'hui. Plusieurs générations d'azolés ont été mises sur le marché jusqu'aux triazolés, tel que le Fluconazole, 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).

## II. 3 Les dérivés pyrimidiques : 5-Fluorocytosine

Ce médicament a été développé initialement comme anticancéreux. La 5-fluorocytosine entre dans la cellule grâce à la cytosine perméase et est ensuite désaminée en sa forme toxique le 5-fluorouracile. Les métabolites du 5-fluorouracile inhibent la thymidylate synthase et donc la synthèse de l'ADN. Ils entrent également en compétition avec l'UTP, sont incorporés à l'ARN et bloquent la synthèse protéique.

Les résistances sont liées à des mutations des gènes de la cytosine perméase, de la cytosine désaminase ou de l'UPRT (*FUR1*) qui est l'enzyme qui transforme le 5-FU en 5-FUMP inhibiteur de la thymidylate synthase (Hope et al., 2004).

#### II. 4 Les échinocandines : 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. La Caspofungine est l'échinocandine la plus utilisée. Les échinocandines inhibent la synthèse des glucanes de la paroi en bloquant l'enzyme  $\beta$  1-3 D-glucane synthase. Chez *C. albicans*, cette enzyme hétérodimérique est constituée d'une sous-unité catalytique codée par *FKS1/GSC1* et *FKS3/GLS1* et d'une sous-unité régulatrice codée par *RHO1*. Les échinocandines inhibent la sous-unité catalytique Fks1 (Douglas et al., 1997; Mio et al., 1997a).

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).

## B/ *Candida albicans* : présentation générale

### I. Taxonomie

*C. albicans* est un microorganisme eucaryote appartenant au règne des champignons, au phylum des Ascomycètes, à la classe des Saccharomycètes, à l'ordre des Saccharomycétales, au clade CTG et au genre *Candida* (<http://www.catalogueoflife.org/details/species/id/8526109>). Les principales espèces séquencées appartenant au clade CTG sont *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *C. guilliermondii* et *C. lusitaniae* (Fitzpatrick et al., 2006) (Figure 4). Toutes les espèces du clade CTG partagent la même particularité du code génétique à savoir la réassignation du codon CUG en sérine au lieu d'une leucine (Santos et al., 2011). Le genre *Candida* est polyphylétique car il comprend des espèces appartenant à deux groupes ayant divergé il y a plus de 150 millions d'années (Dujon et al., 2004; Galagan et al., 2005). Ce genre comprend aujourd'hui plus de 200 espèces dont les plus rencontrées en pathologie humaine sont : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* et *C. kefyr*.

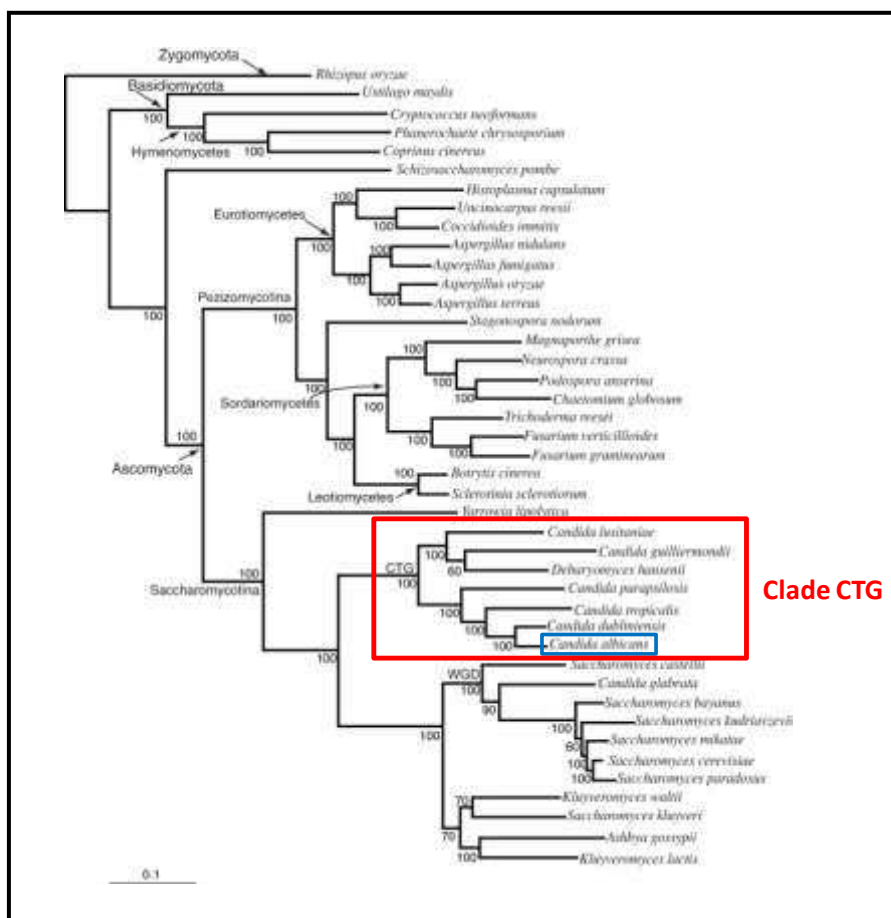
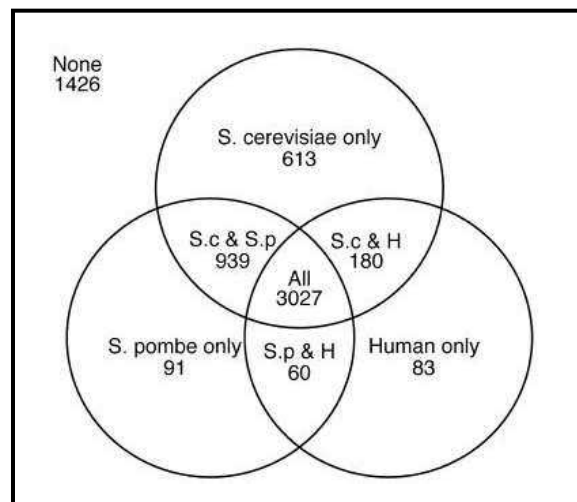


Figure 4 : Arbre phylogénétique de 42 champignons d'après (Fitzpatrick et al., 2006)

## II. Génome

Le génome de la souche SC5314 de *C. albicans* est aujourd'hui entièrement séquencé après près de dix années de travail (Jones et al., 2004). La version 21 de l'assemblage disponible sur le site <http://www.candidagenome.org> depuis 2008 présente une couverture quasiment complète de chaque chromosome. *C. albicans* est un organisme diploïde possédant huit paires de chromosomes dont le plus grand est appelé R et les suivants sont numérotés de 1 à 7 selon leur taille décroissante. Son génome correspond approximativement à 16 Mb pour la forme haploïde et code environ 6400 gènes (pour des ORF > 100 codons) (Jones et al., 2004). Ce génome présente deux particularités : un très grand polymorphisme allélique (qui concerne 30 % des gènes) et un code génétique alternatif traduisant le codon CUG en sérine au lieu de leucine (Jones et al., 2004). De plus, il est intéressant de noter que plus de 1400 gènes de *C. albicans* ne présentent aucune homologie avec les espèces non pathogènes *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces pombe* ou l'humain (Jones et al., 2004) (Figure 5).



**Figure 5 : Comparaison du génome de *C. albicans* (6419 ORF) avec les espèces *S. cerevisiae*, *S. pombe* et l'humain (d'après les résultats de blastp estimés à  $10^{-8}$  ou mieux) (Jones et al., 2004)**

La Figure 6 permet de faciliter la compréhension de la filiation entre les différentes souches de *C. albicans* le plus souvent utilisées au laboratoire.

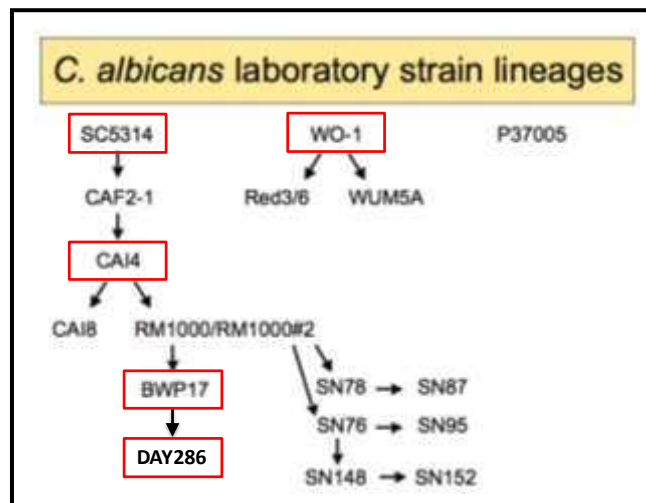


Figure 6 : Origine des souches de *C. albicans* utilisées au laboratoire (<http://www.candidagenome.org/Strains.shtml>)

Pour plus de précisions, la liste suivante indique le génotype des souches :

- **SC5314** : souche sauvage prototrophe, isolat clinique.  
Souche de référence à partir de laquelle dérive la plupart des souches auxotrophes (Gillum et al., 1984) ;
- **CAI4** : *ura3::imm434/ura3::imm434 iro1/iro1::imm434*.  
Souche auxotrophe pour l'uracile construite à partir de CAF2-1 descendante de SC5314. Le gène *IRO1* adjacent à *URA3* a été partiellement délété accidentellement pendant la construction de la souche (Fonzi and Irwin, 1993; Garcia et al., 2001) ;
- **BWP17** : *ura3::imm434/ura3::imm434 iro1/iro1::imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG*.  
Souche auxotrophe pour l'uracile, l'histidine et l'arginine dérivant de la souche RM1000 (dérivant directement de CAI4) par délétion du gène *ARG4* (Wilson et al., 1999) ;
- **DAY286** : *ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG-ARG4-URA3/arg4::hisG pARG4::URA3::arg4::hisG/arg4::hisG*.  
Souche dérivant de BWP17 auxotrophe pour l'histidine et complétée pour l'uracile et l'arginine (Davis et al., 2000) ;
- **WO-1** : *MTLalpha*, souche sauvage.  
Souche issue d'un isolat clinique qui présente une fréquence de transition phénotypique « white/opaque » importante due à l'absence du locus *MTLa* (Lockhart et al., 2002; Slutsky et al., 1987).

Un récent bilan datant d'août 2012 indique qu'encore près des trois-quarts des ORF de *C. albicans* n'ont pas été caractérisées, ce qui représente 4594 ORF ([http://www.candidagenome.org/cache/C\\_albicans\\_SC5314\\_genomeSnapshot.html](http://www.candidagenome.org/cache/C_albicans_SC5314_genomeSnapshot.html)). La distribution des ORF caractérisées et classées selon leurs fonctions biologiques indique qu'environ 13 % des gènes sont impliqués dans la virulence de *C. albicans* (réponse aux drogues 5 %, pathogénicité 3 %, interaction avec d'autres espèces 2 %, formation de biofilm 2 % et adhésion cellulaire 1 %) et qu'environ 10 % sont en lien direct avec le polymorphisme de cette levure (croissance en forme filamenteuse 8 %, croissance en forme hyphes 1 % et croissance en forme pseudo-hyphes 1 %) (Figure 7).

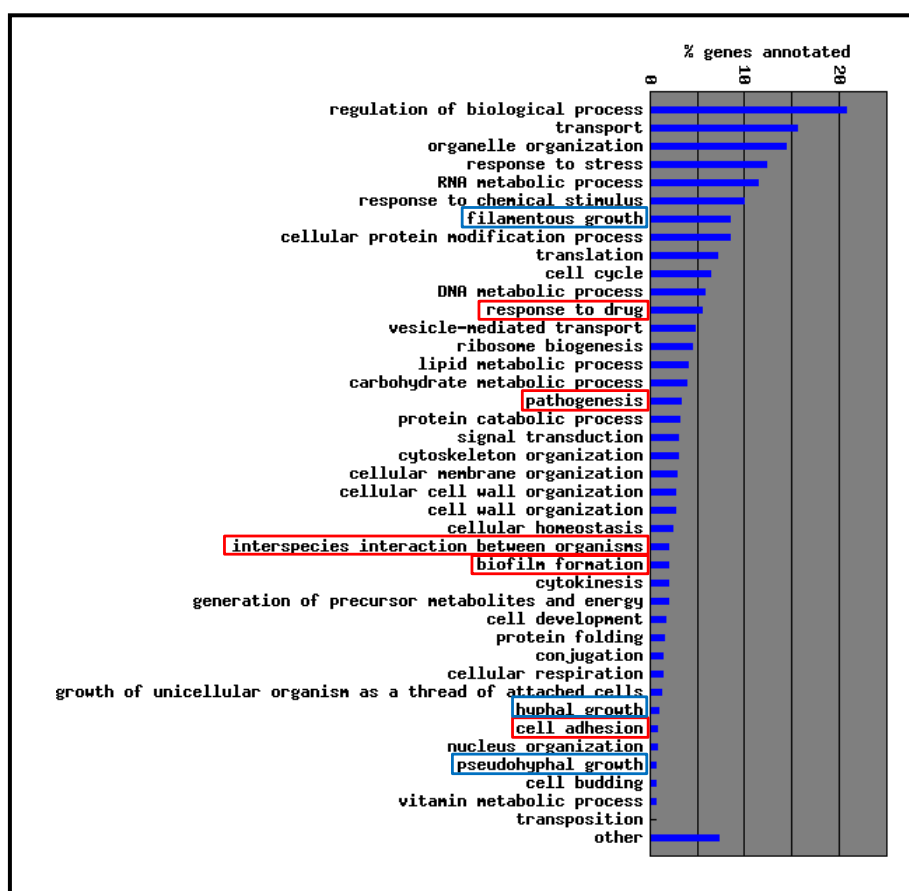


Figure 7 : Distribution des gènes de *C. albicans* selon leur fonction biologique (d'après [http://www.candidagenome.org/cache/C\\_albicans\\_SC5314\\_genomeSnapshot.html](http://www.candidagenome.org/cache/C_albicans_SC5314_genomeSnapshot.html))  
Encadrés en rouge : gènes en lien avec le polymorphisme. Encadrés en bleu : gènes en lien avec la virulence.

### III. Morphologie

Le polymorphisme est un critère caractérisant *C. albicans*, il s'agit de l'un des facteurs de virulence le plus étudié chez cette levure. La transition morphologique entre la forme levure et la forme

mycélium dépend de facteurs environnementaux tels que le pH, la température et la source de carbone (van Burik and Magee, 2001). Ainsi trois aspects morphologiques peuvent être rencontrés (Figure 8) :

- **la forme levure ou blastospore** : ronde ou ovoïde mesurant 2 à 4  $\mu\text{m}$  de largeur par 5 à 8  $\mu\text{m}$  de longueur ;
- **la forme pseudomycélium** : mesurant environ 3  $\mu\text{m}$  de largeur par 500 à 600  $\mu\text{m}$  de longueur, elle est composée d'une chaîne de cellules mises bout à bout (Sudbery et al., 2004; Sudbery, 2001). Au sein de cette structure qui ressemble à un filament mycélien, chaque compartiment cellulaire est identique en longueur et contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme (Barelle et al., 2006) ;
- **la forme mycélium** : caractérisée par des filaments de 2  $\mu\text{m}$  de largeur composés d'un enchaînement d'articles mononucléés séparés par des jonctions septales non constrictives permettant les échanges entre les compartiments (Sudbery et al., 2004). Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte (Gow et al., 2002).

Sous certaines conditions environnementales très spécifiques en termes d'environnement et de température, *C. albicans* peut aussi former des chlamydozoaires. Ce sont des structures rondes, à paroi épaisse (formées par épaissement du thalle), réfringentes et situées en position terminale ou latérale. La fonction biologique et les mécanismes moléculaires aboutissant à la formation de cette structure restent encore à ce jour une énigme pour la communauté scientifique (Staib and Morschhauser, 2007).

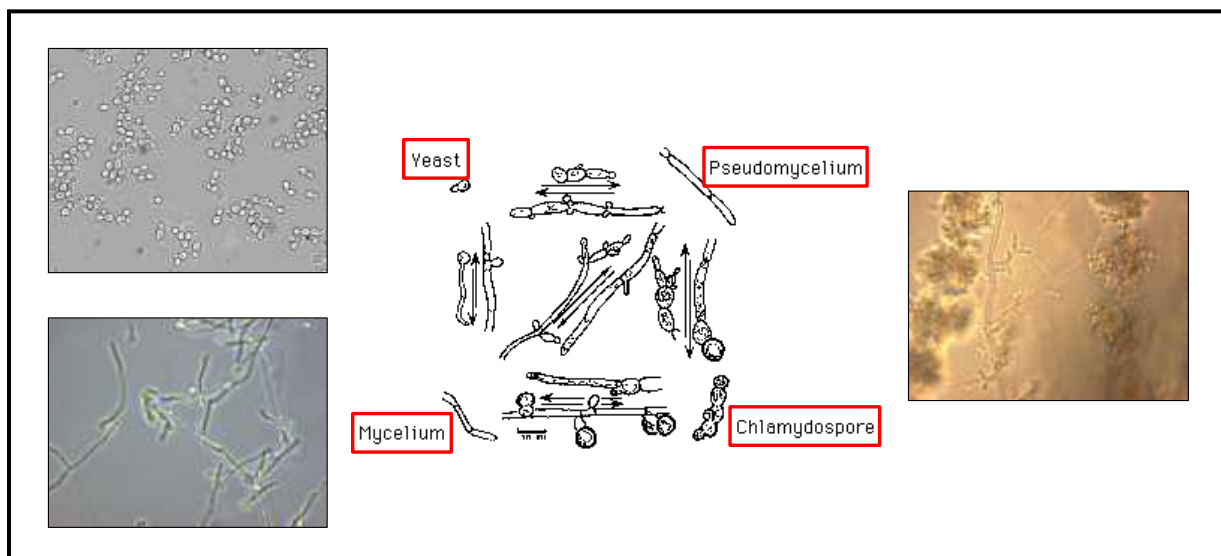


Figure 8 : Caractéristiques morphologiques de *C. albicans*

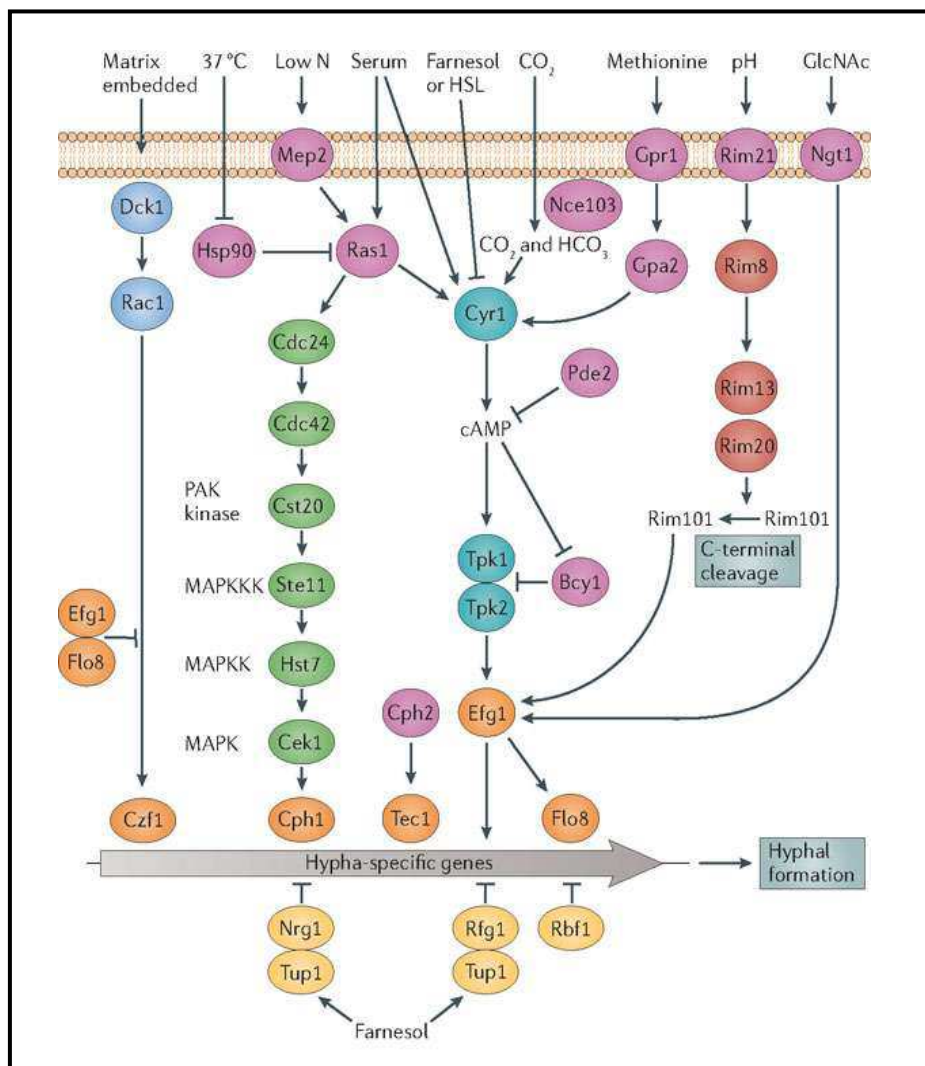
Schéma : <http://pharmaweb.univ-lille2.fr/apache2-default/labos/parasitologie/images/ca1.gif>

Photos : images personnelles



## IV. Dimorphisme

Les principales conditions environnementales induisant la filamentation sont : une température de 37°C et un pH neutre, l'hypoxie, la carence en nutriment, la présence de sérum ou la présence de N-acetylglucosamine (Buffo et al., 1984; Mardon et al., 1969; Simonetti et al., 1974; Sudbery et al., 2004; Taschdjian et al., 1960). De nombreuses voies de signalisations régulent la morphogénèse dont la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), la voie AMP cyclique, la voie de l'enfouissement et la voie dépendante du pH (Sudbery, 2011) (Figure 9). La transition levure/hyphes est contrôlée par quatre protéines régulatrices principales : les protéines activatrices Efg1 et Cph1 et les répresseurs Tup1 et Nrg1 (Braun and Johnson, 2000; Stoldt et al., 1997). Le rôle du dimorphisme dans la virulence de *C. albicans* sera développé plus précisément dans la partie D/II p33.



**Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans la morphogénèse (Sudbery, 2011)**

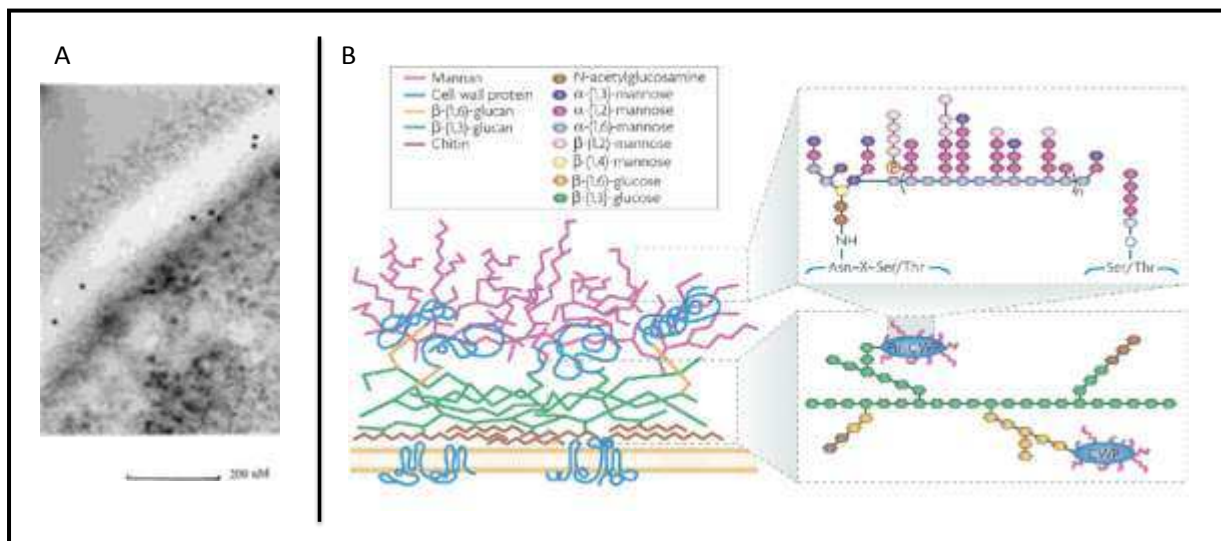
En bleu : la voie de l'enfouissement. En vert : la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase). En turquoise : la voie AMP cyclique. En marron : la voie dépendante du pH. En mauve : les autres facteurs impliqués dans la transduction du signal. En orange : les facteurs de transcription. En jaune : les régulateurs négatifs.

## C/ La paroi de *Candida albicans*

La surface cellulaire de *C. albicans* est constituée d'une paroi rigide dotée d'une grande plasticité assurant un rôle essentiel dans la protection contre les stress extérieurs et le maintien de l'intégrité de la cellule sous différentes formes morphologiques. De plus, la paroi située à l'interface de *C. albicans* et de son environnement occupe une place stratégique dans les interactions hôte/pathogène et de ce fait dans la virulence de cet organisme pathogène opportuniste.

### I. Organisation architecturale générale

La structure de la paroi de *C. albicans* présente de grandes similarités avec celle de *S. cerevisiae* (de Groot et al., 2004; De Groot et al., 2003; Kapteyn et al., 1995). La paroi constitue une matrice extracellulaire d'une épaisseur de 100 à 200 nm entourant la membrane plasmique (Figure 10). Chez *C. albicans*, elle représente environ 30 % du poids sec.



**Figure 10 : Organisation architecturale de la paroi de *C. albicans*** (Kapteyn et al., 2000; Netea et al., 2008)  
En A : Vue en microscopie électronique à transmission. En B : Structure schématisée de la paroi.

La paroi n'est pas homogène mais apparaît stratifiée en microscopie électronique à transmission (Kapteyn et al., 2000) (Figure 10, A). Cette vue permet d'identifier deux couches distinctes schématisées en Figure 10, B (Netea et al., 2008) :

- la couche interne diffuse en microscopie et adjacente à la membrane plasmique est constituée de chitine (2-3 %) et de  $\beta(1,3)$ -glucanes (20 %). Les molécules de  $\beta(1,3)$ -glucanes

sont associées entre elles *via* des liaisons hydrogènes pour former un réseau continu tridimensionnel responsable de la rigidité de la paroi. Les molécules de  $\beta(1,3)$ -glucanes peuvent également être liées aux molécules de chitine et de  $\beta(1,6)$ -glucanes (40 %) *via* des liaisons covalentes (Klis et al., 2001) ;

- la seconde couche, dense en microscopie et située à l'interface de la levure et des cellules hôtes, est constituée principalement de mannoprotéines (37-40 %) (Kapteyn et al., 1999). Ces mannoprotéines sont des protéines fortement glycosylées liées de manière covalente aux glucanes. On distingue les protéines à ancre GPI (GlycosylPhosphatidylinositol) associées majoritairement aux  $\beta(1,6)$ -glucanes et les protéines PIR (Proteins with Internal Repeats) associées aux  $\beta(1,3)$ -glucanes (Klis et al., 2010; Klis et al., 2009).

*C. albicans* est capable de modifier la composition de sa paroi en fonction de son environnement et des différentes phases de son cycle cellulaire. La forme filamenteuse contient plus de chitine, plus de  $\beta(1,6)$ -glucanes et moins de mannoprotéines que la forme levure mais la composition globale de la paroi en carbohydate reste constante (80% à 90%) (Ruiz-Herrera et al., 2006; Smits et al., 2001).

## II. Composition détaillée

### II. 1 La chitine

Bien que la chitine soit un constituant relativement mineur de la paroi (2-3 %), elle est indispensable à la survie de la cellule et à sa morphogénèse. Elle donne à la paroi sa rigidité, joue un rôle dans le bourgeonnement, la séparation des cellules et dans la formation des septums des hyphes. Elle est à la base d'un mécanisme de réparation de la paroi qui permet de corriger les anomalies de structure des autres constituants. Ainsi des défauts touchant soit la synthèse et l'assemblage des  $\beta(1,3)$ -glucanes, soit les liaisons entre les  $\beta(1,6)$ -glucanes et les protéines à ancre GPI entraînent une augmentation massive de la quantité de chitine (Albrecht et al., 2006; Kapteyn et al., 2000).

La chitine est un polysaccharide linéaire fait de plus de 2 000 unités de N-acétylglucosamine (GlcNAc) associées par des liaisons  $\beta(1,4)$  (Chaffin et al., 1998). Les chaînes de chitine sont associées par des liaisons hydrogènes pour former des microfibrilles composées de 20 à 400 chaînes. Ce polymère linéaire de  $\beta(1,4)$ -N-acétylglucosamine est synthétisé dans la paroi par cinq chitines synthases et requiert un métal divalent, classiquement  $Mg^{2+}$ . Chs1 et Chs3 sont les plus importantes pour le maintien de l'intégrité cellulaire et sont impliquées respectivement dans la formation des septums et la synthèse de la chitine de l'anneau de bourgeonnement. Elles jouent également un rôle dans la

virulence (Bulawa et al., 1995; Munro et al., 2001). Chs7 est impliquée dans la filamentation et la virulence (Sanz et al., 2005). Chs2 et Chs8 restaurent l'activité chitine synthase *in vitro* mais leurs mutants ne présentent pas d'anomalies de structure de la paroi *in vivo* (Chen-Wu et al., 1992; Gow et al., 1994; Munro et al., 2003).

## II. 2 Les glucanes

### a. $\beta(1,3)$ -glucanes

Les  $\beta(1,3)$ -glucanes sont de longues chaînes de polymères de résidus glucidiques liés en  $\beta(1,3)$ . Par leurs nombreuses extrémités non réduites ils se lient aux  $\beta(1,6)$ -glucanes, à la chitine et aux mannoprotéines (Kapteyn et al., 2000). La synthèse des  $\beta(1,3)$ -glucanes impliquent des enzymes membranaires, l'activité glucane synthase est portée par un complexe hétérodimérique composé d'une sous-unité catalytique Gsc1/Fks1 (Mio et al., 1997a) et d'une sous-unité régulatrice à activité GTPase Rho1 (Kondoh et al., 1997). Le mode d'action de la Caspofungine, appartenant à la classe des échinocandines, cible la protéine Fks1 (Douglas et al., 1997). La protéine Bgl2, présente dans la paroi, participe à l'élongation des  $\beta(1,3)$ -glucanes (Sarchy et al., 1997). La maintenance de l'intégrité des  $\beta(1,3)$ -glucanes est assurée en partie par les protéines à ancre GPI Phr1 et Phr2 (dont l'expression est pH-dépendante) *via* leur activité  $\beta(1,3)$ -glucanosyl-transferase (Fonzi, 1999).

### b. $\beta(1,6)$ -glucanes

Les  $\beta(1,6)$ -glucanes sont très ramifiés et jouent un rôle majeur dans l'interconnexion entre les différents constituants de la paroi (chitine,  $\beta(1,3)$ -glucanes et mannoprotéines). La synthèse des  $\beta(1,6)$ -glucanes reste une voie encore mal définie à ce jour chez *C. albicans*. Cependant, l'étude de protéines homologues caractérisées chez *S. cerevisiae* a permis d'identifier quatre enzymes impliquées dans ce processus : Big1, Kre5, Kre6 et Skn1 (Herrero et al., 2004; Mio et al., 1997b; Umeyama et al., 2006).

## II. 3 Les lipides

Les lipides ne sont que des constituants mineurs de la paroi mais ont un rôle important dans la signalisation et dans la réponse immunitaire. Le principal lipide est le phospholipomannane, il est composé d'une chaîne de  $\beta(1,2)$ -oligomannosides pouvant contenir jusqu'à 19 mannoses, d'un céramide et d'un phosphoinositol (Trinel et al., 2002; Trinel et al., 1999). Ce lipide induit la production de la cytokine TNF $\alpha$  chez des macrophages murins et humains jouant ainsi un rôle dans la

résistance phagocytaire (Jouault et al., 1994; Mille et al., 2004). La reconnaissance du phospholipomannane par les macrophages implique les récepteurs TLR (Toll Like Receptor) (Jouault et al., 2003).

## II. 4 Les protéines

Trois classes de protéines sont retrouvées au niveau de la paroi de *C. albicans* (Chaffin, 2008) (Figure 11) :

- les protéines « atypiques » liées par des liaisons non covalentes (cercles verts) ;
- les protéines PIR liées de manière covalente aux  $\beta(1,3)$ -glucanes (hexagones jaunes) ;
- et les protéines à ancre GPI liées de manière covalente majoritairement aux  $\beta(1,6)$ -glucanes (rectangles rouges).

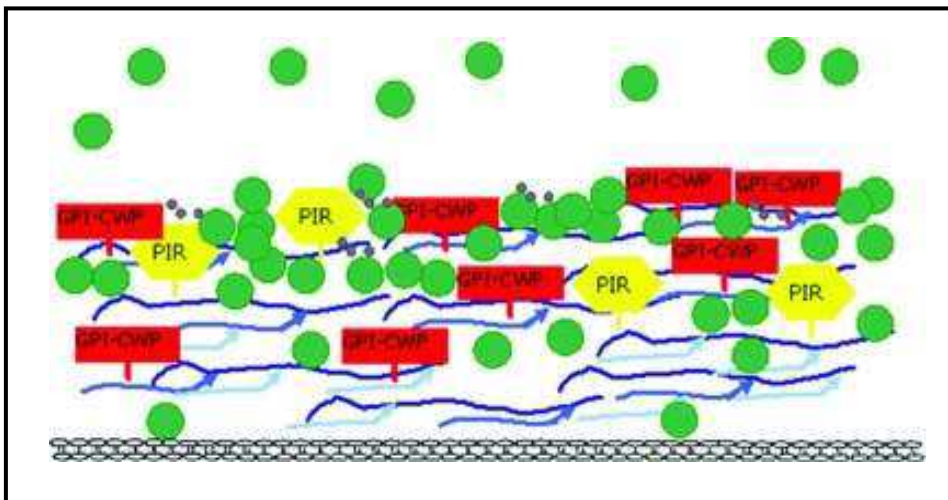


Figure 11 : Représentation schématique des principaux constituants de la paroi de *C. albicans* (Chaffin, 2008)

En blanc et noir : membrane plasmique. Rectangles rouges : protéines à ancre GPI. Hexagones jaunes : protéines PIR. Lignes bleues foncées :  $\beta(1,3)$ -glucanes. Lignes bleues :  $\beta(1,6)$ -glucanes. Lignes bleues claires : chitine. Cercles marron : phospholipomannane. Cercles verts : protéines non covalentes.

### a. Les protéines « atypiques »

Les protéines dites « atypiques » sont des protéines pariétales fixées par des liaisons non covalentes aux glucanes de la paroi (Ruiz-Herrera et al., 2006). Cette classe regroupe des protéines très diverses dont les protéines Hsp (Heat shock proteins). Des études ont montré que les protéines des familles Hsp de *C. albicans* peuvent moduler la réponse immunitaire de l'hôte à cause de réponses croisées entre l'Hsp60 humaine et l'Hsp60 de levure (Raggam et al., 2011). De plus un mutant  $\Delta ssa1/\Delta ssa1$  (membre de la famille Hsp70) présente une virulence diminuée lors d'infection disséminée ou de

candidose oropharyngée dans un modèle murin (Sun et al., 2010). Un autre exemple de protéine atypique est la protéine Pra1, exprimée comme les protéines Hsp en forme levure et en forme hyphes. Dans les hyphes de *C. albicans*, Pra1 devient très fortement glycosylée (Choi et al., 2003). La protéine Pra1 a été identifiée en tant que mp58 (mannoprotéine de 58 kDa) et il a été montré qu'elle induisait une forte réponse immunitaire à médiation humorale (anticorps) (Viudes et al., 2004; Viudes et al., 2001). De plus, la protéine Pra1 participe à l'échappement des macrophages en jouant un rôle essentiel dans la maturation du phagolysosome (Marcil et al., 2008). Cette protéine est également impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire en clivant le facteur C3 du complément (Zipfel et al., 2011).

### **b. Les protéines Pir**

Les protéines Pir (Proteins with internal repeats) sont liées au réseau de  $\beta(1,3)$ -glucanes *via* une liaison sensible aux traitements alcalins (Kandasamy et al., 2000; Kapteyn et al., 2000). Les protéines Pir, retrouvées également chez d'autres levures telles que *S. cerevisiae* ou *Yarrowia lipolytica*, partagent une structure générale commune : un peptide signal, un site de clivage à l'endoprotéase Kex2, un domaine central contenant un nombre variable de répétition du motif [-(A/K/Q)-Q-I-(S/T/G/N)-D-G-Q-I-Q-H-Q-T-] et un domaine C-terminal contenant quatre résidus cystéines régulièrement espacées (Ruiz-Herrera et al., 2006). Le site de clivage à l'endoprotéase Kex2 est un site de modification post-traductionnelle permettant l'obtention de la protéine mature au niveau de l'appareil de Golgi (Mormeneo et al., 2012). Chez *C. albicans*, deux protéines Pir ont été mises en évidence, Pir1 et Pir32. Une étude a montrée qu'un mutant hétérozygote  $\Delta pir1/PIR1$  était plus sensible aux drogues agissant sur la paroi (Calcofluor et Congo Red) (Martinez et al., 2004). Une étude protéomique a mis en évidence que la protéine Pir32 était surexprimée lorsque *C. albicans* est cultivée en présence de macrophages (Fernandez-Arenas et al., 2007). De façon inattendue, un mutant homozygote  $\Delta pir32/\Delta pir32$  présente un phénotype d'hyperfilamentation, une résistance au SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), à l' $H_2O_2$  (péroxyde d'hydrogène) et au chlorure de sodium et est plus virulent dans un modèle murin (Bahnan et al., 2012). Afin d'expliquer ces résultats, les auteurs ont montré que le taux de chitine était augmenté d'un facteur deux dans le mutant  $\Delta pir32/\Delta pir32$ .

### **c. Les protéines à ancre GPI**

Les protéines à ancre GPI est la classe de protéines pariétales la plus abondante, leur description fait l'objet de la partie suivante.

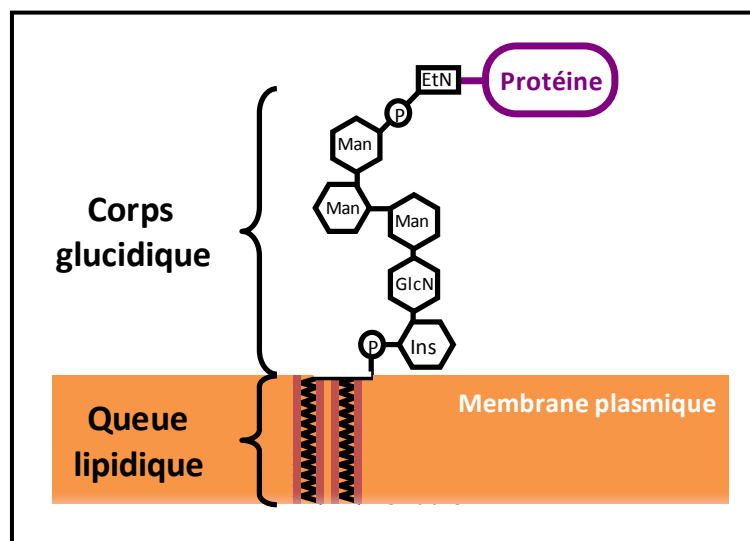
### III. Les protéines à ancre GPI

Les protéines à ancre GPI sont spécifiques des organismes eucaryotes. Chez *C. albicans*, les protéines à ancre GPI représentent 80 % des protéines pariétales. Cette classe de protéines est essentielle pour les levures car des mutants de délétion des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ancre ne sont pas viables (Grimme et al., 2004; Leidich et al., 1994; Orlean and Menon, 2007).

#### III. 1 L'ancre GPI

##### a. La structure de l'ancre GPI

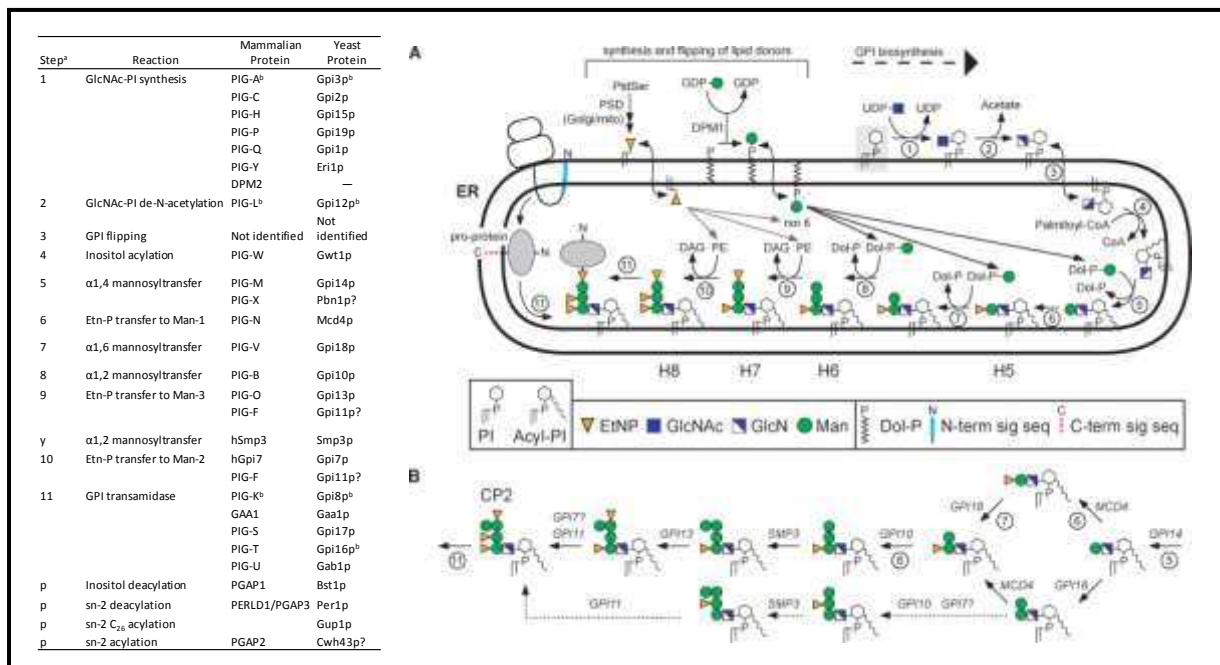
La structure de l'ancre GPI, décrite depuis une vingtaine d'année, est commune à toutes les protéines à ancre GPI. Elle est composée d'une queue lipidique, d'un corps glucidique et d'un groupement phosphoéthanolamine sur lequel se fixe la protéine (Figure 12). Le corps glucidique est constitué de 3 mannoses, d'un groupement N-acétyl glucosamine, et d'un résidu inositol. Des modifications au niveau des mannoses du corps glucidique et de la queue lipidique tels que l'ajout de mannoses, de groupements phosphoéthanolamine ou bien d'acides gras peuvent être observées d'un organisme eucaryote à un autre (Paulick and Bertozzi, 2008).



**Figure 12 : Structure d'une ancre GPI sans groupements ramifiés**  
EtN : éthanolamine. P : phosphate. Man : mannose. GlcN : glucosamine. Ins : inositol.

## b. La biosynthèse de l'ancre GPI

La voie de biosynthèse de l'ancre GPI est globalement très conservée et a lieu au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Celle-ci a été essentiellement étudiée chez la levure *S. cerevisiae* et les cellules de mammifères. Des expériences d'expression hétérologue montrent que les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ancre GPI sont fonctionnelles d'un organisme à l'autre (Kang et al., 2005). L'ancre GPI est synthétisée suite à une cascade de réactions enzymatiques décrites dans la Figure 13. La voie de biosynthèse est initiée du côté cytoplasmique de la membrane du RE par transfert d'un N-acétylglucosamine (GlcNAc) au phosphatidylinositol (PI) à partir d'un UDP-GlcNAc générant un GlcNAc-PI. Puis l'ancre GPI est synthétisée dans le lumen du RE par addition séquentielle nécessitant 11 étapes successives.



**Figure 13 : Schéma général de la voie de biosynthèse de l'ancre GPI au niveau du réticulum endoplasmique des cellules mammifères et des levures (Orlean and Menon, 2007)**

Tableau de gauche : liste d'enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ancre GPI. En A : Etapes générales de la voie de biosynthèse de l'ancre GPI. En B : Etapes additionnelles dans l'assemblage de l'ancre GPI.

## c. Export et localisation des protéines à ancre GPI

Les protéines transloquées dans le RE se fixent sur l'ancre GPI au niveau de l'éthanolamine via leur site d'ancrage appelé  $\omega$ . Les protéines ancrées GPI nouvellement synthétisées sont ensuite exportées à la membrane plasmique *via* le transport vésiculaire. Au niveau de la membrane plasmique, certaines protéines à ancre GPI peuvent subir un clivage au niveau de l'ancre après le glucosamine et être relocalisées à la paroi en se liant de façon covalente majoritairement aux  $\beta$ (1,6)- glucanes ou minoritairement  $\beta$ (1,3)- glucanes (Klis et al., 2010). De ce fait, il existe des protéines à ancre GPI



membranaires et des protéines à ancre GPI pariétales (Kapteyn et al., 1994). Ce phénomène n'a pour l'instant été décrit que chez les levures.

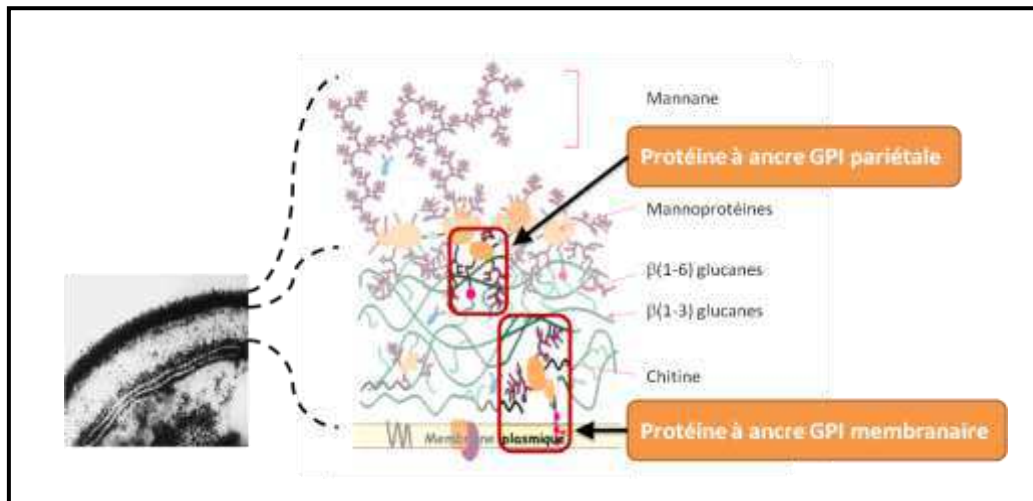


Figure 14 : Schéma de la paroi de *C. albicans* et localisation des protéines à ancre GPI (d'après T. Jouault, communication personnelle)

### III. 2 Caractéristiques des protéines à ancre GPI

#### a. La structure générale

La séquence protéique des protéines à ancre GPI présente trois critères généraux (Figure 15) :

- un peptide signal en position N-terminale pour l'adressage des protéines au RE ;
- un domaine fonctionnel généralement riche en sérine et thréonine qui sont des sites de glycosylation (Hamada et al., 1998) ;
- et un peptide signal d'ancrage GPI C-terminal (Eisenhaber et al., 2004).

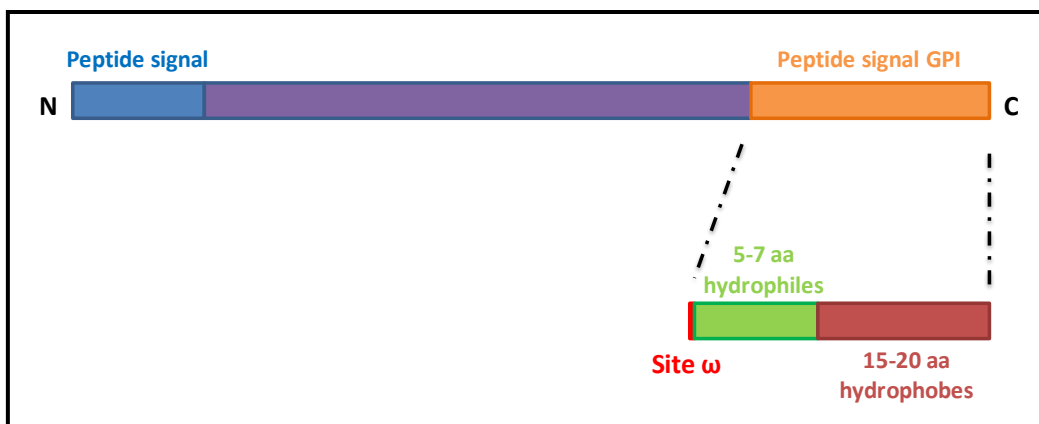


Figure 15 : Structure schématique d'une protéine à ancre GPI

### b. Le peptide d'ancrage

Le peptide signal d'ancrage GPI se compose d'un acide aminé  $\omega$  (site d'ancrage de la protéine sur l'ancre GPI), de 5 à 7 acides aminés hydrophiles puis de 15 à 20 acides aminés hydrophobes (Figure 15). Les acides aminés hydrophobes permettent l'ancrage transitoire de la protéine au niveau de la membrane du RE. Suite au clivage du peptide signal d'ancrage GPI, le site  $\omega$  est alors dévoilé et la protéine se fixe sur l'ancre par une réaction de transamidation (Orlean and Menon, 2007).

L'existence d'un site  $\omega$  peut être prédite par un algorithme développé pour les protéines fongiques ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)) selon des règles établies par Eisenhaber et ses collaborateurs : l'acide aminé  $\omega$  doit avoir une petite chaîne latérale, l'acide aminé  $\omega+1$  ne peut être une proline ou un tryptophane, l'acide aminé  $\omega+2$  doit comme l'acide aminé  $\omega$  contenir une petite chaîne latérale (Eisenhaber et al., 2004). De plus, l'importance de la nature des acides aminés en amont du site  $\omega$  a été soulignée pour la localisation des protéines à ancre GPI au niveau de la membrane plasmique ou de la paroi (Mao et al., 2008). Ainsi, la présence d'un acide aminé de nature isoleucine, valine ou leucine en position  $\omega-3$  à  $\omega-8$  ou bien de résidus phénylalanine, acide aspartique, tyrosine ou asparagine en position  $\omega-1$  à  $\omega-3$  serait en faveur d'une localisation pariétale. A l'inverse, la présence d'une lysine ou d'une arginine en position  $\omega-1$  à  $\omega-7$  ou d'un doublon lysine ou sérine en position en position  $\omega-1$  et  $\omega-2$  déterminerait une position membranaire (Boisrame et al., 2011; Mao et al., 2008).

### c. Les glycosylations

Au cours de leur transit dans la voie de sécrétion, les protéines pariétales peuvent subir des modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications, on retrouve l'ajout de groupements glycosylés en distinguant la O-glycosylation de la N-glycosylation. Les protéines N-glycosylées reçoivent un oligosaccharide grâce à la liaison entre l'azote du groupement amide de l'asparagine et la N-acétylglucosamine tandis que 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 et la perte complète de ce mécanisme est létale. Chez les eucaryotes ce processus est catalysé par un complexe enzymatique localisé dans la membrane du 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 grâce à l'oligosaccharyltransferase. 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. Chez les levures, 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 (Gemmill and Trimble, 1999).

La O-glycosylation commence dans le RE, où les mannosyltransferases (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 cinq isoformes de Pmt (Pmt1, Pmt2, Pmt4, Pmt5 et Pmt6) (Gemmill and Trimble, 1999).

## D/ Le rôle des protéines à ancre GPI dans le processus infectieux de *Candida albicans*

Contrairement à certains organismes pathogènes dont le pouvoir pathogène repose sur un facteur majeur et unique de virulence, comme la toxine cholérique produite par *Vibrio cholera*, *C. albicans* exprime de nombreux facteurs qui contribuent à sa virulence. En effet, la pathogénicité de *C. albicans* résulte de l'association de ces divers facteurs de virulence. Une des caractéristiques principale de son pouvoir pathogène est sa capacité d'adaptation aux conditions environnementales liée à sa variabilité structurale et antigénique. L'expression de molécules impliquées dans l'adhérence aux cellules de l'hôte et aux supports abiotiques, ainsi que la sécrétion d'enzymes telles que les aspartyl protéases (Sap) et les phospholipases sont d'autres facteurs de virulence importants contribuant à la pathogénicité de *C. albicans* (Calderone and Fonzi, 2001).

### I. Le processus infectieux de *C. albicans*

Les infections à *C. albicans* peuvent avoir comme origine deux sources : soit la source est d'origine exogène, soit d'origine endogène. Lorsque l'infection est d'origine exogène, *C. albicans* pénètre dans l'organisme *via* des supports abiotiques contaminés par auto-colonisation cutanée (cathéter, implant,...). Les infections d'origine endogène peuvent se développer chez environ 50-75 % de la population qui est porteur de *C. albicans* en tant que microorganisme saprophyte des muqueuses buccales, digestives, urogénitales et/ou de la peau. Les infections à *C. albicans* se déclenchent lorsque le système immunitaire de l'hôte est affaibli (traitements antibiotiques prolongés, maladies affectant le système immunitaire, chimiothérapie...) rompant ainsi l'équilibre entre *C. albicans* et les défenses de l'hôte au profit du pathogène opportuniste. Le processus infectieux de *C. albicans* repose sur trois étapes majeures consécutives : l'adhésion, l'invasion et la dissémination (Figure 16). Dans un premier temps, *C. albicans* adhère aux cellules de l'hôte *via* des molécules appelées adhésines puis envahissent les cellules épithéliales pour créer des lésions superficielles. Les cellules ayant adhérees sont à la base d'une structure tridimensionnelle, le biofilm. Dans le cas des infections systémiques, *C. albicans* traverse l'épithélium des muqueuses, atteint les vaisseaux sanguins puis traverse la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins grâce à la forme filamenteuse et se dissémine dans l'organisme *via* la circulation sanguine, on parle alors de candidémie (Zakikhany et al., 2007).

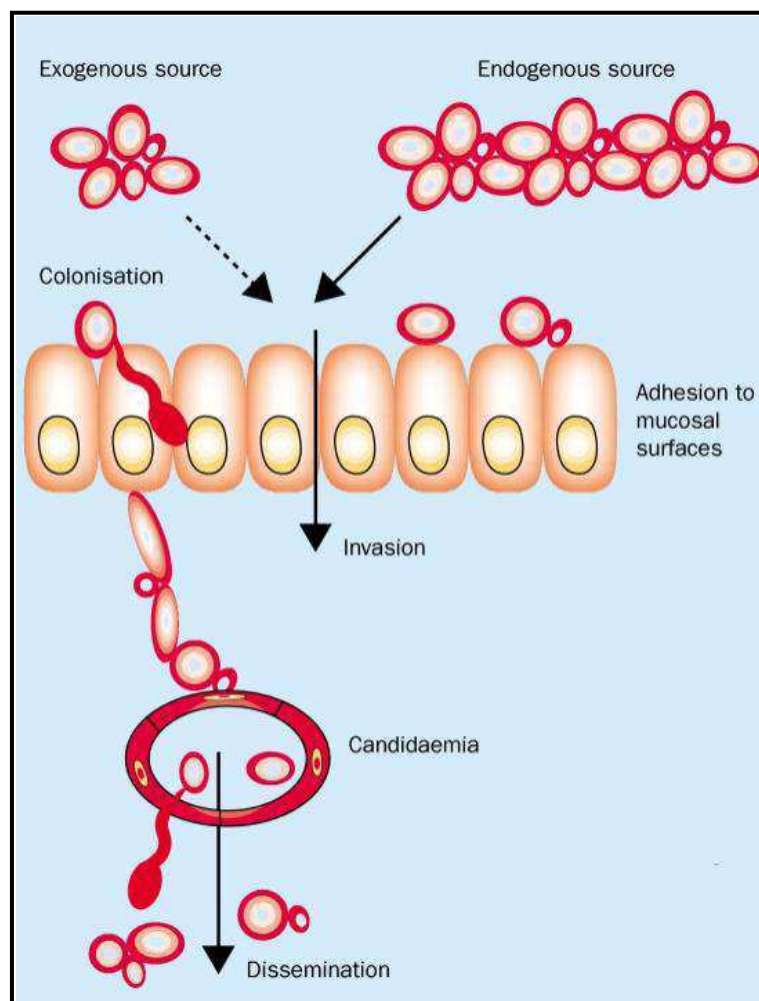


Figure 16 : Physiopathologie des infections invasives à *C. albicans* (Eggimann et al., 2003a)

Trois types majeurs d'interactions aux cellules épithéliales peuvent être distinguées (Zhu and Filler, 2010) (Figure 17). Tout d'abord *C. albicans* se fixe sur les cellules épithéliales *via* des adhésines présentes à la surface de la paroi (III. 6 p36). L'expression des adhésines est très souvent liée à la morphogénèse, ainsi certaines adhésines de *C. albicans* sont spécifiques de la forme levure telles que Als4 et Ywp1 et d'autres de la forme hyphe telles que Als3 et Hwp1 (Maddi et al., 2009) (II p33). Suite à cette phase initiale d'attachement, *C. albicans* envahit les cellules épithéliales. *C. albicans* peut alors : soit pénétrer dans les cellules épithéliales selon deux mécanismes distincts (la pénétration active ou l'endocytose) ; soit pénétrer entre les cellules par un seul mécanisme (la pénétration active). La pénétration active requiert d'une part l'action mécanique exercée par les hyphes dont l'induction a été enclenchée après fixation de *C. albicans* sur les cellules épithéliales, et d'autre part l'action des protéines exerçant un rôle enzymatique telle que Sap qui a pour effet de dégrader les E-cadhérines et les jonctions inter-épithéliales (II p33 et IV p40). L'endocytose implique principalement

des protéines à ancre GPI telles que Als3, Cht2 ou Pga7 (Nobile et al., 2008a; Phan et al., 2007). L'invasion des cellules épithéliales par pénétration active ou endocytose est prérequis pour l'induction des dommages conduisant à la détérioration des tissus épithéliaux exercée en partie par les protéines Sap (IV p40).

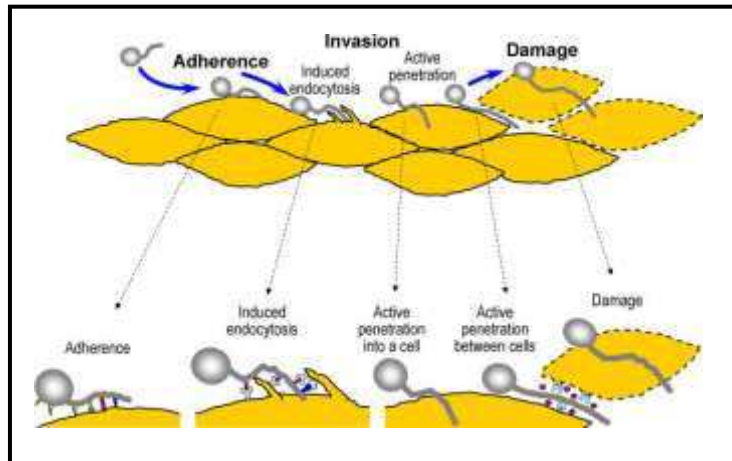


Figure 17 : Schéma des différentes étapes d'interactions *C. albicans*-cellules épithéliales (Zhu and Filler, 2010)

## II. Contribution de la forme hyphe dans la virulence de *C. albicans*

Le dimorphisme peut être considéré comme un facteur de virulence car le passage d'une forme à l'autre est crucial dans le processus infectieux de *C. albicans*. En effet, des travaux réalisés par Lo *et al* indiquent que les deux formes sont liées à la pathogénèse (Lo et al., 1997). Des mutants incapables de morphogénèse, bloqués soit sous forme levure ( $\Delta cph1$ ,  $\Delta efg1$  ou  $\Delta hgc1$ ) ou inversement sous forme hyphe (n'exprimant pas le répresseur Tup1), sont avirulents chez la souris et plus sensibles à l'endocytose par les macrophages (Lo et al., 1997; Marcil et al., 2002; Riggle et al., 1999; Zheng and Wang, 2004). Par ailleurs, le passage de la barrière épithéliale suivi de la dissémination dans la circulation sanguine lors d'infections systémiques impliquent les transitions morphologiques (Eggimann et al., 2003b). De plus, la forme hyphe permet de résister à la réponse immunitaire en participant à l'échappement du phagolysosome après phagocytose (Lorenz and Fink, 2002). La capacité qu'à *C. albicans* à adopter plusieurs formes cellulaires est donc un atout majeur dans la pathogénicité de celle-ci.

Un autre aspect lié au dimorphisme est l'expression de gènes spécifiques de la forme hyphe tels que *ALS1*, *ALS3*, *CSA1*, *HWP1*, *PGA62*, *RBT1* et *TOS1* régulés par Efg1 et Tup1 (Braun et al., 2000; Maddi et

al., 2009). Parmi ces gènes, on retrouve deux adhésines majeures caractérisées chez *C. albicans*, Als3 et Hwp1 (III. 6 p36). De même, une étude a montré que la forme hyphe ainsi que l'expression des protéases Sap4, Sap5 et Sap6 régulées par *EFG1* étaient requises pour l'invasion des organes parenchymateux (Felk et al., 2002) (IV p40). La contribution de la forme hyphe est donc double dans la virulence de *C. albicans* (i) en participant à l'invasion en exerçant une force mécanique et (ii) par l'expression de facteurs de virulence spécifiques tels que les adhésines et les protéases (Kumamoto and Vines, 2005).

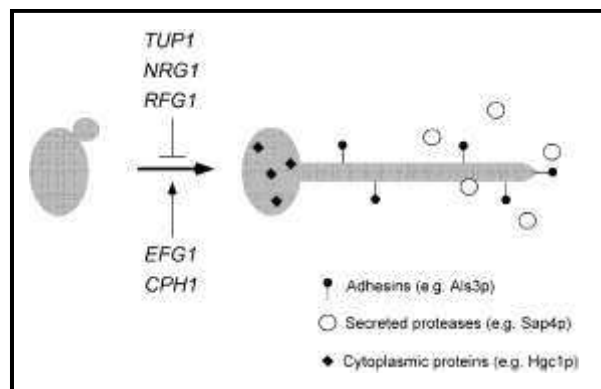


Figure 18 : Corrélation entre morphogénèse et expression de facteurs de virulence chez *C. albicans* (Kumamoto and Vines, 2005)

### III. Adhérence de *C. albicans*

#### III. 1 Adhérence aux cellules épithéliales et endothéliales

L'adhérence de *C. albicans* aux cellules épithéliales et endothéliales de l'hôte est la première étape du processus infectieux. Cette étape est essentielle pour la colonisation et à l'induction de l'infection par *C. albicans*. De plus, la persistance de *C. albicans* sur les muqueuses de l'hôte fait également appel aux propriétés d'adhérence de cette levure. Puisque l'adhésion aux cellules de l'hôte est cruciale pour *C. albicans*, cela pourrait expliquer que les propriétés d'adhésion de ce pathogène opportuniste soient portées par de multiples molécules de surface dont certaines protéines à ancre GPI (Zhu and Filler, 2010). Cette relative redondance explique que l'inactivation des deux copies d'un gène donné résulte le plus souvent en une réduction partielle de l'adhérence. L'expression des adhésines est fréquemment régulée en parallèle de la morphogénèse et le seul contact entre *C. albicans* et des cellules épithéliales déclenche la formation d'hyphes et l'expression des adhésines (Wachtler et al., 2011).

### III. 2 Adhérence aux protéines de l'hôte

La dissémination de *C. albicans* implique le passage des levures dans la circulation sanguine. *C. albicans* est capable de se lier aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques comme les facteurs du complément (Calderone et al., 1988; Wadsworth et al., 1993), le fibrinogène (Annaix et al., 1990; Casanova et al., 1992; Martinez et al., 1994) et les plaquettes sanguines (Robert et al., 1996). Ces types d'interactions font intervenir des récepteurs de surface fongiques tels que le récepteur CR3-like pour le complément (Hostetter, 2008).

### III. 3 Adhérence aux substrats abiotiques

L'implantation de matériaux synthétiques dans l'organisme est très largement corrélée à une augmentation du risque de colonisation. Ces surfaces abiotiques représentent également un terrain favorable à la formation de biofilm (Hawser and Douglas, 1994). Les composants impliqués dans l'interaction de *C. albicans* avec le plastique sont analogues à ceux décrits dans l'interaction avec le fibrinogène et la laminine (Tronchin et al., 1988). Il est important de souligner que l'introduction d'un cathéter dans l'organisme est très rapidement suivie de la formation d'un dépôt constitué en partie de fibrinogène, de plaquettes et d'autres constituants plasmatiques et il est très vraisemblable que l'adhérence de *C. albicans* au plastique soit renforcée par les adhésines impliquées dans ce type d'interaction aux molécules de l'hôte.

### III. 4 Rôle de l'hydrophobicité de surface dans l'adhésion

L'adhérence de *C. albicans* aux surfaces synthétiques (cathéters et prothèses) serait due à des interactions de nature hydrophobe. Des études ont montré qu'il existait une corrélation entre hydrophobicité de surface des souches et adhésion aux surfaces abiotiques (Ener and Douglas, 1992; Klotz et al., 1985; Panagoda et al., 2001). De plus, des différences d'hydrophobicité de surface ont été observées selon les conditions de culture de *C. albicans*. Ainsi, les levures en phase stationnaire sont plus hydrophobes que celles en phase exponentielle de croissance (Hazen and Hazen, 1988). Par ailleurs quelle que soit l'hydrophobicité de surface initiale de la cellule mère, il apparaît que l'hydrophobicité de surface des formes filamenteuses est augmentée (Hazen and Hazen, 1988; Jakab et al., 1993). Au niveau moléculaire, il a été montré que les glycoprotéines hydrophobes présentent un degré de glycosylation moindre que les glycoprotéines hydrophiles (Hazen and Glee, 1994). En parallèle, des études ont montré que les propriétés d'hydrophobicité des surfaces rencontrées par *C.*



*albicans* ont un effet sur l'adhérence. Ainsi l'adhérence de souches hydrophobes de *C. albicans* est diminuée sur des surfaces acryliques recouvertes d'un film hydrophile alors que celle de souches hydrophiles de *C. albicans* reste inchangée ou est augmentée (Yoshijima et al., 2010). Cependant, une étude réalisée sur des bactéries montre que l'adhésion de souches hydrophobes est toujours plus tenace que celle de souches hydrophiles quelque soit les propriétés d'hydrophobicité du support testé (Bruinsma et al., 2001).

### III. 5 Rôle de la glycosylation dans l'adhésion

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 sérine et thréonine de différentes enzymes n'affecte pas leur activité catalytique (Gatti et al., 1994). Néanmoins, d'autres fonctions de nature très variées ont cependant été associées à la O-glycosylation notamment l'adhésion cellulaire. Une étude montre que la délétion de la région riche en sérine et thréonine de la protéine Eap1 de *C. albicans* induit une perte d'adhérence des souches au polystyrène et que cette région fortement O-glycosylée est nécessaire pour projeter à la surface le domaine N-terminal de la protéine Eap1 (Li and Palecek, 2008). De plus, des études ont montré l'importance de la O-glycosylation dans la conformation et la stabilité des adhésines (Hashimoto et al., 2011; Stalnaker et al., 2011; Zhang and Ten Hagen, 2011).

### III. 6 Les principales adhésines caractérisées chez *C. albicans*

#### a. La famille Als

La famille Als (Agglutinin-like sequence) regroupe huit protéines à ancre GPI (Hoyer et al., 2001; Hoyer et al., 2008; Klis et al., 2010). Les protéines Als sont composées de trois domaines : (i) un domaine N-terminal d'une longueur de 300 acides aminés environ contenant trois répétitions en tandem de séquences ayant des propriétés semblables aux immunoglobulines (ii) un domaine central riche en résidus thréonine d'environ une centaine d'acides aminés suivi d'une séquence riche en acides aminés sérine et thréonine comprenant un nombre variable de motifs répétés en tandem, et (iii) un domaine C-terminal riche en sérine et thréonine O-glycosylées (Figure 19) (Loza et al., 2004; Rauceo et al., 2006; Sheppard et al., 2004). Le domaine N-terminal est constitué de feuillets  $\beta$  anti-parallèles caractéristiques des protéines de la superfamille des immunoglobulines. La présence de ces feuillets  $\beta$  anti-parallèles a été mise en évidence par dichroïsme circulaire chez les protéines Als1 et Als5 (Hoyer and Hecht, 2001; Rauceo et al., 2006; Sheppard et al., 2004). De plus la structure

tridimensionnelle prédite du domaine N-terminal de la plupart des protéines Als est similaire à la structure de certaines adhésines bactériennes comme l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis* ou le facteur A de *Staphylococcus aureus* (Sheppard et al., 2004).

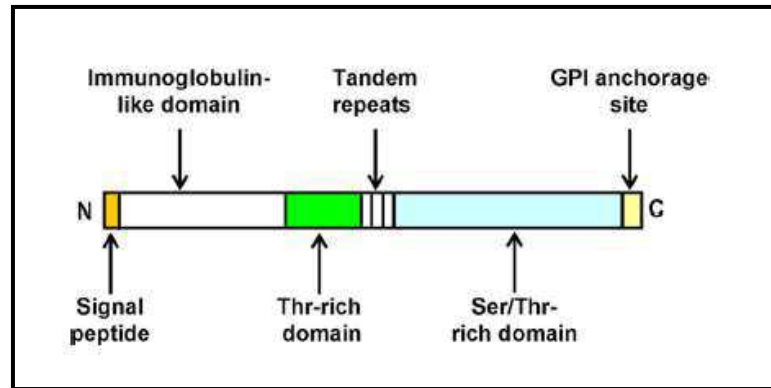


Figure 19 : Structure schématique de la protéine Als3 (Liu and Filler, 2011)

Deux approches complémentaires ont été entreprises pour étudier le rôle des protéines Als dans l'adhésion : (i) une approche d'expression hétérologue des gènes *ALS* de *C. albicans* dans la souche non adhérente *S. cerevisiae* (Fu et al., 1998; Gaur and Klotz, 1997; Gaur et al., 2002; Rauceo et al., 2006) et (ii) une approche de délétion des gènes *ALS* chez *C. albicans* (Fu et al., 2002; Zhao et al., 2006; Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2007). Les expériences d'expression hétérologue ont permis de caractériser les protéines Als1, Als3, Als5, Als6, Als7 et Als9 (Sheppard et al., 2004). La souche de *S. cerevisiae* qui exprime la protéine Als7 n'est pas capable d'adhérer aux cellules humaines testées. Les cinq autres protéines étudiées possèdent des propriétés d'adhésion aux cellules humaines avec quelques spécificités : les protéines Als1, Als3 et Als5 confèrent une adhésion à de multiples cellules de l'hôte incluant les cellules épithéliales orales, tandis que les protéines Als6 et Als9 ont des cibles d'adhésion plus limitées excluant les cellules épithéliales. La seconde approche (délétion de gène) a permis d'identifier les protéines Als2, Als3 et Als4 en tant qu'adhésines ayant pour cible les cellules épithéliales (Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2005).

Une étude a permis d'identifier le domaine N-terminal des protéines de la famille Als comme étant le principal domaine impliqué dans la spécificité des interactions levure-cellule de l'hôte (Sheppard et al., 2004). Toutefois, des études de structure/fonction ont révélé que le domaine correspondant à la séquence de motifs répétés en tandem de la protéine Als1 exerçait également un rôle important dans l'adhérence aux cellules endothéliales (Loza et al., 2004).

### **b. Hwp1**

La protéine Hwp1 (Hyphal Wall protein 1) est une protéine à ancre GPI exprimée à la surface des formes mycéliennes de *C. albicans* (Staab et al., 2003). Cette protéine présente des propriétés d'adhésion aux cellules épithéliales humaines. En effet, le domaine N-terminal de Hwp1 est reconnu comme substrat par les transglutaminases exposées à la surface des cellules épithéliales. Ce domaine présente des similarités avec les substrats habituels des transglutaminases qui sont des petites protéines riches en proline exprimées en surface des épithéliums. Le domaine N-terminal de la protéine Hwp1 confère donc des propriétés d'adhésion aux cellules épithéliales par un mécanisme imitant les protéines de l'hôte (Ponniah et al., 2007; Staab et al., 2004; Staab et al., 1999).

### **c. Hwp2 (= Pga8)**

La protéine Hwp2 est une protéine à ancre GPI spécifique de la forme hyphale de *C. albicans* (Younes et al., 2011). La protéine Hwp2 est impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales et endothéliales (Younes et al., 2011). De plus, la double délétion de Hwp2 engendre un défaut d'invasion cellulaire et une sensibilité au peroxyde d'hydrogène (Hayek et al., 2010; Younes et al., 2011).

### **d. Eap1 (= Pga47)**

La protéine Eap1 (Enhanced adherence to polystyrene) est une adhésine à ancre GPI de *C. albicans* caractérisée par une approche d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* (Li and Palecek, 2003). La structure de protéine Eap1 présente des similarités avec celle des protéines de la famille Als et des études ont montré des spécificités différentes pour le domaine N-terminal et pour la région contenant les séquences répétées en tandem (Li and Palecek, 2008). Des expériences d'adhésion réalisées avec un double mutant  $\Delta eap1/\Delta eap1$  chez *C. albicans* et des souches d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* exprimant Eap1 ont montré que le domaine N-terminal était responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales du rein et au polystyrène tandis que la région contenant les séquences répétées en tandem était responsable des interactions levure/levure (Li and Palecek, 2003, 2008; Li et al., 2007). A ce jour, les cibles d'Eap1 sur les cellules de l'hôte n'ont pas été mises en évidence.

### **e. Iff4**

La protéine Iff4 fait partie de la famille Iff qui est composée de douze protéines. Tous les membres de la famille Iff, exceptée Iff11 qui est une protéine sécrétée, sont des protéines à ancre GPI exprimées à la surface de *C. albicans* (Bates et al., 2007). La famille Iff partage avec la protéine Hyr1 un domaine N-terminal fortement conservé (Bates et al., 2007 ; Boisrame et al., 2011). Une étude a montré que la

surexpression de *Iff4* chez *C. albicans* induisant une augmentation de l'adhérence aux cellules épithéliales orales (Fu et al., 2008). De plus, un mutant homozygote  $\Delta iff4/\Delta iff4$  présente *in vitro* une adhérence diminuée au plastique (Kempf et al., 2007). La forte conservation du domaine N-terminal laisse présager que les autres protéines de la famille Iff pourraient également avoir une fonction d'adhésine. Cependant, la surexpression des protéines *Iff2*, *Iff3* ou *Hyr1* ne modifie pas l'adhérence de *C. albicans* aux cellules épithéliales suggérant ainsi que ces protéines ciblent un autre type de cellules (Fu et al., 2008).

#### f. Ecm33

Un autre exemple de protéine à ancre GPI étant impliquée dans les mécanismes d'interactions cellulaires est la protéine *Ecm33* (Martinez-Lopez et al., 2004; Martinez-Lopez et al., 2006). Une étude a montré qu'un mutant homozygote  $\Delta ecm33/\Delta ecm33$  présentait des capacités d'adhérence et d'invasion aux cellules épithéliales humaines diminuées (Martinez-Lopez et al., 2006). Cependant, le rôle de la protéine *Ecm33* dans l'adhérence est très vraisemblablement dû à des effets indirects. En effet, une composition anormale de la paroi et une délocalisation de la protéine *Als1* de la surface ont été observées chez ce mutant (Martinez-Lopez et al., 2006). Par ailleurs, l'expression hétérologue de la protéine *Ecm33* chez *S. cerevisiae* ne modifie pas les propriétés d'adhésion de ces souches. Toutefois, la complémentation par *Ecm33* des mutants de *S. cerevisiae*  $\Delta ecm33/\Delta ecm33$  permet de restaurer les modifications de paroi (Martinez-Lopez et al., 2004; Martinez-Lopez et al., 2006). Ces derniers résultats suggèrent que la protéine *Ecm33* n'exerce pas à proprement dit une fonction d'adhésine mais semble être nécessaire pour la localisation et la fonction d'autres adhésines.

#### g. Ywp1 (= Pga24)

La protéine *Ywp1* est une protéine à ancre GPI exposée à la surface des levures de *C. albicans*. L'expression de la protéine *Ywp1* a été mesurée en remplaçant la séquence codante de *Ywp1* par la séquence codant le reporteur fluorescent GFP. Ces expériences ont montré que l'expression de *Ywp1* était maximale durant la phase exponentielle de culture et était réprimée en phase stationnaire et pendant la filamentation (Granger et al., 2005). Il a été montré que la double délétion de *YWP1* n'a pas d'impact sur la croissance, la morphologie ou la virulence (Granger et al., 2005). Cependant, ce double mutant  $\Delta ywp1/\Delta ywp1$  présente une adhérence augmentée au polystyrène (Granger et al., 2005). Ces données suggèrent que la protéine *Ywp1* présenterait des propriétés anti-adhésines. De plus, l'expression ectopique de *Ywp1* induit une diminution des propriétés d'adhésion des hyphes *in vitro* indiquant que les propriétés anti-adhésines de *Ywp1* sont fonctionnelles en formes levure et hyphes (Granger, 2012). Granger et ses collaborateurs ont montré qu'après clivage du propeptide de

11 kDA de Ywp1, celui-ci restait accroché par des liaisons non covalentes mais fortes à la protéine Ywp1 mature. Une récente étude a montré que le propeptide, qui porte la partie N-glycan de Ywp1, participerait à la fonction anti-adhésive de Ywp1 (Granger, 2012).

#### IV. Les protéines à ancre GPI impliquées dans l'invasion des cellules de l'hôte

L'invasion des cellules de l'hôte par *C. albicans* repose sur deux mécanismes : la pénétration active et l'endocytose (Naglik et al., 2011) (Figure 20). L'utilisation de ces mécanismes est dépendante du type cellulaire, par exemple les deux mécanismes sont utilisés lors de l'invasion des lignées de cellules épithéliales orales par *C. albicans* tandis que seule la pénétration active est utilisée dans l'invasion des cellules épithéliales intestinales (Dalle et al., 2010; Phan et al., 2007). La forme mycélienne est essentielle au phénomène d'invasion. En effet, de nombreuses études ont montré que des mutants délétés des gènes impliqués dans la formation des hyphes tels que les mutants  $\Delta efg1/\Delta efg1$ ,  $\Delta ras1/\Delta ras1$ ,  $\Delta tec1/\Delta tec1$ ,  $\Delta cka2/\Delta cka2$ ,  $\Delta rim101/\Delta rim101$ ,  $\Delta tpk1,2/\Delta tpk1,2$  et  $\Delta czf1/\Delta czf1$  présente un défaut d'invasion (Chiang et al., 2007; Korting et al., 2003; Naglik et al., 2008; Nobile et al., 2008b; Park et al., 2005; Wachtler et al., 2011). Ces mutants affectent les voies MAPK et AMP cyclique aboutissant au facteur de transcription Efg1 qui contrôle l'expression des protéines spécifiques de la forme mycélienne.

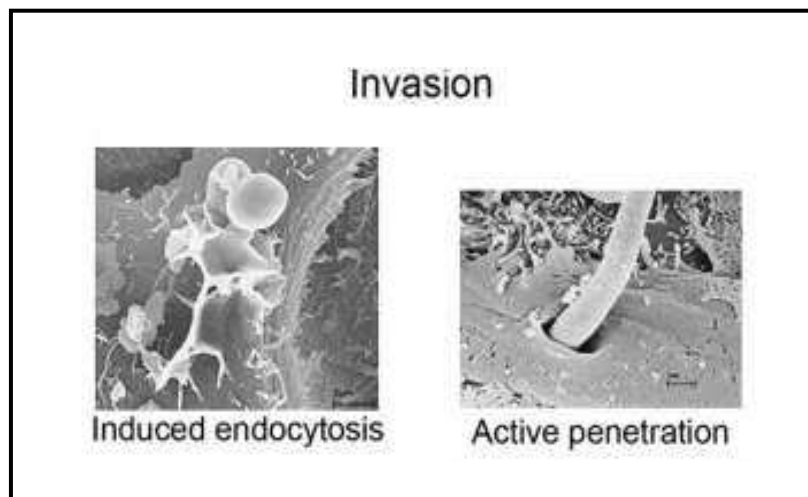


Figure 20 : Invasion des cellules épithéliales orales par pénétration active ou endocytose (Naglik et al., 2011)

## IV. 1 Endocytose

Plusieurs protéines à ancre GPI de *C. albicans* participent à l'invasion par des cellules hôtes par le mécanisme d'endocytose : Als3, Cht2, Pga7 et les protéines de la famille Sap. Des études ont montré qu'un mutant homozygote  $\Delta als3/\Delta als3$  avait des propriétés d'adhésion réduite, une capacité à envahir les cellules épithéliales diminuée et était moins virulent dans un modèle murin d'infection oropharyngée (Liu and Filler, 2011; Wachtler et al., 2011). Il a été démontré que la protéine Als3 se fixait aux E-cadhérines des cellules de l'hôte puis était endocytosée par le mécanisme lié aux clathrines (Phan et al., 2005; Phan et al., 2007). Les protéines Cht2 et Pga7 sont des protéines de surface régulées par le facteur de transcription Rim101 (Davis et al., 2000). Dans un mutant  $\Delta rim101/\Delta rim101$ , les protéines Cht2 et Pga7 ne sont plus exprimées et les capacités d'induction de l'endocytose sont diminuées (Nobile et al., 2008b). La complémentation individuelle des gènes cibles de Rim101 permet de restaurer partiellement l'endocytose (Nobile et al., 2008b). Les protéines de la famille Sap contribuent également à l'endocytose. Des triples mutants homozygotes  $\Delta sap1,2,3/\Delta sap1,2,3$  et  $\Delta sap4,5,6/\Delta sap4,5,6$  présentent des capacités d'invasion très réduites (Dalle et al., 2010). Cependant l'effet de ces mutants n'est observé qu'en présence d'une molécule appelée pepstatine A qui est un inhibiteur des aspartyl protéases suggérant un rôle indirect des protéines Sap dans l'endocytose.

## IV. 2 Pénétration active

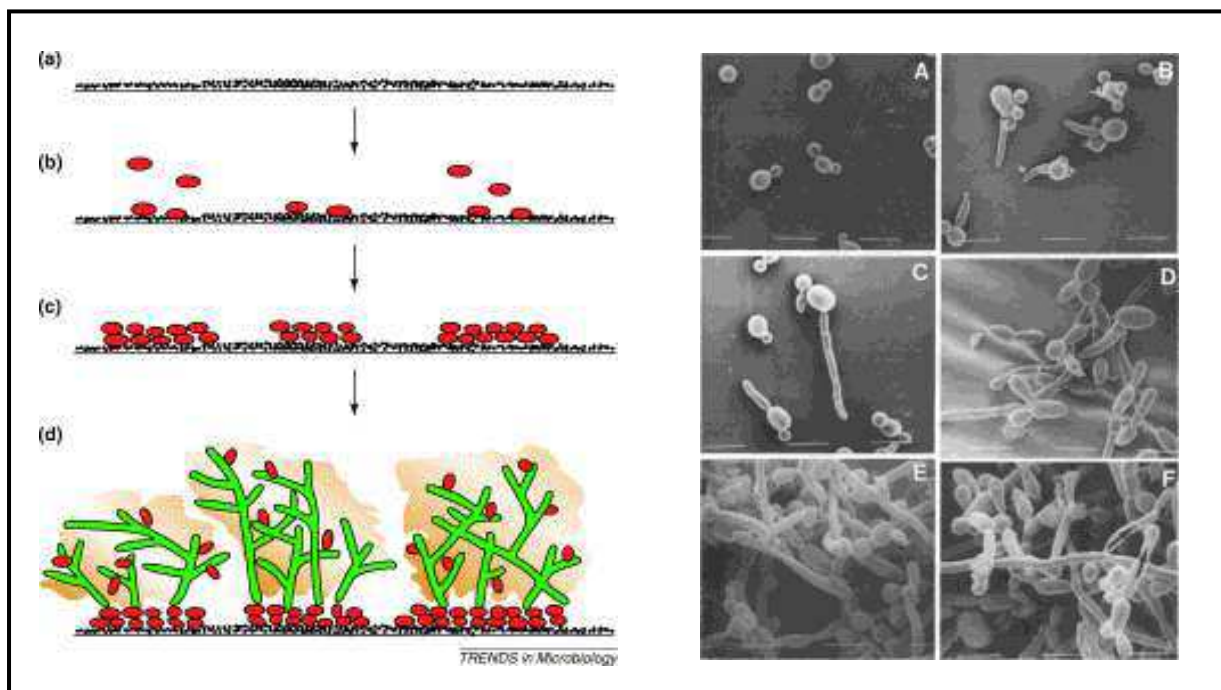
Les protéines impliquées dans la pénétration active lors de l'invasion cellulaire sont encore méconnues. Toutefois, la protéine multifonctionnelle Als3 semble jouer un rôle dans ce mécanisme de manière indirecte en se liant aux cellules épithéliales (Wachtler et al., 2011). Les protéines Sap apportent également leur contribution à l'invasion de *C. albicans* via la pénétration active. Leur principale propriété est de faciliter la pénétration des hyphes de *C. albicans* entre les cellules épithéliales. Les protéines Sap4, Sap5 et Sap6 sont plus précisément impliquées dans la modulation de l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes conduisant à l'obtention d'un tissu épithélial plus permissif à la colonisation de *C. albicans* (Rollenhagen et al., 2009). La protéine Sap5 participe à la pénétration active en dégradant les E-cadhérines présentes en fortes concentrations aux niveaux des jonctions intercellulaires (Villar et al., 2007).

## V. Formation de biofilm par *C. albicans*

### V. 1 Les biofilms à *C. albicans*

#### a. Ultrastructure des biofilms

Les biofilms sont des communautés de cellules qui se forment suite à l'étape initiale d'adhésion des levures de *C. albicans* aux supports biotiques ou abiotiques. Les biofilms sont des structures tridimensionnelles formées de deux couches principales : la première couche est constituée de levures de *C. albicans* et la seconde couche est majoritairement composée d'hyphes (associées à des levures et à des pseudo-hyphes) entourées d'une matrice extracellulaire d'exopolysaccharides (Douglas, 2003; Hawser and Douglas, 1994; Kuhn et al., 2002) (Figure 21, gauche). Une étude cinétique de la formation de biofilm a montré que la seconde couche du biofilm se formait 3 à 6h après l'adhésion initiale des levures, temps nécessaire à la formation de filaments mycéliens (Hawser and Douglas, 1994) (Figure 21, droite).



**Figure 21 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm par *C. albicans* à la surface d'un cathéter**

**A gauche : Schéma des étapes aboutissant à la formation d'un biofilm (Douglas, 2003)**

En a : colonisation de la surface du cathéter par des protéines de l'hôte (en noir). En b : Adhésion initiale des levures de *C. albicans* (en rouge). En c : Formation de microcolonies formées par des levures constituant la première couche du biofilm.

En d : formation d'un réseau constitué de filaments mycéliens (en vert) sur lesquels se fixent les levures (en rouge) constituant la seconde couche du biofilm englobée dans une matrice extracellulaire (en beige)

**A droite : Images obtenues par balayage électronique (Hawser and Douglas, 1994)**

Au temps 1h (A), 3h (B), 6h (C), 18 (D), 24h (E) et 48h (F)

### b. Résistance aux drogues

La structure cohésive des biofilms formés par *C. albicans* joue un rôle essentiel dans la résistance aux drogues. Les cellules de *C. albicans* englobées dans la structure tridimensionnelle d'un biofilm sont 1000 fois plus résistantes aux antifongiques que les cellules planctoniques (Tobudic et al., 2011). Plusieurs mécanismes complémentaires sont responsables de cette résistance :

- la barrière physique exercée par les exopolysaccharides de la matrice extracellulaire (Al-Fattani and Douglas, 2006) ;
- la diminution de la croissance de *C. albicans* et des besoins en nutriments réduits (Donlan and Costerton, 2002; Mah and O'Toole, 2001) ;
- la surexpression des pompes à efflux des transporteurs actifs ABC (ATP-Binding Cassette) et des transporteurs passifs (Ramage et al., 2002) ;
- la surexpression biofilm-spécifique des gènes *ALS3* et *HWP1* en réponse à la Caspofungine (Vediyappan et al., 2010).

### c. Les protéines à ancre GPI

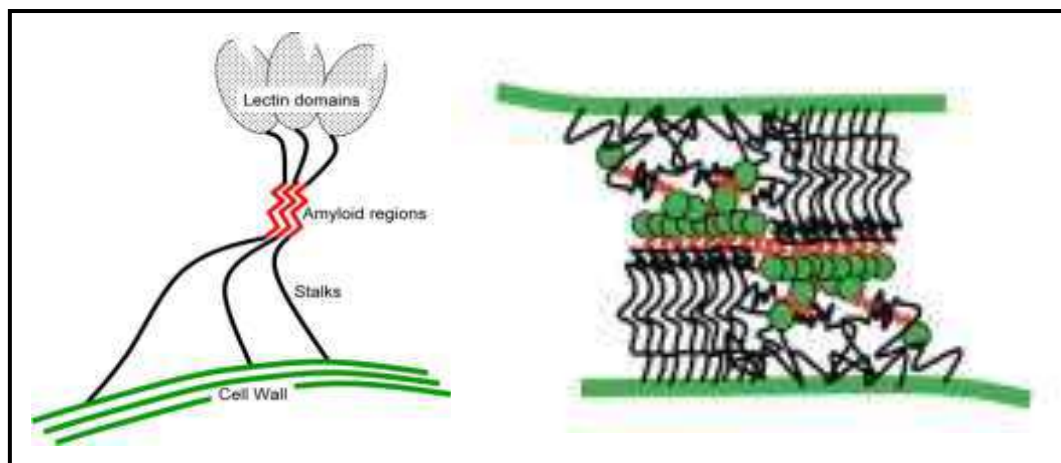
De nombreuses protéines pariétales de *C. albicans* sont impliquées dans la formation des biofilms. Les quatre protéines à ancre GPI majeures caractérisées sont des adhésines : Als1, Als3, Hwp1 et Eap1. Des études ont montré que la protéine Hwp1 était nécessaire pour la formation de biofilm *in vitro* et *in vivo* tandis que la protéine Als3 n'était requise uniquement qu'*in vitro* (Nobile et al., 2006). De plus, des expériences de complémentation de défaut de biofilm réalisées avec des mutants de délétion  $\Delta als1,3/als1,3$  et  $\Delta hwp1/\Delta hwp1$  permettent d'affirmer que le rôle des protéines Als1, Als3 et Hwp1 est complémentaire (Nobile et al., 2008a). Ces observations suggèrent que les interactions entre les protéines Als1/Als3 et la protéine Hwp1 seraient responsables de la cohésion des hyphes dans le biofilm. Par ailleurs, un défaut de formation de biofilm a été observé pour le mutant homozygote  $\Delta eap1/\Delta eap1$  dans des expériences *in vitro* et *in vivo* (Li et al., 2007).

### d. Rôle des structures amyloïdes

Il est connu que les protéines présentant des structures amyloïdes possèdent des propriétés d'agrégation (Barnhart and Chapman, 2006; Fowler et al., 2006). Les protéines amyloïdes sont des protéines fibrillaires ayant des propriétés d'empilement *via* leurs hélices  $\beta$  (Garcia et al., 2011). Otoo et ses collaborateurs ont montré que les protéines de la famille Als avaient des séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation d'après les prédictions du serveur TANGO (<http://tango.crg.es/>) au niveau de leur domaine riche en motifs répétés en tandem (Frank et al., 2010; Otoo et al., 2008). Ces séquences auraient des propriétés équivalentes à celles des structures amyloïdes. Des expériences



d'agrégation avec des peptides portant la séquence prédite de  $\beta$ -agrégation et des protéines Als5 tronquées ont permis de valider cette hypothèse (Ramsook et al., 2010). De plus, le rôle des séquences prédites de  $\beta$ -agrégation de la protéine Als5 dans la formation de biofilm a été démontré suggérant leur implication dans de possibles interactions intercellulaires (Garcia et al., 2011). Les régions amyloïdes auraient donc un rôle dans la présentation de polymère lorsque les interactions se font entre les protéines d'une même cellule (Figure 22, à gauche) et dans la formation de biofilm ou d'agrégats lorsque les interactions protéiques s'effectuent entre plusieurs cellules (Figure 22, à droite) (Garcia et al., 2011; Ramsook et al., 2010). Une étude bioinformatique a permis d'identifier des séquences prédites de  $\beta$ -agrégation *via* le serveur TANGO au sein des séquences des principales adhésines caractérisées chez *C. albicans* à savoir les protéines Als1, Als5, Hwp1, Hwp2, Eap1 et l'invasine Sap3 (Ramsook et al., 2010).



**Figure 22 : Modèles d'interactions via les régions amyloïdes**

A droite : interactions interprotéiques permettant la présentation d'un polymère (Ramsook et al., 2010)

A gauche : réseau d'interactions interprotéiques entre différentes cellules de *C. albicans* permettant l'agrégation (Garcia et al., 2011)

## V. 2 Les biofilms mixtes *C. albicans*-bactéries

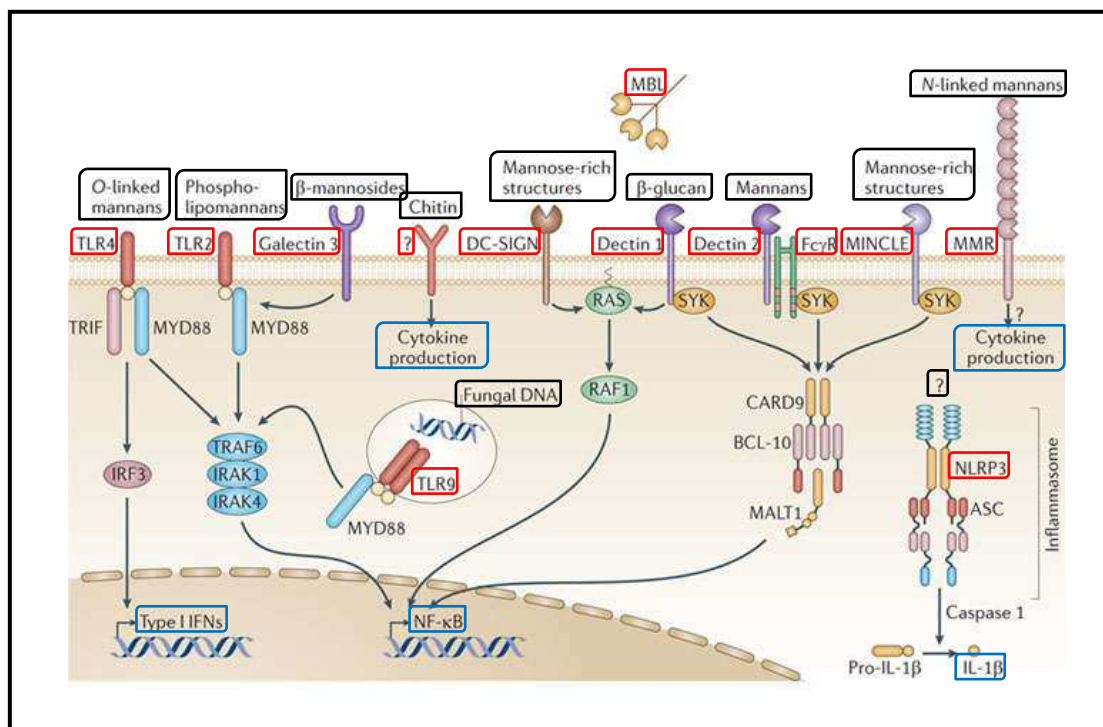
*C. albicans* est également capable de former des biofilms avec d'autres microorganismes et en particulier avec les bactéries, on parle alors de biofilm mixte. Ces interactions inter-espèces peuvent jouer à la faveur ou à la défaveur de *C. albicans* dans le développement des infections fongiques (Morales and Hogan, 2010). Les principaux agents bactériens rencontrés dans les biofilms mixtes sont les Streptocoques, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Brusca et al., 2012; Hogan and Kolter, 2002; Peters et al., 2012). Les protéines de la famille Als ont été identifiées dans les interactions physiques entre *C. albicans* et les bactéries (Klotz et al., 2007; Shirtliff et al., 2009). Au

sein de ces biofilms mixtes, les échanges inter-espèces s'effectuent majoritairement *via* le quorum-sensing (Hogan et al., 2004).

## VI. Induction de la réponse immunitaire en réponse à *C. albicans*

### VI. 1 Les mécanismes de défense de l'hôte

L'invasion de l'organisme humain par *C. albicans* déclenche l'activation des mécanismes de défense de l'hôte. La première ligne de défense activée est le système immunitaire inné représenté par les cellules phagocytaires telles que les macrophages et les neutrophiles. Cette défense immunitaire est médiée par les PRRs (Pattern-Recognition Receptors) présents à la surface des cellules immunitaires en réponse à des molécules conservées appelées PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) exprimées en surface des pathogènes (Cheng et al., 2012; Gow et al., 2012; Hajishengallis and Lambris, 2011; Hontelez et al., 2012; Villar and Dongari-Bagtzoglou, 2008) (Figure 23). La reconnaissance des PAMPs par les PRRs déclenche une cascade de signalisation intracellulaire spécifique conduisant à l'activation des divers facteurs de transcription tels que le facteur NF- $\kappa$ B, les interleukines, les cytokines proinflammatoires et les chemokines (Figure 23).



**Figure 23 : Modèle d'interactions moléculaires entre les PRRs de l'hôte (et les PAMPs de *C. albicans* conduisant à l'activation des facteurs de transcription de la réponse immunitaire (Gow et al., 2012)** Encadrés en rouge : PRRs. Encadrés en noir : PAMPs. Encadrés en bleu : réponse immunitaire

*C. albicans* possède une grande variété de PAMPs incluant les composants de la paroi comme la chitine, les  $\beta$ -glucanes, le phospholipomannane, les  $\alpha$ -mannanes liés en O et en N ainsi que les structures riches en mannoses (Gow et al., 2012) (Figure 23). Les PRRs impliqués dans la reconnaissance des PAMPs sont de types : TLRs (Toll-Like Receptors) dont les TLR-2, TLR-4 et TLR-9 ; CLR (C-type Lectin Receptors) à savoir les récepteurs Dectin-1, Dectin-2, MMR, DC-SIGN, MINCLE et MBL ; et les récepteurs Galectin-3, NLRP-3 et MBL (Gow et al., 2012) (Figure 23). Les récepteurs TLR9 et NLRP-3 ne rentrent en jeu dans la réponse immunitaire qu'après internalisation ou phagocytose de *C. albicans*, ces récepteurs reconnaissent respectivement l'ADN fongique et des ligands putatifs associés à la forme hyphe (Gross et al., 2009; Miyazato et al., 2009) (Figure 23). Le récepteur MBL (Mannose-Binding Lectin) est un récepteur soluble circulant (Figure 23).

## VI. 2 Macrophages

Le rôle des macrophages dans les infections systémiques par *C. albicans* est bien établi (Hurtrel and Lagrange, 1981; Jensen et al., 1993; Qian et al., 1994), cependant peu d'études portent sur leur rôle dans les candidoses oropharyngées (Farah et al., 2001). Ces cellules immunitaires sont capables d'ingérer et de tuer 30 à 60 % des levures de *C. albicans* non opsonisées (Netea et al., 2004; Vonk et al., 2002). Des études ont montré que la reconnaissance des formes levures ou des formes mycéliennes de *C. albicans* faisait intervenir des PRRs différents présents en surface des macrophages (Filler, 2006; Moyes et al., 2010) (Figure 24). Ainsi la forme levure est reconnue par trois PRRs à savoir le TLR-2, le TLR-4 et le Dectin-1 (Figure 24). Le TLR-2 formerait probablement un complexe avec ou plusieurs autres récepteurs qui seraient le TLR-6 et/ou le Dectin-1. La reconnaissance des levures par les macrophages provoque alors une réponse immunitaire pro-inflammatoire médiée par la sécrétion de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$  et la production de superoxyde. Cette réponse conduit à l'activation des leucocytes et à la mort des cellules de *C. albicans*. En comparaison, les hyphes de *C. albicans* sont reconnues seulement par les TLR-2 (et non plus par les PRRs TLR-4 et Dectin-1) (Figure 24). A l'inverse de la reconnaissance des levures, la reconnaissance des hyphes induit une réponse anti-inflammatoire. La sécrétion d'IL-10 inhibe l'action des leucocytes et réduit donc l'activité fongicide. La forme hyphe est donc plus résistante aux mécanismes de défense mis en place par l'hôte. Ces résultats indiquent que le dimorphisme de *C. albicans* est une cible thérapeutique potentielle dans la lutte contre les candidoses (Jacobsen et al., 2012).

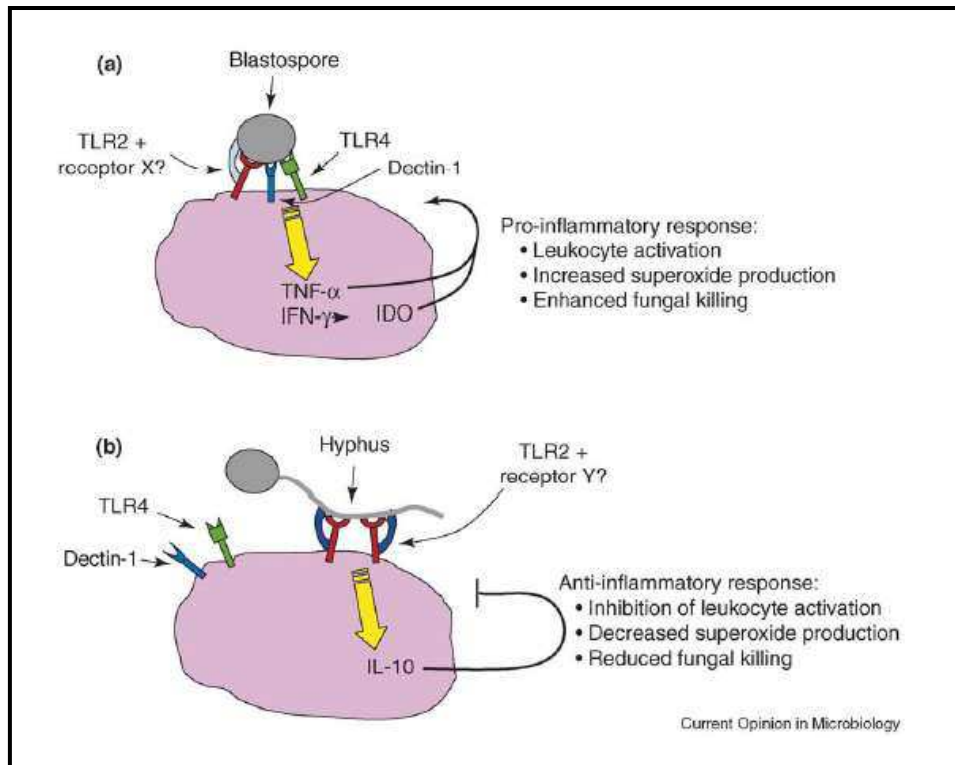


Figure 24 : Récepteurs présents en surface des monocytes et des macrophages impliqués dans la reconnaissance des levures (en a) et des hyphes (en b) de *C. albicans* et les voies de signalisations cellulaires associées (Filler, 2006)

### VI.3 Neutrophiles

Les neutrophiles sont les cellules phagocytaires effectrices les plus importantes dans la réponse contre les candidoses systémiques mais cela n'est pas le cas lors d'infections vaginales (Fidel, 1999; Marquis et al., 2006). La réponse des neutrophiles induit la production d'IL-8, de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$  favorisant la production de résidus superoxydes. De plus, il a été montré que la mort des neutrophiles pouvait contribuer à la lutte contre *C. albicans*. En effet, la mort de ces cellules immunitaires provoque la dégranulation et le relargage de peptides antimicrobiens au niveau du site de l'infection (Villar and Dongari-Bagtzoglou, 2008).

## **E/ Les nouveaux moyens de lutte contre les infections à *Candida albicans***

### **I. Problématique**

Comme évoqué en début d'introduction, *C. albicans* est un pathogène opportuniste responsable d'infections superficielles bénignes, mais souvent récurrentes, chez les personnes immunocompétentes et d'infections profondes chez les personnes immunodéprimées (A/ p9). Le taux de mortalité atteint 30 à 50 % lors de candidoses systémiques, ce taux élevé reste constant depuis des années (Cassone, 2008). Le fait que ce type d'infections à *C. albicans* se développe chez des individus ayant un système immunitaire fortement affaibli et que le nombre d'antifongiques soit très limité est un frein dans l'efficacité des traitements disponibles à ce jour. La mise au point d'un vaccin dans la prévention ou la lutte contre ces infections à *C. albicans* représente donc un enjeu actuel majeur.

### **II. L'immunisation passive**

Par définition, l'immunisation passive ou sérothérapie consiste à injecter directement l'anticorps contre l'agent pathogène. Le principal avantage est que la personne infectée est immédiatement protégée, sans avoir à attendre que les anticorps se développent. Cependant, ce type de vaccination est éphémère et ne dure que quelques mois étant donné que les cellules de défense du système immunitaire n'ont pas été suffisamment en contact avec l'agent pathogène.

Diverses études ont déjà montré l'effet prometteur d'anticorps dirigés contre certains composants de la paroi dans la lutte anti-*C. albicans*. Ainsi, il a été mis en évidence que l'injection d'anticorps IgG dirigés contre le domaine N-terminal de la protéine de surface Hyr1 prolongeait la survie des souris infectées par *C. albicans* en comparaison avec des souris n'ayant pas reçu d'anticorps (Luo et al., 2011). En neutralisant la fonction de la protéine Hyr1 dans la résistance aux neutrophiles, l'action des anticorps anti-Hyr1 restaure la réponse immunitaire de ces cellules (Luo et al., 2010). Une étude mettant en jeu des anticorps anti- $\beta$ -glucanes a permis de préciser que les anticorps ayant des propriétés protectrices étaient ceux dirigés spécifiquement contre les glucoses liés en  $\beta$ -1,3 et que cette reconnaissance influençait l'ancrage des protéines pariétales Als3 et Hyr1 retrouvées dans la fraction sécrétée (Torosantucci et al., 2009). Le pouvoir protecteur des anticorps anti- $\beta$ -glucanes repose sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *C. albicans* et de leur adhérence aux cellules

épithéliales humaines (Torosantucci et al., 2009). L'action des anticorps anti-Sap2 et anti-MP65 dans l'inhibition de l'adhérence de *C. albicans* sur des épithéliums vaginaux et leur pouvoir protecteur dans un modèle de candidose vaginale ont également été démontrés récemment (De Bernardis et al., 2007). Les protéines de la famille Hsp90 sont également une cible de choix pour le développement de nouveaux moyens de lutte anti-*C. albicans*. Il a été montré que l'Efungumab, un anticorps humain dirigé contre les protéines Hsp90, avait un effet synergique avec les antifongiques actuellement disponibles comme l'amphotéricine B et la caspofungine en augmentant la sensibilité de *C. albicans* à ces drogues (Hodgetts et al., 2008).

### III. L'immunisation active

L'immunisation active ou vaccination a pour but d'activer la réponse adaptative afin d'installer une réponse immunitaire à long terme. En opposition à la réponse immunitaire innée qui entre en jeu lors d'une primo-infection à un agent pathogène, la réponse immunitaire adaptative fait intervenir des cellules immunitaires appelées les lymphocytes B (rôle dans l'immunité humorale par la sécrétion d'anticorps) et les lymphocytes T (rôle dans l'immunité cellulaire) dits mémoires permettant une réponse rapide et très efficace lors d'un second contact avec le même agent pathogène. Une des difficultés à la mise au point d'un vaccin dirigé contre *C. albicans* est que celui-ci soit un pathogène opportuniste. En effet, près de 75 % de la population héberge *C. albicans* en tant que microorganisme commensal. L'objectif est donc d'identifier des antigènes fongiques capables d'induire une réponse immunitaire adaptative.

#### III. 1 Les vaccins synthétiques chez la souris

Plusieurs approches vaccinales développées dans des modèles murins montrent des résultats prometteurs dans la lutte contre les infections à *C. albicans*. La protéine Als3 aux propriétés multiples dans la virulence de *C. albicans* est une cible de choix pour la vaccination anti-*C. albicans*. Il a été reporté que la vaccination avec une protéine recombinante correspondant au domaine N-terminal de la protéine Als3 conférait une protection contre les infections disséminées, oropharyngées et vaginales à *C. albicans* en stimulant la réponse immunitaire Th1/Th17 de l'hôte (Lin et al., 2009b; Spellberg et al., 2006). De plus, il a été observé que la réponse induite par la vaccination avec le domaine N-terminal de la protéine Als3 protégeait également les souris contre *Staphylococcus aureus* (Lin et al., 2009a; Spellberg et al., 2008). Comme pour Als3, la vaccination par le domaine N-terminal de la protéine Als1 confère une protection contre les candidoses disséminées (Ibrahim et

al., 2006). Les protéines Sap2 et Hyr1 ont également été testées dans des modèles d'infection murin et leur effet protecteur en tant que vaccins a été prouvé (Luo et al., 2011; Sandini et al., 2011). Un vaccin composé de  $\beta$ -glucanes solubles issus de l'algue *Laminaria digita* couplés à l'anatoxine diphtérique CRM197 protège efficacement les souris contre les infections systémiques et vaginales contre *C. albicans* et d'autres agents fongiques en se fixant sur les formes hyphes et en inhibant leur croissance (Torosantucci et al., 2005). Cette protection est médiée par la production d'anticorps anti- $\beta$ -1,3 glucanes (Bromuro et al., 2010). Les différentes molécules testées pour la vaccination contre les infections à *C. albicans* sont listées dans la figure suivante (Figure 25).

Components	Reference	Protective immunity	Protection
1,3- $\beta$ -glucan	Torosantucci et al. (2008), Cassone et al. (2010), Bromuro et al. (2010)	Abs	Systemic
rHyr1p-N	Luo et al. (2011)	Abs	Systemic
Mannoproteins	De Bernardis et al. (2010) Pietrella et al. (2002)	B cells Th1	Vaginal Systemic
$\beta$ -1,2-mannotriose-Fba	Xin et al. (2012)	Abs	Systemic
Heat shock proteins 90	Raska et al. (2008)	Abs	Systemic and vaginal
<i>C. albicans</i> surface protein, Als3p	Spellberg et al. (2008)	Th1-Th17	Systemic
(Agglutinin-Like Sequence 3) rAls3-N	Bsquir et al. (2010), Liu and Filler (2011)	Abs	Vaginal, systemic, and oral
Phosphoglycerate kinase	Caloedo et al. (2012)	Abs	Oral
Secreted aspartic proteases 2	De Bernardis et al. (2012), Cassone and Casadevall (2012)	Abs	Mucosal and vaginal
Yeast derived- $\beta$ glucan particles (GPs)	Huang et al. (2010)	Th1, Th17, Abs	NT
DCs transfected with fungal RNA	Bozza et al. (2004), Perruccio et al. (2004)	T cell response Th1	Systemic
Nanoparticle-mediated target DCs	Roy and Klein (2012)	T cell response	NT
Liposome-mannan (L-mann)	Han et al. (2000)	Abs to $\beta$ -1,2-mannotriose	Systemic and vaginal
Daucosterol	Lim et al. (2007)	Th1	Systemic
Enolase	Li et al. (2011)	Abs Th1	Systemic
Glycopeptide or a peptide synthetic vaccine, ( <i>Candida albicans</i> cell wall-derived)	Xin et al. (2012)	Abs	Systemic
Fba, (peptide derived from fructose bisphosphate aldolase which has cytosolic and cell wall distributions in the fungus)	Cutler et al. (2011)	Abs	Systemic
<i>C. albicans</i> dsDNA	Remichkova et al. (2009)	T cells (Th1)	Gastrointestinal

Figure 25 : Molécules candidates pour la vaccination anti-candidose (Vecchiarelli et al., 2012)

Abs : anticorps. NT : not tested

### III. 2 Les vaccins vivants atténués chez la souris

Une souche mutante avirulente de *C. albicans*  $\Delta$ ecm33/ $\Delta$ ecm33 a été utilisée pour vacciner des souris (Martinez-Lopez et al., 2008) Les résultats de cette étude montrent que la réponse induite par ces souches vivantes atténuées permet de protéger les souris contre une infection disséminée à *C. albicans*. De plus, une analyse protéomique des anticorps produits suite à la vaccination avec la souche mutée  $\Delta$ ecm33/ $\Delta$ ecm33 a permis d'identifier 29 protéines antigéniques présentes dans le sérum de souris, ces protéines sont très variées (protéines de surface, facteur de transcription,...) (Martinez-Lopez et al., 2008). Les souches mutées de *C. albicans* déjà caractérisées comme

avirulentes dans un modèle de souris seraient donc également des souches candidates potentielles pour la vaccination :  $\Delta hwp1/\Delta hwp1$  (infections oropharyngées réduites),  $\Delta hwp2/\Delta hwp2$ ,  $\Delta iff4/\Delta iff4$  et  $\Delta rbt1/\Delta rbt1$  (infection disséminée réduire) (Braun et al., 2000; Fu et al., 2008; Hayek et al., 2010; Sundstrom et al., 2002). Puisque la morphologie de *C. albicans* est un facteur important dans la virulence de ce pathogène, Saville et ses collaborateurs ont construit une souche modifiée dont le régulateur négatif de la filamentation, *NRG1*, est sous le contrôle du promoteur tétracycline inductible à la doxycycline (Saville et al., 2008). Dans un premier temps, des souris ont été vaccinées par la souche modifiée de *C. albicans* sous forme levure, cette souche est non pathogène car elle n'est pas capable d'envahir les tissus. Puis dans un second temps, ces souris ont été infectées avec la même souche modifiée en présence de doxycycline, condition permettant la filamentation. Ces résultats montrent un fort taux de protection contre l'infection à *C. albicans*. Cependant, des expériences complémentaires utilisant des souris immunodéprimées (déficiences en lymphocytes B et T ou en neutrophiles) montrent qu'elles sont capables de survivre à une infection par la souche modifiée sous forme levure mais pas à une infection par *C. albicans* sous forme hyphes (Saville et al., 2008).

### III. 3 Les vaccins en cours d'étude chez l'homme

Deux vaccins sont actuellement à l'étude chez l'homme : rAls3-N et Sap2. Après des résultats prometteurs en modèle murin, le vaccin rAls3-N développé par NovaDigm Therapeutics est testé pour la première fois chez l'Homme en Phase I d'études cliniques (Hennessey and Yeaman, 2011). Les premiers résultats montrent que la vaccin (utilisé à une concentration de 30 mg et 300 mg) n'induit pas d'effets secondaires et est bien toléré par l'organisme. Chez les sujets vaccinés, un fort taux de production d'anticorps IgG et IgA1 et de cytokines IFN et IL-17 a été mesuré (Hennessey and Yeaman, 2011). Ces observations suggèrent que les lymphocytes B et T et les anticorps sont stimulés par le vaccin rAls3-N. Des expériences sur les cellules immunitaires et les sérums des sujets avant et après immunisation sont actuellement en cours afin d'évaluer l'activité d'opsonisation et de phagocytose en réponse à *C. albicans* (Hennessey and Yeaman, 2011). Après validation de l'efficacité de ce vaccin, il pourra être envisagé de l'utiliser pour lutter contre les infections superficielles et profondes à *C. albicans*. En 2010, une étude clinique en Phase I basée sur une forme recombinante et tronquée de Sap2 a débuté en Europe (Edwards, 2012). Ce vaccin développé par Pevion Biotech a pour cible la lutte spécifique contre les infections vaginales à *C. albicans*. Les premiers résultats montrent que le vaccin délivré par voie intramusculaire ou intravaginale est bien toléré, à faible dose, par l'organisme humain. La description complète des analyses de cette étude clinique n'est pas disponible au domaine public (Edwards, 2012).





# ***RESULTATS***



# **PROJET 1**

## **Etude des protéines à ancre GPI à travers leurs domaines fonctionnels**

## A/ Objectif de ce projet

Rappelons ici deux informations majeures :

- *C. albicans* est le premier pathogène d'origine fongique chez l'Homme ;
- et plus des deux tiers des protéines à ancre GPI de *C. albicans*, protéines majoritaires de la paroi, n'ont pas de fonctions connues à ce jour.

La thématique générale de notre équipe de recherche est l'étude du rôle des protéines à ancre GPI en relation avec la virulence de *C. albicans*. Pour ce projet, nous avons ciblé notre étude sur les protéines à ancre GPI accessibles à la surface de *C. albicans*. Notre hypothèse de travail est que ces protéines seraient impliquées dans la virulence en interagissant directement avec l'hôte.

Le premier axe de recherche développé au sein de l'équipe, pour l'étude des protéines à ancre GPI de *C. albicans*, a été basé sur une approche génétique. Celle-ci consistait à construire une banque de mutants délétés des gènes codant les protéines à ancre GPI et d'en étudier leurs phénotypes (Thèse A. Plaine, 2006) (Plaine et al., 2008). Une des difficultés rencontrées a été l'absence de phénotype de certains mutants probablement due à la redondance de fonction entre certaines protéines à ancre GPI. Par cette approche, il était donc difficile d'attribuer une fonction à une protéine lorsque celle-ci n'est pas capitale pour *C. albicans*. En parallèle, une étude approfondie de la famille Iff a permis de récolter des données quant à leur expression en culture simple et en coculture avec des macrophages ou des cellules HeLa (Thèse A. Cornu, 2010). Ces données indiquent que le taux d'expression de ces protéines est faible (inférieur à 5 % du taux de l'actine). Ces résultats suggèrent que la faible expression des protéines à ancre GPI à laquelle s'ajouteraient les problèmes liés à leur redondance rendrait l'étude par l'approche génétique compliquée.

Un second axe de recherche basé sur une approche biochimique et protéique a été développé afin de contourner ces difficultés, cette approche constitue la première partie de mon travail de thèse. Cependant, la présence de nombreux sites de O-glycosylation chez les protéines à ancre GPI représente une difficulté d'ordre technique. De ce fait, pour s'affranchir des limitations précédemment citées (redondance, faible taux d'expression et O-glycosylation), l'alternative choisie a été de surproduire et de sécréter dans *C. albicans* une version raccourcie des protéines à ancre GPI en se limitant au domaine fonctionnel putatif. Notre étude cible uniquement les protéines à ancre GPI de *C. albicans*, localisées à la membrane ou à la paroi, potentiellement exposées à la surface grâce à un domaine central riche en sérine et thréonine O-glycosylées. En effet, l'une des hypothèses émises est que le domaine riche en sérine et thréonine O-glycosylées aurait pour rôle de « projeter »

le domaine fonctionnel de la protéine à la surface de la levure (Frieman et al., 2002; Li and Palecek, 2008). Cela permettrait ainsi au domaine fonctionnel d'être en contact avec les cellules de l'hôte. Cette hypothèse a été émise suite à la localisation en surface de protéines, liées à la paroi, présentant ce type de profil. Des études d'immunofluorescence réalisées au laboratoire par Anita Boisramé sur la protéine Iff2, membre de la famille Iff, valident cette hypothèse (Boisrame et al., 2011). De plus, lorsque que la protéine Iff8 est rallongée par l'addition de la région riche en sérine et thréonine de la protéine Iff2 celle-ci devient accessible à la surface de la levure alors qu'elle ne l'était pas auparavant (Boisrame et al., 2011).

L'objectif de ce projet a donc été de produire en quantité suffisante une vingtaine de protéines à ancre GPI facilement purifiables en se limitant uniquement aux domaines fonctionnels putatifs et de les sécréter dans une souche de *C. albicans* en utilisant un vecteur de surexpression pExpV5 dans le but de déterminer leurs propriétés vis-à-vis (i) du maintien de l'intégrité de la paroi, (ii) de l'adhésion aux cellules de l'hôte et de l'activation de voies de signalisations spécifiques, (iii) de l'immunomodulation et (iv) du caractère immunogène et de leur pouvoir protecteur dans la réponse immunitaire.

## B/ Le choix des protéines à ancre GPI candidates

Parmi la centaine de protéines à ancre GPI prédites chez *C. albicans*, une vingtaine d'entre elles ont été sélectionnées pour faire partie de la banque de surexpression et de sécrétion de ce projet. Ces protéines répondent à deux critères principaux à savoir une fonction encore inconnue dans la littérature et un profil de protéine à ancre GPI exposée à la surface de *C. albicans* capable d'interagir avec l'hôte. Les protéines sélectionnées dans notre étude présentent donc les caractéristiques suivantes (Figure 26) :

- un peptide signal en position N-terminal : il s'agit du signal d'adressage au réticulum endoplasmique ;
- un domaine fonctionnel putatif ne présentant pas de sites de O-glycosylation : il est en général situé du côté N-terminal, et il peut présenter ou non des sites de N-glycosylation ;
- un domaine riche en sérine et thréonine O-glycosylées distinct du domaine fonctionnel : il est en général situé du coté C-terminal, et il peut présenter ou non des sites de N-glycosylation ;
- un peptide signal d'ancrage GPI en position C-terminal : il permet la fixation de la protéine sur l'ancre GPI au niveau de l'acide aminé  $\omega$ .

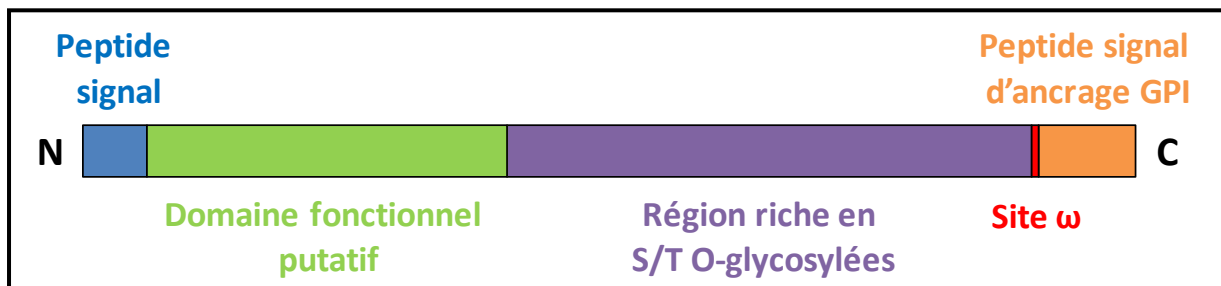


Figure 26 : Schéma d'une protéine à ancre GPI exposée à la surface

Ce travail de sélection a été réalisé à partir d'une liste de départ de 115 protéines à ancre GPI putatives (Richard and Plaine, 2007). Une étude plus récente révèle que le nombre de protéines à ancre GPI prédites chez *C. albicans* est revu à la baisse, il est estimé à 108 au lieu de 115 (Munro, 2012).

## I. Premier critère de sélection : les protéines à ancre GPI déjà caractérisées

Notre premier critère de sélection fut d'éliminer de la liste de départ des 115 protéines à ancre GPI les protéines dont la fonction a été partiellement ou entièrement caractérisée. Ces protéines présentent, pour la plupart, une activité enzymatique et sont impliquées dans la formation ou le maintien de l'intégrité de la paroi :

- **Crh11, Crh12** : activité transglycosylase, protéine impliquée dans l'architecture de la paroi (de Groot et al., 2004; Pardini et al., 2006) ;
- **Csa1** : antigène de surface présent sur les hyphes et les bourgeons (Lamarre et al., 2000) ;
- **Cht1, Cht2** : activité chitinase (McCreath et al., 1995) ;
- **Dfg5** : activité endo-1,6-alpha mannosidase (Spreghini et al., 2003) ;
- **Exg2** : activité exo-1,3-beta-glucosidase (Cabazon et al., 2009) ;
- **Kre1** : protéine impliquée dans la biosynthèse des  $\beta$ 1,6-glucanes (Boone et al., 1991) ;
- **Mid1** : protéine impliquée dans le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  (Brand et al., 2007) ;
- **Phr1, Phr2** : protéines impliquées dans la synthèse de la paroi, activité 1,3-beta-glucanosyltransferase (Fonzi, 1999) ;
- **Pir1** : protéine impliqué dans le maintien de l'intégrité de la paroi (Martinez et al., 2004) ;
- **Plb3, Plb4.5, Plb5** : activité phospholipase (Cabazon et al., 2009; Theiss et al., 2006) ;
- **Sap9, Sap10** : activité aspartyl proteinase (Schild et al., 2011) ;
- **Spr1** : protéine précurseur d'une exo-1,3-beta-glucanase (Nobile et al., 2003) ;
- **Ssr1** : protéine requise pour le maintien de l'intégrité de la paroi (Garcera et al., 2005).

Par ailleurs, les familles **Als** (8 membres GPI) et **Iff** (11 membres GPI) ont fait l'objet d'études antérieures, nous avons décidé de n'inclure qu'un seul membre de chacune de ces deux familles à notre banque de surexpression et de sécrétion. Les membres de la famille Als (Agglutinin like sequences) sont principalement impliqués dans l'adhésion aux cellules hôtes, la protéine Als3 sera alors intégrée à notre étude en tant que témoin pour les expériences d'adhésion (III. 6 p36, III. 2 p69). La famille Iff est une famille largement étudiée au sein de notre équipe. Nous avons donc choisi d'intégrer à notre banque le membre Iff2 dont l'exposition en surface a été démontrée (Boisrame et al., 2011). Les protéines **Eap1** (=Pga47), **Hwp1** et **Hwp2** (=Pga8) dont le rôle dans l'adhésion et la formation de biofilm a été démontré dans de récentes études n'ont pas été retenues dans notre étude (III. 6 p36 et V. 1 p42).

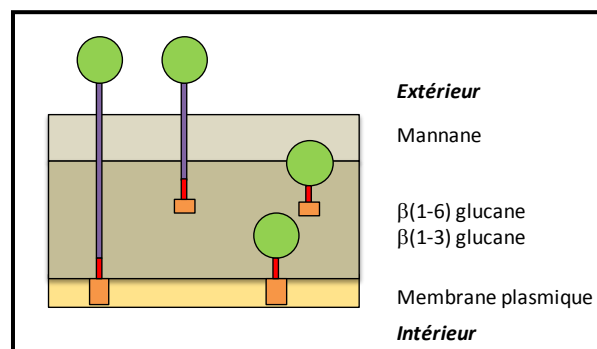


## II. Analyse bioinformatique des protéines à ancre GPI non caractérisées

Dans un second temps, j'ai entrepris de caractériser toutes les protéines à ancre GPI qui n'avaient pas de fonctions connues, soit 76 protéines, à partir des outils informatiques disponibles et des séquences protéiques disponibles sur le site <http://www.candidagenome.org/>. Pour ces 76 protéines, plusieurs caractéristiques prédites par des algorithmes informatiques ont été recensées afin d'affiner notre sélection :

- la séquence et la taille de la protéine  
<http://www.candidagenome.org/> ;
- la présence d'un peptide signal et la position de clivage  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> ;
- la présence du peptide signal d'ancrage GPI et la position du site  $\omega$   
[http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) et <http://gpi.unibe.ch/> ;
- l'absence de domaine transmembranaire  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> ;
- la position des sites de O-glycosylation  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> ;
- la position de sites de N-glycosylation  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.

Afin de répondre aux critères d'exposition à la surface de *C. albicans*, nous avons sélectionné les protéines possédant une région riche en sérine et thréonine O-glycosylable permettant de présenter à la surface un domaine N-terminal non O-glycosylé (Figure 27). Ces protéines peuvent être localisées à la membrane ou à la paroi.



**Figure 27 : Schéma représentant les différentes structures des protéines à ancre GPI**  
 En vert : domaine fonctionnel putatif. En violet : domaine riche en S/T O-glycosylées. En rouge : site  $\omega$ .  
 En orange : ancre GPI.

## II. 1 Défaut d'annotation dans la séquence protéique de PGA31

La séquence protéique de PGA31 mise à disposition sur le site <http://www.candidagenome.org/> présente un défaut d'annotation. En effet, cette protéine d'une longueur de 352 acides aminés ne présente pas de peptide signal (Figure 28). Après une analyse plus fine, nous avons observé que cette séquence protéique contenait deux méthionines : la première en position M1 et la seconde en position M60. Après délétion des 59 premiers acides aminés, la nouvelle séquence protéique de Pga31 ne contient plus que 293 résidus et présente un peptide signal (Figure 29). Le site de clivage du peptide signal est situé entre les acides aminés 18 et 19 de la nouvelle séquence protéique.

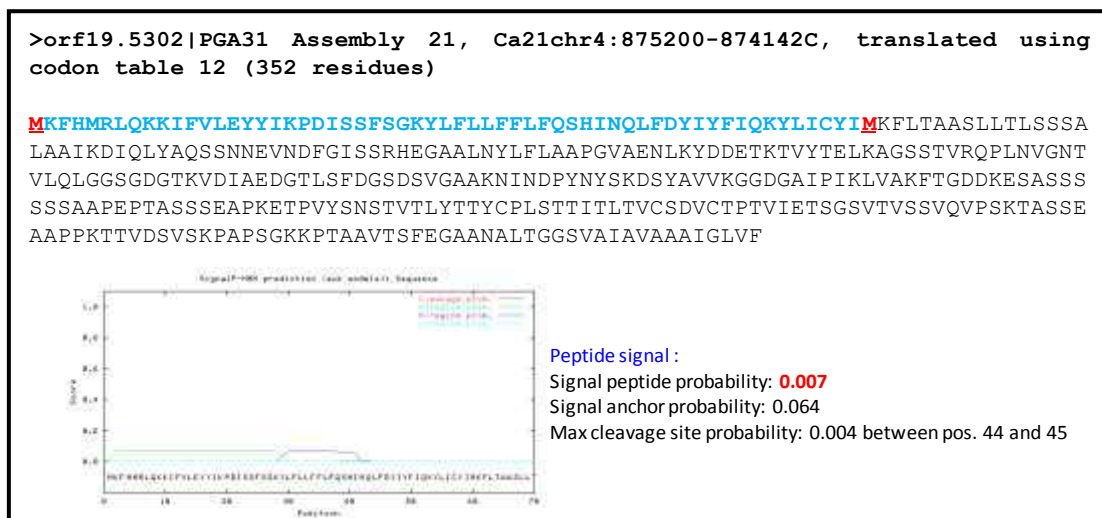


Figure 28 : Séquence protéique de Pga31 extraite du site <http://www.candidagenome.org/> et prédiction du peptide signal

En rouge : méthionine. En bleu : séquence entre les deux méthionines

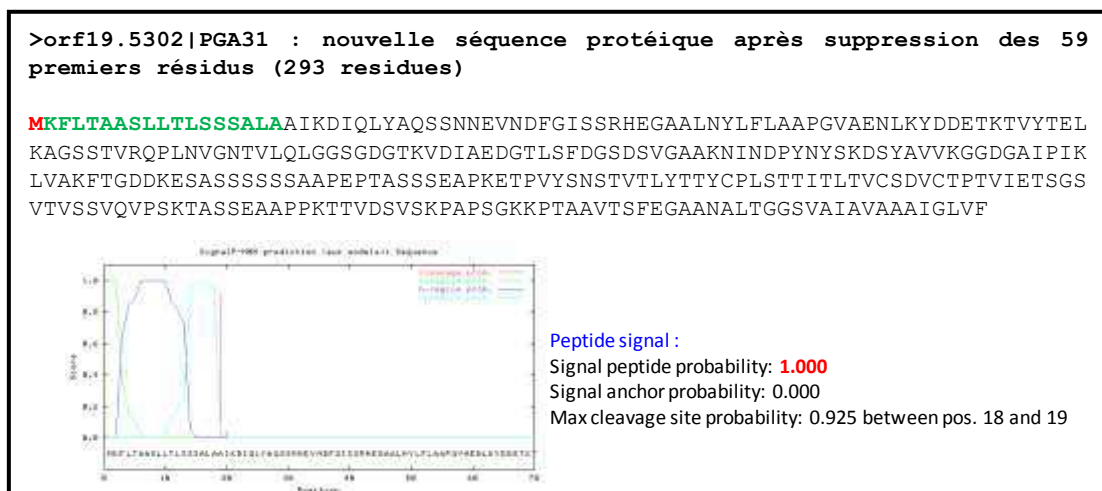


Figure 29 : Nouvelle séquence protéique de Pga31 après délétion des 59 premiers acides aminés et prédiction du peptide signal (en vert)

## II. 2 Deuxième critère de sélection : les protéines à ancre GPI mal prédites

L'analyse bioinformatique a révélé que 9 protéines (parmi les 76) ont été mal prédites : Pga1, Pga12, Pga35, Pga54, Pga63, Orf19.7606, Orf19.5267, Orf19.4014 et Orf19.6329. En effet, ces protéines ne sont pas des protéines à ancre GPI.

D'après l'algorithme de prédiction utilisé (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), la protéine Pga1 serait une protéine transmembranaire (Figure 30). Elle posséderait 3 domaines transmembranaires en position N-terminale, centrale et C-terminale. De plus, la protéine Pga1 présenterait un domaine externe compris entre les domaines transmembranaires N-terminal et central et un domaine interne localisé entre les domaines transmembranaires central et C-terminal.

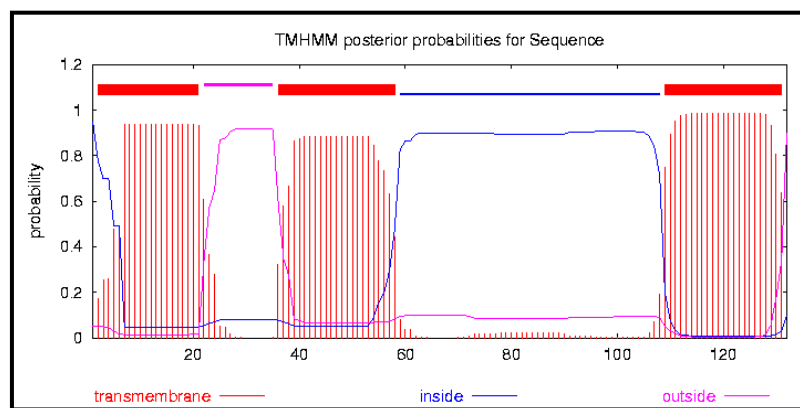


Figure 30 : Schéma de prédiction de domaines transmembranaires de la protéine Pga1

La protéine Pga63 ne présente pas de séquence peptide signal : la prédiction obtenue par l'algorithme du site <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> donne un score de prédiction de 0,390 (Figure 31). La protéine Pga63 ne serait pas adressée au reticulum endoplasmique et ne pourrait donc pas être localisée à la paroi.

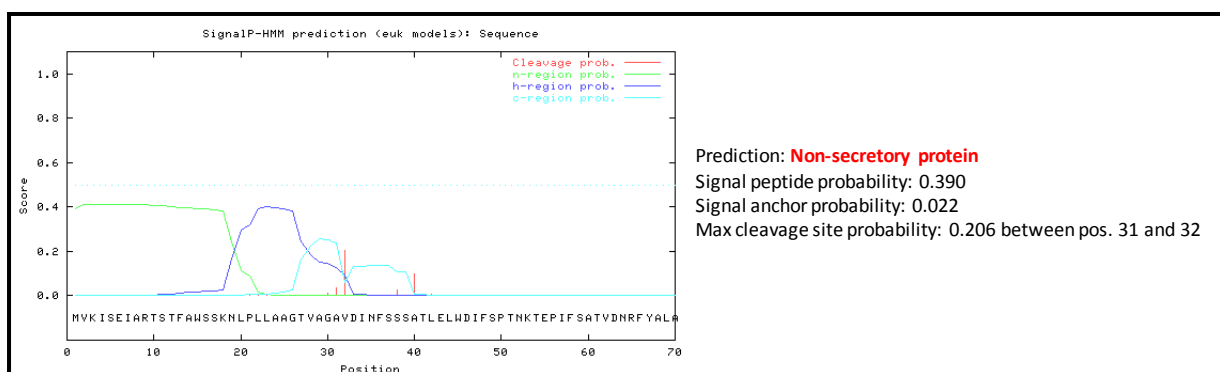


Figure 31 : Schéma de prédiction du peptide signal de la protéine Pga63

La prédiction de la séquence signal d’ancrage GPI s’est révélée négative pour les 7 autres protéines (Pga12, Pga35, Pga54, Orf19.7606, Orf19.5267, Orf19.4014 et Orf19.6329). L’algorithme [http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) a été utilisé pour la prédiction de la séquence signal d’ancrage GPI des 76 protéines à ancre GPI putatives puis les prédictions négatives ont ensuite été confirmées avec l’algorithme <http://gpi.unibe.ch/>. A titre d’illustration, les résultats de prédictions montrent qu’aucun site d’ancrage GPI n’est prédit pour la protéine Pga54 avec l’algorithme [http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) (Figure 32). Il en est de même pour la protéine Orf19.6329 avec l’algorithme <http://gpi.unibe.ch/> (Figure 33). Après élimination des protéines à ancre GPI mal prédites, il reste 67 protéines à ancre GPI dans notre liste de choix.

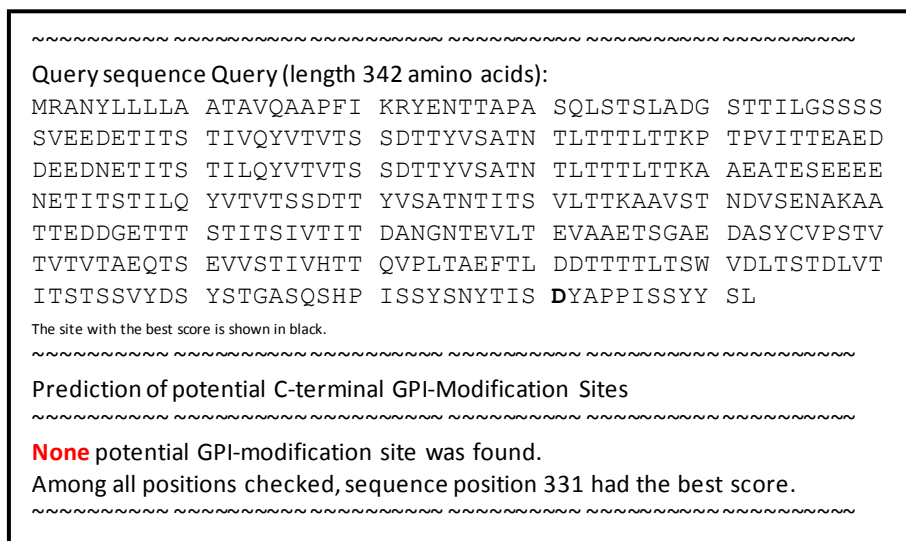


Figure 32 : Prédiction du site d’ancrage GPI de la protéine Pga54 ([http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html))

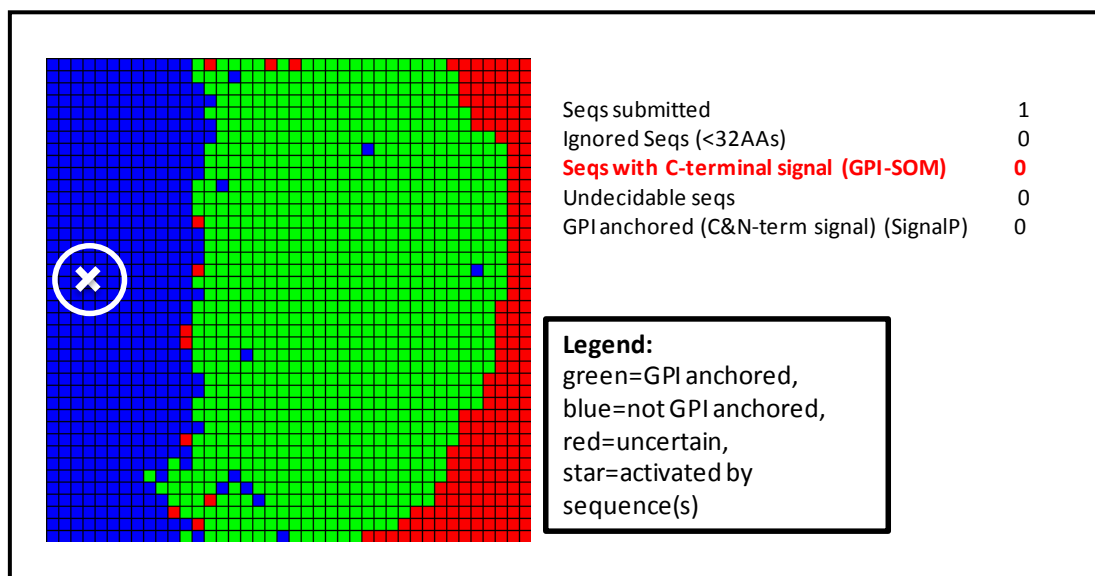


Figure 33 : Prédiction du site d’ancrage GPI de la protéine Orf19.6329 (<http://gpi.unibe.ch/>)

### II. 3 Troisième critère de sélection : les protéines à ancre GPI avec peu ou pas de sites de O-glycosylation

Les protéines à ancre GPI avec peu ou pas de sites de O-glycosylation n'ont pas été retenues dans notre étude car l'absence de domaine riche en sérine et thréonine suggère que les protéines pourraient se replier de façon plus compacte et donc seraient moins susceptibles d'être exposées à la surface de *C. albicans*. 16 protéines ont été éliminées de la liste grâce à ce critère de sélection. Au sein de ces protéines, on retrouve deux catégories différentes :

- les protéines (au nombre de 9) dont le nombre de sérine ou de thréonine est faible (Figure 34) : Pga11, Pga14, Pga16, Pga19, Pga43, Pga48, Pga56, Orf19.6390 et Orf19.7130
- les protéines (au nombre de 10) qui contiennent un grand nombre de sérine et de thréonine mais dont la probabilité de O-glycosylation n'atteint pas le seuil de prédiction positive (Figure 35) : Pga5, Pga9, Pga17, Pga27, Pga29, Pga45, Pga46, Pga49, Pga51 et Pga52

Il reste 48 protéines à ancre GPI de fonction inconnue présentant de nombreux sites de O-glycosylation.

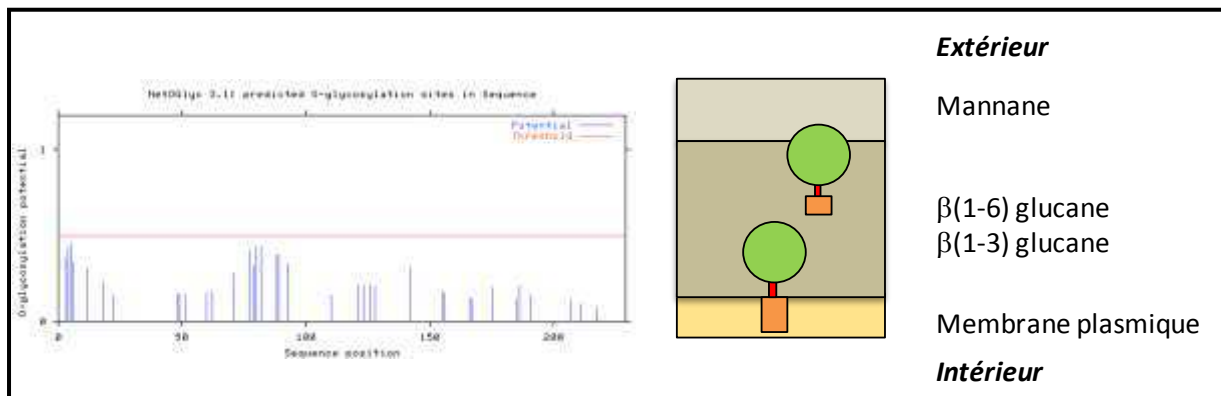


Figure 34 : Schéma de prédiction des sites de O-glycosylation et représentation schématique de la protéine Pga19

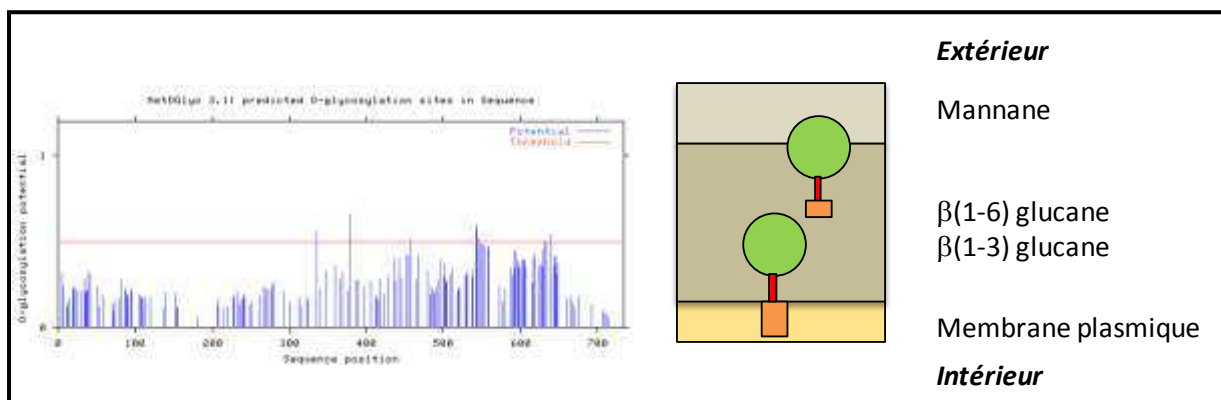


Figure 35 : Schéma de prédiction des sites de O-glycosylation et représentation schématique de la protéine Pga49

## II. 4 Quatrième critère de sélection : les protéines à ancre GPI sans domaine fonctionnel distinct

Certaines protéines présentent des sites de O-glycosylation répartis tout au long de la séquence ne permettant pas de délimiter une région distincte riche en sérine et thréonine O-glycosylées. Bien que présentant un grand nombre de sérine et thréonine O-glycosylées, nous n'avons pas retenu les protéines de cette catégorie car nous n'avons pas pu distinguer de domaine fonctionnel putatif. 16 protéines présentent ce profil de O-glycosylation : Pga6, Pga13, Pga20, Pga22, Pga23, Pga25, Pga32, Pga33, Pga34, Pga38, Pga40, Pga58, Pga59, Pga62, Orf19.206 et Orf19.7104 (Figure 36).

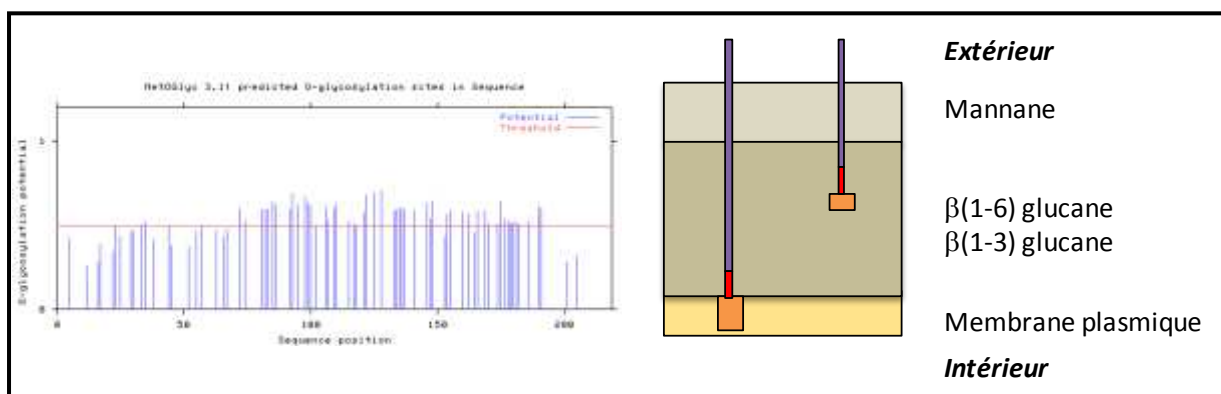


Figure 36 : Schéma de prédiction des sites de O-glycosylation et représentation schématique de la protéine Pga6

## II. 5 Cinquième critère de sélection : les protéines à ancre GPI avec un domaine fonctionnel trop court

Parmi les 32 protéines restantes, 8 d'entre elles possèdent un domaine fonctionnel putatif que nous avons considéré trop court (une longueur inférieure à 100 acides aminés) : Pga10, Pga18, Pga26, Pga39, Pga53, Orf19.4652, Orf19.4653 et Orf19.4654 (Figure 37). La longueur de ces domaines fonctionnels putatifs n'est pas suffisante pour la stratégie de purification utilisée dans notre étude.

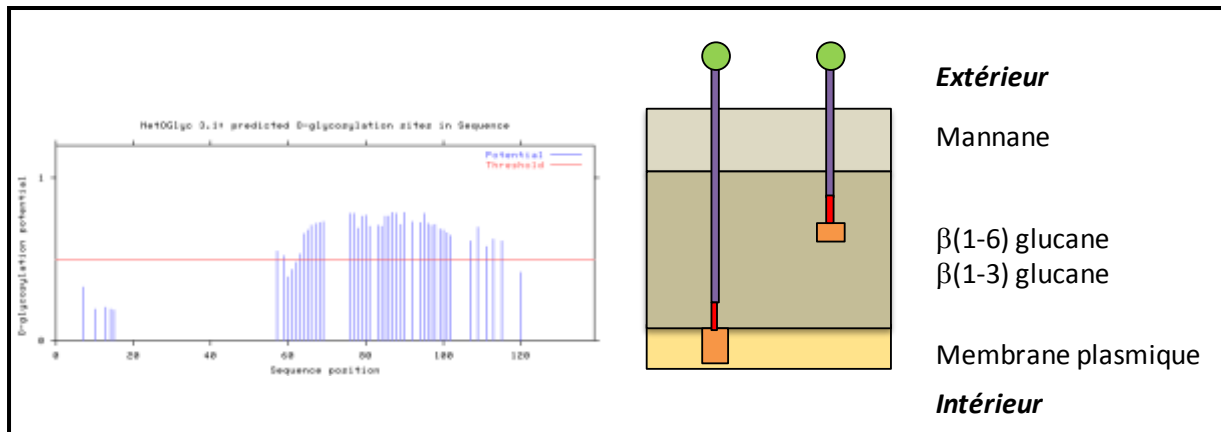


Figure 37 : Schéma de prédiction des sites de O-glycosylation et représentation schématique de la protéine Pga53

## II. 6 Sixième critère de sélection : le regroupement en famille des protéines à ancre GPI présentant un domaine fonctionnel putatif distant du domaine riche en S/T O-glycosylées

Après les cinq premières étapes de sélection, nous avons retenu 24 protéines qui répondent aux critères que nous avons déterminés d'une protéine à ancre GPI présentant un domaine N-terminal potentiellement exposé à la surface capable d'interagir avec l'hôte. En effet, ces protéines présentent à la fois une région riche en sérine et thréonine O-glycosylées et un domaine N-terminal d'au moins une centaine d'acides aminés : Pga2, Pga3, Pga4, Pga7, Pga15, Pga21, Pga24, Pga28, Pga30, Pga31, Pga36, Pga37, Pga41, Pga42, Pga44, Pga50, Pga55, Pga57, Pga60, Pga61, Orf19.206, Ecm33, Ecm33.1, Rbt1 et Rbt5 (Figure 38).

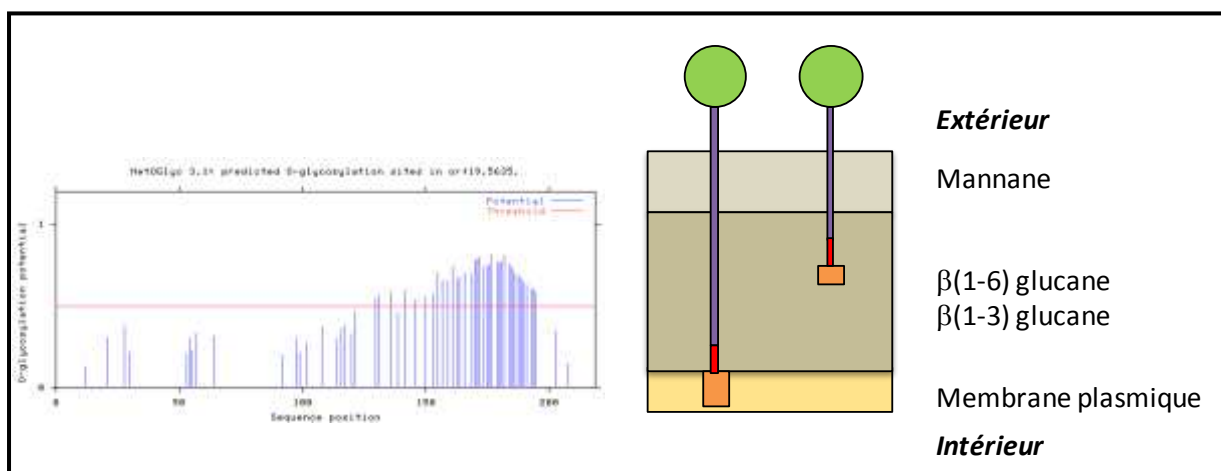


Figure 38 : Schéma de prédiction des sites de O-glycosylation et représentation schématique de la protéine Pga7

Les séquences protéiques de ces 24 protéines à ancre GPI ont été alignées sur le génome de *C. albicans* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ces alignements nous ont permis de classer ces protéines en familles suivant les similarités de séquences trouvées au niveau de leur domaine fonctionnel putatif (Figure 39). 18 protéines ont été regroupées en 9 familles. Au sein de ces familles, on retrouve parfois des protéines qui avaient été éliminées au cours de notre sélection. Par exemple, Pga29 éliminée à cause de son faible nombre de sites de O-glycosylation est homologue à Pga30 et Pga31. Nous avons inclus à notre banque un seul membre pour chaque famille : Pga2, Pga4, Pga7, Pga15, Pga31, Pga37, Pga50, Orf19.4955 et Iff2. Précisons également que ce classement par famille nous a permis d'identifier une nouvelle protéine à ancre GPI : il s'agit de Orf19.4955. Cette protéine, qui ne faisait pas partie de la liste des 115 protéines, est homologue à Ecm33 et Ecm33.1 et répond aux critères d'une protéine à ancre GPI d'après les résultats des différents algorithmes de prédiction utilisés (Annexe 1, p195).

Nom de la famille	SOD	GAS	CFEM					ECM33	IFF
<b>Protéines retenues</b>	<b>Pga2</b>	<b>Pga4</b>	<b>Pga7</b>	<b>Pga15</b>	<b>Pga31</b>	<b>Pga37</b>	<b>Pga50</b>	<b>Orf19.4955</b>	<b>Iff2</b>
Protéines répondant aux critères mais non retenues	Pga3			Pga41 Pga42	Pga30	Pga57	Pga36 Pga61	Ecm33 Ecm33.1	
Protéines de la famille ne répondant pas aux critères		Pga5	Csa1 Pga10 Rbt5		Pga29				Iff3 à Iff9 Hyr1

Figure 39 : Les protéines à ancre GPI regroupées en famille

Les 7 protéines restantes : Pga21, Pga24, Pga28, Pga44, Pga55, Pga60 et Rbt1 ne sont pas regroupées en famille (Figure 40). Ces protéines ont été sélectionnées pour notre projet. Ainsi, notre banque de surexpression et de sécrétion sera composée de 16 protéines à ancre GPI aux fonctions inconnues potentiellement exposées à la surface.

<b>Protéines isolées retenues</b>	<b>Pga21</b>	<b>Pga24</b>	<b>Pga28</b>	<b>Pga44</b>	<b>Pga55</b>	<b>Pga60</b>	<b>Rbt1</b>
-----------------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	-------------

Figure 40 : Les protéines à ancre GPI ne présentant pas de similarités de séquences avec des protéines du génome de *C. albicans*



### III. Les protéines à ancre GPI retenues

#### III. 1 Les protéines à ancre GPI inconnues

Suite aux critères de sélection décrits précédemment, les 16 protéines à ancre GPI retenues sont : **Pga2, Pga4, Pga7, Pga15, Pga21, Pga24, Pga28, Pga31, Pga37, Pga44, Pga50, Pga55, Pga60, Iff2, Orf19.4955 et Rbt1**. Pour ces protéines, les données des études antérieures disponibles sur le site <http://www.candidagenome.org/> ont été ajoutées au tableau récapitulatif de l'analyse bioinformatique (Annexe 1, p195).

Parmi ces protéines, trois d'entre elles présentent une particularité concernant la position de leur domaine fonctionnel putatif :

- le domaine fonctionnel putatif de la protéine Pga37 et de la protéine Pga55 est situé du côté C-terminal tandis que la région riche en sites de O-glycosylation est située du côté N-terminal (Figure 41). Bien que ce profil protéique ne corresponde pas totalement aux critères de sélection que nous nous étions fixés, ces deux protéines qui présentent toutefois un domaine fonctionnel putatif bien distinct de la région riche en sérine et thréonine O-glycosylée ont été intégrées à notre étude ;

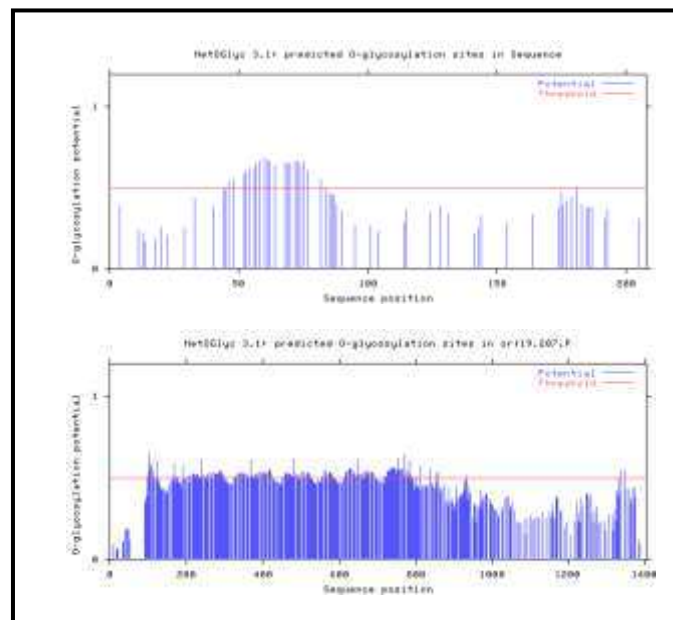


Figure 41 : Schéma de prédiction des sites de O-glycosylation de la protéine Pga37 (en haut) et de la protéine Pga55 (en bas)

- la protéine Pga60 semble être constituée non pas d'un mais de deux domaines fonctionnels putatifs (en position N-terminal et en position centrale), ces deux domaines ont été intégrés à notre étude (Figure 42). Par la suite, le domaine fonctionnel putatif N-terminal sera nommé 1Pga60 et celui en position 2Pga60.

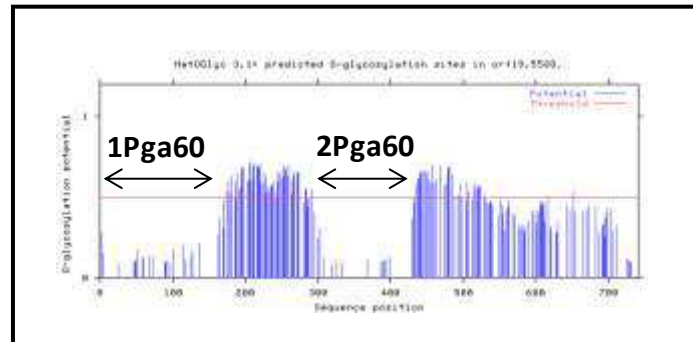


Figure 42 : Schéma de prédiction des sites de O-glycosylation de la protéine Pga60

### III. 2 Les protéines témoins

Nous avons choisi d'inclure plusieurs protéines connues dans notre banque de peptides en tant que témoins pour les expériences utilisées au cours de notre criblage de phénotype. Comme pour les protéines à ancre GPI sélectionnées, seul le domaine fonctionnel putatif des protéines témoins sera exprimé et sécrété. Quatre protéines à ancre GPI (protéines soulignées) et une protéine non ancrée GPI (protéine non soulignée) ont été choisies :

- **Als3** et **Hwp1** : ces protéines à ancre GPI décrites pour être des adhésines sont des témoins positifs dans les tests d'adhésion suivant les types de surfaces utilisés (III. 6 p36) (Liu and Filler, 2011; Staab et al., 2004) ;
- **Cht2** et **Plb5** : ces deux protéines ont une activité enzymatique connue, respectivement chitinase et phospholipase. Le dosage d'activité enzymatique de leurs domaines fonctionnels putatifs validera la stratégie utilisée pour la banque de surexpression et de sécrétion (McCreath et al., 1995; Theiss et al., 2006) ;
- **Pra1** : cette protéine connue pour être retenue dans la paroi est surexprimée lorsque *C. albicans* interagit avec les macrophages ce qui lui permettrait d'échapper à la phagocytose. Pra1 est notre référence pour les tests de résistance en coculture avec les macrophages (Marcil et al., 2008).

## **C/ La construction de la banque de surexpression et de sécrétion des domaines fonctionnels putatifs issus des protéines à ancre GPI**

### **I. Stratégie de clonage et d'obtention de la banque de surexpression et de sécrétion**

Les domaines fonctionnels putatifs des protéines à ancre GPI sélectionnées (voir paragraphe précédent B/III p68) ont été exprimés *via* le vecteur de surexpression pExpV5 dans la souche sauvage de *C. albicans CA14 Ura<sup>-</sup>*. Le choix de *C. albicans* pour l'expression de ces peptides a reposé sur deux critères : la particularité du code génétique de *Candida* (le codon CTG est associé à une sérine et non pas à une leucine) et les modifications post-traductionnelles spécifiques des organismes eucaryotes telles que la O-glycosylation et la N-glycosylation (excluant ainsi l'utilisation des systèmes bactériens).

Les différentes étapes suivies pour l'obtention des souches de surexpression et de sécrétion sont schématisées dans la partie Matériels et Méthodes (p151). En quelques mots, les séquences codant les domaines fonctionnels putatifs ont été amplifiées en utilisant deux amorces spécifiques : l'amorce F située en aval du peptide signal qui contient un site *AvrII* et l'amorce R située en amont du premier acide aminé O-glycosylé qui contient un site *SphI*. Les fragments de PCR ont été sous-clonés dans le vecteur pGEMT Easy. Puis, les plasmides obtenus ont été digérés par les enzymes *AvrII* et *SphI* et les fragments d'ADN ont été clonés dans le vecteur d'expression pExpV5. Ces deux premiers clonages ont été réalisés dans la souche *E. coli DH5 $\alpha$* . Enfin, les plasmides pExpV5 ont été linéarisés par *StuI* permettant ainsi l'intégration au locus *RP10* chez *C. albicans CA14*.

Nous avons obtenu toutes les souches de *C. albicans* surproductrices pour chacun des domaines fonctionnels putatifs sélectionnés dans notre liste. Ces constructions ont été vérifiées par séquençage par la société GATC Biotech au stade pGEMT ou pExpV5. La liste des souches obtenues dans cette étude est indiquée dans le Tableau 1 (p147).

Le plasmide pExpV5 permet à la fois la surexpression, la sécrétion et l'excrétion des domaines fonctionnels putatifs (Figure 43) (Boisrame et al., 2011). Il est constitué :

- d'un promoteur fort constitutif (promoteur de l'actine) pour la surexpression des protéines ;
- d'un peptide signal d'une protéine à ancre GPI, Pga59, pour l'adressage au réticulum endoplasmique ;
- d'un épitope V5 pour l'identification et la purification des protéines ;
- d'un multisite de clonage pour l'insertion du domaine fonctionnel putatif des protéines à ancre GPI ;
- d'un terminateur de transcription (celui de Pga59) ;
- de la séquence *RP10* qui permet, après digestion par *StuI* et linéarisation du vecteur, l'insertion au locus *RP10* de *C. albicans* ;
- du gène *URA3* pour la sélection des clones.

La position du multisite de clonage, situé entre le peptide signal de Pga59 fusionné à l'étiquette V5 et le terminateur de Pga59, permet de cloner en une seule étape n'importe quelle séquence codante et d'obtenir ainsi des protéines sécrétées et étiquetées V5 du côté N-terminal.

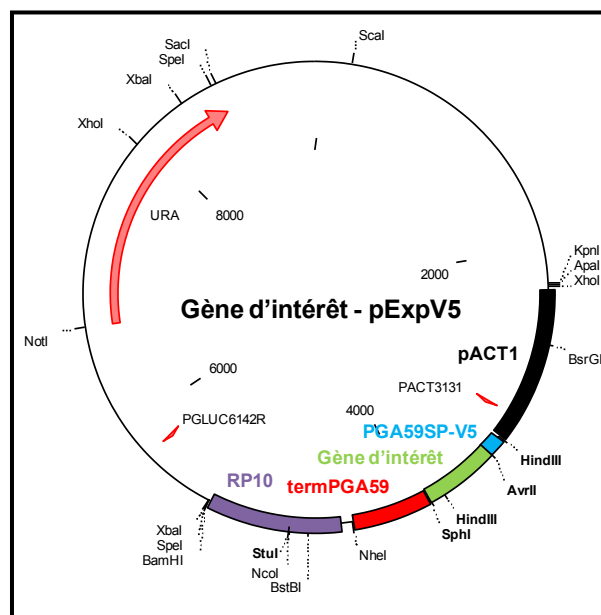


Figure 43 : Carte du plasmide pExpV5

## II. Immunodétection des polypeptides étiquetés V5 produits par les souches de surexpression dans le milieu de culture

### II. 1 Vérification de la production et de la sécrétion

Bien que les clones de surexpression aient été vérifiés par séquençage, il a fallu dans un second temps vérifier que chaque souche exprimait et sécrétait le domaine fonctionnel putatif étiqueté V5 dans le milieu de culture. Pour cela, les protéines présentes dans les surnageants de culture de 24h concentrés 10 fois ont été détectées par une méthode d'immunoempreinte. Pour chaque construction, les surnageants de 6 à 12 clones de *C. albicans* ont été déposés sur membrane de nitrocellulose.

Différents profils de résultats ont été observés selon les constructions obtenues (Figure 44) :

- détection nulle pour les clones surexprimant : **Pga2, Pga15, Pga21, Pga28 et Pga55** ;
- faible détection pour les clones surexprimant : **Pga50, Hwp1, Plb5 et Rbt1** ;
- détection hétérogène d'un clone à l'autre en ce qui concerne les clones surexprimant : **Pga7 et Pga24** ;
- détection de forte intensité pour les clones qui surexpriment : **Pga4, Pga31, Pga37, Pga44, 1Pga60, 2Pga60, Iff2, Orf19.4955, Als3, Cht2 et Pra1**.

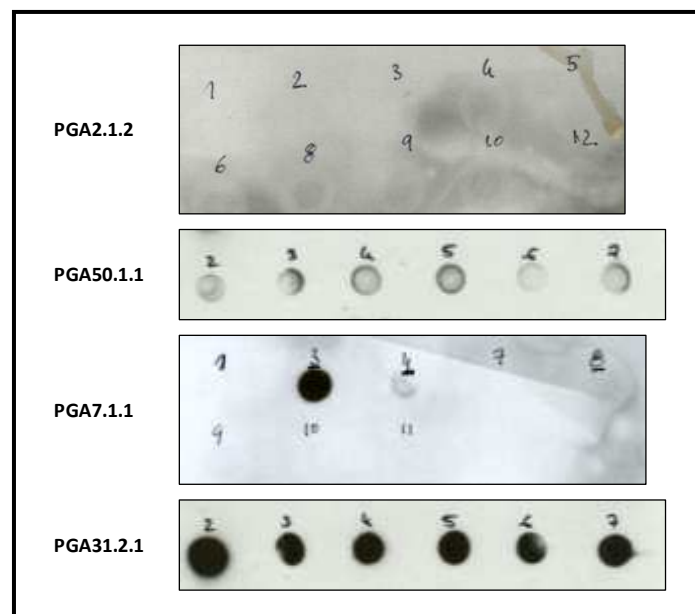
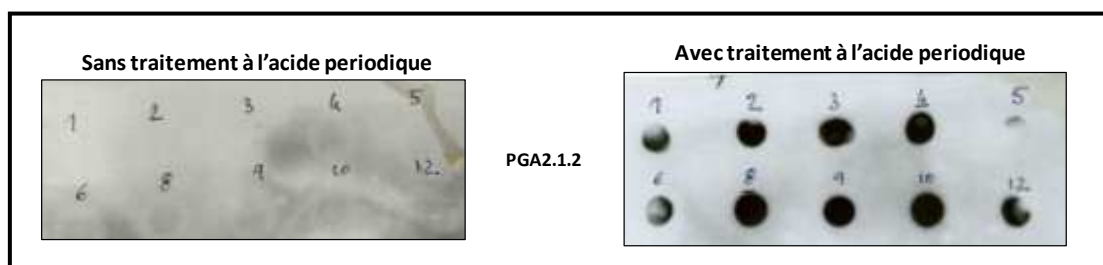


Figure 44 : Immunodétection des protéines avec un anticorps anti-V5 par dot blot

Parmi les clones producteurs obtenus, les deux clones pour lesquels la détection des protéines (et donc la production) était la plus forte ont été inclus dans la banque de mutants de surexpression. Lorsque les protéines n'ont pas été détectées ou ont été faiblement détectées dans le surnageant de culture, deux hypothèses ont été émises : soit la souche ne produit et/ou ne secrète pas la protéine en question, soit la protéine est bien présente mais l'épitope V5 est masqué (par un sucre) et est non accessible à l'anticorps primaire. Pour valider l'une des deux hypothèses, les membranes ont été traitées à l'acide periodique après dépôt des surnageants. En effet, le masquage de l'épitope V5 est très probablement dû à la N-glycosylation (et/ou à la O-glycosylation) des protéines. L'action de l'acide periodique, qui est un agent oxydant rompant les liaisons carbonées du squelette des sucres, rendrait alors l'épitope V5 accessible.

Le traitement à l'acide periodique a permis de détecter les protéines **Pga2, Pga15, Pga21, Pga28 et Pga55** qui n'avaient pas du tout été détectées dans un premier temps (Figure 45). Toutefois, ce traitement n'a pas permis de meilleure révélation pour les protéines **Pga50, Hwp1, Plb5 et Rbt1**. Deux raisons peuvent expliquer ce résultat : (i) soit les polypeptides sont présents dans le surnageant de culture mais nous n'arrivons pas à les détecter ; (ii) soit les peptides ne sont pas présents dans les surnageants. Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant la deuxième raison : (i) soit la surexpression de ces protéines est toxique pour *C. albicans* ; (ii) soit les protéines sont mal sécrétées, et sont restées bloquées au niveau de la paroi ; (iii) soit les protéines sont instables et sont rapidement dégradées dans le milieu de culture. Après avoir vérifié que la croissance de ces souches n'était pas affectée et que protéines n'étaient pas retenues dans la paroi, les deux hypothèses privilégiées sont que ces quatre domaines fonctionnels putatifs synthétisés (Pga50, Hwp1, Plb5 et Rbt1) ne sont pas stables ou que nos méthodes de détection ne sont pas efficaces pour ces quatre polypeptides.



**Figure 45 : Immunodétection de la protéine Pga2 avec un anticorps anti-V5 par dot blot avec ou sans traitement à l'acide periodique**

En résumé, toutes les souches construites expriment efficacement les domaines fonctionnels putatifs sauf pour quatre d'entre eux : **Pga50, Hwp1, Plb5 et Rbt1**. Cependant, un traitement à l'acide periodique est nécessaire pour détecter les peptides issus des protéines **Pga2, Pga15, Pga21, Pga28 et Pga55**.

## II. 2 Vérification du profil de glycosylation

Après avoir confirmé que les souches exprimaient les domaines fonctionnels, des western blot ont été réalisés sur les surnageants de culture. La taille des protéines attendues ainsi que les prédictions de N-glycosylation des protéines sont indiquées en Figure 46. Les protéines qui présentent des sites de N-glycosylation (prédits d'après l'algorithme <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) ont préalablement été traitées à l'endoglycosydase H (EndoH). Ce traitement enzymatique est spécifique de la N-glycosylation, il permet de libérer les N-acétylglucosamines liées aux acides aminés asparagines.

Protéine	Pga2	Pga4	Pga7	Pga15	Pga21	Pga24	Pga28	Pga31	Pga37	Pga44	Pga50	Pga55
Taille de la protéine sécrétée (en acide aminés)	158	381	116	127	86	143	93	143	104	146	217	522
<b>Total (en acide aminés) + V5</b>	<b>172</b>	<b>395</b>	<b>130</b>	<b>141</b>	<b>100</b>	<b>157</b>	<b>107</b>	<b>157</b>	<b>118</b>	<b>160</b>	<b>231</b>	<b>536</b>
Taille de la protéine sécrétée (en kDa)	17,4	41,9	12,8	14,0	9,5	15,8	10,2	15,8	11,4	16,1	23,9	57,4
<b>Total (en kDa) + V5</b>	<b>18,9</b>	<b>43,4</b>	<b>14,3</b>	<b>15,5</b>	<b>11,0</b>	<b>17,3</b>	<b>11,7</b>	<b>17,3</b>	<b>12,9</b>	<b>17,6</b>	<b>25,4</b>	<b>58,9</b>
<b>Prédiction N-glycosylation</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>

Protéine	1Pga60	2Pga60	Iff2	Orf19.4955	Rbt1	Als3	Hwp1	Cht2	Plb5	Pra1
Taille de la protéine sécrétée (en acide aminés)	156	141	320	390	258	344	165	284	624	227
<b>Total (en acide aminés) + V5</b>	<b>170</b>	<b>155</b>	<b>334</b>	<b>404</b>	<b>272</b>	<b>358</b>	<b>179</b>	<b>298</b>	<b>638</b>	<b>241</b>
Taille de la protéine sécrétée (en kDa)	17,2	15,5	35,2	42,9	28,4	37,8	18,2	31,2	68,6	25,0
<b>Total (en kDa) + V5</b>	<b>18,7</b>	<b>17,0</b>	<b>36,7</b>	<b>44,4</b>	<b>29,9</b>	<b>39,3</b>	<b>19,7</b>	<b>32,7</b>	<b>70,1</b>	<b>26,5</b>
<b>Prédiction N-glycosylation</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

Figure 46 : Tailles attendues des protéines (en acides aminés et en kDa) et prédiction de la N-glycosylation

Les résultats des gels protéiques obtenus ont révélé que les prédictions de O-glycosylation et de N-glycosylation obtenues par les algorithmes ne sont pas parfaites. Les différents profils protéiques obtenus sont représentés à titre d'illustration en Figure 47, on distingue :

- les protéines dont le profil correspond aux prédictions. Par exemple, **Pga2** est bien N-glycosylée puisque le traitement à l'EndoH permet de réduire la taille de la protéine pour obtenir celle prédite d'après la séquence (18,9 kDa) ; **Pga7** quant à elle est détectée directement à la taille attendue (14,3 kDa) ;
- les protéines non prédites pour être N-glycosylées qui ne migrent pas à la taille attendue en absence de traitement à l'EndoH. La protéine **Pga55** (taille attendue : 58,9 kDa) qui

donne un signal à un très haut poids moléculaire est très probablement glycosylée. Les protéines **Pga15** (taille attendue : 15,5 kDa) et **Pga28** (taille attendue : 11,7 kDa) qui présentent un signal très étendu sur une large partie du gel protéique sont également très probablement glycosylées ;

- les protéines prédites pour être N-glycosylées qui ont un profil similaire avec ou sans traitement à l'EndoH. Les protéines **Pga21** (taille attendue : 11,0 kDa), **Pga37** (taille attendue : 12,9 kDa) et **Pga44** (taille attendue : 17,6 kDa) donnent un signal étendu sur la partie du gel avec ou sans traitement à l'EndoH suggérant que la N-glycosylation prédite n'est pas effective et que ces protéines seraient probablement O-glycosylées.

Par ailleurs, nous avons observé que deux protéines, **Pga4** et **Cht2**, semblaient former des dimères. En effet, une deuxième bande correspondant au double de la taille attendue est visible sur gel : autour de 65-70 kDa pour Cht2 (taille attendue : 32,7 kDa) (Figure 47).

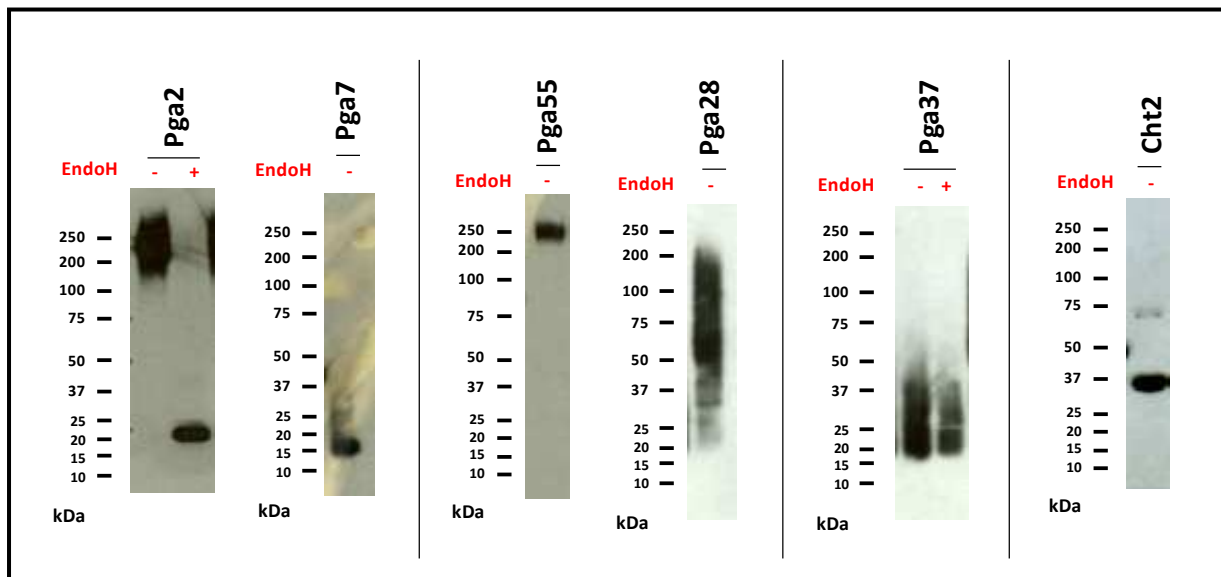


Figure 47 : Western blot révélés par un anticorps anti-V5 après traitement à l'acide periodique

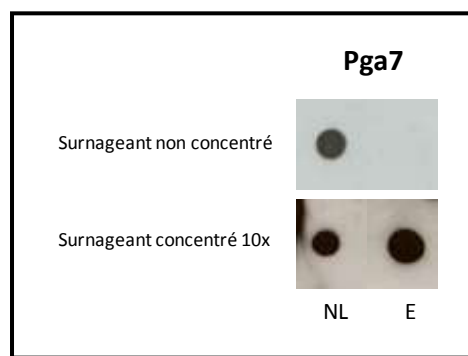
### III. Purification des polypeptides

La purification des polypeptides étiquetés V5 produits dans le surnageant de culture est une étape indispensable afin de s'affranchir des réponses croisées liées aux protéines excrétées naturellement par *C. albicans*. Nous avons utilisé une technique de purification par affinité en utilisant des anticorps anti-V5 couplés à des billes d'agarose.

Les premiers essais de purification réalisés n'ont pas été concluants. En effet, les résultats en western blot réalisés révèlent la présence des protéines uniquement dans les fractions non liées et aucun

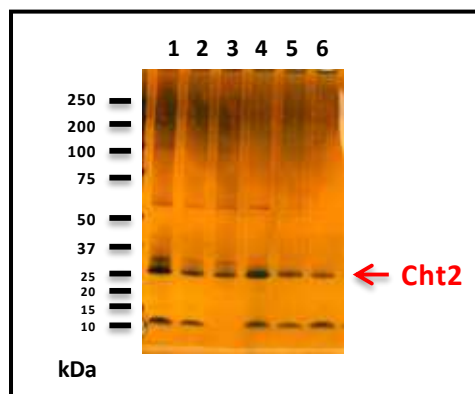


signal dans les fractions éluées (Figure 48). Des conditions optimales de purification (concentration en SDS, volume de surnageant de culture à purifier) ont dues être mises au point, elles sont précisées dans la partie Matériels et Méthodes (p159). Une des conditions nécessaires à la purification des polypeptides est la concentration préalable des surnageants de culture sur des colonnes dont le filtre laisse passer les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa. Ces résultats suggèrent que des molécules à faibles poids moléculaires présentent dans le milieu de culture empêcheraient les polypeptides de se fixer sur les billes d'agarose, la concentration permettrait ainsi de les éliminer. Après concentration des surnageants, les polypeptides sont détectés dans les fractions éluées (Figure 48).



**Figure 48 : Purification de la protéine Pga7**  
NL : fraction non liée. E : éluat.

Les purifications entreprises sur chacun des peptides nous permettent de nous affranchir des protéines sécrétées majoritaires comme l'illustre la Figure 49 pour la protéine Cht2. Cependant, les quantifications des protéines réalisées sur gel en coloration de nitrate d'argent avec une gamme étalon de BSA indiquent que les niveaux de production obtenus sont faibles, de l'ordre de 50 à 100 µg/L).



**Figure 49 : Purification de la protéine Cht2 du le surnageant de culture concentré 10x, coloration au nitrate d'argent du gel d'électrophorèse**

1 : surnageant concentré 10x au 1/20<sup>e</sup>. 2 : surnageant concentré 10x au 1/100<sup>e</sup>. 3 : fraction non liée.  
4 : fraction éluée 1 au 1/20<sup>e</sup>. 5 : fraction éluée 1 au 1/100<sup>e</sup>. 6 : fraction éluée 2 au 1/20<sup>e</sup>.

Ces faibles quantités ont été un frein pour entreprendre le développement d'anticorps spécifiques à partir des domaines fonctionnels car la société Genosphere demandait 5 mg de protéine pour cette production. Nous avons envisagé de tester les propriétés de ces anticorps à travers (i) leur action inhibitrice sur l'interaction de *C. albicans* avec les cellules hôtes, (ii) leur pouvoir de détection d'antigènes spécifiques dans le sérum de patients atteints de candidémies et (iii) leur effet protecteur vis-à-vis de l'infection à *C. albicans in vivo* dans un modèle murin. Néanmoins, ces concentrations ont été suffisantes pour les autres expériences énoncées dans la partie A/ p56.

#### IV. Validation de la stratégie d'étude des polypeptides : dosage de l'activité enzymatique du domaine N-terminal de la protéine Cht2

Notre stratégie de travail repose sur l'étude des polypeptides issus des protéines à ancre GPI potentiellement exposées à la surface de *C. albicans*. La conformation d'une séquence protéique est un critère primordial lorsque celle-ci possède une activité enzymatique. Nous avons choisi de vérifier l'activité enzymatique du domaine N-terminal de la protéine Cht2. Cht2 fait partie des quatre chitinases présentes chez *C. albicans* : Cht1 et Cht2 sont deux protéines à ancre GPI, Cht3 est sécrétée et Cht4 n'est pas encore totalement caractérisée.

Les dosages d'activité chitinase ont été effectués au cours d'une collaboration, j'ai réalisé ces expériences dans le laboratoire de Carol Munro à l'université d'Aberdeen en Ecosse. L'activité chitinase a été mesurée par un test enzymatique, le produit formé par cette réaction est un produit fluorescent. La mesure de fluorescence formée suite à cette réaction est relative à l'activité chitinase présente dans l'échantillon. Après 6h de culture à 30°C, l'activité chitinase des surnageants concentrés 20X de la souche sauvage CA14 et de la souche de surexpression du domaine N-terminal de la protéine Cht2 ont été mesurées (Figure 50).

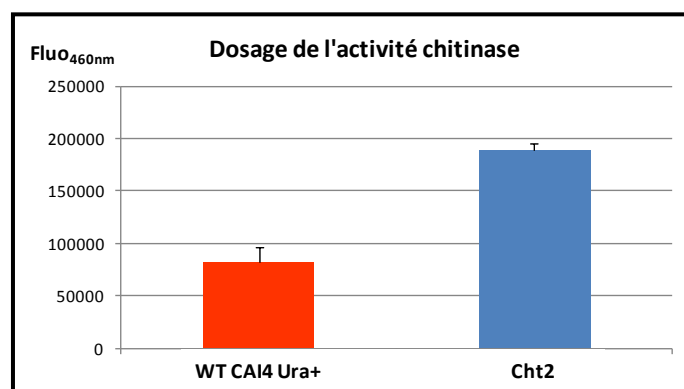


Figure 50 : Dosage de l'activité chitinase dans les surnageants de culture concentrés 20x

L'activité chitinase mesurée dans le surnageant de la souche sauvage correspond à l'activité chitinase de la protéine Cht3 qui est une chitinase sécrétée. Le surnageant de la souche de surexpression de Cht2 comporte à la fois la protéine Cht3 et le domaine fonctionnel N-terminal de Cht2. Nous observons que la fluorescence est augmentée dans le surnageant de la souche de surexpression de la protéine Cht2 en comparaison avec la souche sauvage CAI4 Ura<sup>+</sup>. Cette augmentation est donc due à l'activité du domaine N-terminal de la protéine Cht2 qui est fonctionnel.

Nous avons démontré au cours de cette expérience que la délétion de la partie C-terminale de la protéine Cht2 ne semble pas avoir d'influence sur l'activité chitinase de celle-ci. En effet, le domaine N-terminal seul de Cht2 exprimé et sécrété par les clones de surexpression présente une activité chitinase. Ce résultat nous conforte dans la stratégie utilisée dans ce projet à savoir l'étude du rôle des protéines à ancre GPI potentiellement exposées à la surface par l'étude du domaine fonctionnel putatif seul. Néanmoins, nous ne pouvons pas extrapoler ce résultat à chacun des autres domaines N-fonctionnels putatifs du projet car ils correspondent pour la plupart à des protéines inconnues.

## D/Le criblage d'activité des domaines fonctionnels putatifs

Comme annoncé en préambule, j'ai construit une banque de surexpression de domaines fonctionnels putatifs de protéines à ancre GPI potentiellement exposées à la surface de *C. albicans* dans le but de cribler leur rôle dans la virulence à travers diverses expériences. Les résultats de ces expériences sont synthétisés dans les paragraphes suivants.

### I. Etude du rôle des domaines fonctionnels putatifs dans le maintien de l'intégrité de la paroi

Nous avons étudié le rôle des domaines fonctionnels putatifs dans le maintien de l'intégrité de la paroi. La survie des souches de surexpression, soumis à divers stress agissant sur la paroi, a été observée sur milieu solide par un test en goutte. Les agents stressant étudiés sont : la caspofungine (de 16 à 32  $\mu\text{g/ml}$ ), le calcofluor (de 10, 25 à 50  $\mu\text{g/ml}$ ), l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (de 5 à 7,5 mM), le SDS (de 0,001 % à 0,005 %) et le pH acide (pH3) et basique (pH10). Les résultats obtenus n'ont pas révélé de phénotype pour les souches de la banque de surexpression quelle que soit la drogue et la concentration testées. En effet, comme indiqué à titre d'illustration en Figure 51, la croissance de celles-ci est similaire à celle de la souche de référence pour chacune des conditions. Ceci indique que la paroi des souches de surexpression n'est pas modifiée suite à l'expression et à la sécrétion des polypeptides.

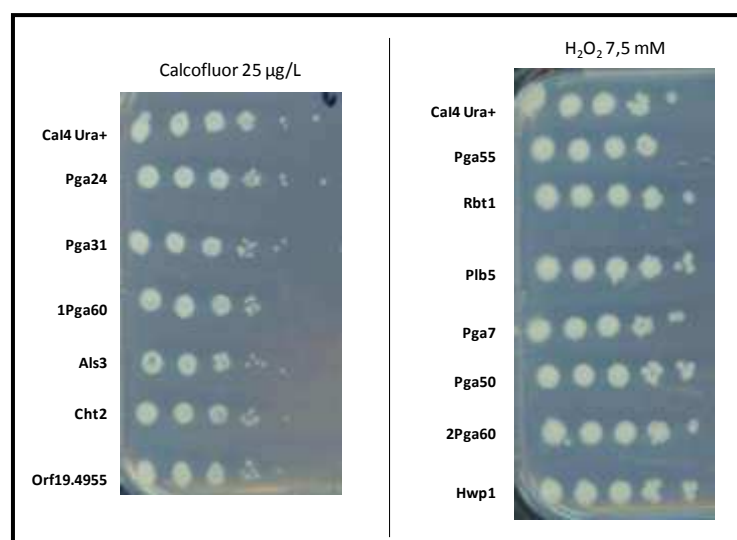


Figure 51 : Test en goutte sur SC + Calcofluor (25  $\mu\text{g/L}$ ) et SC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (7,5 mM)

## II. Etude du rôle des domaines fonctionnels putatifs dans la reconnaissance par les cellules hôtes et l'activation de voies de signalisation

Notre criblage s'est porté également sur l'étude du dialogue levures-cellules eucaryotes afin d'identifier des protéines à ancre GPI capables de moduler les fonctions des cellules épithéliales intestinales via l'activation de voies de signalisation NFκB ou la régulation du gène TSLP (gène codant une cytokine). Nous avons utilisé deux lignées cellulaires épithéliales issues chacune d'un adénocarcinome du colon : les cellules Caco-2 et les cellules HT29. Les systèmes étudiés (cellule/voie de signalisation/système rapporteur) ont été les suivants : HT29/NFκB/SEAP, HT29/TSLP/LUC et Caco-2/NFκB/SEAP (Figure 52).

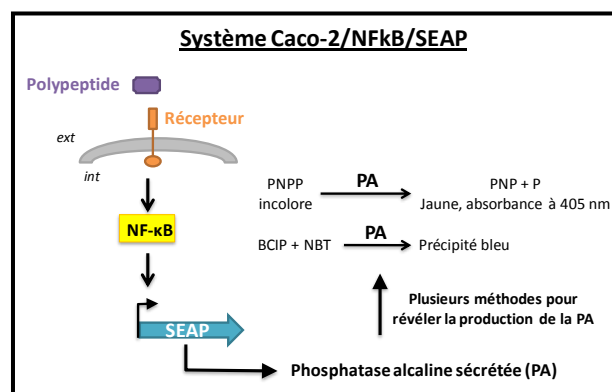
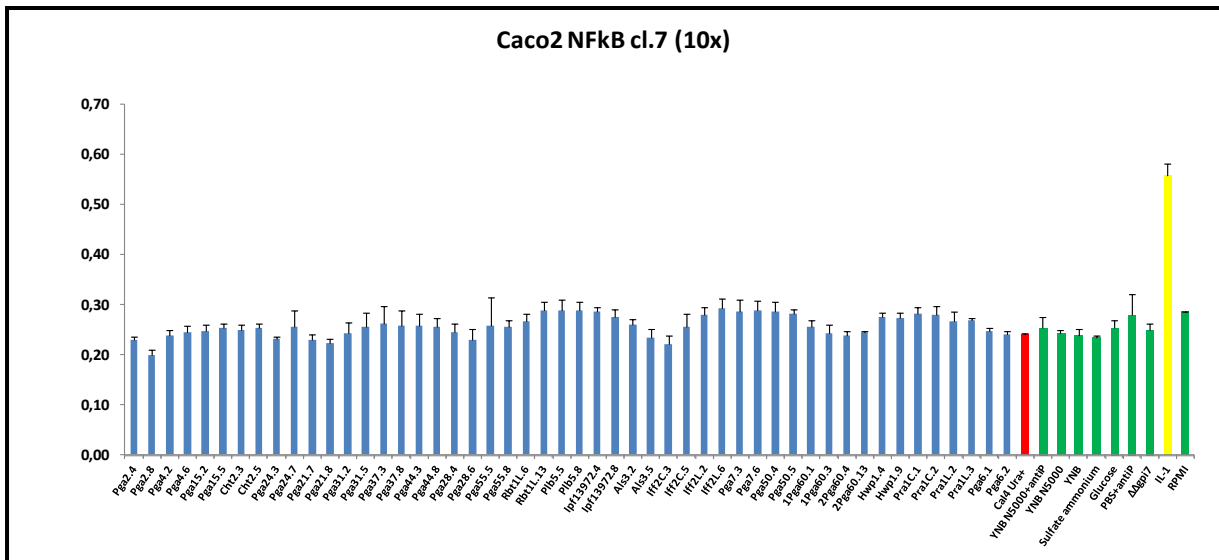


Figure 52 : Schéma de l'induction du système rapporteur Caco-2/NFκB/SEAP

Les conditions de cocultures testées avec les surnageants de culture concentrés 10 fois et les systèmes cités précédemment ont permis d'étudier (i) le rôle activateur (en absence d'IL-1) et (ii) le rôle inhibiteur (en présence d'IL-1) des domaines fonctionnels putatifs. Pour ces expériences, nous avons collaboré avec l'équipe de Hervé Blottière de l'Institut MICALIS (INRA, Jouy-en-Josas) qui possède les outils et l'expérience nécessaires pour ce type de criblage (Lakhdari et al., 2010). A titre d'illustration, les résultats obtenus pour le système Caco-2/NFκB/SEAP sont présentés en Figure 53 et Figure 54.

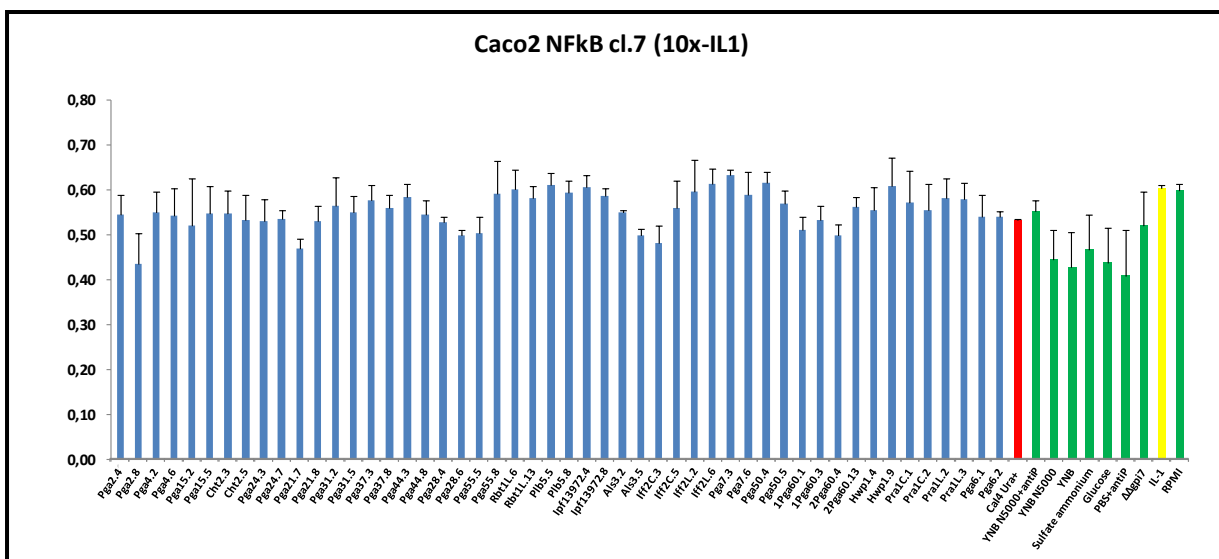
En condition de coculture avec les domaines fonctionnels putatifs et les cellules Caco-2 en absence d'IL-1, les résultats montrent qu'aucun domaine fonctionnel putatif n'active la voie NFκB (Figure 53, barres bleues). Le témoin positif cellules Caco-2 + IL-1 active la voie NFκB et valide ainsi l'expérience (Figure 53, barre jaune). Les résultats obtenus dans cette condition indiquent que les domaines fonctionnels putatifs n'ont pas de rôle activateur dans le système Caco-2/NFκB/SEAP.



**Figure 53 : Etude de l'induction de la voie de signalisation NFkB par les domaines fonctionnels putatifs dans le système Caco2/NFkB/SEAP**

Barres bleues : domaines fonctionnels putatifs. Barre rouge : témoin cellules entières *C. albicans*. Barres vertes : témoins milieux de culture. Barre jaune : témoin IL-1.

En parallèle, le rôle inhibiteur des domaines fonctionnels putatifs a été étudié en condition de coculture avec les cellules Caco-2 en présence d'IL-1. Les résultats montrent que pour chaque domaine fonctionnel putatif testé la voie NFkB est activée à un niveau comparable au témoin Caco-2 + IL-1 (Figure 54, barres bleues et barre jaune). Ces résultats suggèrent que les domaines fonctionnels putatifs ne sont pas des inhibiteurs de la voie NFkB dans système Caco-2/NFkB/SEAP.



**Figure 54 : Etude de l'inhibition de la voie de signalisation NFkB par les domaines fonctionnels putatifs dans le système Caco2/NFkB/SEAP + IL-1**

Barres bleues : domaines fonctionnels putatifs. Barre rouge : témoin cellules entières *C. albicans*. Barres vertes : témoins milieux de culture. Barre jaune : témoin IL-1.

Les profils de résultats obtenus avec les systèmes HT29/NFkB/SEAP et HT29/TSLP/LUC sont similaires à ceux présentés pour le système Caco-2/NFkB/SEAP suggérant que les domaines fonctionnels putatifs de la banque de surexpression et de sécrétion ne sont ni activateurs ni inhibiteurs des voies de signalisation NFkB et TSLP testées dans ces systèmes rapporteurs.

### III. Etude du rôle des domaines fonctionnels putatifs dans l'activation de la réponse immunitaire

Une des questions à laquelle nous souhaitions répondre était de savoir si l'un ou l'autre des domaines fonctionnels putatifs était associé à la réponse immunitaire. Pour cela, nous avons étudié la survie des souches de surexpression en coculture avec des macrophages de la lignée J774.2. Le facteur MOI (Multiplicity Of Infection) utilisé dans nos expériences est de 1:20. Le taux de survie de *C. albicans* aux macrophages a été déterminée par une technique de « end point dilution » en calculant le ratio entre le nombre de cellules de *C. albicans* dans les puits sans macrophages par rapport au nombre de cellules de *C. albicans* dans les puits avec macrophages après 48h d'incubation à 37°C + 5 % de CO<sub>2</sub>. Les résultats obtenus ont été normalisés à 100% par rapport à la souche sauvage (Figure 55) et les différences de valeurs d'adhésion par rapport à CAI4 sont représentées graphiquement en Figure 56.

Ces résultats montrent que les souches qui surexpriment Pga24, Orf19.4955 et Cht2 sont plus sensibles à l'action des macrophages car leur taux de survie en coculture est inférieur que celui de la souche sauvage de *C. albicans* suggérant ainsi que les protéines Pga24, Orf19.4955 et Cht2 activent la réponse des macrophages. Quatre souches de surexpression, à savoir Rbt1, Pga50, 2Pga60 et Plb5, ont un taux de survie aux macrophages plus important que celui de la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que les protéines Rbt1, Pga50, 2Pga60 et Plb5 ont un rôle inhibiteur sur l'action des macrophages dans la réponse anti-*C. albicans*. Notons que le taux de survie de la souche surexprimant la protéine témoin Pra1C (domaine fonctionnel putatif sans O-glycosylation) n'est pas significativement différente de la souche sauvage tandis que la souche qui surexprime la protéine Pra1L (protéine entière) n'est que légèrement plus résistante à l'action des macrophages par rapport à la souche sauvage. Ces résultats montrent que le rôle inhibiteur de Pra1 dans la maturation du phagolysosome n'a pas été mis en évidence dans nos conditions expérimentales suggérant que la protéine Pra1 n'est pas fonctionnelle seule.

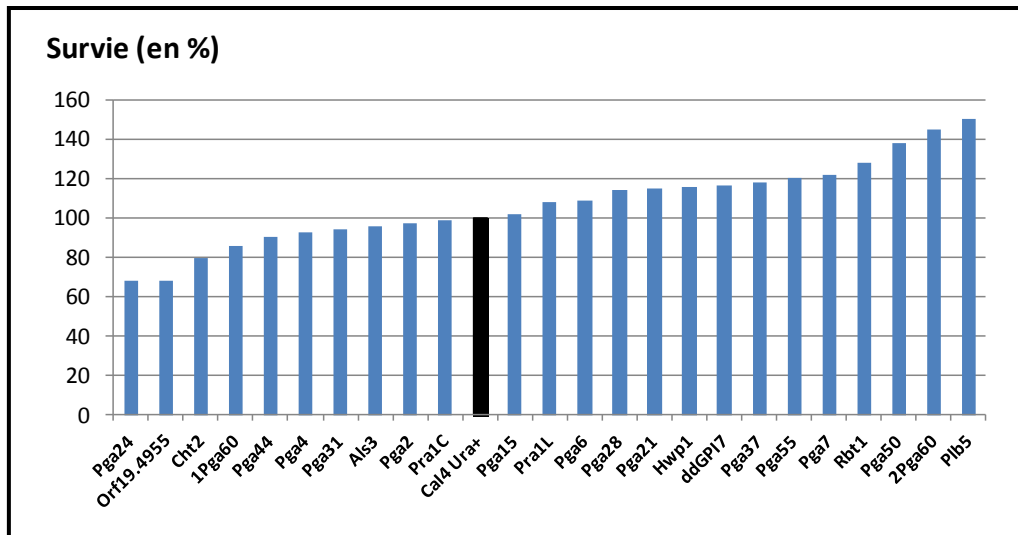


Figure 55 : Survie aux cellules macrophages de la lignée J774.2 (résultats normalisés à 100% de la souche sauvage CA14)

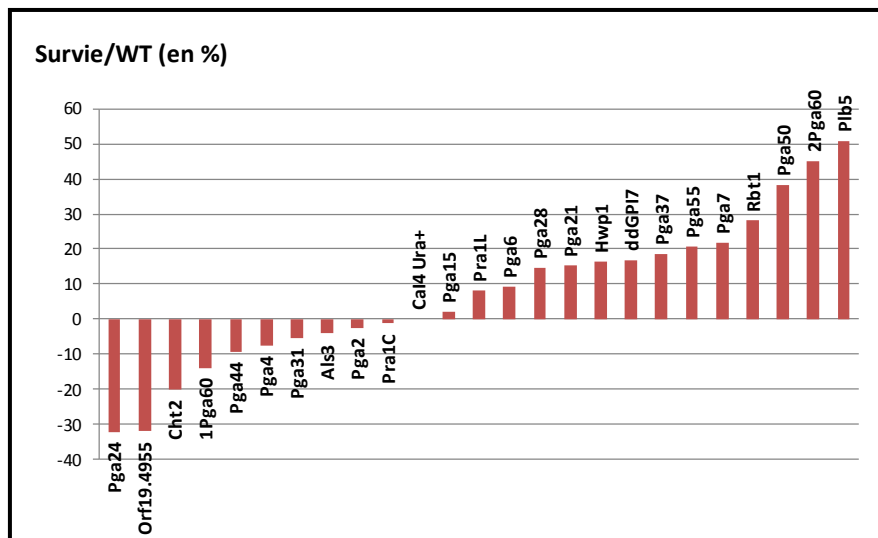


Figure 56 : Survie aux cellules macrophages de la lignée J774.2 (résultats en comparaison avec la souche sauvage en pourcentage)

#### IV. Etude du rôle des domaines fonctionnels putatifs dans l'immunité protectrice

Un des objectifs de ce projet vise à identifier des cibles potentielles pour le diagnostic des infections à *C. albicans* et pour le développement de nouveaux moyens de traitements antifongiques. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés à la capacité des domaines fonctionnels putatifs à induire une réponse immunitaire protectrice par la production d'anticorps spécifiques. Ces domaines ainsi identifiés pourraient être utilisés en tant qu'antigènes pour le développement de



vaccins synthétiques lors d'immunothérapie active thérapeutique. En effet, comme *C. albicans* est un pathogène opportuniste et non pas un pathogène strict, l'objectif n'est pas de prévenir l'apparition de la maladie mais d'aider l'organisme des personnes déjà infectées à lutter contre la maladie en restaurant ses défenses immunitaires par la stimulation de la production d'anticorps. Les personnes qui présentent une infection profonde à *C. albicans* ont, dans la plupart des cas, un système immunitaire fortement affaibli. Il serait donc intéressant d'envisager un vaccin mixte composé à la fois d'anticorps spécifiques pour une immunisation passive et rapide et d'épitopes (domaines fonctionnels) pour une immunisation active en stimulant le système immunitaire.

Afin de déterminer si un des domaines fonctionnels putatifs pourrait être un marqueur spécifique de l'infection à *C. albicans*, nous disposons de sérums de personnes saines et de sérums de personnes ayant présentées une infection à *C. albicans*. Des tests en blot ont été réalisés : les peptides purifiés ont été déposés sur membrane de nitrocellulose et la présence d'anticorps spécifiques dans les sérums a été mise en évidence par immunodétection. Les résultats de dot blot obtenus pour trois sérums de patients sains et de trois sérums de patients infectés sont présentés en Figure 57 (cercle bleu : signal positif).

L'analyse des résultats obtenus avec les patients sains nous montre que :

- le sérum du patient sain 5 reconnaît faiblement tous les peptides avec une réaction plus importante pour les peptides Pga24 et Iff2L
- le sérum du patient sain 7 ne reconnaît aucun des peptides
- le sérum du patient sain 8 reconnaît spécifiquement 3 peptides : Pga4, Pga24 et Iff2L

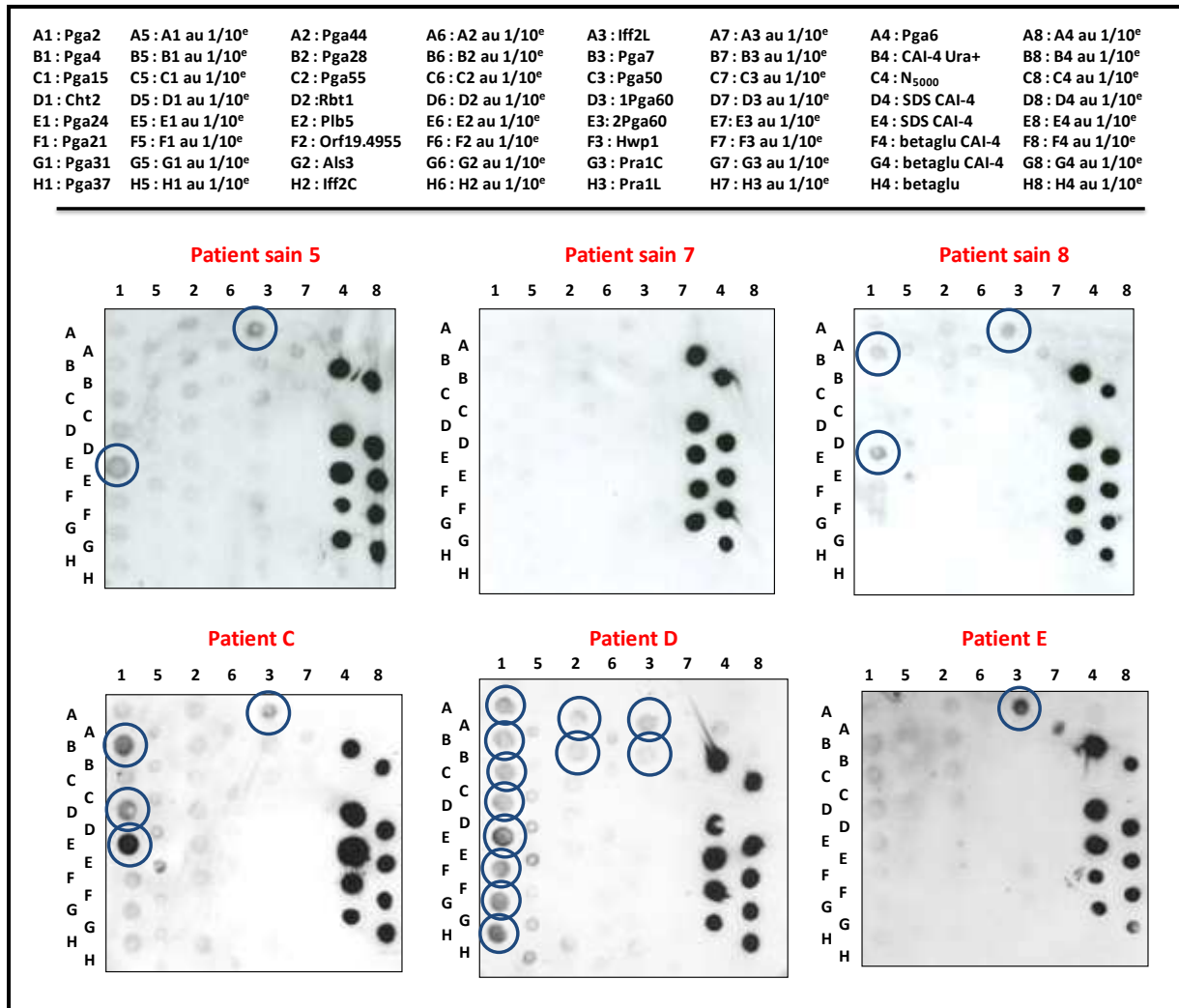
Ces résultats sont difficiles à interpréter car nous savons que 75 % de la population sont porteurs sains de *C. albicans* et que nous n'avons aucune information sur les antécédents médicaux sur ces patients (ces patients peuvent avoir eu une infection superficielle à *C. albicans* dans le passé).

Néanmoins, l'analyse des résultats obtenus avec les sérums de personnes infectées nous apporte des données intéressantes :

- le sérum du patient C réagit fortement avec les peptides Pga4, Cht2, Pga24 et Iff2L. Notons que la reconnaissance du peptide Pga24 est très importante.
- le sérum du patient D reconnaît la plupart des peptides de la banque dont principalement Pga2, Pga4, Pga15, Cht2, Pga24, Pga21, Pga31, Pga37, Pga44, Pga28, Iff2L et Pga7. Encore une fois, la réponse contre le peptide Pga24 est la plus forte.
- le sérum du patient E présente une réponse principalement contre Iff2L

Au niveau de l'intensité de la réponse des sérums des patients infectés par *C. albicans*, trois peptides se distinguent : Pga4, Pga24 et Iff2L. Les résultats précédents montrent que ces trois peptides sont

également reconnus par des sérums de patients sains. Il sera donc intéressant de poursuivre l'identification du rôle de ces peptides dans la capacité à induire une réponse protectrice vis-à-vis de l'infection à *C. albicans* par des expériences de survie dans un modèle murin.



**Figure 57 : Dot blot réalisés sur la banque de peptides avec des sérums de patients sains (5, 7 et 8) et des sérums de personnes infectées par *C. albicans* (C, D et E). Spots bleus : signal positif.**

Lignes 1, 2, 3, et 4 : protéines purifiées pures. Lignes 5, 6, 7 et 8 : protéines purifiées diluées au 1/10<sup>e</sup>. B4/B8 : témoin cellules entières CAI4. C4/C8 : témoin négatif milieu de culture. D4/D8 et E4/E8 : témoin protéines membranaires. F4/F8 et G4/H8 : témoin protéines pariétales. H4/H8 : témoin négatif betagluconase seule.

## E/ Bilan

Ce qu'il faut retenir :

- **sélection** de protéines à ancre GPI potentiellement exposées à la surface de *C. albicans* **Pga2, Pga4, Pga7, Pga15, Pga21, Pga24, Pga28, Pga31, Pga37, Pga44, Pga50, Pga55, Pga60, Iff2, Orf19.4955, Rbt1, Als3, Hwp1, Cht2, Plb5** et Pra1 (non GPI) ;
- **construction** d'une banque de surexpression et de sécrétion des **polypeptides** dépourvus de sites de prédiction de O-glycosylation et issus des protéines sélectionnées ;
- **production et détection** dans le milieu de culture des polypeptides exceptés pour **Pga50, Hwp1, Plb5 et Rbt1** ;
- traitement à l'acide periodique nécessaire pour la **détection** des polypeptides **Pga2, Pga15, Pga21, Pga8 et Pga55** ;
- mauvaise **prédiction** de la N ou de la O-glycosylation pour les polypeptides **Pga55, Pga15, Pga28, Pga21, Pga37 et Pga44** ;
- mise en évidence de l'**activité chitinase** du domaine N-terminal de **Cht2** ;
- **aucun phénotype** des polypeptides dans le **maintien de l'intégrité de la paroi** dans les tests en gouttes sur milieu solide ;
- **aucun polypeptide** identifié en tant qu'**activateur ou inhibiteur** des voies **NFkB et TSLP** étudiées dans les systèmes rapporteurs HT29/NFkB/SEAP, HT29/TSLP/LUC et Caco-2/NFkB/SEAP ;
- **7 souches de surexpression et de sécrétion** présentent un phénotype dans le **test de survie au macrophage** : les polypeptides **Pga24, Orf19.4955 et Cht2** induisent une **diminution du taux de survie** de *C. albicans* tandis que les polypeptides **Rbt1, Pga50, 2Pga60 et Plb5 favorise la survie** de *C. albicans* vis-à-vis de la réponse immunitaire ;
- **3 polypeptides, Pga4, Pga24 et Iff2L**, sont **reconnus par les sérums** de patients sains et de patients infectés par *C. albicans* : aucun polypeptide n'est un marqueur spécifique d'un lot de sérums.

## **PROJET 2**

### **Caractérisation du rôle de la protéine à ancre GPI Rbt1**

## A/ Objectif de ce projet

Le second projet de ma thèse est focalisé sur la caractérisation fonctionnelle d'une protéine à ancre GPI : Rbt1. Plusieurs raisons nous ont amenées à nous intéresser spécifiquement au rôle de cette protéine. Tout d'abord, l'organisation protéique de Rbt1 est caractéristique d'une protéine à ancre GPI exposée à la surface : à savoir un domaine fonctionnel putatif situé en amont d'une région riche en sérine et thréonine O-glycosylées (Projet 1, B/II). Ceci nous a d'ailleurs incité à inclure cette protéine dans la banque de surexpression et de sécrétion dont les résultats ont été présentés dans la partie précédente. Les résultats obtenus ont montré que le domaine fonctionnel putatif de Rbt1 est probablement instable (Projet 1, C/II. 1 p72), ce qui ne nous a pas permis de poursuivre l'étude de Rbt1 par cette approche. De plus, il n'existait que peu de données bibliographiques concernant Rbt1 au début de notre étude : seule la répression de l'expression de Rbt1 par le régulateur *TUP1* et une virulence atténuée de la souche mutante  $\Delta rbt1$  dans un modèle murin ont été mises en évidence par Braun et ses collaborateurs (Braun et al., 2000). Enfin, la similarité de Rbt1 avec Hwp1, une des adhésines principales décrites chez *C. albicans*, (Braun et al., 2000) et avec Flo11, une floculine caractérisée chez *S. cerevisiae*, (Lo and Dranginis, 1996, 1998) a renforcé notre intérêt pour Rbt1.

En nous appuyant sur les précédentes informations, nous avons développé un projet centré sur l'étude approfondie de Rbt1. Afin de traiter au mieux le sujet, nous avons utilisé deux modèles : un modèle de surexpression hétérologue chez *S. cerevisiae* et un modèle de surexpression chez *C. albicans*. Le principal avantage du premier modèle est que nous nous affranchissons des difficultés liées à la redondance de fonction des protéines à ancre GPI tandis que le second modèle nous permet d'étudier Rbt1 en forme levure chez *C. albicans*. Les expériences menées avec les souches construites dans ces deux modèles nous ont permis d'étudier le rôle de Rbt1 dans : (i) l'adhésion aux surfaces abiotiques et aux surfaces biotiques, (ii) la formation de biofilm, (iii) la formation d'agrégats, (iv) les propriétés de surface des levures.

## B/ Description de la protéine Rbt1

### I. Variation allélique du gène *RBT1* chez *C. albicans*

Une PCR sur l'ADN génomique de la souche sauvage *BWP17* avec des amorces spécifiques du gène *RBT1* a permis d'amplifier deux fragments nucléotidiques révélant ainsi que les deux allèles de *C. albicans* codaient deux protéines Rbt1 de tailles différentes. Les deux fragments de PCR, nommés Rbt1SL pour le fragment court et Rbt1FL pour le fragment long, ont été séquencés par la société GATC. Les séquences obtenues ont été traduites et alignées (Figure 58) (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

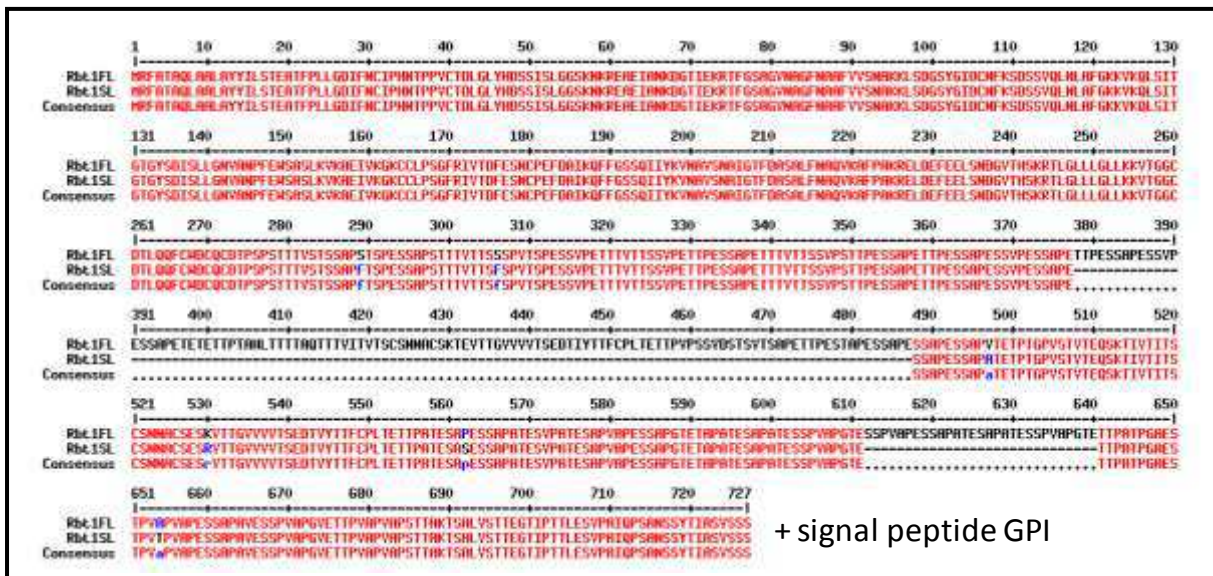


Figure 58 : Alignements des séquences protéiques Rbt1SL et Rbt1FL

(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

L'alignement des deux séquences protéiques a permis de révéler la présence de deux délétions dans la protéine Rbt1SL par rapport à la protéine Rbt1FL. La première délétion est située entre les acides aminés en position 378 et 487 de Rbt1FL, tandis que la seconde est située entre les acides aminés 612 et 640. Ces deux délétions ont pour conséquence d'influer sur le nombre de répétition des motifs PESSAP, PATES et  $T^V/I/V^V/T^V/I$ TSCX<sub>4</sub>CX<sub>4</sub>VTTGVVVVTX<sub>5</sub>YTFCPL retrouvés dans les deux formes de Rbt1 :

- PESSAP : 14 exemplaires dans Rbt1FL / 10 exemplaires dans Rbt1SL
- PATES : 7 exemplaires dans Rbt1FL / 5 exemplaires dans Rbt1SL
- $T^V/I/V^V/T^V/I$ TSCX<sub>4</sub>CX<sub>4</sub>VTTGVVVVTX<sub>5</sub>YTFCPL : 2 exemplaires dans Rbt1FL / 1 exemplaire dans Rbt1SL

Nous avons alors étudié la variation allélique de *RBT1* au sein d'un ensemble de 28 souches provenant d'isolats cliniques (souches fournies par Marie-Elizabeth Bougnoux, Institut Pasteur). La migration sur gel d'agarose des fragments d'ADN amplifiés à partir de l'ADN génomique avec les amorces spécifiques de *RBT1* a montré que chaque souche exprimait deux allèles *RBT1* différents. Néanmoins, la plus grande différence de taille observée est celle de la souche *BWP17* décrite précédemment. L'analyse des séquences protéiques a mis en évidence que les délétions et/ou insertions touchaient principalement le nombre de répétitions des motifs PESSAP et PATES et que la région N-terminale de la protéine Rbt1 était parfaitement conservée. En reportant les résultats obtenus sur l'arbre des isolats cliniques de *C. albicans*, nous remarquons que la variabilité allélique des souches pour *RBT1* est organisée en fonction de la répartition dans les clades : les souches dont les deux allèles ont le plus de différences appartiennent toutes, exceptée une, au clade 2 (Figure 59).

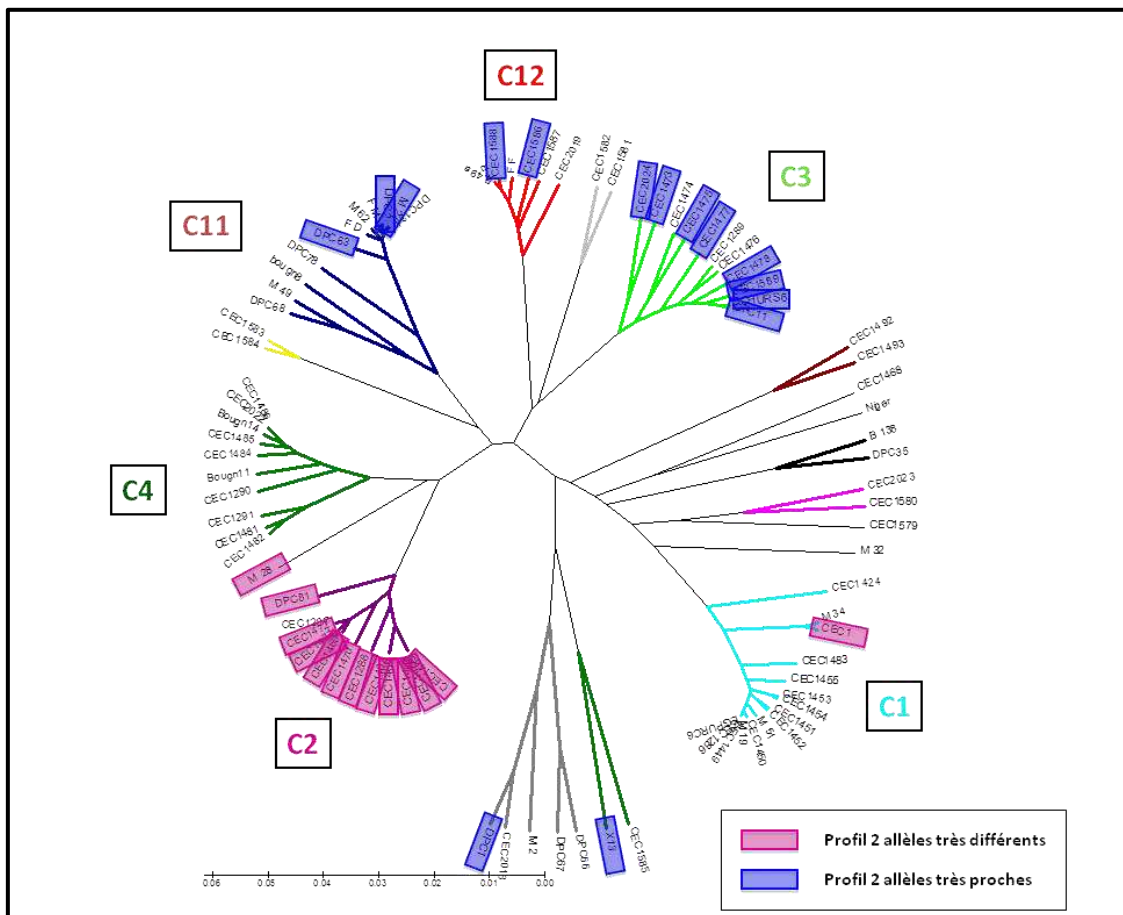


Figure 59 : Variabilité allélique du gène *RBT1* de souches cliniques de *C. albicans* fournies par Marie-Elizabeth Bougnoux, Institut Pasteur

## II. Motif $T^V/I^1/V^V/I^1TSCX_4CX_4VTTGVVVVTX_5YTTCPL$ et séquence à fort potentiel de $\beta$ -agrégation

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la séquence protéique de Rbt1 contient un motif particulier :  $T^V/I^1/V^V/I^1TSCX_4CX_4VTTGVVVVTX_5YTTCPL$ . Ce motif appelé Rbt1-M est situé dans la partie C-terminale de la protéine Rbt1 dans une région ne présentant pas de sites de O-glycosylation au sein même d'une région très fortement O-glycosylée (Figure 60). La protéine Rbt1FL a deux copies de ce motif Rbt1-M (en gras acides aminés identiques aux deux séquences) :

- Rbt1-M1 : **QTTTVITV**TSCSNACSKTEV**TTGVVVV**TSEDTI**YTTFCPL**ETTP ;
- et Rbt1-M2 : **QSKTIV**TITSCSNACSESKV**TTGVVVV**TSEDT**VYTTFCPL**ETTP.

La protéine Rbt1SL n'a qu'une copie de ce motif, il s'agit de la séquence Rbt1-M2.

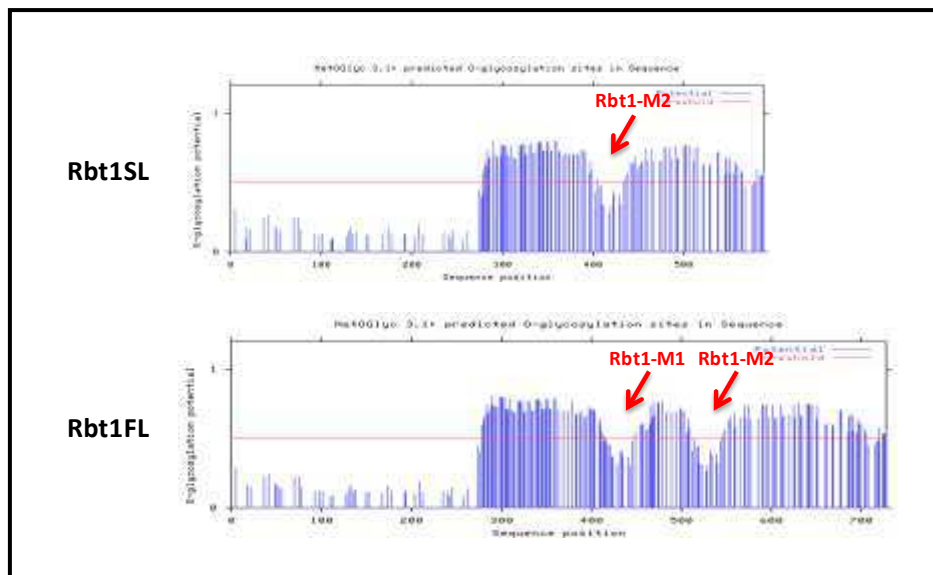


Figure 60 : Schémas de prédiction des sites de O-glycosylation des protéines Rbt1SL et Rbt1FL et indication de la localisation des motifs Rbt1-M1 et Rbt1-M2 par des flèches rouges

La recherche de régions à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation dans les séquences protéiques de Rbt1SL et Rbt1FL *via* le serveur TANGO (<http://tango.crg.es/>) a mis en évidence quatre régions à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation dans la protéine Rbt1FL contre deux dans la protéine Rbt1SL. Ces régions correspondant, chacune, à cinq acides aminés sont comprises dans les motifs Rbt1-M1 et Rbt1-M2 (Figure 61). Les acides aminés concernés sont :

- les acides aminés **TVITV** et **TIVTI** situés respectivement en amont de la première cystéine des motifs Rbt1-M1 et Rbt1-M2 ;
- et les acides aminés **GVVVV** situés entre le deuxième et la troisième cystéine des motifs Rbt1-M1 et Rbt1-M2.



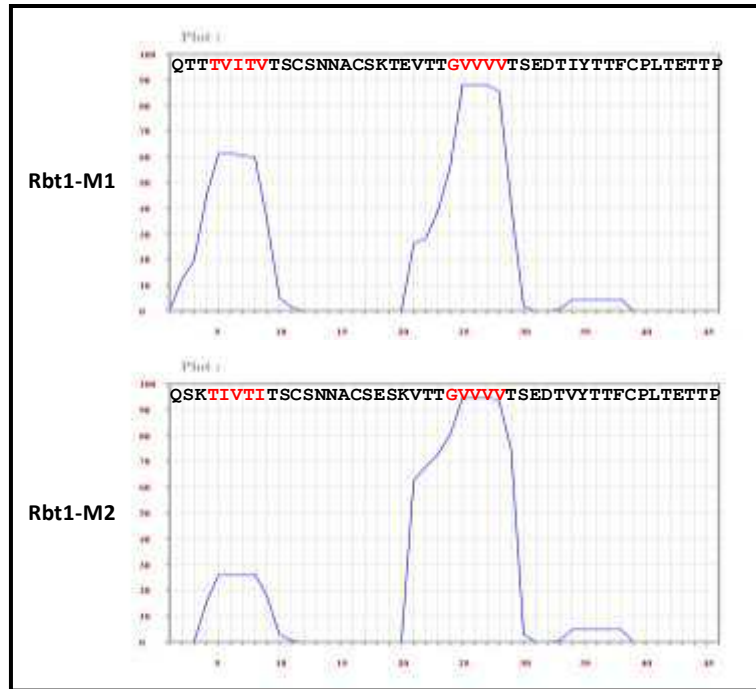


Figure 61 : Prédiction des régions de  $\beta$ -agrégation dans les séquences protéiques des motifs Rbt1-M1 et Rbt1-M2 et indication des acides aminés concernés en rouge (<http://tango.crg.es/>)

A ce jour, aucune fonction liée à ce motif n'est connue. Cependant, 11 autres protéines à ancre GPI (dont 1 non GPI) présentent également une ou plusieurs copies de ce motif fortement conservé (Figure 62). Parmi elles, on retrouve trois adhésines (Hwp1, Eap1 et Hwp2), une anti-adhésine (Ywp1), une protéine impliquée dans l'invasion (Cht2) et cinq protéines spécifiques de la forme hyphe (Hwp1, Eap1, Hwp2, Cht2 et Pga18) (III. 6 p36 et IV p40). Nous avons alors recherché les régions à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation au sein de ces motifs. Sur les 19 séquences protéiques analysées, 14 d'entre elles ont une région à haut potentiel de  $\beta$ -agrégation en amont de la 1<sup>ère</sup> cystéine et 10 ont une entre la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> cystéine (Figure 62).

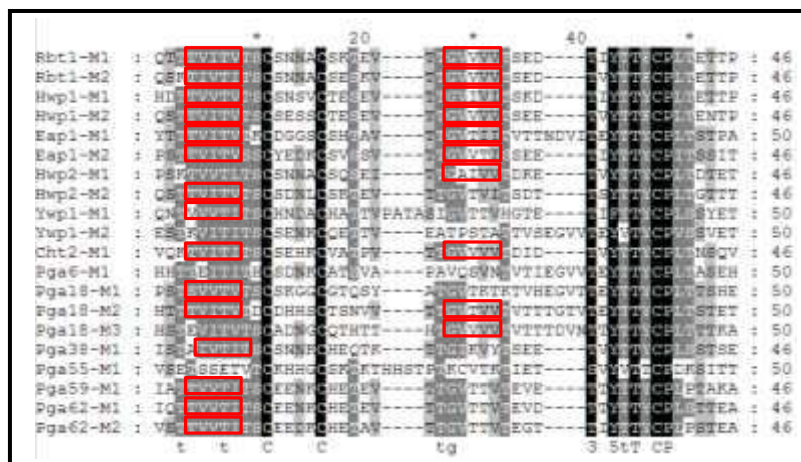


Figure 62 : Alignement des séquences protéiques du motif  $T^V/I/V^I/TSCX_4CX_4VTTGVVVVX_5YTFPCPL$  de 12 protéines de *C. albicans*.

Encadrés en rouge : séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation prédites *via* TANGO

### III. Homologies de la protéine Rbt1

#### III. 1 Avec Flo11

Le domaine N-terminal de Rbt1, qui est conservé dans la forme Rbt1SL et Rbt1FL, présente une similarité avec les 254 premiers acides aminés (après clivage de la séquence du peptide signal) du domaine N-terminal des protéines de la superfamille Flo11 (Figure 63). Cette famille de protéines, caractérisées chez *S. cerevisiae*, joue un rôle dans la formation de pseudohyphes et dans l'invasion de l'agar. Les gènes *FLO* sont également essentiels dans la formation de pellicules pour les levures utilisées dans l'industrie du vin et sont impliqués dans la floculation et l'adhésion (Lo and Dranginis, 1996, 1998; Nakagawa et al., 2011). Une étude récente a montré que le domaine N-terminal de la protéine Flo11 ne contenait pas le domaine PA14 de liaison au mannose présent dans les autres flocculines (Flo1, Flo5, Flo9 et Flo10) et que les propriétés d'auto-interaction de ce domaine pourraient expliquer le rôle de Flo11 dans les interactions cellules-cellules (Goossens and Willaert, 2012).



Figure 63 : Homologie du domaine N-terminal de la protéine Rbt1FL avec les protéines de la superfamille Flo11 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

#### III. 2 Avec Hwp1

La protéine Rbt1 est le membre d'une famille de trois protéines avec Hwp1 et Hwp2 (Munro, 2012). Les protéines Hwp1 et Hwp2 (Hypal Wall Protein) sont des adhésines caractérisées chez *C. albicans* (III. 6 p36). Braun et ses collaborateurs ont montré que la similarité entre la protéine Rbt1 et Hwp1 était de 16 % pour le côté N-terminal et de 61 % pour le côté C-terminal (Braun et al., 2000) (Figure 64). Comme abordé précédemment, la protéine Hwp1 possède deux exemplaires du motif  $T^V/I/V/T^V/I/TSCX_4CX_4VTTGVVVVTX_5YTTFCPL$  situés dans le domaine C-terminal (II p91).

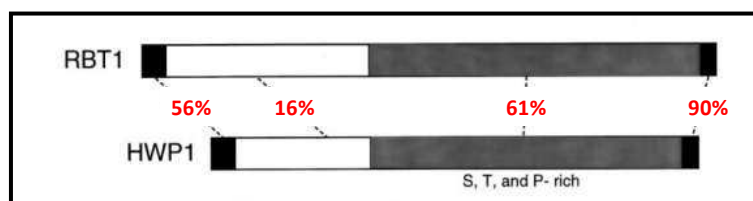


Figure 64 : Similarité de la protéine Rbt1 avec la protéine Hwp1 (Braun et al., 2000)

#### IV. Régulation de l'expression de *RBT1* par *TUP1*

La définition du nom *RBT1* résume en lui seul la régulation de ce gène : en effet, *RBT1* signifie Repressed By T*UP1* (Braun et al., 2000). Donc comme son nom l'indique, l'expression de *RBT1* est régulée par *TUP1* qui est un régulateur négatif de la transition de la forme levure à la forme hyphe (Braun et al., 2000). Ce régulateur réprime donc à la fois l'expression du gène *RBT1* et la transition levure/hyphe. De ce fait, l'expression du gène *RBT1* est réprimée en forme levure et induite en forme hyphe (Figure 65).

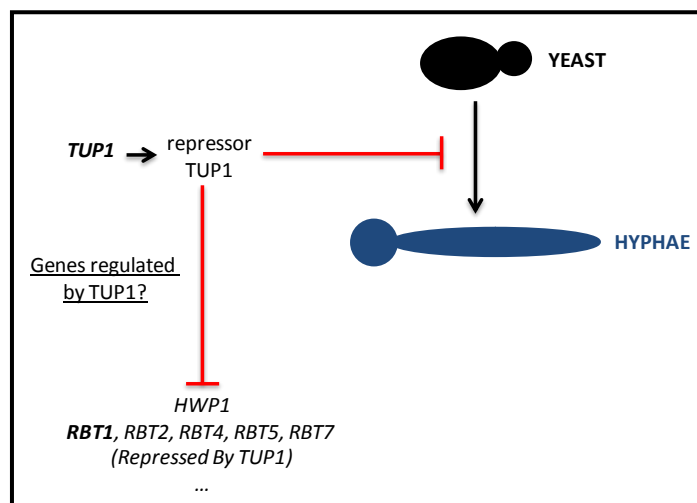


Figure 65 : Régulation de l'expression du gène *RBT1* par *TUP1*

Pour illustrer cette régulation, nous avons mesuré le taux d'expression du gène *RBT1* par qPCR chez la souche sauvage de *C. albicans* CAY1175 et chez le mutant  $\Delta rbt1$  CAY171 (Ene and Bennett, 2009) : ces résultats représentés en pourcentage du taux d'actine sont présentés dans la Figure 66.

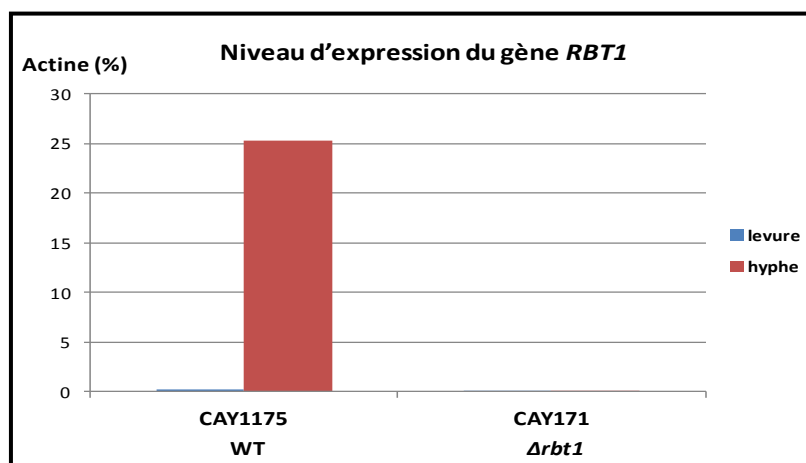


Figure 66 : Mesure du niveau d'expression du gène *RBT1* par qPCR

Aucune expression n'a été mesurée pour le gène *RBT1* en forme levure que ce soit pour la souche sauvage *CAY1771* ou le mutant  $\Delta rbt1$  *CAY171*. Le niveau d'expression de *RBT1* atteint 25 % du taux d'actine pour la souche sauvage *CAY1175* après 2h de filamentation induite par la température et le pH. La délétion du gène *RBT1* dans le mutant  $\Delta rbt1$  *CAY171* est confirmée par l'absence d'expression de *RBT1* en forme hyphe. Nous avons intégré ces deux souches aux expériences réalisées au cours de ce projet dans le but de caractériser le rôle de la protéine Rbt1.

## V. Implication du gène *RBT1* dans la virulence

Très peu de données portant sur le gène *RBT1* étaient disponibles au début de notre projet. Néanmoins, Braun et ses collaborateurs ont montré qu'un mutant  $\Delta rbt1$  avait une virulence significativement réduite dans un modèle d'infection systémique chez la souris ainsi que dans un modèle d'infection de la cornée chez le lapin (Braun et al., 2000) (Figure 67). Ene et ses collaborateurs ont démontré la contribution des protéines Rbt1, Hwp1 et Hwp2 dans la formation de biofilm, et un récent travail a montré que *RBT1* était surexprimé dans des biofilms matures (Bonhomme et al., 2011; Ene and Bennett, 2009).

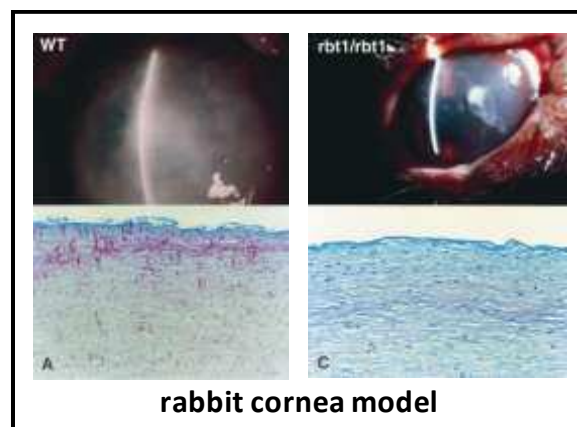


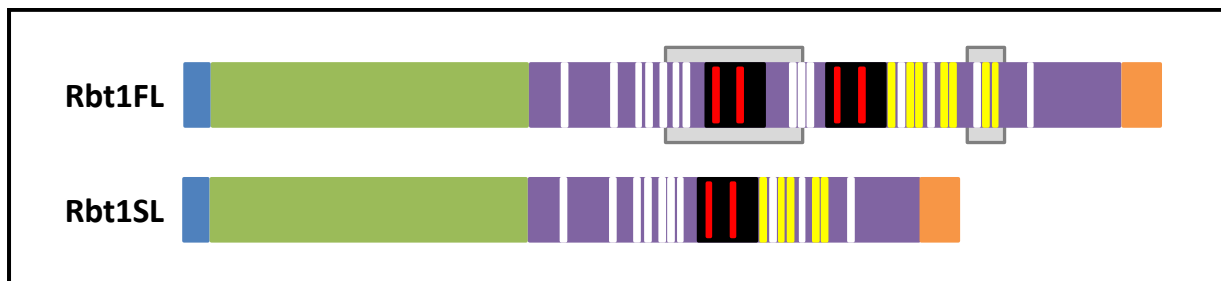
Figure 67 : Etude du rôle de *RBT1* dans la virulence dans un modèle d'infection de cornée chez le lapin (Braun et al., 2000)

## VI. Vision générale des séquences protéiques de Rbt1

Il m'a semblé opportun de résumer les différentes données obtenues sur les séquences protéiques de Rbt1 dans un schéma récapitulatif. Ainsi comme l'illustre la Figure 68, les protéines Rbt1SL et Rbt1FL sont découpées en deux domaines principaux d'après les similarités de séquences :

- un domaine N-terminal (en vert) : ce domaine, conservé dans les protéines Rbt1SL et Rbt1FL, est similaire à Flo11 et ne contient pas de sites de O-glycosylation prédits ;
- et un domaine C-terminal (en violet) : ce domaine est très riche en O-glycosylation et est homologue à Hwp1. Deux délétions (en gris) sont présentes dans la protéine Rbt1SL par rapport à Rbt1FL influant ainsi sur le nombre de répétitions des motifs PESSAP (barres blanches, 10 motifs dans Rbt1SL et 14 dans Rbt1FL), PATES (barres jaunes, 5 motifs dans Rbt1SL et 7 dans Rbt1FL) et  $T^V/I^V/T^V/I^V/TSCX_4CX_4VTTG VVVVTX_5YTTF CPL$  (cadres noirs, 1 motif dans Rbt1SL et 2 dans Rbt1FL).

Au sein des motifs  $T^V/I^V/T^V/I^V/TSCX_4CX_4VTTG VVVVTX_5YTTF CPL$ , appelés Rbt1-M1 et Rbt1-M2, deux régions à fort potentiel  $\beta$ -agrégation (barres rouges) sont prédites par l'algorithme TANGO : la première en amont de la première cystéine et la seconde entre la deuxième et la troisième cystéine.



**Figure 68 : Description générale des séquences protéiques Rbt1SL et Rbt1FL**

En bleu : peptide signal. En vert : domaine N-terminal homologue à la superfamille Flo11. En violet : domaine C-terminal fortement O-glycosylé homologue à Hwp1. En orange : peptide signal d'ancrage GPI. Encadré en gris : séquence déléetée dans Rbt1SL. Barre blanche : motif PESSAP. Barre jaune : motif PATES. Cadre noir : motif Rbt1-M. Barre rouge : séquence à fort potentiel  $\beta$ -agrégation

## C/ Modèle d'expression hétérologue chez *Saccharomyces cerevisiae*

Nous avons déterminé le rôle de la protéine Rbt1 dans l'adhésion en utilisant un système d'expression hétérologue chez la souche non adhérente *S. cerevisiae*. De la même façon, nous avons caractérisé par une approche de délétion le rôle du domaine N-terminal dans la fonction de Rbt1.

### I. Le système d'expression

Le plasmide pBC542 utilisé dans notre stratégie d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* a été construit par Zupancic *et al.* (Zupancic et al., 2008) (Figure 69). Ce plasmide permet d'une part la localisation à la paroi grâce au peptide signal d'ancrage GPI de la protéine CWP2 et d'autre part l'expression en surface par l'ajout d'une région riche en sérine et thréonine O-glycosylées. De plus, les protéines exprimées dans ce système ont une étiquette HA insérée en position centrale en amont de la région riche en O-glycosylation (Figure 70).

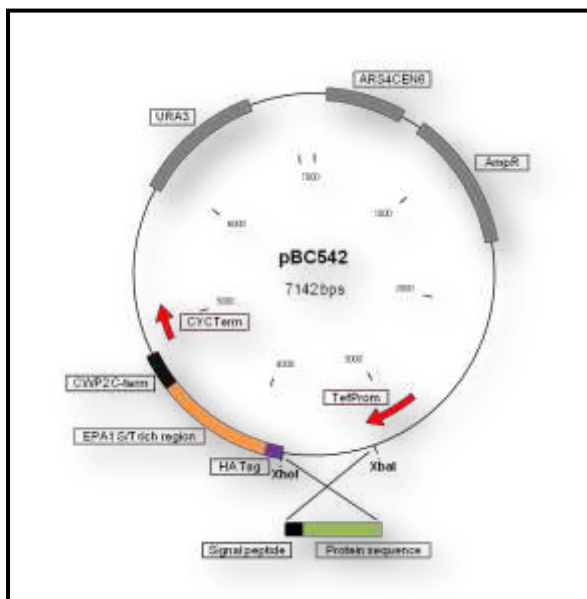


Figure 69 : Carte du plasmide pBC542

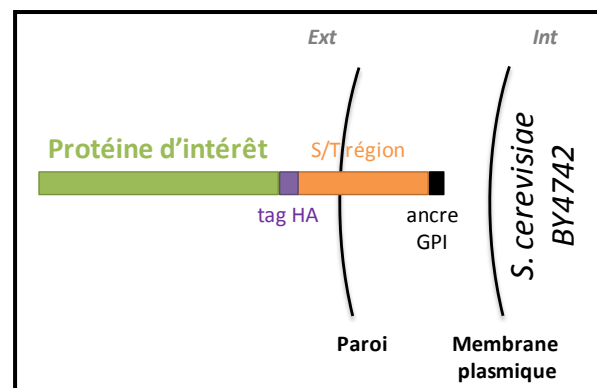


Figure 70 : Schéma d'une protéine exprimée par le vecteur pBC542

## II. La construction des souches d'expression hétérologue

### II. 1 Clonage des séquences codantes dans *S. cerevisiae*

Dans le but d'étudier le rôle de Rbt1, les protéines entières Rbt1SL et Rbt1FL ont été exprimées dans la souche de *S. cerevisiae* BY4742. Des constructions délétées du domaine N-terminal ( $\Delta$ NRbt1SL et  $\Delta$ NRbt1FL) ou composée du domaine N-terminal seul (N-term) ont été transformées dans *S. cerevisiae* afin de déterminer la fonction du domaine N-terminal. La protéine Eap1 (Enhanced Adherence to Polystyrene 1), protéine à ancre GPI de *C. albicans*, a également été clonée en tant que témoin positif pour les expériences d'adhésion au polystyrène (III. 6 p38). Les différentes protéines exprimées chez la souche *S. cerevisiae* BY4742 sont résumées en Figure 71.

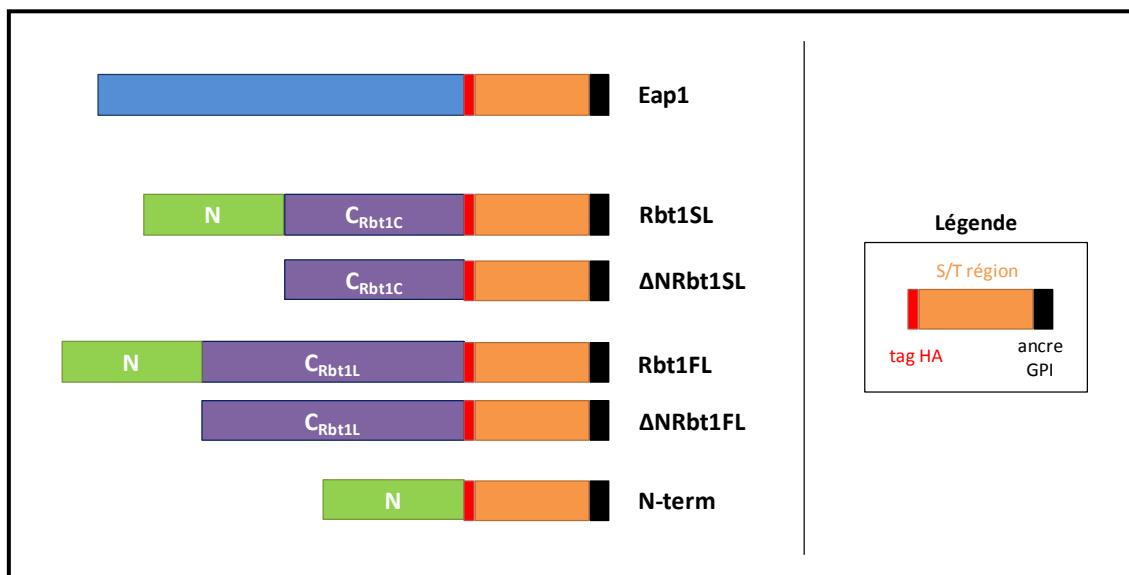


Figure 71 : Protéines exprimées chez *S. cerevisiae* BY4742

Différentes stratégies ont été utilisées pour la construction dans la souche *S. cerevisiae* BY4742. Pour obtenir les constructions exprimant les protéines Rbt1SL, Rbt1FL et Eap1, les séquences codantes ont été amplifiées à partir de l'ADN génomique de BWP17 et clonées dans le vecteur d'expression pBC542 en utilisant le système Gateway tandis que les séquences codantes des protéines  $\Delta$ NRbt1SL,  $\Delta$ NRbt1FL et N-term ont été clonées dans le vecteur pBC542 par une technique classique de digestion enzymatique (Matériels et Méthodes p153).

Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage par la société GATC au stade pBC542. Seule la construction N-term n'a pas été obtenue à ce jour et une nouvelle tentative de construction est en cours.

## II. 2 Vérification de l'exposition en surface des protéines par immunofluorescence

Nous avons vérifié l'exposition en surface des protéines Eap1, Rbt1SL,  $\Delta$ NRbt1SL, Rbt1FL et  $\Delta$ NRbt1FL dans les constructions de *S. cerevisiae* en réalisant des expériences d'immunofluorescence en utilisant un anticorps primaire anti-HA. Un marquage continu a été observé autour des levures, sans traitement de perméabilisation, pour toutes les souches d'expression hétérologue de *S. cerevisiae* (Figure 72). Ces résultats confirment l'exposition en surface des protéines exprimées *via* le plasmide pBC542.

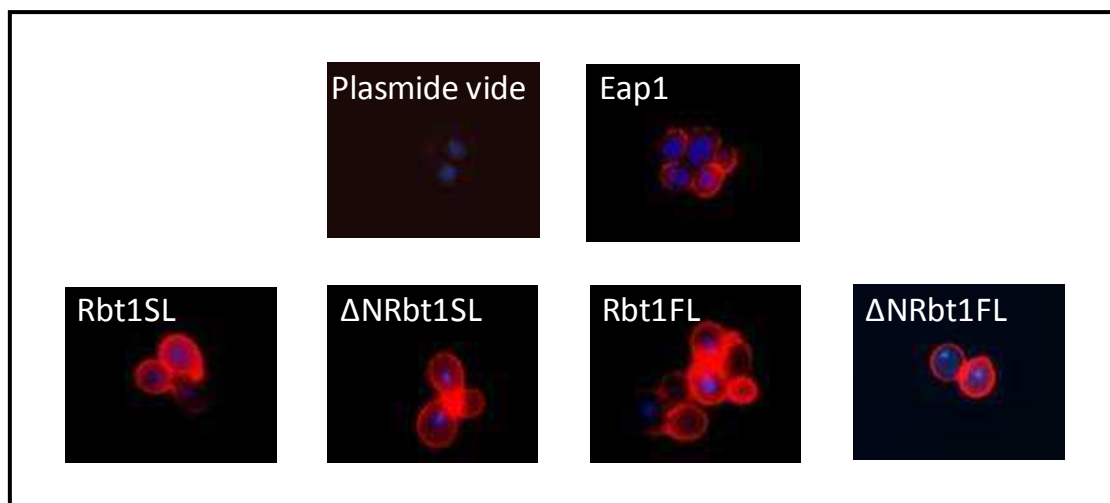


Figure 72 : Images d'immunofluorescence sur les souches de *S. cerevisiae* non perméabilisées

## III. Rôle de Rbt1 dans l'adhésion au polystyrène

Les propriétés d'adhésion au polystyrène de chacune des souches de *S. cerevisiae* (constructions Rbt1, témoin négatif vecteur vide et témoin positif Eap1) ont été déterminées en plaque 24 puits traitée pour la culture cellulaire après 1h d'incubation à 28°C. Les cellules non adhérentes ont été éliminées puis les cellules adhérentes ont été quantifiées par coloration au cristal violet. La quantité de cristal violet relarguée par l'acide acétique est relative à la quantité de cellules présentes dans le puits. Les résultats sont exprimés en valeurs de densité optique mesurées à 595 nm, longueur d'onde d'absorbance du cristal violet.



### III. 1 Adhésion des souches exprimant les deux formes de Rbt1

Après 1h d'incubation, nous observons que les souches qui expriment l'une ou l'autre forme de Rbt1, Rbt1SL ou Rbt1FL, adhèrent au polystyrène (Figure 73) : les quantités de biomasse sont respectivement 10,6 et 12,4 fois plus importantes pour les souches exprimant Rbt1SL et Rbt1FL en comparaison avec la souche transformée avec le vecteur vide. Ces résultats indiquent que les deux formes de Rbt1 contribuent à l'adhésion au polystyrène avec une efficacité plus grande pour la forme longue Rbt1FL. En parallèle, les valeurs de biomasse obtenues pour la souche qui exprime la protéine Eap1 ne sont augmentées que d'un facteur 8,9 par rapport au témoin négatif.

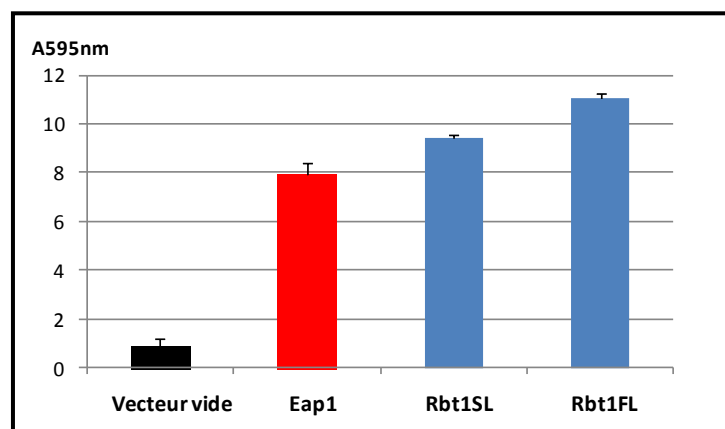


Figure 73 : Test d'adhésion au polystyrène en plaque 24 puits à 28°C

### III. 2 Rôle du domaine N-terminal de Rbt1

Comme illustré en Figure 74, les souches qui expriment uniquement les protéines Rbt1 déléetées du domaine N-terminal,  $\Delta$ NRbt1SL et  $\Delta$ NRbt1FL, adhèrent au polystyrène à un niveau similaire au témoin vecteur vide.

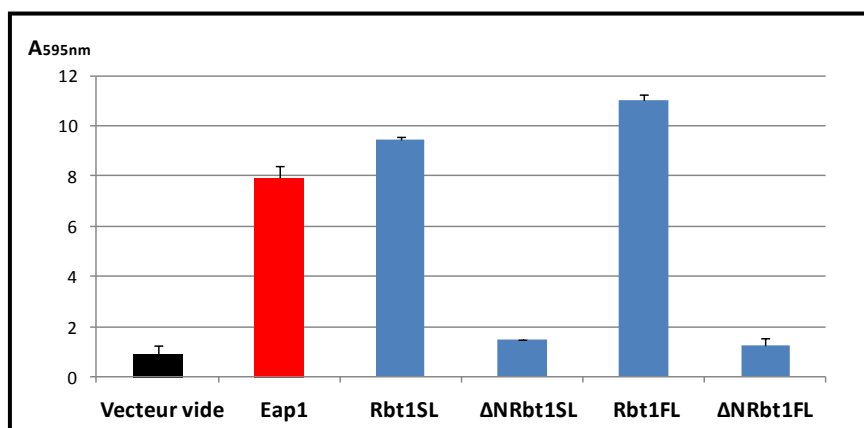


Figure 74 : Test d'adhésion au polystyrène en plaque 24 puits à 28°C

En comparaison avec les valeurs obtenues avec les souches exprimant les formes entières Rbt1SL et Rbt1FL, les taux de biomasse sont respectivement 6,3 fois moindres pour  $\Delta$ NRbt1SL et 8,9 fois moindres pour  $\Delta$ NRbt1FL. Ces résultats suggèrent que le domaine N-terminal des protéines Rbt1SL et Rbt1FL est essentiel à la fonction d'adhésine de Rbt1.

#### IV. Rôle de Rbt1 dans la formation de biofilm

En parallèle des tests d'adhésion sur polystyrène, nous avons étudié le rôle de la protéine Rbt1 dans la formation de biofilm. Après 1h d'adhésion, les cellules ayant adhéré au polystyrène ont été incubées pendant 24h supplémentaires à 28°C afin d'étudier la formation de biofilm. La biomasse des biofilms a été évaluée quantitativement par coloration au cristal violet.

Les valeurs de DO mesurées à 595 nm atteignent respectivement 25,4 et 34,0 pour les souches exprimant Rbt1SL et Rbt1FL (Figure 75). De plus, les ratios d'accumulation de biomasses entre 24h de formation de biofilm et 1h d'adhésion sont de 2,7 pour la souche Rbt1SL et 3,1 pour la souche Rbt1FL. Ce ratio est de 2,2 pour la souche exprimant la protéine Eap1. Ces résultats indiquent que les protéines Rbt1 sont impliquées dans l'adhésion cellule-polystyrène et dans l'adhésion cellule-cellules avec une efficacité plus importante pour la forme longue Rbt1FL par rapport à la forme courte Rbt1SL.

Les souches exprimant les protéines Rbt1 délétées du domaine N-terminal,  $\Delta$ NRbt1SL et  $\Delta$ NRbt1FL, ne forment pas de biofilm après 24h d'incubation. Ces résultats suggèrent que le domaine N-terminal essentiel à la fonction d'adhésine de Rbt1 est indispensable pour la formation de biofilm.

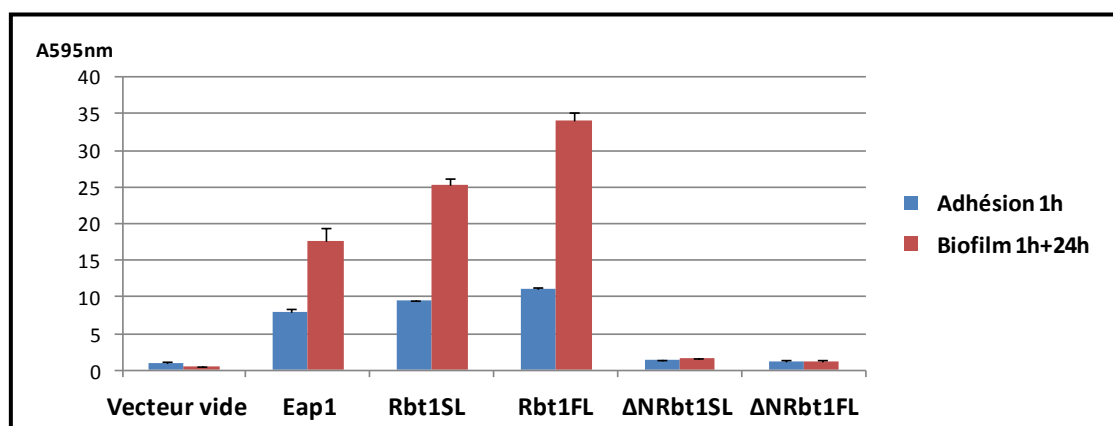


Figure 75 : Test d'adhésion au polystyrène et de formation de biofilm en plaque 24 puits à 28°C

## V. Expression de Rbt1 et propriétés de surface

### V.1 Hydrophobicité de surface

Nous avons caractérisé les propriétés de surface des souches exprimant les différentes versions de Rbt1 en déterminant le pourcentage d'hydrophobicité de surface de ces souches par une méthode basée sur l'affinité au décane. Marie-Noëlle Bellon-Fontaine et Margareth Renault de l'Unité Bioadhésion-Biofilms et Hygiène des matériaux, MICALIS (INRA, Massy) nous ont apporté leur aide pour adapter cette technique à nos souches. Comme nous le montre la Figure 76, l'hydrophobicité de surface des souches exprimant les formes entières de Rbt1 est augmentée en comparaison avec celle de la souche exprimant le vecteur vide : elle passe de 22,8 % pour le témoin négatif à 56,4% lorsque la souche exprime Rbt1SL et 63,8% pour Rbt1FL. Les souches qui expriment uniquement le domaine C-terminal des protéines Rbt1 ont une hydrophobicité de surface similaire à celle de la souche contrôle. Ces résultats suggèrent que l'expression à la surface des protéines Rbt1 entières augmente l'hydrophobicité de surface des levures et que le domaine N-terminal de Rbt1 est impliqué dans cette propriété. Nous avons également montré que l'hydrophobicité de surface est augmentée lorsque la protéine Eap1 est exprimée à la surface des levures.

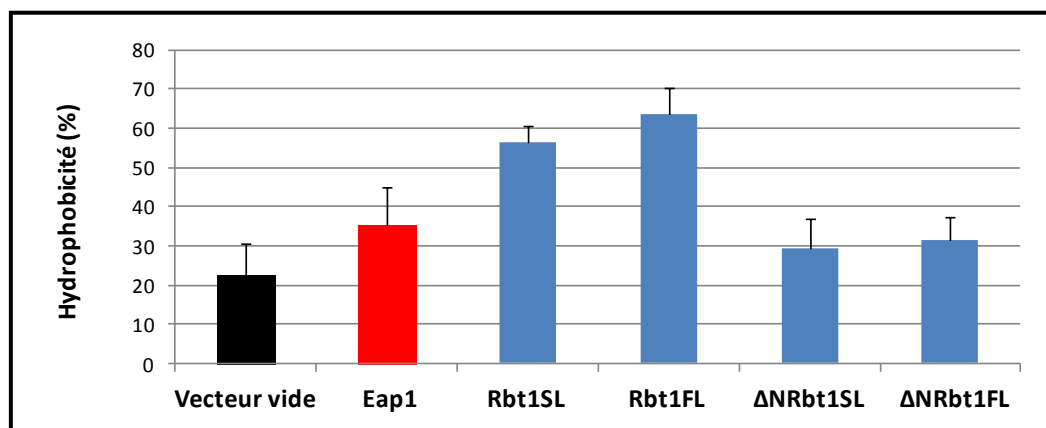
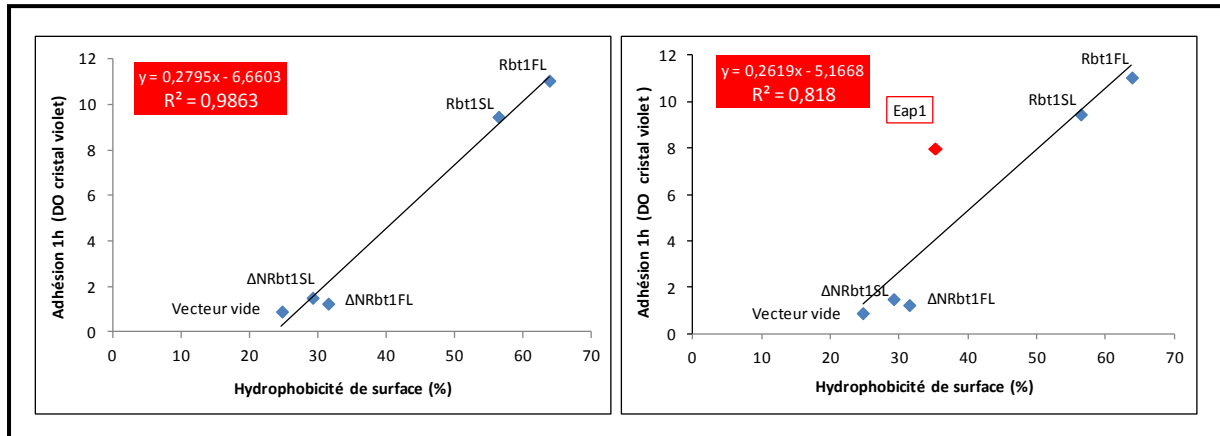


Figure 76 : Hydrophobicité de surface (en %) des souches de *S. cerevisiae*

### V.2 Corrélation entre adhésion et hydrophobicité de surface

Puisque les propriétés d'adhésion et d'hydrophobicité de surface des souches exprimant les différentes constructions de Rbt1 évoluent dans le même sens, nous avons représenté graphiquement les valeurs d'hydrophobicité de surface en fonction des valeurs d'adhésion au polystyrène (Figure 77). Le facteur de corrélation linéaire,  $R^2$ , obtenu avec les quatre constructions

de Rbt1 et la construction vecteur vide est de 0,9863. Ce résultat indique que la fonction d'adhésine de Rbt1 est due essentiellement à son caractère hydrophobe porté par le domaine N-terminal. Lorsque l'on ajoute les valeurs obtenues pour la construction exprimant la protéine Eap1 aux valeurs précédentes, le facteur de corrélation linéaire,  $R^2$ , n'est plus que de 0,818. Ce résultat suggère que l'hydrophobicité de surface n'est pas l'unique propriété caractérisant la fonction d'adhésine pour la protéine Eap1.



**Figure 77 : Corrélation entre adhésion au polystyrène et hydrophobicité de surface**

A gauche : constructions vecteur vide + Rbt1 (Rbt1SL, Rbt1FL, ΔNRbt1SL, ΔNRbt1FL)

A droite : constructions vecteur vide + Rbt1 (Rbt1SL, Rbt1FL, ΔNRbt1SL, ΔNRbt1FL) + Eap1

## D/Modèle de surexpression chez *Candida albicans*

### I. La surexpression de Rbt1 dans *C. albicans*

La stratégie utilisée pour la surexpression de *RBT1* dans *C. albicans* est le remplacement du promoteur natif de *RBT1* par le promoteur fort constitutif *TEF1* par double recombinaison homologue (Figure 78) (Matériels et Méthodes p155). Deux souches de surexpression ont été obtenues :

- la souche OExRbt1SL qui surexprime l'allèle court de *RBT1* (l'allèle long est exprimé sous le contrôle natif de *RBT1*) ;
- et la souche OExRbt1FL qui surexprime l'allèle long de *RBT1* (l'allèle court est exprimé sous le contrôle natif de *RBT1*).

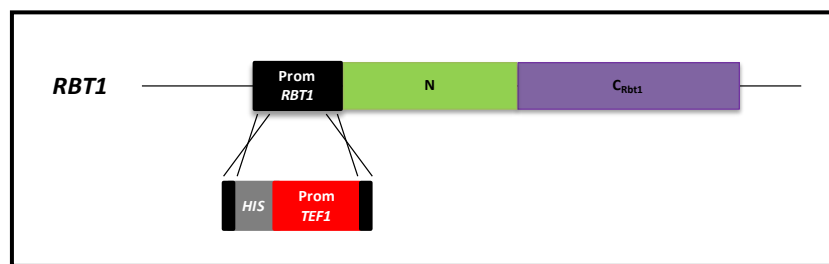


Figure 78 : Remplacement du promoteur natif de *RBT1* par le promoteur fort constitutif *TEF1* par double recombinaison homologue

### II. Surexpression de *RBT1* indépendante de la forme hyphes

Le niveau d'expression du gène *RBT1* a été mesuré par qPCR pour la souche sauvage DAY185 et les souches de surexpression OExRbt1SL et OExRbt1FL pour les formes levures et hyphes (Figure 79). Les levures ont été prélevées en phase exponentielle (DO=1) tandis que les hyphes ont été prélevées après 2h d'induction de la filamentation en milieu SC pH7 à 37°C à partir d'une préculture en milieu SC pH5 à 30°C diluée à DO=1. Les niveaux d'ARNm de *RBT1* mesurés atteignent 47,1 % et 40,1 % de l'actine pour les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL en forme levure respectivement. Pour la souche sauvage DAY185, le niveau d'ARNm de *RBT1* mesuré est inférieur à 0,1 % du gène de l'actine. En forme hyphes, le niveau d'expression de *RBT1* est de 61,4 % et 47,2 % du gène de l'actine pour respectivement les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL tandis que celui-ci atteint 8,3 % du gène de l'actine pour la souche sauvage DAY185. Ainsi en forme hyphes, les taux d'expression de *RBT1* dans

les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL sont respectivement augmentés d'un facteur 7,4 et 5,7 par rapport à la souche sauvage DAY185.

Les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL expriment donc à un niveau supérieur le gène *RBT1* par rapport aux niveaux d'expression de *RBT1* sous son propre promoteur. Les niveaux d'expression de *RBT1* en forme levure et en forme hyphe sont comparables entre les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL.

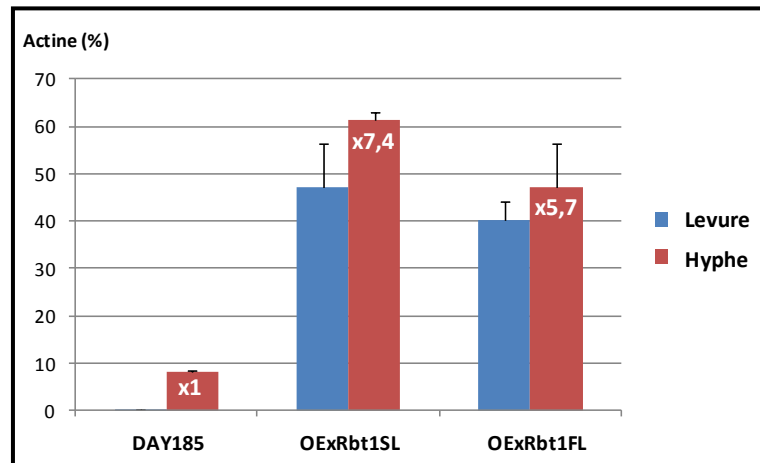


Figure 79 : Mesure du niveau d'expression du gène *RBT1* par qPCR

### III. Croissance des souches de surexpression

Nous avons établi les courbes de croissances des souches DAY185, OExRbt1SL et OExRbt1FL en suivant pendant 24h leur croissance en milieu SC pH7 à 37°C à partir d'une culture en milieu SC pH7, 30°C DO=1 diluée à DO=0,25. Les courbes représentées en logarithme népérien du nombre de cellules sont illustrées en Figure 80.

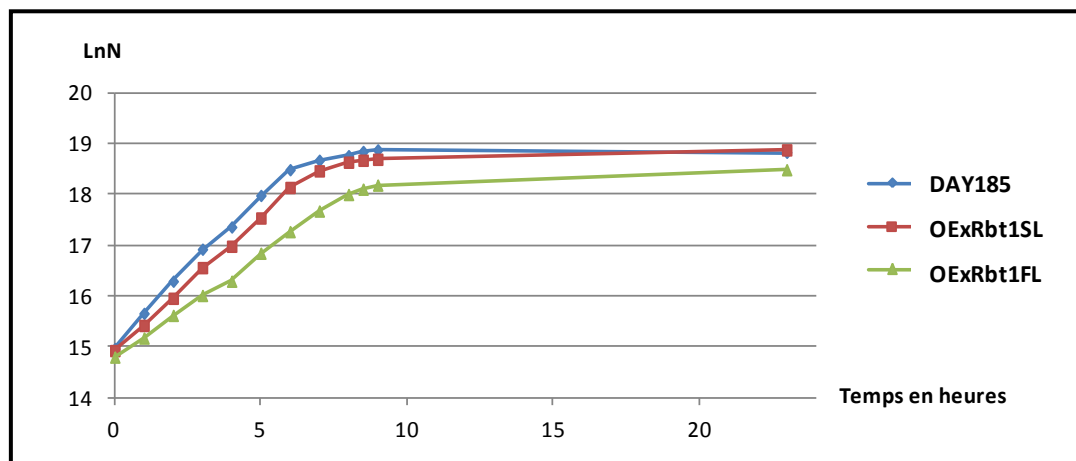


Figure 80 : Courbes de croissances des souches DAY185, OExRbt1SL et OExRbt1FL en milieu SC pH7 à 37°C

Dans ces conditions, il n'y a pas de phase de latence. La croissance des souches de surexpression de Rbt1 est ralentie par rapport à celle de la souche sauvage, avec un effet beaucoup plus marqué pour la souche qui surexprime l'allèle long de Rbt1. A titre d'illustration les densités optiques mesurées à 595 nm après 6 heures de culture sont de 8,8 pour DAY185 contre 6,2 pour OExRbt1SL et 2,6 pour OExRbt1FL. En phase stationnaire, les valeurs d'absorbance obtenues sont 12,4 pour DAY86, 13 pour OExRbt1SL et 8,8 OExRbt1FL.

## IV. Rbt1 et filamentation

Sachant que la protéine Rbt1 est exprimée uniquement en forme hyphe dans la souche sauvage, nous avons voulu vérifier que la surexpression de Rbt1 en forme levure n'avait pas d'impact sur le profil de filamentation des souches de surexpression de l'une ou de l'autre forme de Rbt1.

### IV. 1 Sur milieu Spider

Nous avons également observé les souches DAY185, OExRbt1SL et OExRbt1FL après 5 jours de filamentation à 37°C sur milieu Spider (Figure 81). L'observation macroscopique des colonies montre d'une part que la croissance des souches de surexpression de Rbt1 n'est pas retardée sur milieu Spider et d'autre part que ces souches n'ont ni un défaut ni un excès de filamentation.

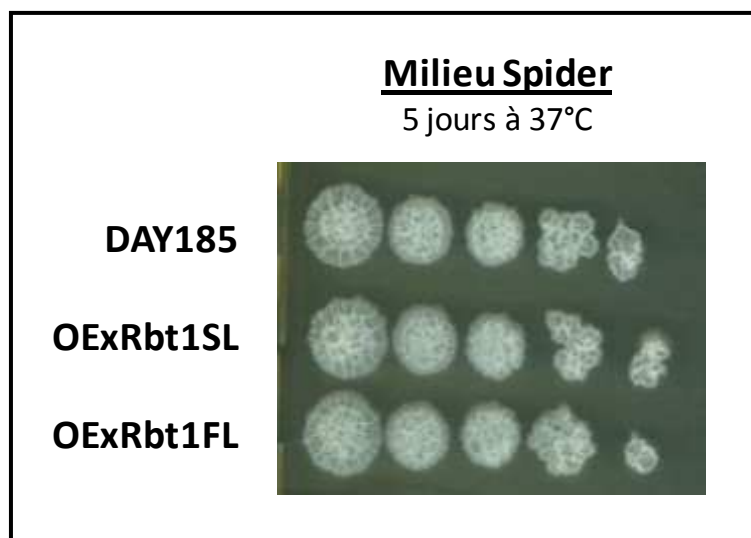


Figure 81 : Observations macroscopiques des colonies incubées sur milieu Spider pendant 5 jours à 37°C

## IV. 2 En milieu semi-solide

Les souches DAY185, OExRbt1SL et OExRbt1FL ont été ensemencées dans une gélose YPS contenant 1 % d'agar et incubées à 25°C. Les colonies formées dans la gélose ont été observées au microscope toutes les 24h et des photos ont été prises aux temps 72h et 144h (Figure 82). Aucune différence dans la cinétique de filamentation n'a été observée pour les souches qui surexpriment la protéine Rbt1 par rapport à la souche sauvage : après 72h d'incubation, les colonies formées dans la gélose présentent un ou deux prolongements synonymes du début de la filamentation tandis qu'après 144h d'incubation de nombreux prolongements recouvrent la totalité de la surface des colonies caractérisant une filamentation bien avancée.

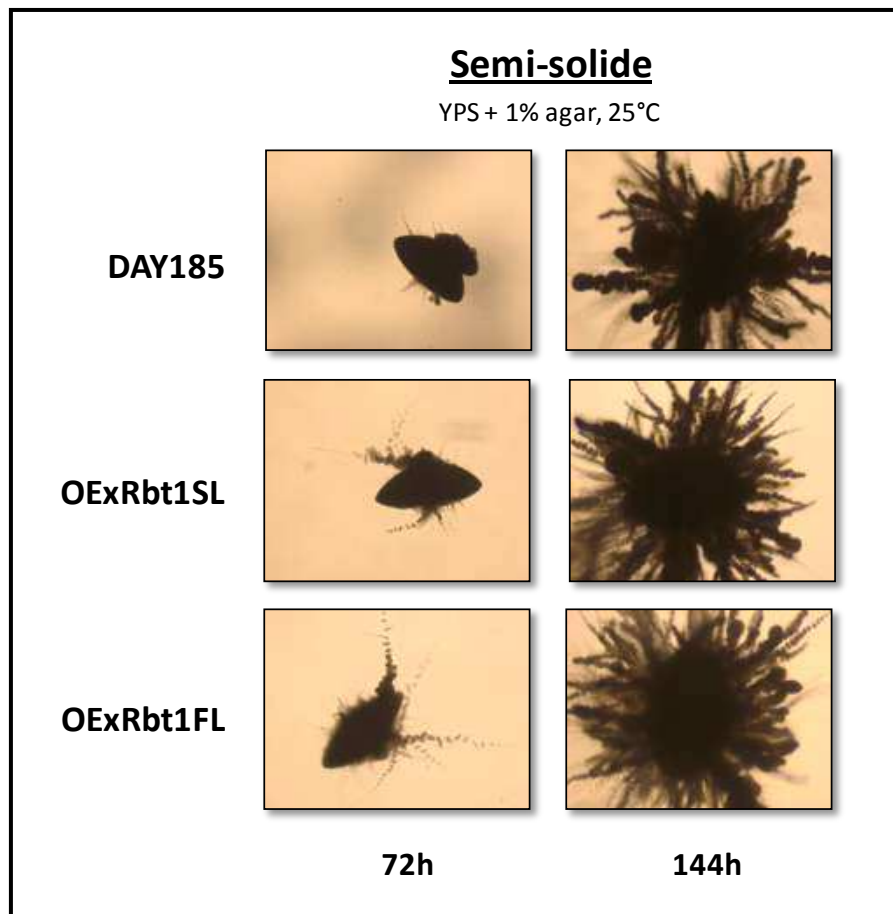


Figure 82 : Observations microscopiques des colonies incubées en condition de filamentation dans un milieu semi-solide à 25°C



## V. Rbt1 et adhésion cellulaire

Les propriétés d'adhésion des souches de *C. albicans* surexprimant soit Rbt1FL soit Rbt1SL a été testée sur deux types cellulaires : les cellules HeLa issues d'un cancer du col utérin et les cellules Caco-2 issues d'un cancer du colon. L'adhésion de *C. albicans* aux cellules HeLa est quantifiée par dénombrement cellulaire tandis que l'adhésion aux cellules Caco-2 est déterminée par coloration de la chitine de la paroi fongique.

### V. 1 Cellules HeLa

L'adhésion des souches aux cellules HeLa a été déterminée après une étape d'incubation en coculture de 45 minutes à 37°C. Les résultats obtenus en pourcentage de cellules adhérentes sont représentés en Figure 83. La souche de référence DAY185 a un taux d'adhésion de 15,1 % aux cellules HeLa. Le taux d'adhésion de la souche surexprimant l'allèle court de Rbt1, OExRbt1SL, est similaire à celui de la souche de référence (14,9 %) alors que la souche surexprimant l'allèle long de Rbt1, OExRbt1FL, a un taux d'adhésion réduit à 9,7 %. Ce résultat montre que la surexpression de l'allèle long de Rbt1 induit un défaut d'adhésion aux cellules HeLa.

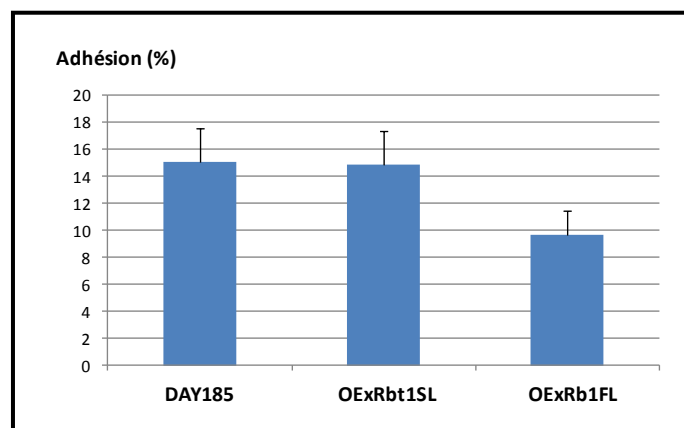


Figure 83 : Adhésion aux cellules HeLa en pourcentage après 45 minutes à 37°C

### V. 2 Cellules Caco-2

Les expériences sur cellules Caco-2, adhésion et cytotoxicité, ont été réalisées en collaboration avec Marc Sautour et Frédéric Dalle du Laboratoire Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire (Dijon). L'adhésion aux cellules épithéliales Caco-2 a été testée pendant 30 minutes à 37°C (Figure 84). Les résultats exprimés en pourcentage montrent que la souche OExRbt1SL a une adhésion

similaire à la souche sauvage DAY185, respectivement 11,1 % et 9,6 %. De même que lors des tests d'adhésion aux cellules HeLa, le pourcentage d'adhésion de la souche OExRbt1FL est légèrement diminué (7,3 %).

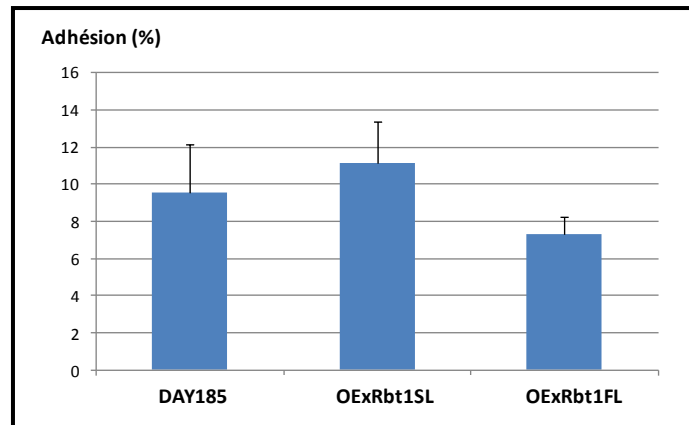


Figure 84 : Adhésion aux cellules Caco-2 en pourcentage après 30 minutes à 37°C

## VI. Rbt1 et cytotoxicité

Les propriétés cytotoxiques des souches surexprimant l'un ou l'autre des allèles de Rbt1 ont été évaluées sur cellules Caco-2 (Figure 85). Les résultats, exprimés en valeurs brutes, montrent par intensité de la fluorescence une cytotoxicité de 158 pour la souche sauvage DAY185. La souche OExRbt1SL est légèrement moins cytotoxique (valeur brute de 126) par rapport à la souche de référence tandis que la souche OExRbt1FL a une cytotoxicité fortement diminuée correspondant à un facteur 1,7 (valeur brute de 95). Les souches surexprimant la protéine Rbt1 sont donc moins cytotoxiques que la souche sauvage avec un effet plus important pour la souche qui exprime la forme longue de Rbt1, OExRbt1FL.

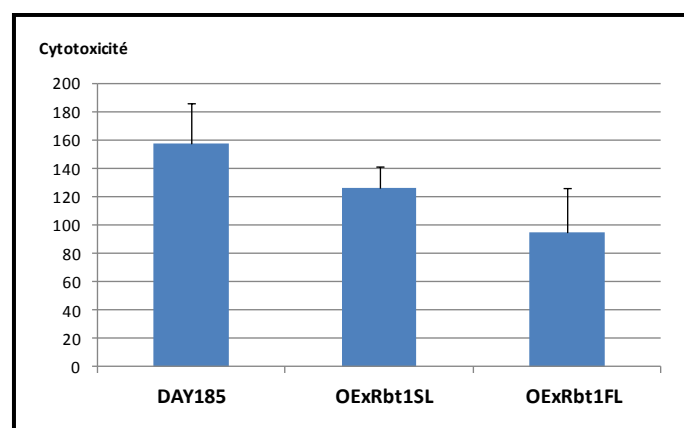


Figure 85 : Essais de cytotoxicité sur cellules Caco-2

## VII. Rbt1 et formation de biofilm

### VII.1 Thermanox™

Des expériences de formation de biofilm ont été réalisées sur lamelles de Thermanox™ en microfermenteur après une étape d'adhésion de 30 minutes à température ambiante. Ce système de microfermenteur permet l'apport d'un flux continu de milieu frais tout au long de la formation de biofilm (Garcia-Sanchez et al., 2004) (Figure 86). Ces expériences ont été réalisées à l'Institut Pasteur (Paris) en collaboration avec Christophe d'Enfert et Murielle Chauvel de l'Unité de Biologie et Pathogénicité fongiques.

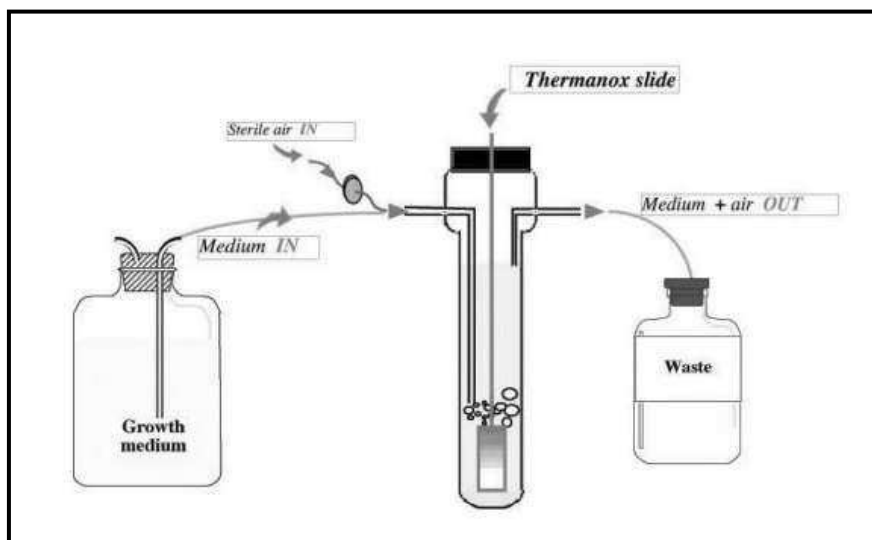


Figure 86 : Schéma du dispositif du microfermenteur (Garcia-Sanchez et al., 2004)

Les biomasses des biofilms ont été déterminées par mesure du poids secs après 40h d'incubation à 37°C, les résultats ont ensuite été normalisés à 100 % pour la souche sauvage DAY185 (Figure 87). Les biofilms formés par les souches surexprimant la protéine Rbt1 sont plus conséquents que celui formé par la souche sauvage représentant respectivement 120 % et 142 % de la biomasse du biofilm formé par la souche sauvage pour les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL. L'observation microscopique des lamelles de Thermanox™ n'a révélé aucune différence entre ces trois souches après l'étape d'adhésion de 30 minutes à température ambiante. De plus, une observation macroscopique des biofilms en cours de formation, après 24h, n'a pas mis en évidence une formation plus rapide quelque soit la souche étudiée. A noter également que le biofilm formé à partir de la souche OExRbt1FL est fragile et se détache plus facilement des lamelles de Thermanox™ par rapport à ceux formés par les deux autres souches (Figure 88).

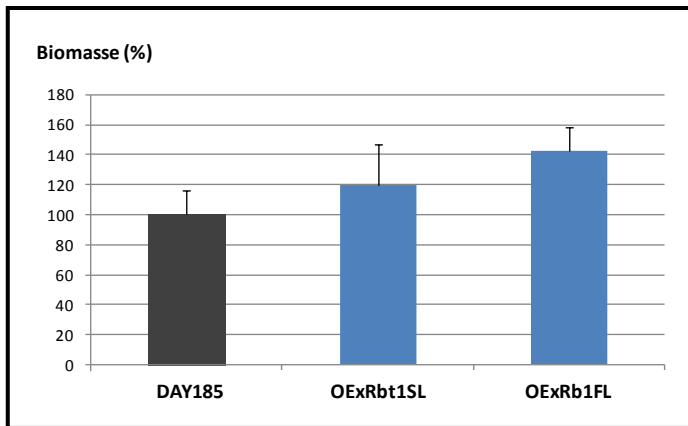


Figure 87 : Biofilm sur Thermanox™ en microfermenteur après 40h à 37°C (biomasses en pourcentage)

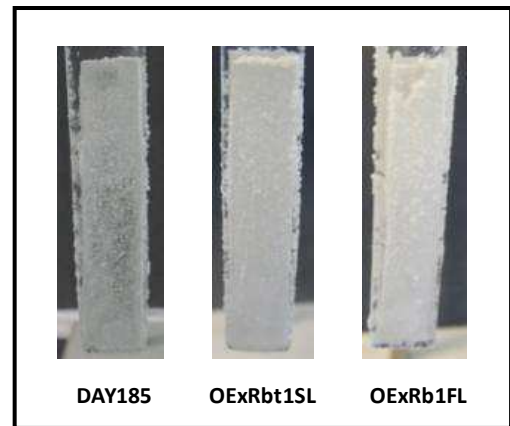


Figure 88 : Photos des lamelles de Thermanox® après 40h d'incubation à 37°C

## VII. 2 Silicone

Des expériences de formation de biofilm ont également été réalisées sur des carrés de silicone préincubés avec du sérum. Après une étape d'adhésion de 90 minutes à 37°C, les carrés de silicone ont été lavés puis placés dans une plaque de polystyrène de 12 puits (1 carré de silicone par puits) dans du milieu frais pendant 72h d'incubation à 37°C. Les biofilms formés au bout de 72h ont été quantifiés par mesure du poids sec (Figure 89). Les résultats confirment ceux obtenus sur lamelles de Thermanox™ à savoir un biofilm plus important pour les souches OExRbt1SL (8,4 mg) et OExRbt1FL (9,2 mg) en comparaison avec celui formé pour la souche sauvage (7,4 mg). Il est important de souligner, encore une fois, que c'est la souche qui surexprime l'allèle long de Rbt1 qui se distingue le plus de la souche sauvage. Pour les trois souches testées, les observations macroscopiques des carrés de silicone placés dans une plaque de polystyrène de 12 puits montrent que les biofilms formés sont localisés à la surface des carrés de silicone et qu'il n'y a pas de croissance cellulaire en suspension dans le milieu de culture (Figure 90).

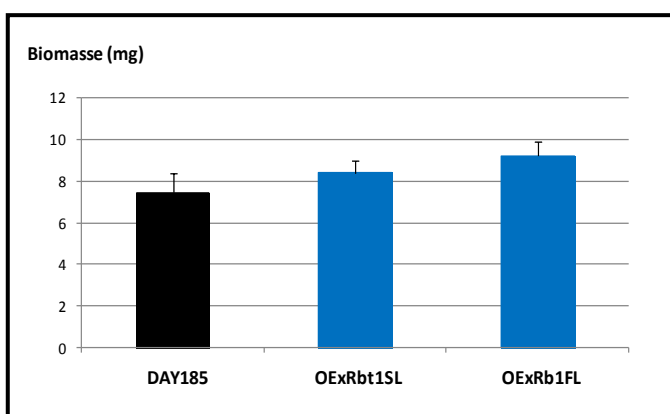


Figure 89 : Biofilm sur silicone en plaque 12 puits après 72h à 37°C (biomasses en mg)

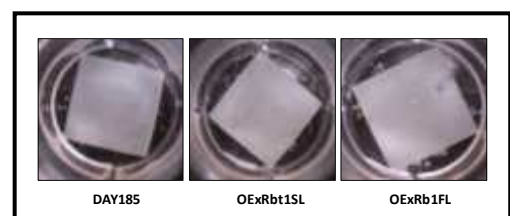


Figure 90 : Photos des carrés de silicone après 72h d'incubation à 37°C

## VIII. Rbt1 et agrégation cellulaire

### VIII. 1 Agrégation

Les souches de surexpression de Rbt1 (OExRbt1SL et OExRbt1FL) et le mutant de délétion  $\Delta rbt1$  (CAY171) ainsi que les souches de référence associées (respectivement DAY185 et CAY1175) ont été incubées dans des conditions permettant la croissance en forme levure (en milieu SC pH5 à 30°C pendant une nuit) ou l'induction de la filamentation (après dilution de la culture en forme levure en milieu SC pH7 et incubation à 37°C pendant 24h). Des observations microscopiques des cultures de ces cinq souches en forme levure et en forme hyphe ont été réalisées (Figure 91). Lorsque les souches sont sous forme levure aucune d'entre elles ne présente de phénotype. Cependant, lorsque ces souches sont sous forme hyphe, des agrégats ont été observés. Les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL forment des agrégats de tailles plus importantes par rapport à ceux de la souche sauvage DAY185. De plus, les agrégats formés par la souche OExRbt1FL sont très compacts et de tailles très supérieures à ceux formés par la souche OExRbt1SL suggérant que le nombre de séquences à hauts potentiels de  $\beta$ -agrégation prédites *via* le serveur TANGO (B/II p91) a une influence sur la formation d'agrégats. Par ailleurs, l'absence de formation d'agrégats par le mutant  $\Delta rbt1$  (CAY171) en comparaison avec les agrégats formés par la souche de référence CAY1175 valide le rôle de la protéine Rbt1 dans la formation d'agrégats.

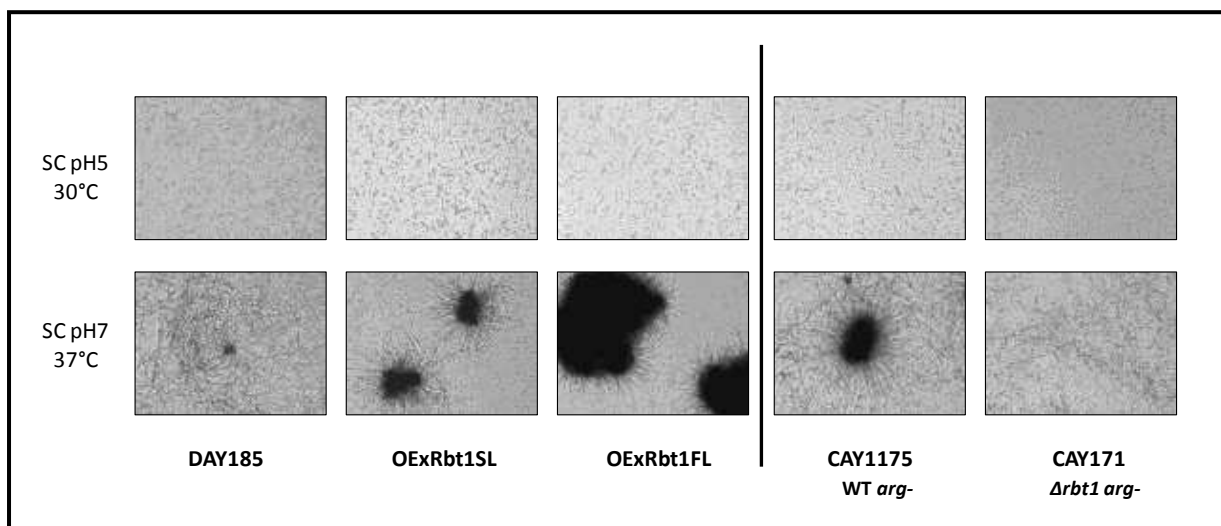


Figure 91 : Observations microscopiques des souches en forme levures (après 24h de culture en milieu SC pH5 à 30°C) et en forme hyphes (après passage en milieu SC pH7 à 37°C pendant 24h)

## VIII. 2 Floculation

La floculation des cultures en forme hyphe des souches DAY185, OExRbt1SL et OExRbt1FL obtenues après 24h d'incubation en milieu SC pH7 à 37°C a été analysée en tubes (Figure 92). Après seulement 15 secondes de sédimentation, la souche OExRbt1FL a totalement floculé au fond du tube. Ce phénomène s'explique par la taille des agrégats formés par cette souche. La vitesse de sédimentation de la souche OExRbt1SL est similaire à celle de la souche sauvage DAY185.

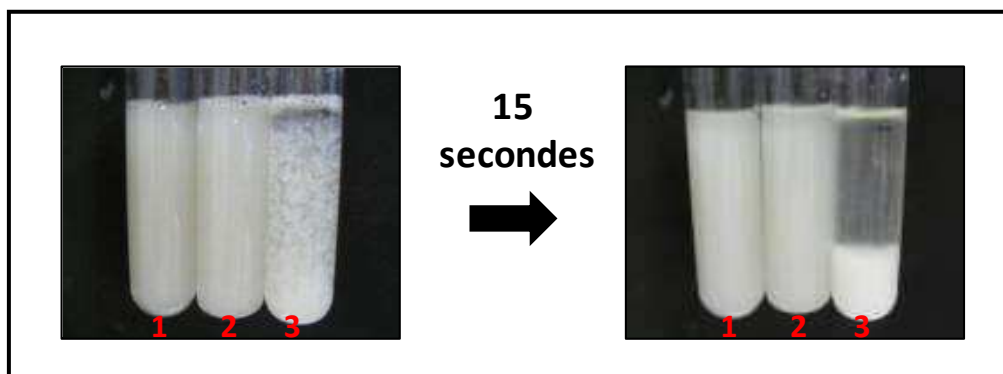


Figure 92 : Observations macroscopiques des cultures après 24h d'induction de la filamentation (en milieu SC pH7 à 37°C) au temps t=0 et t=15s de sédimentation (En 1 : DAY185. En 2 : OExRbt1SL. En 3 : OExRbt1FL)

## VIII. 3 Hydrophobicité de surface

Les propriétés de surface des souches en forme levure et en forme hyphe ont été caractérisées en déterminant leur hydrophobicité de surface par une méthode d'affinité au décane (Figure 93). Sous forme levure, l'hydrophobicité de surface des souches OExRbt1SL et OExRbt1FL, respectivement 31,1 % et 46,3 %, est augmentée par rapport à celle de la souche sauvage DAY185 (17,6 %). La délétion du gène *RBT1* ne modifie pas l'hydrophobicité de surface de *C. albicans* (20,4 % pour la souche sauvage CAY1175 et 20,9 % pour le mutant de délétion  $\Delta rbt1$ ). De manière générale, l'hydrophobicité de surface de chaque souche est augmentée lorsque la filamentation est induite. Toutefois, les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL doublent leur hydrophobicité de surface et atteignent respectivement 60,2 % et 90,7 % d'hydrophobicité tandis que la souche sauvage DAY185 fait mieux en la triplant (51 % d'hydrophobicité). Ces résultats montrent qu'en forme hyphe seule la souche OExRbt1FL a une hydrophobicité de surface significativement augmentée par rapport à la souche sauvage. Les propriétés très hydrophobes de cette souche (90,7 %) pourraient expliquer physiquement la morphologie très compacte des agrégats formés par les formes mycéliennes de OExRbt1FL. De plus, les résultats d'hydrophobicité de surface montrent que le mutant de délétion  $\Delta rbt1$  est légèrement moins hydrophobe (52,6 %) par rapport à la souche sauvage de référence CAY1175 (56,8 %).

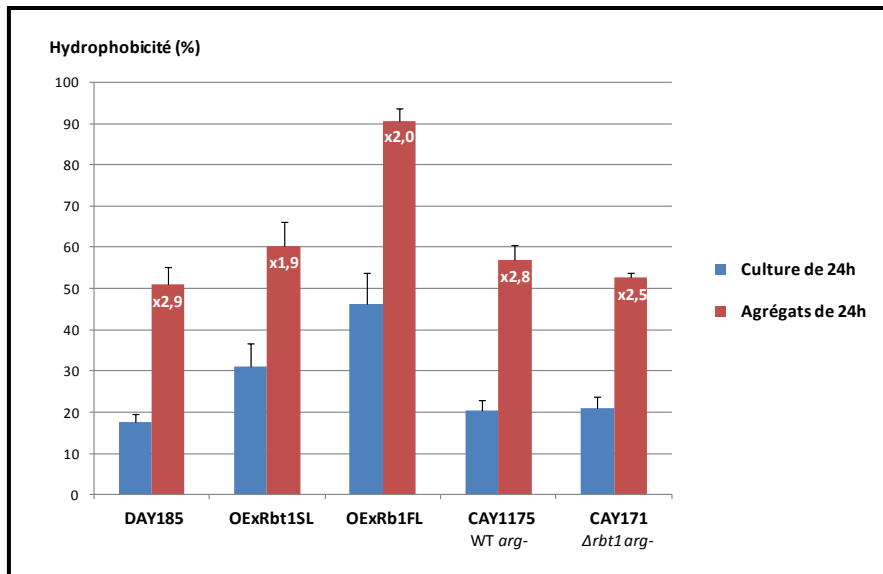


Figure 93 : Hydrophobicité de surface (en %) des souches surexprimant ou délétée pour Rbt1 en forme levure (En bleu : culture de 24h) et en forme hyphe (En rouge : agrégats de 24h)

#### VIII. 4 Propriétés des séquences à fort potentiel de $\beta$ -agrégation

Afin de déterminer le rôle des séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation dans les séquences protéiques de Rbt1 prédites *via* le serveur TANGO dans la formation d'agrégats par les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL, des expériences d'agrégation en présence de peptides ont été réalisées. Deux peptides ont été synthétisés : le premier nommé peptide WT correspond à la séquence protéique à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation prédite dans les séquences de Rbt1 VTTGVVVVTS ; le second nommé peptide V\*N est un peptide muté (le premier acide aminé valine étant remplacé par une asparagine) qui n'a plus le potentiel d'une séquence à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation (Figure 94).

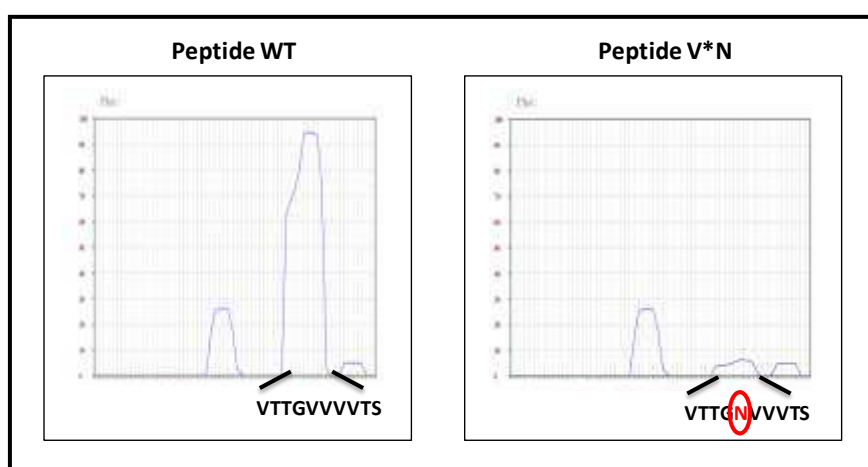


Figure 94 : Prédiction des régions de  $\beta$ -agrégation dans les séquences protéiques des peptides WT et V\*N (<http://tango.crg.es/>)

Pour ces expériences, la filamentation a été induite pendant 2h à 37°C en milieu SC pH7 en absence de peptide ou en présence de peptide WT à 2 µg/ml ou de peptide V\*N à 20 µg/ml puis les cultures ont été incubées à température ambiante pendant 24h (Figure 95). Les observations microscopiques montrent que la présence du peptide WT favorise la formation d'agrégats pour les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL (les agrégats sont plus compacts en présence de peptide WT qu'en absence de peptide) alors que la souche sauvage DAY185 ne forme pas d'agrégats en présence de peptide WT. De plus, les conditions de culture en présence de peptide V\*N inhibent la formation d'agrégats pour les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL par rapport aux conditions de culture sans peptide. Ces résultats prouvent que la séquence VTTGVVVVTS prédite à fort potentiel de β-agrégation *via* le serveur TANGO, présente en un seul exemplaire dans la protéine Rbt1SL et en deux exemplaires dans la protéine Rbt1FL, est la séquence responsable de la formation d'agrégats et donc des interactions cellule/cellule pour les souches OExRbt1SL et OExRbt1FL.

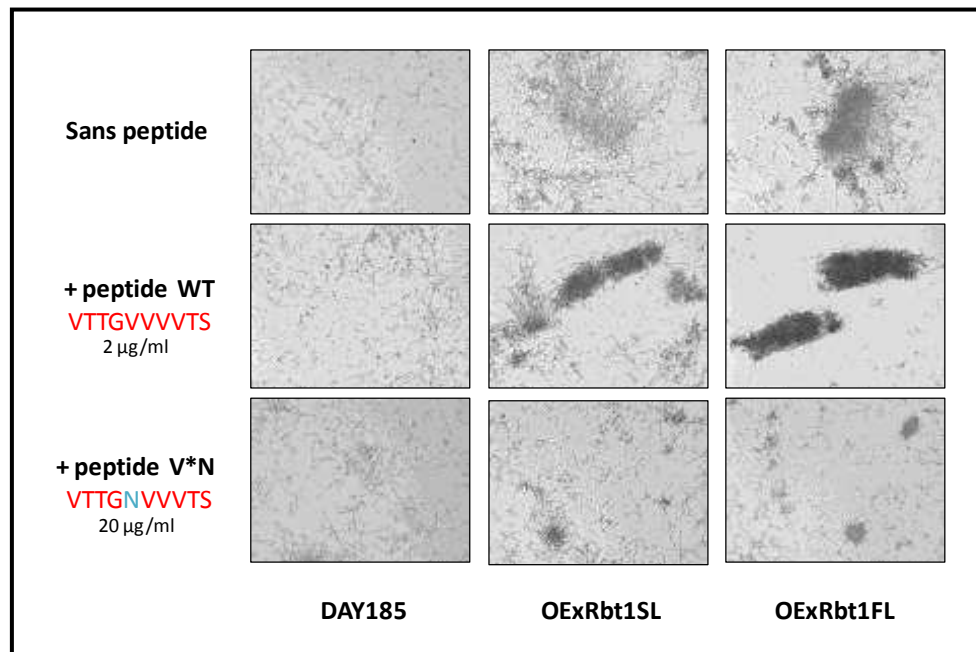


Figure 95 : Observations microscopiques des souches après 24h d'incubation à température ambiante précédée de 2h d'incubation à 37°C en milieu SC pH7 en absence ou en présence de peptide (WT ou V\*N)



## E/ Localisation de Rbt1

Dans le but de localiser les protéines Rbt1SL et Rbt1FL dans les formes levures et hyphes, des souches étiquetées V5 (insertion d'une étiquette V5 entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal de Rbt1) ont été construites. Deux séries de construction souches ont été réalisées : dans la première série les protéines Rbt1SL et Rbt1FL étiquetées V5 sont exprimées sous le promoteur natif *RBT1* après intégration au locus *RBT1* tandis que dans la seconde série les protéines Rbt1 étiquetées V5 sont exprimées sous le contrôle du promoteur fort constitutif *ACT1* après intégration au locus *RP10*.

### I. Construction des souches Rbt1SL et Rbt1FL étiquetées V5

L'insertion de l'étiquette V5 entre les domaines N-terminal et C-terminal de la séquence codante des protéines Rbt1SL et Rbt1FL a été réalisée par deux amplification PCR indépendantes. Le détail de la construction pour l'obtention des souches Rbt1SL-V5 et Rbt1FL-V5 sous le contrôle du promoteur *ACT1* ou *RBT1* est clarifié dans la partie Matériels et Méthodes (155).

### II. Cinétique d'expression de Rbt1

L'expression de Rbt1 a été suivie par immunofluorescence sur les souches étiquetées Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur natif *RBT1* après induction de la filamentation induite par le pH et la température (Figure 96).

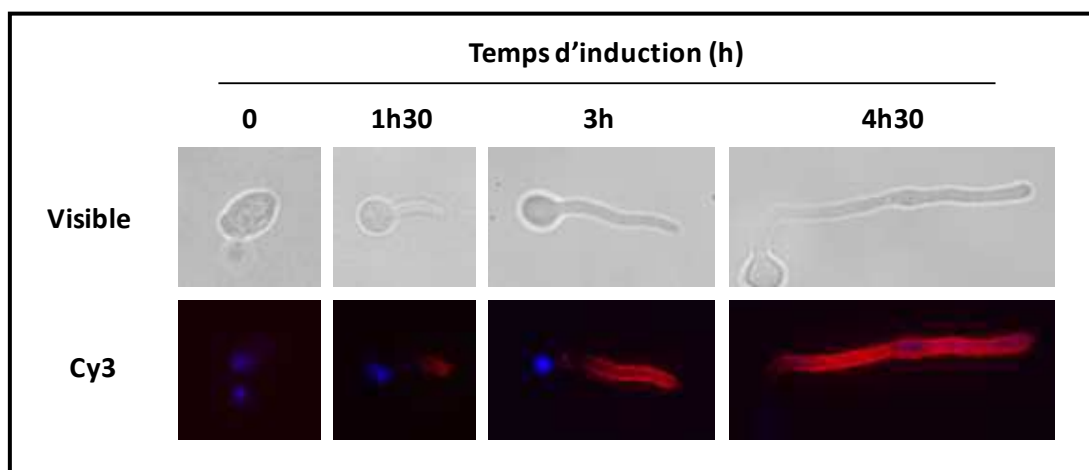
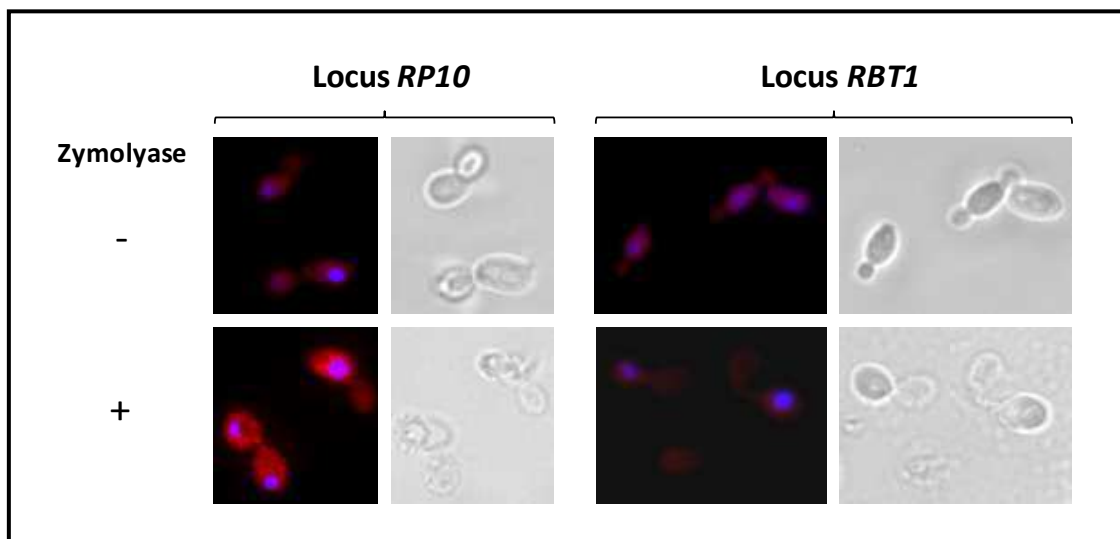


Figure 96 : Cinétique d'expression de *RBT1* dans la souche étiquetée Rbt1SL-V5 intégrée au locus *RBT1*

Les images d'immunofluorescence obtenues avec un anticorps anti-V5 couplé au fluorochrome Cy3 confirment l'absence de marquage pour les formes levures et révèlent un marquage progressif en fonction du temps pour les formes hyphes. Après 1h30 d'induction de filamentation, on observe l'apparition d'un signal, spécifique de Rbt1, au niveau apical de l'hyphe. Puis ce signal progresse pour recouvrir toute la longueur de l'hyphe après 3h de filamentation. Néanmoins ce signal reste spécifique de l'hyphe car aucun marquage n'est observé pour la cellule d'origine. La cinétique d'expression de Rbt1FL est identique à celle décrite pour Rbt1SL confirmant que la protéine Rbt1 est une protéine spécifique de la forme hyphe et qu'elle est exposée à la surface.

### III. Exposition en surface de Rbt1

Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur les souches étiquetées Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur *ACT1* afin de confirmer l'exposition en surface de Rbt1 dans ces souches de surexpression (Figure 97).



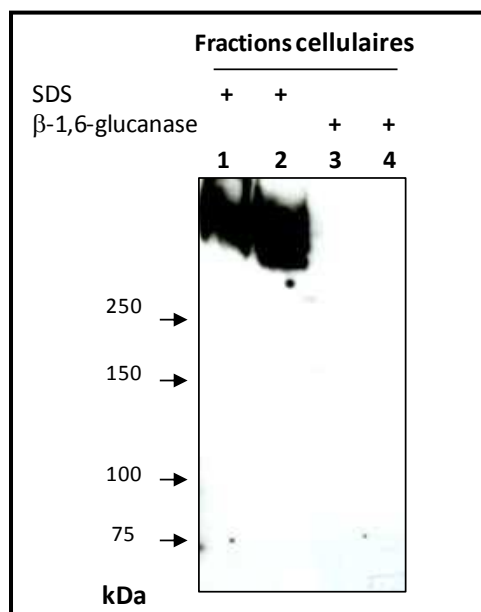
**Figure 97 : Images d'immunofluorescence réalisées avec un anticorps anti-V5 couplé au Cy3 sur les souches étiquetées Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur *ACT1* (à gauche) ou sous le promoteur *RBT1* (à droite) sur cellules intactes (sans traitement) et sur cellules perméabilisées (après traitement à la zymolyase)**

De façon surprenante, aucun signal n'a été observé pour les souches étiquetées Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur *ACT1* en forme levure pour aucun des deux allèles de Rbt1 (Figure 97, gauche). Un traitement de perméabilisation à la zymolyase a alors été réalisé sur les cellules en forme levure avant l'étape d'immunofluorescence et a révélé la présence de la protéine Rbt1 retenue dans les cellules. Ces résultats suggèrent que les souches étiquetées Rbt1-V5 sous le

contrôle du promoteur *ACT1* expriment bien la protéine Rbt1 (Rbt1SL ou Rbt1FL) mais que celle-ci n'est pas exposée à la surface. En parallèle, des expériences d'immunofluorescence réalisées sur les souches étiquetées Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur *RBT1* sur cellules intactes et sur cellules perméabilisées après traitement à la zymolyase confirment l'absence de marquage pour Rbt1 en forme levure (Figure 97, droite). Par ailleurs, le marquage obtenu sur les formes hyphe sur cellules intactes des souches étiquetées Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur *ACT1* est similaire à celui obtenu avec les souches étiquetées Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur *RBT1*.

#### IV. Localisation de Rbt1

Des fractions cellulaires ont été réalisées sur les souches étiquetées Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur *ACT1* en forme levure et en forme hyphe afin de localiser la protéine Rbt1. Les résultats des western-blot révèlent la présence de Rbt1 dans la fraction extraite au SDS à partir du culot cellulaire après centrifugation à faible vitesse (Figure 98, Matériels et Méthodes p161). Puisque cette fraction contient principalement les protéines membranaires, ces résultats montrent que la protéine Rbt1 est une protéine membranaire. La localisation membranaire de Rbt1 a été observée pour les souches de surexpression dans les formes levure et hyphe.



**Figure 98 : Localisation cellulaire de Rbt1FL**

Analyse par western blot des fractions cellulaires de la souche étiquetée Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur *ACT1* pour les formes levure (lignes 1 et 3) et hyphe (lignes 2 et 4) : les protéines non covalamment liées à la paroi ont été extraites par traitement avec 2% SDS pendant 10 min à 100°C (lignes 1 et 2) puis les parois cellulaires ont été incubées avec 2U de β-1,6-glucanase pendant 3 heures à 37°C dans du tampon NaAc pH4,5 (lignes 3 et 4).

## F/ Bilan

Ce qu'il faut retenir :

- **deux** protéines Rbt1 chez *C. albicans* : **Rbt1SL** et **Rbt1FL** ;
- **conservation** du domaine **N-terminal** (similaire à Flo11) dans les deux formes de Rbt1 ;
- présence d'un **motif** **T<sup>v</sup>/I<sup>v</sup>/T<sup>v</sup>/TSCX<sub>4</sub>CX<sub>4</sub>VTTGVVVVTX<sub>5</sub>YTTFCPL** présentant deux séquences à **haut potentiel de β-agrégation** localisé dans le domaine C-terminal (**1 exemplaire pour Rbt1SL** et **deux exemplaires pour Rbt1FL**) ;
- mise en évidence du **rôle du domaine N-terminal** dans l'**adhésion au polystyrène** par des propriétés d'**hydrophobicité** ;
- **caractérisation des séquences à fort potentiel de β-agrégation** dans la **formation de biofilm** et l'**agrégation** ;
- **localisation des protéines Rbt1** à la **membrane plasmique** de *C. albicans* ;
- **confirmation de l'exposition en surface Rbt1** pour la **forme hyphe** mais pas pour la forme levure.



# ***DISCUSSION ET PERSPECTIVES***



## Les protéines à ancre GPI de *C. albicans* dans l'interaction avec l'hôte.

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés aux protéines à ancre GPI de *C. albicans* impliquées dans les interactions avec l'hôte en nous appuyant sur deux études complémentaires : une étude exploratrice d'une vingtaine de protéines à ancre GPI à travers leur domaine fonctionnel putatif par une stratégie de surexpression et de sécrétion par *C. albicans* ; et une étude structure/fonction de la protéine à ancre GPI Rbt1 par une approche d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* et de surexpression chez *C. albicans*. Le crible réalisé à partir de la banque de surexpression et de sécrétion a permis d'identifier (i) sept polypeptides impliqués dans la modulation de la réponse des macrophages (Pga24, Orf19.4955, Cht2, Rbt1, Pga50, 2Pga60 et Plb5) et (ii) trois polypeptides ayant des propriétés immunogènes (Pga24, Pga4 et Iff2). En parallèle, nous avons caractérisé la protéine Rbt1 en montrant (i) que le domaine N-terminal, par ses propriétés hydrophobes, était impliqué dans l'adhésion au substrat abiotique et (ii) que les séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation du domaine C-terminal étaient impliquées dans les interactions cellules-cellules.

Au cours de cette partie Discussion et Perspectives, les deux études menées au cours de cette thèse seront analysées indépendamment l'une de l'autre en suivant un schéma commun. Ainsi pour chaque étude, je ferai tout d'abord un rappel des objectifs à atteindre en détaillant les différentes étapes pour y parvenir. Puis plus particulièrement pour l'étude 1, je reprendrai chaque étape du projet en synthétisant les résultats obtenus et en vérifiant l'adéquation avec le projet de départ. J'aborderai ensuite les points techniques et stratégiques soulevés par ces expériences. Enfin, je discuterai des apports fondamentaux des résultats de ces deux études et je développerai les projets envisageables pour la poursuite de ce travail.



## De l'étude de domaines solubles...

L'objectif de ce projet était d'attribuer un rôle aux protéines à ancre GPI de surface inconnues dans la pathogénie de *C. albicans* à travers leur domaine fonctionnel putatif. Plus précisément, cette étude ciblait l'effet des domaines solubles sur la réponse immunitaire de l'hôte dans le but d'identifier des nouvelles cibles pour le diagnostic des infections à *C. albicans* et pour le développement de nouveaux moyens dans la lutte contre les candidoses. Différentes étapes ont été définies pour aboutir à ce résultat :

- identifier les protéines répondant à nos critères de sélection et les peptides à exprimer en se limitant uniquement aux domaines fonctionnels putatifs ;
- construire une banque de surexpression et de sécrétion dans *C. albicans* ;
- produire et de purifier suffisamment de protéines pour procéder à l'immunisation de lapins ;
- cribler les activités des polypeptides sur différents substrats ou pour différents tests ;
- étudier la survie des souches de surexpression à la réponse immunitaire des macrophages ;
- rechercher les anticorps spécifiques des domaines solubles présents dans les sérums de patients sains ou infectés par *C. albicans*.

A l'issue de ce projet de départ il est possible de faire le bilan suivant des résultats obtenus : suite à l'analyse bioinformatique des 115 protéines à ancre GPI prédites chez *C. albicans* (Richard and Plaine, 2007), nous avons sélectionné 16 protéines à ancre GPI « inconnues » Pga2, Pga4, Pga7, Pga15, Pga21, Pga24, Pga28, Pga31, Pga37, Pga44, Pga50, Pga55, Pga60, Iff2, Orf19.4955 et Rbt1 ainsi que 5 protéines témoins Als3, Hwp1, Cht2, Plb5 et Pra1. Les séquences codantes des domaines fonctionnels putatifs issus de ces 21 protéines ont toutes été clonées dans le vecteur pExpV5 permettant leur surexpression *via* le promoteur *ACT1* et leur sécrétion. Nous avons montré que les domaines solubles exprimés par les souches transformées étaient bien sécrétés dans le milieu de culture hormis pour les polypeptides Pga50, Hwp1, Plb5 et Rbt1 pour lesquels nous n'avons pu détecter leur présence dans le surnageant de culture. Nous avons alors estimé les quantités de polypeptides sécrétés entre 50 et 100 µg/L. L'objectif de départ était donc en partie atteint puisque nous avons validé que ce système permettait la sécrétion de la majorité des domaines fonctionnels putatifs mais que la surexpression et/ou la purification n'était pas aussi efficace que celle que nous espérions. Ces niveaux de production ne permettaient pas de générer suffisamment de protéines pour l'immunisation de lapins. En effet, pour la production d'anticorps les quantités de polypeptides demandées par la société Genosphere est de l'ordre de 5 mg/L. Néanmoins, nous avons montré que les polypeptides produits étaient purifiables ce qui nous permettait de réaliser les expériences qui n'étaient pas entravées par la faible quantité produite à savoir l'identification des récepteurs de

cellules hôtes impliqués dans la reconnaissance des domaines solubles et des voies de signalisation mises en jeu et la recherche des anticorps spécifiques des domaines solubles présents dans les sérums de patients sains ou infectés par *C. albicans*.

Un premier niveau d'analyse de ce travail de thèse est d'envisager les différentes étapes d'un point de vue stratégique et technique et de discuter leur pertinence aujourd'hui à la lumière du travail effectué, des difficultés rencontrées et des données bibliographiques parues depuis.

### **Définition des protéines cibles et des polypeptides à produire**

Ce projet avait pour but d'étudier les protéines à ancre GPI, potentiellement exposées à la surface, capables d'interagir avec l'hôte. L'analyse des séquences des protéines à ancre GPI putatives nous a permis de détecter quelques erreurs d'annotation ce qui souligne l'importance de reprendre précisément chaque séquence dans ce type d'approche car l'annotation d'un génome ne peut être strictement parfaite. Pour la sélection de ces protéines, les critères que nous nous étions fixés étaient ceux caractéristiques des protéines à ancre GPI auxquels nous avons ajouté la présence d'un domaine riche en sérine et thréonine O-glycosylées distinct dont le rôle serait de projeter le domaine fonctionnel putatif en surface. Notre critère de sélection ne tenait compte que de la présence ou non de ce domaine O-glycosylé sans prendre en compte la longueur de celui-ci. Or, il a été démontré que la longueur du domaine O-glycosylé avait une importance majeure afin de permettre l'exposition du domaine N-terminal en surface (Boisrame et al., 2011; Li and Palecek, 2008). Les récents travaux effectués au sein de l'équipe par Anita Boisramé montrent qu'un domaine O-glycosylé d'une longueur de 340 acides aminés est insuffisant pour exposer en surface des levures le domaine N-terminal d'une protéine tandis que 580 acides aminés suffisent (Boisrame et al., 2011). Ces résultats apportent des données précises quant à la longueur de ce domaine pour l'exposition en surface des protéines chez *C. albicans* et montrent que les données antérieures définies par Frieman et ses collaborateurs chez *C. glabrata* qui fixent la longueur optimale du domaine riche en sérine et thréonine O-glycosylées à 170 acides aminés pour l'exposition en surface n'est pas applicable d'un organisme à l'autre (Frieman et al., 2002). Ces nouvelles données indiquent donc que la longueur des domaines riches en sites de O-glycosylation est une critique pour l'exposition en surface des protéines sélectionnées. Ainsi, seuls les domaines fonctionnels putatifs issus de protéines composées d'un domaine O-glycosylé d'une longueur supérieure à 340 acides aminés (Pga24, Pga44, Pga55, Pga60, Iff2, Rbt1, Als3, Hwp1 et Cht2) pourraient être présents en surface de *C. albicans* et seraient donc capables d'interagir avec l'environnement.

## Production par *C. albicans* de protéines sécrétées et purifiables

La surexpression et la sécrétion par *C. albicans* des domaines putatifs issus des protéines à ancre GPI était une nouvelle technique développée par notre équipe. Au début de cette étude, cette nouvelle technique soulevait de nombreuses questions en termes de faisabilité et d'efficacité. D'un point de vue technique cette nouvelle approche biochimique nous a permis d'identifier différents éléments à améliorer ou à retenir qu'il m'a paru intéressant de reprendre ici.

### **Expression**

Nous avons montré que les polypeptides produits dans le milieu de culture étaient facilement détectables avec un anticorps anti-V5 excepté pour sept d'entre eux. Nous avons démontré qu'un traitement à l'acide periodique était nécessaire pour détecter les polypeptides Pga2, Pga15, Pga21 et Pga28 suggérant que pour ces quatre polypeptides l'étiquette V5 était masquée par des résidus glycosylés, ce qu'ont confirmé les analyses en western blot. Toutefois, même après ce traitement les polypeptides Pga50, Hwp1, Plb5 et Rbt1 n'ont pas pu être détectés. Ces résultats laissent supposer que ces quatre polypeptides ne sont pas stables dans le temps (les immunodétections ont été réalisées à partir des surnageants de culture après 48h d'incubation à 30°C). Bien que nous n'ayons pu prouver que ces polypeptides étaient exprimés par les souches de surexpression et de sécrétion, nous avons néanmoins inclus ces quatre souches à notre crible. Des analyses en qPCR en temps réel pourraient être envisagées afin de suivre le taux d'expression de ces polypeptides dans le temps et de vérifier leur expression afin de cibler l'étape limitante ou bloquante.

### **Glycosylation**

Les résultats de western blot réalisés sur les surnageants de culture ont révélé que les prédictions de glycosylation (N et O-glycosylation) n'étaient pas parfaites (Pga55, Pga15, Pga28, Pga21, Pga37, Pga44). En effet, les polypeptides Pga55, Pga15 et Pga28 ne sont pas prédits pour avoir des sites de N-glycosylation et présentent un signal, en absence de traitement à l'EndoH, correspondant à un très haut poids moléculaire suggérant que ces polypeptides sont probablement O-glycosylés. De plus, le même signal a été obtenu avec ou sans traitement à l'EndoH pour les polypeptides Pga21, Pga37 et Pga44 prédits pour être N-glycosylés suggérant que ces polypeptides sont O-glycosylés et que la N-glycosylation n'est pas effective. Ces résultats nous amènent à nous poser la question concernant la puissance des sites de prédiction de la N et de la O-glycosylation utilisés (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> et <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), sachant que ces derniers algorithmes ont été développés pour des protéines de mammifères. Il est donc

important de retenir que les algorithmes ne donnent que des indications prédictives concernant l'ajout des groupements glycosylés et que celles-ci doivent être validées par des expériences *in situ*. Dans ce travail, nous avons pris l'initiative de n'étudier les protéines à ancre GPI qu'à travers leur domaine fonctionnel putatif dépourvu de O-glycosylation. Or, il est connu que les modifications post-traductionnelles et en particulier la glycosylation joue un rôle fondamental dans la reconnaissance et la réponse mise en place par le système immunitaire (Rabinovich et al., 2012). Les PAMPs fongiques cibles reconnus par les PRRs des cellules immunitaires de l'hôte sont aujourd'hui bien identifiés : ainsi les MMR reconnaissent spécifiquement les mannanes liés en N et les TLR4 reconnaissent ceux liés en O (Gow et al., 2012). La vocation de ce projet n'était pas d'étudier la reconnaissance des sucres par le système immunitaire, nous avons essayé de nous en affranchir afin d'étudier exclusivement la partie protéique des protéines à ancre GPI. De plus, au niveau technique aucune enzyme n'est disponible pour éliminer la O-glycosylation ce qui pourrait être un frein pour la détection et la purification des protéines. Cette approche arbitraire est un choix discutable car il semble difficile de dissocier ces deux composantes dans la réponse immunitaire. Le fait que pour certains des polypeptides, des sérines et/ou thréonines O-glycosylées aient été involontairement incluses peut donc favoriser leur « action ».

### ***Production et purification***

La quantité de protéines purifiée a été une des déceptions de notre stratégie, puisque cela réduisait les options possibles pour la suite du projet. La phase de purification nous a semblé relativement efficace, néanmoins des difficultés au départ nous ont montré qu'il existait dans le surnageant des éléments perturbant l'accrochage des protéines étiquetées aux billes, il est donc tout à fait possible que la purification n'était pas optimale.

Concernant la quantité produite, afin d'optimiser l'efficacité de surexpression, deux options pourraient être classiquement envisagées : soit changer de modèle soit opter pour un autre promoteur fort. Toutefois, plusieurs raisons nous confortent dans le choix de *C. albicans* et s'opposent à un changement de modèle. En effet, bien que de nombreux outils soient disponibles pour permettre de forts niveaux d'expression dans l'organisme modèle *E. coli*, la solubilité et le repliement de ces protéines « eucaryotes » est souvent entravée. De même, les modifications post-traductionnelles spécifiques des organismes eucaryotes telles que la glycosylation ne pourraient pas avoir lieu dans cet organisme procaryote. Par ailleurs, le code génétique particulier de *C. albicans* (le codon CUG code une sérine au lieu d'une leucine) limite l'utilisation des organismes eucaryotes utilisés en bioindustries comme *Pichia pastoris*. De plus, des essais de production de protéines de *Candida albicans* par la levure *Yarrowia lipolytica* s'étaient avérés peu convaincants (données personnelles). Pour ces deux raisons, le choix de *C. albicans* comme modèle pour la surexpression et

la sécrétion semble effectivement le plus adapté à notre étude. La seconde option serait donc d'opter pour un autre promoteur fort. Une récente étude s'est intéressée, par une approche de synthèse de promoteurs hybrides, à la création d'une banque de promoteur fort pour *S. cerevisiae* (Blazeck et al., 2012). Les promoteurs hybrides de cette banque sont constitués d'un nombre variable de région UAS (Upstream Activation Sequences) couplé au corps d'un promoteur constitutif ou inductible. Les résultats d'efficacité de ces promoteurs hybrides montrent que l'ajout de séquences UAS en amont des promoteurs amplifie leur efficacité (Blazeck et al., 2012). Bien que décrit chez *S. cerevisiae*, il serait envisageable de rapporter ces données à *C. albicans* et de remplacer le promoteur constitutif de l'actine utilisé dans notre banque par un autre caractérisé par Blazeck et ses collaborateurs. Notre choix pourrait se porter sur le promoteur UAS<sub>CLB(3x)</sub>P<sub>GPD</sub> qui est décrit pour être le promoteur constitutif le plus efficace de la banque ou sur le promoteur inductible UAS<sub>GAL</sub>P<sub>GAL</sub> qui est réprimé en présence de glucose et très fortement induit en présence de galactose (Blazeck et al., 2012). Ce dernier promoteur apporte l'avantage de maîtriser les conditions de surexpression de nos domaines d'intérêt et de ce fait leur sécrétion lors des tests réalisés sur cellules entières (par opposition aux tests réalisés à partir des peptides purifiés). De plus, l'utilisation de ce promoteur nous permettrait d'obtenir un témoin souche idéal pour chacun des polypeptides en condition de répression.

### **Le criblage d'activité des polypeptides de la banque de surexpression et de sécrétion**

L'obtention de peptides sécrétés pour 24 souches nous a permis d'envisager différents cribles sur les souches sécrétrices afin d'identifier les effets de la présence de ces polypeptides dans le milieu environnant des levures. Par ce crible, nous avons répondu en partie aux attentes de ce projet concernant l'identification de protéines à ancre GPI impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Nous avons pu montrer par des expériences de coculture des souches de surexpression et de sécrétion en présence de macrophages que sept polypeptides (Pga24, Orf19.4955, Cht2, Rbt1, Pga50, 2Pga60 et Plb5) étaient impliqués dans la modulation de la réponse des macrophages en faveur (Pga24, Orf19.4955, Cht2) ou en défaveur (Rbt1, Pga50, 2Pga60 et Plb5) de la survie de *C. albicans*. De plus, nous avons identifié trois polypeptides (Pga24, Pga4 et Iff2) ayant des propriétés immunogènes par des tests en dot blot en révélant les membranes sur lesquelles les polypeptides purifiés avaient été préalablement déposés avec des sérums de patients sains ou infectés par *C. albicans*. Par contre, les expériences réalisées à partir de systèmes rapporteurs des voies de l'immunité innée ne nous ont pas permis d'identifier de polypeptides capables d'induire les voies de signalisation des cellules de l'hôte. Enfin, l'analyse approfondie du peptide Cht2 a montré

que le domaine N-terminal dépourvue de O-glycosylation de la protéine Cht2 avait une activité chitinase fonctionnelle.

Dans cette partie j'ai choisi de focaliser la discussion sur des résultats clefs en analysant les données obtenues ainsi que les perspectives envisageables.

### ***Identification de polypeptides impliqués dans le maintien de l'intégrité de la paroi***

Au cours de ce crible, nous avons étudié par des tests en gouttes la survie des souches de surexpression sur des milieux permettant d'étudier la croissance des souches en réponse à des stress (pH, SDS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou à des drogues (Casponfungine). Le crible mis en place dans notre étude n'a pas permis l'identification de polypeptides impliqués dans le maintien de l'intégrité de la paroi. Une des hypothèses qui pourrait expliquer l'absence de phénotype est que nos tests ont été réalisés sur milieu solide et que cette condition ne serait pas adaptée pour caractériser l'activité des polypeptides. Il est donc envisagé d'étudier le phénotype de souches de la banque de surexpression et de sécrétion en réponse aux drogues dans des conditions de culture liquide et une étape de préincubation entre les cellules et les polypeptides sécrétés dans le milieu de culture sera alors nécessaire avant l'ajout des agents stressant.

La banque de surexpression et de sécrétion est un outil qui offre la possibilité de diversifier la nature des expériences, nous pourrions donc envisager de réaliser des tests de fonctionnalité sur boîte ou en microplaques permettant de caractériser des activités enzymatiques directement à partir des surnageants de culture. Kuznetsova et ses collaborateurs présentent une liste principale non exhaustive de substrats permettant l'identification de nouvelles activités enzymatiques (Kuznetsova et al., 2005). L'activité enzymatique est alors révélée par l'apparition d'un produit qui absorbe à une longueur d'onde spécifique. Nous pourrions dans un premier temps utiliser les substrats caséine et pNPP pour étudier respectivement l'activité protéase et phosphatase des domaines solubles. Ces résultats apporteraient des résultats complémentaires aux tests de stress déjà réalisés.

### ***Le domaine soluble Cht2***

La fonction chitinase de la protéine Cht2 de *C. albicans* a déjà été montrée au cours d'études antérieures (Dunkler et al., 2005; McCreath et al., 1995). De plus, Selvaggini et ses collaborateurs ont montré que la délétion des gènes codant les chitines n'avait pas d'effet sur l'activité des chitines synthases tandis que la délétion des gènes codant les chitines synthases (CHS) diminuait l'activité chitinase (Selvaggini et al., 2004). Kaneko et ses collaborateurs se sont également intéressés à la voie de régulation de la synthèse de la chitine en mesurant l'expression des chitines synthases et des

chitinases dans des souches de *C. albicans* dans des conditions de croissance en biofilm après traitement à la micafungine qui est un antifongique de la classe des échinocandines et donc agissant sur la synthèse du réseau de glucanes (Kaneko et al., 2010). Ils ont ainsi montré que les quatre gènes codant les chitines synthases (*CHS1*, *CHS2*, *CHS3* et *CHS8*) étaient surexprimées tandis que les gènes codant les chitinases *CHT2* et *CHT3* étaient sous exprimés et que les gènes codant les chitinases *CHT1* et *CHT4* étaient respectivement surexprimé et inchangé (Kaneko et al., 2010). Au cours de cette étude, nous avons montré par des dosages enzymatiques à partir des surnageants de culture que le domaine putatif de Cht2 possédait une activité chitinase fonctionnelle. Ce résultat, bien que spécifique à Cht2, a conforté notre choix stratégique basé sur l'étude des protéines à ancre GPI à travers leur domaine fonctionnel putatif. Une des données nous confortant également dans ce choix est que les homologies existantes entre les protéines à ancre GPI sont, pour la plupart, restreintes au domaine fonctionnel putatif.

Il sera intéressant de continuer la caractérisation de Cht2 en dosant la chitine dans la paroi de cette souche de surexpression afin de corréler la surexpression de la chitinase Cht2 à un effet sur l'équilibre synthèse/dégradation de la chitine. De plus afin de compléter la voie de régulation établie à partir de souches de délétion, la quantification de l'expression des gènes codant les chitines synthases et des chitinases par la souche de surexpression du domaine soluble de Cht2 apportera des informations nouvelles concernant ce mécanisme de régulation. Enfin, nous pourrions également analyser la paroi de cette souche dans le but de regarder s'il y aurait des domaines solubles Cht2 non sécrétés qui seraient restés accrochés.

#### ***Identification des récepteurs de cellules hôtes impliquées dans la reconnaissance des domaines solubles et les voies de signalisations mises en jeu***

Le crible effectué en collaboration avec Hervé Blottière et son équipe (Institut MICALIS, Jouy-en-Josas) avec des systèmes rapporteurs n'a pas permis l'identification de polypeptides impliqués dans la régulation des voies NFkB et TSLP que ce soit en tant qu'activateurs ou inhibiteurs. On pourrait se demander si les quantités de polypeptides obtenus dans les surnageants de culture sont suffisantes pour ce type d'expériences. Toutefois, la quantité d'IL-1 utilisée dans le témoin positif (10 ng/ml final) est similaire à la quantité de polypeptides estimée dans le surnageant de culture (50-100 µg/L) (Lakhdari et al., 2010). Ces données numériques valident donc les conditions expérimentales utilisées.

Un des points qui limite cette partie du criblage est que notre banque est constituée d'un certain nombre de polypeptides dépourvus de glycosylation et que nous savons que les résidus glycosidiques sont les molécules majoritaires reconnues par les PRRs de l'hôte (Gow et al., 2012). Les résultats de

ce criblage ambitieux ne sont donc pas surprenants compte tenu de l'importance de la glycosylation dans la reconnaissance avec les cellules hôtes.

### **Étude de la survie des souches de surexpression à la réponse immunitaire des macrophages**

Les résultats obtenus lors des expériences de coculture avec les macrophages de la lignée J774.2A ont révélé un phénotype intéressant pour les souches de surexpression et de sécrétion des polypeptides Pga24, Orf19.4955, Cht2, Rbt1, Pga50, 2Pga60 et Plb5.

En effet, ces résultats ont montré que le taux de survie aux macrophages des souches de surexpression et de sécrétion Pga24, Orf19.4955 et Cht2 était diminué par rapport à celui de la souche sauvage :

- L'autre nom de la protéine Pga24 est Ywp1 (Yeast Wall Protein). Des propriétés anti-adhésives au polystyrène ont été caractérisées chez cette protéine (Granger et al., 2005). Il a été récemment démontré que cette protéine subissait un clivage permettant de libérer un propeptide correspondant aux cent premiers acides aminés N-terminaux et que ce propeptide resterait accroché par des liaisons non covalentes à la partie C-terminale et participerait ainsi à la fonction de Ywp1 (Granger, 2012). Le polypeptide issu de Ywp1 exprimé dans notre banque de surexpression correspond au 143 premiers acides aminés de Ywp1, il s'agit donc d'une version allongée du propeptide décrit par Granger et ses collaborateurs. Nous avons donc démontré que la version allongée du propeptide de Ywp1 participait à la modulation de la réponse immunitaire en favorisant l'action des macrophages. Granger et ses collaborateurs avaient également démontré que l'expression ectopique de Ywp1 dans les hyphes était fonctionnelle (Granger, 2012). De plus, un double mutant  $\Delta ywp1/\Delta ywp1$  présente une adhérence augmentée au polystyrène et participe à la formation d'un biofilm plus important (Granger et al., 2005). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le polypeptide de Ywp1 pourrait être actif lorsque *C. albicans* est en forme levure en se fixant sur Ywp1 mais également en forme hyphe en se fixant sur une protéine partenaire homologue à Ywp1 et « inhibant » ainsi l'action d'autres protéines. La protéine Orf19.3621 qui présente des similarités de séquence avec la protéine Ywp1 pourrait être reconnue par le polypeptide de Ywp1. Actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant cette protéine.

- La sécrétion du polypeptide Orf19.4955 induit également une diminution de la survie de *C. albicans*. La séquence protéique de ce polypeptide présente une faible similarité de séquences avec



les protéines à ancre GPI Ecm33 et Ecm33.1. Une étude récente a montré qu'un mutant  $\Delta ecm33/\Delta ecm33$  présentait une altération de l'architecture de la paroi et induisait une réponse immunitaire protectrice contre les infections à *C. albicans* dans un modèle murin (Martinez-Lopez et al., 2008). D'après ces résultats, nous ne nous attendions pas à ce que la surexpression du polypeptide Orf19.4955, homologue à Ecm33, induise une forte réponse immunitaire. Ce résultat suggère que le polypeptide Orf19.4955 (i) pourrait également modifier la paroi de *C. albicans* ce qui fragiliserait ainsi sa résistance aux macrophages ou (i) amplifierait la réponse des macrophages.

➤ La troisième souche sensible aux macrophages est celle qui surexprime le polypeptide Cht2. L'action de Cht2 pourrait avoir un effet indirect sur la réponse immunitaire. Des études ont montré que la chitine empêchait la reconnaissance de *C. albicans* en bloquant les PRRs de type Dectin-1 des macrophages qui n'étaient alors plus disponibles pour reconnaître les PAMPs fongiques (Mora-Montes et al., 2011). On pourrait donc poser l'hypothèse que la souche de surexpression et de sécrétion de Cht2 serait donc plus sensible à l'action des macrophages en raison d'un déficit de chitine dans la composition de sa paroi, par un phénomène « d'hyper reconnaissance » par exemple. En effet, nous avons démontré que l'activité chitinase du peptide était bien fonctionnelle. Cela voudrait-il dire que Cht2 libre aurait diminué la quantité de chitine de la souche de surexpression et de sécrétion ? Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait doser la chitine de la paroi de la souche et tester la reconnaissance de ces levures par les macrophages.

Les souches de surexpression et de sécrétion des polypeptides Rbt1, Pga50, 2Pga60 et Plb5 ont donné des résultats opposés à ceux décrits précédemment. En effet, ces souches présentent un taux de survie aux macrophages 1,3 à 1,5 fois supérieur à celui de la souche sauvage. Ces résultats nous indiquent que les polypeptides Rbt1, Pga50 et Plb5 non détectés dans les surnageants de culture par immunodétection seraient toutefois produits par les souches de surexpression et de sécrétion. L'hypothèse privilégiée est que ces trois polypeptides sont bien sécrétés dans le surnageant de culture mais que leur épitope V5 serait masqué empêchant ainsi leur détection.

➤ Le rôle de Plb5 dans la virulence et plus particulièrement dans l'invasion a déjà été montré par Theiss et ses collaborateurs (Theiss et al., 2006). L'hypothèse proposée est que le polypeptide Plb5 participerait à la survie de *C. albicans* aux macrophages en lui permettant d'échapper à la phagocytose par un mécanisme que l'on ignore aujourd'hui.

➤ Aucune donnée au début de ce projet ne permettait d'avoir une idée précise quant au mode d'action des polypeptides Rbt1, Pga50 et 2Pga60. Ces trois polypeptides peuvent aussi bien jouer un rôle en faveur de la défense de *C. albicans* ou en défaveur de l'action des macrophages. Cependant, nous avons montré dans le second projet de ce travail le rôle de la protéine Rbt1 dans l'adhésion et les interactions cellulaires. Nous pouvons donc envisager que le mécanisme d'action de Rbt1 serait

opposé à celui de Ywp1 qui est une anti-adhésine. Ainsi, la surexpression d'adhésine favoriserait la survie de *C. albicans* à l'action des macrophages tandis que pour une anti-adhésine l'effet serait contraire.

Nous avons montré que 7 polypeptides (Pga24, Orf19.4955, Cht2, Rbt1, Pga50, 2Pga60 et Plb5) modulaient la virulence de *C. albicans* vis-à-vis de la réponse des macrophages. Des hypothèses ont été émises quant au mécanisme d'action de ces peptides mais aucune donnée expérimentale ne permet de s'appuyer sur l'une ou l'autre de ces hypothèses. Notre test de co-culture avec les macrophages est un test donnant des informations globales, il est donc important dans une seconde étape d'analyser de manière plus séquentielle les différentes étapes lors de cette co-culture (adhésion, phagocytose, survie dans le phagolysosome, échappement/apoptose du macrophage). Il serait donc intéressant de réaliser des expériences récemment mises au point au sein de notre équipe qui est de quantifier le taux de phagocytose afin de déterminer si cette étape clé varie suivant les souches. Nous pouvons également envisager de doser par un test ELISA la réponse immunitaire en mesurant la quantité de TNF $\alpha$  ou d'IL produits par les macrophages en contact des souches de surexpression et de sécrétion. Les résultats de ces nouvelles expériences permettront de statuer sur le rôle des polypeptides afin de savoir s'ils agissent au moment de la reconnaissance de *C. albicans* par les macrophages ou s'ils participent plus tardivement au mécanisme d'échappement. Comme évoqué précédemment des études de composition de paroi sur les souches montrant un phénotype particulier vis-à-vis de la résistance aux macrophages pourraient être réalisées.

### **Recherche d'anticorps spécifiques de *C. albicans* à partir de sérums humains**

Dans le but d'identifier des cibles potentielles dans le diagnostic ou pour le développement de nouveaux moyens de lutte contre l'infection, nous avons recherché des anticorps spécifiques dirigés contre les polypeptides de la banque de surexpression et de sécrétion présents dans des sérums de patients sains et dans des sérums de patients infectés par *C. albicans*. Ces expériences ont permis d'identifier trois polypeptides majeurs reconnus par les sérums, Pga24, Pga4 et Iff2L. Cependant, aucun n'a été reconnu spécifiquement par le lot de sérums de patients sains ou par le lot de sérums de patients infectés par *C. albicans*. L'interprétation de ces résultats est difficile car : (i) près de 75 % de la population sont porteurs sains de *C. albicans* et il n'est pas à exclure que certains patients sains n'aient développé une infection à *C. albicans* dans le passé et que leurs sérums ne contiennent des anticorps protecteurs vis-à-vis de *C. albicans* ; (ii) les patients infectés par *C. albicans* sont en général des patients immunodéprimés et leur système immunitaire est souvent inefficace. Ces résultats ne

nous permettent donc pas d'identifier un marqueur spécifique de l'infection à *C. albicans* mais ont permis d'identifier trois polypeptides (Pga24, Pga4 et Iff2L) ayant des propriétés antigéniques.

Ces résultats prometteurs ouvrent une voie pour l'utilisation de protéines à ancre GPI de *C. albicans* dans le développement de vaccins synthétiques et l'immunisation passive. Nous pourrions envisager de produire puis de tester le pouvoir protecteur de ces trois anticorps (Pga24, Pga4 et Iff2L) vis-à-vis de l'infection à *C. albicans in vivo* dans un modèle murin. Le mode opératoire utilisé pourrait être le suivant : (i) injection des polypeptides Pga24, Pga4 ou Iff2L dans une souris ; (ii) infection par *C. albicans* et ; (iii) étude de la propagation de la candidose (courbe de survie, observation histologique des organes). Deux alternatives pourraient également être choisies pour compléter cette étude : (i) nous pourrions tester le pouvoir protecteur des anticorps présents dans le sérum des souris ayant reçu une injection de polypeptides en l'injectant à une autre souris avant infection par *C. albicans*. Cette expérience permettra de savoir si la réponse protectrice est humorale (par les anticorps) ou cellulaire ; (ii) nous pourrions envisager de concaténer les trois protéines dans le but de diversifier la réponse immunitaire et donc d'optimiser son efficacité. Enfin, ces polypeptides pourraient faire l'objet d'un projet visant l'élaboration d'un outil de diagnostique des infections à *C. albicans*. Pour ce projet, il sera important de dissocier une infection récente d'une infection ancienne à *C. albicans*. La quantification des anticorps présents dans le sérum de patients pourrait être une indication permettant de discriminer l'une ou l'autre de ces infections. De plus, nous devons garder en mémoire que le profil de la réponse immunitaire pourrait être différent entre une infection superficielle développée (i) chez un patient hébergeant *C. albicans* en tant que commensal ou (ii) chez un patient n'ayant jamais rencontré *C. albicans* préalablement.

## Conclusions

Suite à l'analyse de ce crible, il est important de rappeler plusieurs points pouvant influencer sur les résultats. Tout d'abord, les résultats dits « négatifs » qui ne montrent pas de phénotype doivent être interprétés avec prudence. En effet, il n'est pas à exclure que certaines conditions testées ne soient pas adéquates pour caractériser le rôle des protéines à ancre GPI. Deux points stratégiques peuvent être soulevés : (i) d'une part le fait de s'intéresser uniquement à un domaine et non pas à l'intégralité de la protéine laissent supposer que chaque domaine aurait un rôle fonctionnel indépendamment du reste de la protéine qui n'aurait qu'un rôle mineur ; (ii) d'autre part la sécrétion de ces domaines occulte les possibles interactions moléculaires qui pourraient être indispensables à la fonction de la protéine. D'un point de vue interprétation, les expériences réalisées avec les souches de

surexpression et non pas à partir des polypeptides nous permettent de proposer seulement des hypothèses. L'étude approfondie de ces souches (composition de paroi, expression de protéines) est indispensable afin de proposer un mécanisme d'action pour les domaines solubles. Enfin nous avons soulevé que la quantité de polypeptides produits par notre système d'expression était insuffisante pour la production d'anticorps. Afin de parer à cette contrainte, nous avons utilisé une partie du financement d'AgroParistech pour faire synthétiser des peptides « spécifiques » des protéines (définis par la société Genosphere) nous permettant de produire les anticorps polyclonaux associés chez le lapin. Nous avons montré que trois de ces anticorps produits n'étaient pas spécifiques, nous empêchant ainsi de poursuivre les aspects du projet mettant en jeu avec ces trois anticorps (inhibition d'adhésion...). La spécificité de cinq anticorps doit être encore vérifiée à ce jour.

En complément de la suite déjà proposée précédemment, la banque de surexpression et de sécrétion de polypeptides construite lors de ce travail est un très bon outil pour poursuivre la caractérisation des protéines à ancre GPI de *C. albicans*. Une approche alternative serait de cristalliser la structure de ces domaines solubles afin de proposer des fonctions biochimiques ou biophysiques en comparaison avec la structure tridimensionnelle de protéines déjà caractérisées (Zarembinski et al., 1998). Cependant, cette méthode techniquement compliquée nécessite de grandes quantités de protéines qui nous ne sommes pas en mesure de produire actuellement.

Un autre aspect du crible que nous n'avons pas pu réaliser par manque de temps mais qu'il serait intéressant de tester est le rôle de ces domaines solubles dans l'adhésion. Un test préliminaire serait d'incuber les polypeptides en présence de cellules HeLa adhérentes et à confluence. Puis après une étape de lavage, les polypeptides ayant adhéré aux cellules HeLa seraient détectés par un anticorps anti-V5. Ce premier test permettrait ainsi d'identifier les polypeptides ayant des fonctions d'adhésives. En complément de ce test, nous pourrions envisager de réaliser des expériences de compétition en ajoutant des anticorps anti-polypeptides. Les anticorps qui empêcheraient les polypeptides d'adhérer aux cellules HeLa pourraient alors être un nouvel outil pour le développement de vaccins synthétiques utilisés pour l'immunisation active et procureraient donc une réponse rapide pour la lutte contre l'infection à *C. albicans*.

## ... à la caractérisation de la protéine Rbt1

Ce projet a fait l'objet de l'écriture d'un article qui sera soumis à la date de la soutenance de ma thèse. Le texte du manuscrit est à retrouver à la suite de cette partie (Annexe 2, p205). Dans cette partie discussion j'ai mis l'accent sur différents aspects originaux de mon travail en s'appuyant sur différents modèles qu'il serait possible de proposer pour rendre compte des résultats obtenus.

L'objectif de ce projet était de caractériser la protéine à ancre GPI Rbt1 de *C. albicans* par une étude structure/fonction. La protéine Rbt1 est le troisième membre d'une famille composée de Hwp1 et Hwp2 (Munro, 2012). La protéine Hwp1 a d'abord été décrite comme une adhésine impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales (Staab et al., 1999). Puis les résultats de récentes études ont montré le rôle de Hwp1 dans l'adhésion au plastique et la formation de biofilm (Ene and Bennett, 2009; Nobbs et al., 2010; Nobile et al., 2006). De plus, l'étude de mutants de délétion et de souches d'expression hétérologue dans *S. cerevisiae* des protéines Hwp2 et Rbt1 a montré l'effet de ces protéines dans l'adhésion et la formation de biofilm (Ene and Bennett, 2009; Nobbs et al., 2010). Par ailleurs, le domaine N-terminal de Rbt1 présente des similarités avec le domaine N-terminal de Flo11, une flocculine de *S. cerevisiae*, qui joue un rôle d'adhésine dans les interactions aux surfaces abiotiques et dans les interactions cellulaires (Guo et al., 2000; Reynolds and Fink, 2001). Dans leurs travaux, Goossens et ses collaborateurs suggèrent que la capacité du domaine N-terminal de la protéine Flo11 à auto-interagir pourrait expliquer les interactions cellules-cellules (Goossens and Willaert, 2012). Enfin, l'analyse de la séquence protéique de Rbt1 a permis de mettre en évidence un motif présentant un fort potentiel de  $\beta$ -agrégation présent dans le domaine C-terminal. L'étude de séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation dans la protéine Als5 révèle que ces séquences sont responsables de la formation d'agrégats (Garcia et al., 2011). Ainsi d'après ces données, nous souhaitons approfondir les connaissances concernant le rôle de la protéine Rbt1 dans les phénomènes d'adhésion et d'interactions cellulaires en identifiant les propriétés des domaines N- et C-terminaux. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour mener à bien ce projet :

- caractériser les propriétés d'adhésion du domaine N-terminal de Rbt1 grâce à l'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* ;
- étudier le rôle de la protéine Rbt1 dans les interactions cellulaires chez *C. albicans* et en particulier les propriétés des séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation ;
- suivre l'apparition au cours du temps, la localisation et l'exposition de la protéine Rbt1 chez *C. albicans*.

## Deux allèles RBT1 découverts chez la souche *C. albicans* BWP17

Dans cette étude, nous avons montré qu'il existait deux allèles codant une protéine Rbt1 courte de 611 acides aminés (Rbt1SL) et une protéine Rbt1 longue de 750 acides aminés (Rbt1FL) chez la souche *C. albicans* BWP17. L'alignement de ces deux séquences protéiques a révélé que la partie N-terminale était parfaitement conservée sur une longueur de 376 acides aminés. Par ailleurs, les domaines C-terminaux de Rbt1SL et Rbt1FL diffèrent principalement par le nombre de répétitions d'un motif particulier  $T^V/I/V T^V/I TSCX_4CX_4VTTG VVVVTX_5YTTF CPL$  : la protéine Rbt1FL contient deux copies de ce motif tandis que la protéine Rbt1SL n'en contient qu'une seule. La recherche de séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation dans les séquences protéiques de Rbt1 a permis de prédire deux séquences (en gras) associées au motif  $T^V/I/V T^V/I TSCX_4CX_4VTTG VVVVTX_5YTTF CPL$ . Notre travail s'est donc appuyé sur l'étude des deux protéines Rbt1 afin de caractériser les propriétés du domaine N-terminal et du domaine C-terminal.

Rbt1 présente une variation allélique comme les principales adhésines caractérisées chez *C. albicans*, en effet il a été observé des variations de taille pour les protéines Als3, Eap1 et Hwp1 (Hoyer et al., 2001; Padovan et al., 2009). Vestrepen et ses collaborateurs émettent l'hypothèse que la variation de nombre de copies de motifs participerait au pouvoir pathogène de *C. albicans* en (i) lui permettant de s'adapter rapidement à son environnement en modulant l'exposition en surface de protéines capables d'adhérer à différents substrats et (ii) lui permettant de contourner la réponse immunitaire de l'hôte (Verstrepen and Fink, 2009).

## L'exposition en surface de la protéine Rbt1 est exclusive de la forme hyphe

L'expression de *RBT1* est régulée par le répresseur de la transition levure/hyphe *TUP1* (Braun et al., 2000). Vialas et ses collaborateurs avaient également démontré au cours de leur étude sur l'analyse des protéines de surfaces de *C. albicans* après un traitement à la trypsine sur les formes levure et hyphe la présence de Rbt1 uniquement dans les formes hyphes (Vialas et al., 2012). Par une expérience d'immunofluorescence réalisée sur des souches étiquetées V5 exprimant la protéine Rbt1-V5 sous son propre promoteur, nous avons observé un marquage extérieur dans les hyphes en formation. Ces résultats montrent que la protéine Rbt1, spécifique de la forme hyphe, est une protéine de surface.

Nous avons construit une deuxième série de souches de surexpression étiquetées V5 pour laquelle l'expression de Rbt1-V5 est sous contrôle du promoteur constitutif *ACT1*. Étonnamment, les résultats

d'expériences d'immunofluorescence réalisées sur ces souches sans traitement préalable ont montré que les protéines Rbt1SL-V5 et Rbt1FL-V5 étaient détectées en surface uniquement dans les formes hyphes. Cependant, les western blot sur des fractions cellulaires ont révélé que les protéines Rbt1SL et Rbt1FL étaient présentes en quantité similaire dans les fractions membranaires des formes hyphe et levure excluant l'hypothèse que les protéines Rbt1 ne seraient pas détectées en surface des levures à cause de leur absence. Ce résultat suggère que les protéines Rbt1, dans les souches de surexpression, sont produites et localisées à la membrane en forme levure et hyphe mais ne sont exposées en surface qu'en forme hyphe. Des expériences d'immunofluorescence réalisées sur les souches en forme levure après perméabilisation des cellules ont confirmé cette hypothèse. Ainsi, nous avons montré que la protéine Rbt1 est une protéine de surface membranaire des formes hyphes. D'après les travaux de Boisrame sur la famille Iff réalisés dans notre équipe, il semble que cette localisation membranaire est assez rare pour une protéine de surface (Boisrame et al., 2011). Ces dernières informations nous amènent à émettre l'hypothèse que c'est la différence de structure de la paroi entre les formes hyphe et levure qui permettrait à certaines protéines membranaires d'être exposées en surface et que cela serait indépendant des propriétés d'ancrage de la protéine. La principale différence observée est la réduction de la couche externe de fibrilles, principalement composée de mannoprotéines, à la surface des hyphes par rapport aux formes levures (Fukazawa and Kagaya, 1997). Une couche de fibrilles plus fine faciliterait alors l'exposition en surface des protéines pariétales dans les formes hyphes (Fukazawa and Kagaya, 1997). Ces résultats nous amènent à redéfinir des critères plus précis concernant la longueur nécessaire du domaine riche en sérine et thréonine O-glycosylées pour l'exposition en surface des levures et ou des hyphes. Récemment, A. Boisramé a démontré que la taille minimale de la région riche en O-glycosylation nécessaire pour l'exposition en surface des levures était comprise entre 340 et 580 acides aminés (Boisrame et al., 2011). Dans nos constructions, l'étiquette V5 est insérée entre les domaines N- et C-terminaux des protéines Rbt1SL et Rbt1FL. Ainsi, nous pouvons affiner la prédiction de la taille minimale de la région O-glycosylée pour projeter le domaine N-terminal des protéines pariétales en surface des formes levures entre 480 (taille du domaine C-terminal de Rbt1FL + l'étiquette V5) et 580 acides aminés. De plus, nous montrons que 341 acides aminés (taille du domaine C-terminal de Rbt1SL + l'étiquette V5) sont suffisants pour exposer les domaines N-terminaux des protéines pariétales dans les formes hyphes. Toutefois, il faut tenir compte du fait que ces résultats ont été obtenus avec une protéine membranaire et que dans le cas d'une protéine pariétale liée aux  $\beta$ -1,6 glucanes ces critères de longueurs pourraient être revus à la baisse. Cependant, nous pouvons noter que la longueur du domaine C-terminal nécessaire pour l'exposition en surface dans le cas d'une protéine membranaire diffère de près de 200 acides aminés entre la forme levure et la forme hyphe. Cette information est à retenir pour l'interprétation des résultats obtenus avec les souches de

surexpression de Rbt1 sous le contrôle du promoteur *TEF1* dans les expériences de formation d'agrégation. Nous pouvons ainsi imaginer le modèle suivant (Schéma 1) où l'épaisseur et la densité en protéines glycosylées de la paroi varie suffisamment suivant la forme morphologique de *C. albicans* pour modifier l'exposition des protéines, expliquant les variations de détection observées.

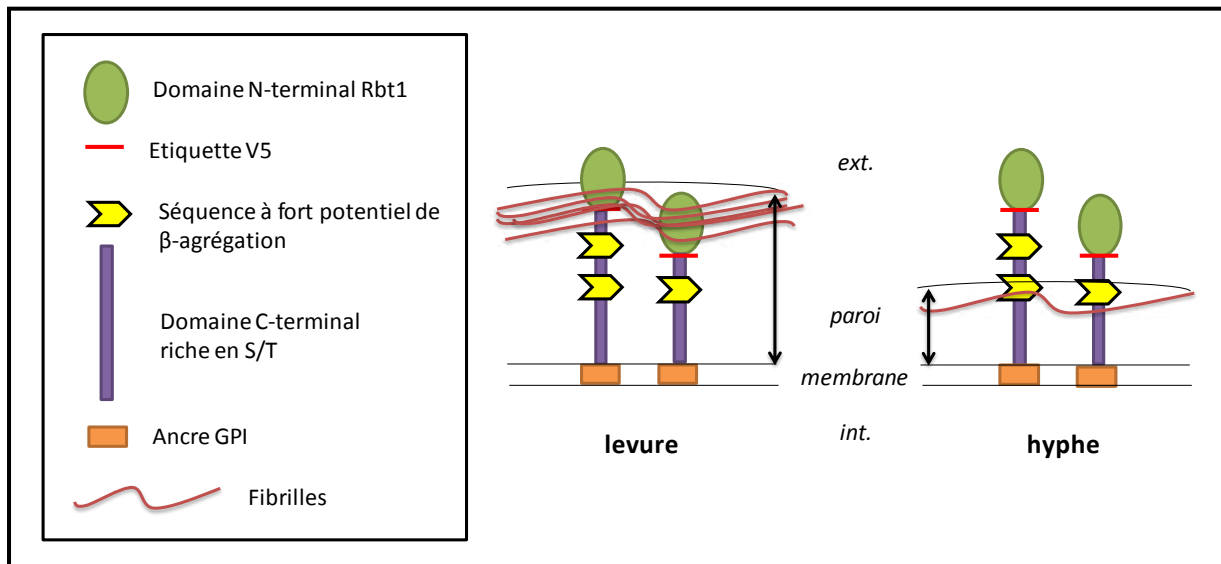


Schéma 1 : Modèle de la modification de la paroi suivant l'état morphologique de *C. albicans*

### Le domaine N-terminal de Rbt1 joue un rôle crucial dans l'hydrophobicité de surface et l'adhésion aux surfaces abiotiques

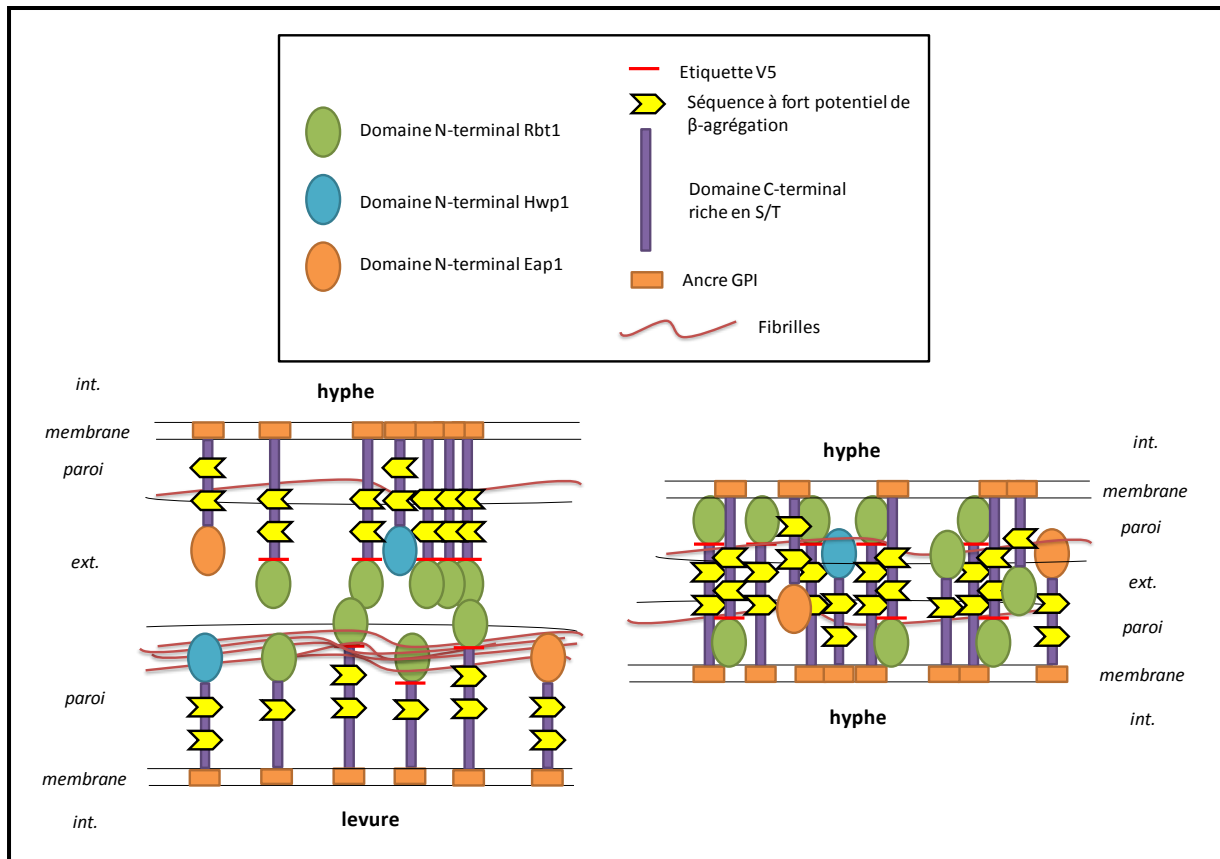
Au cours de ce travail, nous avons confirmé les résultats de Nobbs et ses collaborateurs en montrant que les souches d'expression hétérologue de *S. cerevisiae* exprimant les deux formes entières de Rbt1 étaient capables d'adhérer au polystyrène (Nobbs et al., 2010). De plus, nous avons démontré que les souches de *S. cerevisiae* exprimant l'une ou l'autre des protéines Rbt1 délétées de leur domaine N-terminal n'étaient plus capables d'adhérer au polystyrène attestant que la fonction adhésive de Rbt1 est portée par le domaine N-terminal. Nous avons également observé que l'hydrophobicité de surface des souches exprimant les formes entières de Rbt1 était augmentée tandis que celle des souches surexprimant les formes de Rbt1 délétées du domaine N-terminal était inchangée. Les propriétés hydrophobes du domaine N-terminal des protéines Rbt1SL et Rbt1FL sont donc le principal facteur permettant l'adhésion au polystyrène. Cependant, il semble que le domaine C-terminal *via* les séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation soit également impliqué dans cette propriété puisque nous avons observé une différence entre les deux allèles, la forme longue est plus



hydrophobe et permet une meilleure adhésion que la forme courte de Rbt1. Nous avons montré également que l'hydrophobicité était la principale propriété permettant à Rbt1 d'adhérer. Cependant, l'hydrophobicité n'est pas l'unique facteur permettant l'adhésion aux surfaces abiotiques pour toutes les adhésines comme nous l'avons observé pour la protéine Eap1. Par ailleurs, nous avons montré que dans une souche sauvage l'hydrophobicité de surface était augmentée en forme hyphes par rapport à la forme levure suggérant que cette propriété pourrait contribuer à la virulence de *C. albicans* lors de la transition levure/hyphes au cours de l'infection. De plus, nous avons observé que l'hydrophobicité de surface dans un mutant  $\Delta rbt1/\Delta rbt1$  n'était que légèrement diminuée indiquant que d'autres protéines de surface participeraient à l'hydrophobicité des formes hyphes. Braun et ses collaborateurs ont montré que la virulence d'un mutant  $\Delta rbt1/\Delta rbt1$  était diminuée dans un modèle murin (Braun and Johnson, 2000). Il sera intéressant de tester la virulence des souches de surexpression afin de corrélérer les propriétés d'hydrophobicité de surface de *C. albicans* à son pouvoir pathogène.

### **Les propriétés amyloïdes du motif $T^V/I/V^V/I/TSCX_4CX_4VTTGVVVVTX_5YTTFCPL$ sont responsables des interactions cellulaires**

Nous avons ensuite poursuivi l'étude de Rbt1 en construisant des souches de surexpression de Rbt1 chez *C. albicans* sous le contrôle du promoteur *TEF1*. Nous avons montré que la surexpression des deux formes de Rbt1 favorisait la formation de biofilm. De plus, nous avons observé que les biofilms formés par la souche surexprimant Rbt1FL étaient plus importants que ceux formés par la souche surexprimant Rbt1SL. Cependant, nous avons également remarqué que les biofilms formés par la souche de surexpression de Rbt1FL étaient plus fragiles ce qui suggère que les interactions cellules-cellules entre la couche inférieure du biofilm principalement composée de levures et la couche supérieure représentée majoritairement par des hyphes sont moins robustes (Schéma 2). D'après ces résultats, il semble que la longueur de la région riche en sérine et thréonine influencerait les capacités d'interaction de Rbt1. Le domaine délété dans la forme courte de Rbt1SL pourrait être impliqué (i) directement dans les interactions cellules-cellules ou (ii) indirectement en participant à la présentation du domaine d'interaction.



**Schéma 2 : Modèle d'interaction cellule-cellule suivant la forme morphologique**

De plus, nous avons montré que les souches surexprimant Rbt1SL ou Rbt1FL avaient la faculté de former des agrégats lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu liquide en forme hyphe. Les agrégats formés par la souche de surexpression de Rbt1FL dans ces expériences étaient plus compacts et avaient une taille supérieure à ceux formés par la souche de surexpression de Rbt1SL. Ces résultats indiquent que les interactions cellule-cellule sont plus nombreuses et/ou plus fortes pour la souche surexprimant Rbt1FL par rapport à la souche surexprimant Rbt1SL et suggèrent que le nombre de séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation est à l'origine de ce « phénotype ». Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences d'agrégation en absence et en présence de peptide WT (séquence à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation) ou de peptide muté V\*N (séquence ayant perdu ses propriétés de  $\beta$ -agrégation) comme Garcia et collaborateurs l'ont publié pour Als5 (Garcia et al., 2011). L'ajout de ces peptides dans les tests d'agrégations a mis en évidence que le peptide WT favorisait l'agrégation tandis que le peptide muté V\*N l'inhibait, confirmant ainsi le rôle de ces séquences présentes dans le motif CX<sub>4</sub>CX<sub>18</sub>YTTCPL dans les interactions cellules-cellules. L'absence de formation d'agrégats pour les souches de surexpression en forme levure peut être expliquée par la non exposition des protéines Rbt1 en surface comme l'illustre le Schéma 2.

## Le rôle de Rbt1 dans l'adhésion aux cellules de l'hôte

Nous avons exploré la diversité des cibles de Rbt1 en testant la capacité des souches de surexpression à adhérer aux cellules humaines de types HeLa et Caco-2. Nous avons montré que l'adhésion de la souche surexprimant l'allèle court de Rbt1 est similaire à la souche sauvage tandis que l'adhésion de la souche surexprimant l'allèle long de Rbt1 est diminuée. Ces résultats suggèrent que la protéine Rbt1 n'est pas impliquée dans l'adhésion cellulaire. Cependant, il est possible que la forme longue de Rbt1 masque les protéines impliquées dans ce type d'adhésion telles que Hwp1 et Eap1 par exemple. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces protéines qui présentent chacune deux motifs contenant des séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation forment un complexe multiprotéique avec la protéine Rbt1 (Ramsook et al., 2010). Ces protéines partenaires seraient alors englobées au sein d'un complexe multiprotéique ce qui limiterait leurs fonctions comme illustré dans le Schéma 2.

## Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons montré que la protéine Rbt1 était une adhésine capable d'adhérer aux surfaces abiotiques. De plus, nous avons mis en évidence que le domaine N-terminal, de par ses propriétés très hydrophobes, était le domaine fonctionnel de cette adhésine et que le domaine C-terminal ne jouait qu'un rôle mineur dans le rôle de Rbt1 dans l'adhésion aux surfaces abiotiques. De plus, nous avons démontré par l'étude de souches de surexpression que l'exposition en surface de la protéine Rbt1, qui est localisée à la membrane, était dépendante de la forme morphologique de *C. albicans* (et non pas de son expression). Ces résultats nous apportent une piste supplémentaire pour comprendre pourquoi la forme hyphe est plus virulente que la forme levure dans les infections à *C. albicans*. Ainsi en plus des protéines exprimées uniquement en forme hyphe, la transition levure/hyphe de *C. albicans* permettrait l'exposition en surface de protéines non régulées par le dimorphisme. Il serait intéressant de regarder dans les levures et les hyphes l'exposition en surface des protéines de *C. albicans*, comme par exemple la protéine Iff8 qui n'est pas détectée dans les levures, afin de confirmer cette hypothèse (Boisrame et al., 2011).

Nous avons également démontré que les séquences à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation contenues dans le motif T<sup>V</sup>/<sub>I</sub>/V/T<sup>V</sup>/<sub>I</sub>TSCX<sub>4</sub>CX<sub>4</sub>VTTGVVVVTX<sub>5</sub>YTTFCPL des domaines C-terminaux de Rbt1SL et Rbt1FL étaient impliquées dans la formation d'agrégats et la formation de biofilm vraisemblablement *via* des

interactions cellules-cellules. De plus, nous avons remarqué que ce motif était partagé par d'autres protéines à ancre GPI et que des séquences à haut potentiel de  $\beta$ -agrégation étaient prédites pour les motifs présents dans les séquences protéiques des adhésines Eap1, Hwp1 et Hwp2 (II p91). Les protéines Hwp1 et Hwp2, spécifiques de la forme hyphe, sont les deux autres membres de la famille à laquelle appartient Rbt1 (Munro, 2012). Ces données suggèrent que des interactions entre les protéines Rbt1 et les protéines Hwp1 et Hwp2 seraient possibles au niveau de leur séquence à haut potentiel de  $\beta$ -agrégation. Au cours d'expériences de complémentation de formation de biofilm, Nobile et ses collaborateurs ont mis en évidence une complémentation fonctionnelle pour les mutants  $\Delta als1, als3 / \Delta als1, als3$  et  $\Delta hwp1 / \Delta hwp1$  suggérant des interactions entre ces protéines (Nobile et al., 2008a). Pour confirmer l'hypothèse d'interactions interprotéiques, nous pouvons envisager de réaliser des expériences d'immunoprécipitation ou des tests double-hybride. Pour ce dernier test, des souches exprimant Rbt1 fusionnée à un domaine A non actif d'un marqueur fluorescent et des souches exprimant des protéines X fusionnées à un domaine B non actif du marqueur fluorescent seront construites. Si les deux protéines interagissent, il y aura alors interaction entre les domaines A et B et reconstitution de l'activité fluorescente. Ainsi, nous pourrions valider le modèle présenté dans le Schéma 2 inspiré des travaux de Lipke et ses collaborateurs (Lipke et al., 2011) et des résultats d'agrégation obtenus avec les souches de surexpression de Rbt1. Enfin afin de confirmer que les interactions entre les domaines amyloïdes des protéines pariétales constituent le mécanisme majeur d'agrégation, nous avons construit une souche exprimant la protéine Rbt1SL avec une mutation ponctuelle dans la séquence à fort potentiel de  $\beta$ -agrégation. Des expériences d'agrégation avec cette souche doivent être réalisées prochainement. Nous pouvons également envisager de construire des mutants ponctuels pour l'une ou l'autre de ces séquences ou les deux dans les motifs  $T^V/I_1/V^V/I_1TSCX_4CX_4VTTGVVVVVX_5YTTFCL$  des protéines Hwp1, Eap1 et Hwp2 et d'étudier la capacité d'agrégation de ces mutants « seuls » ou en coculture.

La formation d'agrégats très compacts et de taille importante, notamment ceux formés par la souche de surexpression Rbt1FL, amène les questions suivantes : ces agrégats se forment-ils *in vivo* et si oui à quoi servent-ils ? est-ce que ces agrégats atténuent ou amplifient la virulence de *C. albicans* ? Nos travaux ont montré que la formation d'agrégats *in vivo* avait pour conséquence la modification des interactions cellulaires dans les biofilms en défaveur de la structure cohésive de cette structure tridimensionnelle et pourrait masquer l'exposition des protéines de surface impliquées dans la pathogénie suggérant un effet néfaste des agrégats pour *C. albicans*. D'autres pistes peuvent être étudiées pour amener d'autres éléments de réponse : (i) étudier la résistance des agrégats aux traitements fongiques ; et (ii) suivre la dissémination des agrégats de *C. albicans* dans la circulation sanguine. Plusieurs expériences peuvent être envisagées afin de tester ces hypothèses. La résistance

des agrégats aux drogues pourrait être étudiée par une technique classique de survie de *C. albicans* à une exposition de drogue. La difficulté majeure sera de dénombrer les cellules résistantes et donc de mettre au point une méthode permettant de quantifier le nombre de cellules présentes dans les agrégats. L'effet des agrégats dans la dissémination de *C. albicans* pourra être étudié dans un modèle d'infection systémique chez la souris. Les courbes de survie des souris après infection et l'observation microscopique des organes infectés reflèteront la virulence des souches étudiées. Pour valider ces données, il faudra confirmer la présence d'agrégats de taille plus importante dans les prélèvements sanguins et dans les organes avec les souches de surexpression de Rbt1 par rapport à une souche sauvage. Enfin, les résultats d'adhésion aux cellules HeLa et Caco-2 obtenus au cours de ce projet ont déjà soulevé l'hypothèse que les protéines de surface de *C. albicans* seraient masquées par la surexpression de Rbt1FL. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier que certaines protéines de surface ne sont plus accessibles en surface par un anticorps spécifique. Toutefois, il est important de garder en tête que ces agrégats sont obtenus en conditions de surexpression et afin de pouvoir transposer cette étude sur le rôle de Rbt1 dans la pathogénie de *C. albicans*, il s'avère indispensable de trouver les conditions où *RBT1* est le plus fortement exprimé. Une récente étude a montré que le gène *RBT1* était surexprimé dans les biofilms matures de 40h (Bonhomme et al., 2011).

# ***MATERIELS ET METHODES***



## A/ Matériels biologiques

### I. Souches utilisées

#### I. 1 Liste des souches utilisées

Tableau 1 : Liste des souches utilisées dans cette étude

Nom	Parent	Génotype	Source
<b><i>C. albicans</i></b>			
SC5314	Isolat clinique	Souche sauvage de <i>Candida albicans</i>	(Gillum et al., 1984)
CAI4	SC5314	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 iro1/iro1::imm434</i>	(Fonzi and Irwin, 1993)
CAI4 Clp10	CAI4	<i>iro-ura3Δ::λimm434/iro-ura3Δ::λimm434, RPS10::Clp10-URA3</i>	(Hobson et al., 2004)
BWP17	CAI4	<i>iro-ura3Δ::λimm434/iro-ura3Δ::λimm434</i>	
		<i>his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG</i>	(Wilson et al., 1999)
DAY286	BWP17	<i>iro-ura3Δ::λimm434/iro-ura3Δ::λimm434</i>	
		<i>his1::hisG/his1::hisG pARG4::URA3::arg4::hisG/arg4::hisG</i>	(Davis et al., 2000)
DAY185	DAY286	<i>ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/HIS1::his1::hisG</i>	(Davis et al., 2000)
		<i>arg4::hisG/ARG4::URA3::arg4::hisG PEP12/PEP12</i>	
RBY 1175*	SC5314	<i>arg4/arg4</i>	(Schaefer et al., 2007)
* souche renommée CAY1175 dans cette étude			
CAY 171	SC5314	<i>leu2/leu2 his1/his1 arg4/arg4 rbt1::LEU2/rbt1::HIS4</i>	(Ene and Bennett, 2009)
<b><i>S. cerevisiae</i></b>			
BY4742		<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
<b><i>Banque de surexpression et de sécrétion<sup>a</sup></i></b>			
<u>PGA2.4</u>	CAI4	+pExpV5-PGA2 clone 4 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA2.8</u>	CAI4	+pExpV5-PGA2 clone 8 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA4.2</u>	CAI4	+pExpV5-PGA4 clone 2 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA4.6</u>	CAI4	+pExpV5-PGA4 clone 6 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA7.3</u>	CAI4	+pExpV5-PGA7 clone 3 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA7.8</u>	CAI4	+pExpV5-PGA7 clone 8 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA15.2</u>	CAI4	+pExpV5-PGA15 clone 2 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA15.3</u>	CAI4	+pExpV5-PGA15 clone 3 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA21.7</u>	CAI4	+pExpV5-PGA21 clone 7 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA21.8</u>	CAI4	+pExpV5-PGA21 clone 8 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA24.3</u>	CAI4	+pExpV5-PGA24 clone 3 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA24.7</u>	CAI4	+pExpV5-PGA24 clone 7 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA28.4</u>	CAI4	+pExpV5-PGA28 clone 4 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA28.6</u>	CAI4	+pExpV5-PGA28 clone 6 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA31.2</u>	CAI4	+pExpV5-PGA31 clone 2 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA31.5</u>	CAI4	+pExpV5-PGA31 clone 5 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA37.3</u>	CAI4	+pExpV5-PGA37 clone 3 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA37.8</u>	CAI4	+pExpV5-PGA37 clone 8 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA44.3</u>	CAI4	+pExpV5-PGA44 clone 3 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA44.8</u>	CAI4	+pExpV5-PGA44 clone 8 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA50.4</u>	CAI4	+pExpV5-PGA50 clone 4 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA50.5</u>	CAI4	+pExpV5-PGA50 clone 5 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA55.5</u>	CAI4	+pExpV5-PGA55 clone 5 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PGA55.8</u>	CAI4	+pExpV5-PGA55 clone 8 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>1PGA60.1</u>	CAI4	+pExpV5-1PGA60 clone 1 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>1PGA60.3</u>	CAI4	+pExpV5-1PGA60 clone 3 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>2PGA60.4</u>	CAI4	+pExpV5-2PGA60 clone 4 <i>URA3</i>	Cette étude



Nom	Parent	Génotype	Source
<b>Banque de surexpression et de sécrétion<sup>a</sup> (suite)</b>			
<u>2PGA60.13</u>	CAI4	+pExpV5-2PGA60 clone 13 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>IFF2C.1</u>	CAI4	+pExpV5-IFF2C clone 1 <i>URA3</i>	Cette étude
IFF2C.2	CAI4	+pExpV5-IFF2C clone 2 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>IFF2L.1</u>	CAI4	+pExpV5-IFF2L clone 1 <i>URA3</i>	Cette étude
IFF2L.2	CAI4	+pExpV5-IFF2L clone 2 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>ORF19.4955.4</u>	CAI4	+pExpV5-ORF19.4955 clone 4 <i>URA3</i>	Cette étude
ORF19.4955.8	CAI4	+pExpV5-ORF19.4955 clone 8 <i>URA3</i>	Cette étude
RBT1.6	CAI4	+pExpV5-RBT1 clone 6 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>RBT1.13</u>	CAI4	+pExpV5-RBT1 clone 13 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>ALS3.2</u>	CAI4	+pExpV5-ALS3 clone 2 <i>URA3</i>	Cette étude
ALS3.5	CAI4	+pExpV5-ALS3 clone 5 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>HWP1.4</u>	CAI4	+pExpV5-HWP1 clone 4 <i>URA3</i>	Cette étude
HWP1.9	CAI4	+pExpV5-HWP1 clone 9 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>CHT2.2</u>	CAI4	+pExpV5-CHT2 clone 2 <i>URA3</i>	Cette étude
CHT2.3	CAI4	+pExpV5-CHT2 clone 3 <i>URA3</i>	Cette étude
PLB5.5	CAI4	+pExpV5-PLB5 clone 5 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PLB5.8</u>	CAI4	+pExpV5-PLB5 clone 8 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PRA1C.1</u>	CAI4	+pExpV5-PRA1C clone 1 <i>URA3</i>	Cette étude
PRA1C.2	CAI4	+pExpV5-PRA1C clone 2 <i>URA3</i>	Cette étude
<u>PRA1L.2</u>	CAI4	+pExpV5-PRA1L clone 2 <i>URA3</i>	Cette étude
PRA1L.3	CAI4	+pExpV5-PRA1L clone 3 <i>URA3</i>	Cette étude

<sup>a</sup>la souche soulignée es le clone utilisé dans les expériences de criblage de cette étude

### Caractérisation de *Rbt1*

ScEap1	BY4742	+pBC542-EAP1 <i>HIS3</i>	Cette étude
ScRbt1SL	BY4742	+pBC542-RBT1SL <i>HIS3</i>	Cette étude
ScRbt1FL	BY4742	+pBC542-RBT1FL <i>HIS3</i>	Cette étude
ScΔNRbt1SL	BY4742	+pBC542-ΔNRBT1SL <i>HIS3</i>	Cette étude
ScΔNRbt1FL	BY4742	+pBC542-ΔNRBT1FL <i>HIS3</i>	Cette étude
OExRbt1SL	DAY185	+pExpV5-RBT1SL <i>HIS3</i>	Cette étude
OExRbt1FL	DAY185	+pExpV5-RBT1FL <i>HIS3</i>	Cette étude
Rbt1SL-V5 pACT1	CAI4	+pACT1-RBT1SL <i>URA3</i>	Cette étude
Rbt1FL-V5 pACT1	CAI4	+pACT1-RBT1FL <i>URA3</i>	Cette étude
Rbt1SL-V5 pRBT1	CAI4	+pRBT1-RBT1SL <i>URA3</i>	Cette étude
Rbt1SL-V5 pRBT1	CAI4	+pRBT1-RBT1FL <i>URA3</i>	Cette étude

## I. 2 Liste des amorces utilisées

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées dans cette étude

Número	Nom	Séquence
<b>Construction de la banque de surexpression et de sécrétion</b>		
1	PGA2-46Avr	AGCCCTAGGGGTGATTACCAATTTCAACTG
2	PGA2-519RSph	CCGCATGCATCGTCACCTTCGTCAAGAG
3	PGA4-55Avr	AGCCCTAGGATTGCTCCATCAAAGTTGAAG
4	PGA4-1197RSph	CCGCATGCAATGGAGGACGTGTAGTTACC
5	PGA7-43Avr	AGCCCTAGGGATTACGGTAACCTTTGGTACATA
6	PGA7-390RSph	CCGCATGCAGTAACTTCCTTAGCATCTCCA
7	PGA15-49Avr	AGCCCTAGGGCTCAAAGAATCTACAACAAAG
8	PGA15-429SphR	CCGCATGCTGAACCTGTTTTAGAGCCGGTA
9	PGA21Avr67	AGCCCTAGGGCATCATCCGATGTTCAATTC
10	PGA21Sph324R	CCGCATGCACCTTTGCCACCAGCATCAG

Numéro	Nom	Séquence
--------	-----	----------

**Construction de la banque de surexpression et de sécrétion (suite)**

11	PGA24Avr64	AGCCCTAGGCAAGATGTTGCTTGTGGTTG
12	PGA24Sph492R	CCGCATGCACCTGGAACGTAATCAACAAC
13	PGA28Avr79	AGCCCTAGGAATGGCTGCGAAGTGAATC
14	PGA28Sph357R	CCGCATGCGTCAGTTTCAAAATCACTATAAC
15	PGA31Avr55	AGCCCTAGGGCCATTAAAGACATTCAATTATATG
16	PGA31Sph483R	CCGCATGCTCTTTATCGTCACCAGTGAATTT
17	PGA37Avr271	AGCCCTAGGAGAAATTGGGGAAGTAATCAATAC
18	PGA37Sph582R	CCGCATGCATGGGTAGAAGGAATATTTAGTG
19	PGA44Avr67	AGCCCTAGGGATCTTGGTGGACCATGTTTTT
20	PGA44Sph504R	CCGCATGCTCCAGGGGAATTTCAATATAG
21	PGA50Avr52	AGCCCTAGGGTTACAAATTACAATCTTGGTTC
22	PGA50Sph702R	CCGCATGCTTTTGACGCCAATCCAGAAGTG
23	PGA55LAvr2578	AGCCCTAGGGAATGCATCAGCTCATCAAGC
24	PGA55LSph4143R	CCGCATGCTCCCTGTAAAACACCCGGCAG
25	1PGA60Avr55	AGCCCTAGGAATGATTTATTTCAAGTTAAAACC
26	1PGA60Sph522R	CCGCATGCTGAAAAGTCAGTCGAGGATTC
27	2PGA60Avr874	AGCCCTAGGGAAGGACCATCAGGAGGAAA
28	2PGA60Sph1296R	CCGCATGCCGTCTCAGTTTCATCAATTTCA
29	IFF264ClaAvr	CCATCGATCCTAGGGTTATCACTGAAGATAGAGTTG
30	IFF2-1023SphR	CCGCATGCTGTTCTGGCGCGGTAGGC
31	IFF2-1122SphR	CCGCATGCACCATTTGAATCGGTGAGAATATC
32	ORF19.4955Avr133	AGCCCTAGGGGAAAAGATTTTTTGATAAACTG
33	ORF19.4955Sph1302	CCGCATGCATCAGTGCATTCAATTTCTCCA
34	RBT1Avr61	AGCCCTAGGACTTCCCATTTGGGTGAC
35	RBT1Sph834R	CCGCATGCTGATGGAGATGGGGTGTCAC
36	ALS3Avr52	AGCCCTAGGAAGACAATCACTGGTGTTTTCAA
37	ALS3Sph1083R	CCGCATGCAGGTTTCAAAATTTCAATGTCTT
38	HWP1-82Avr	AGCCCTAGGCAAGGTGAAACAGAGGAAGC
39	HWP1-577RSph2	CCGCATGCTGGCTTTCTGGGAATATCTGG
40	CHT2-64Avr	AGCCCTAGGTCTAATCAAGTTGCTCTTTACTG
41	CHT2-915RSph	CCGCATGCATTTGGTTTAAAACATTCTTGAC
42	PLB5Avr322	AGCCCTAGGTATGCTCCATTTAATTTGACATG
43	PLB5Sph2193R	CCGCATGCAACCAAGTCTCCACCATTTTTTC
44	PRA1Avr46	AGCCCTAGGGCACCAGTTACGGTTACCAG
45	PRA1Sph726R	CCGCATGCACCATCTCCATTGCACCCTTC
46	PRA1Sph897R	CCGCATGCACAGTGACTTCACCATCTG

**Vérification des plasmides**

47	M13-UP	TGTAAAACGACGGCCAGT
48	M13-DO	CAGGAAACAGCTATGACC
49	PACT3131	CACCAAGATTTATTGCCAACG
50	RP10-1250R	CGTATTCATTAATCCCACT
51	PGLUC-4652	GTTTTGTACCTATATGACTCTTC

**Construction dans pBC542 pour la construction des souches d'expression hétérologue**

52	RBT1AttB1ATG	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAACTATGAGATTTGCAACTGC
53	RBT1AttB22098R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCAATGAAGAGACTGAAGC
54	EAP1AttB1ATG	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAAATGAAAGTTTCTCAAATTTTACC
55	EAP1AttB21894R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCAAAAGTGGAAACTTGAGC
56	RBT1XbaATG	CCCTCTAGACTATGAGATTTGCAACTGCC
57	RBT1Xho824R	CCCCTGAGGGGGTGCACATTGACAGTC
58	RBT1Nhe60R	CCCCTAGCCTCAGTGGATAAAATGTAG
59	RBT1Xba805	CCCTCTAGAGACTGTCAATGTGACCCC
60	RBT1Xho2090R	CCCCTGAGGAAGAGACTGAAGCAATAGTG

Numéro	Nom	Séquence
<b>Construction des souches de surexpression en remplaçant le promoteur natif RBT1 par TEF1</b>		
61	JRBT1PUp	CTTAATATCTACAAAGATAGCCTGCTGTAATGACAGTATTTTCTTTAATTGCTCATGTCATTT AGTATTTACGAAAATGAGTCTGGACGATACATCGATTTCCAGTCACGACGTTCC
62	JRBT1PDo	GTGGAATACAATTAAGATGTCACCCAATAATGGGAAAGTAGCCTCAGTGGATAAAATGTA GTAAGCGAGGGCAGCGAGTTGGGAGTTGCAAATCTCATGATTGATTATGACTATAAATGTG
63	PTEFMIuF	ACGCGTGTAACGCTGATACGGCAT
<b>Construction des souches RBT1 étiquetées V5</b>		
64	RBT1ATGHind	GCAAGCTTCAACTATGAGATTGCAACTGCC
65	RBT1V5F820	CCAAATCCATTGTTGGGTTGGATTCAACTACCCCATCTCCATCAACTACC
66	RBT1V5R819	ACCCAACAATGGATTTGGAATTGGTTTACCGTCACATTGACAGTCCCAAC
67	Rbt1STOPPst	CCCTGCAGCAAGACCAATAATAGC
68	RP10-1250R	CGTATTCACCTAATCCCACT
69	PGLUC-4652	GTTTTGTACCTATATGACTCTTC
70	PRBT1F	AAATCTCGTATTAGTCATTCGC
71	V5R	CCAAACCAACAATGGATTTGG
<b>RT-PCR</b>		
72	RBT1qFb	TCAATGCCGCATTTGTCGTGCT
73	RBT1qRb	AAGGCCAGGTTCAATTGGACAG

## II. Cellules de mammifères utilisées

### II. 1 Cellules HeLa

La lignée cellulaire HeLa est issue d'un prélèvement de métastase effectué sur une patiente, Henrietta Lacks, atteinte d'un cancer du col de l'utérus. Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales ayant des propriétés de cellules adhérentes. Les cellules HeLa utilisées dans nos expériences proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection, [www.atcc.org/](http://www.atcc.org/)). Elles sont cultivées en flasque de 75 cm<sup>2</sup> dans un milieu H10 à 37°C + 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu H10 est composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de 10 % de serum de veau fœtal (Gibco), de 100 mM d'acides aminés non essentiels, de 100 µg/ml de streptomycine et de 100 µg/ml de pénicilline. Le milieu H10 est renouvelé tous les 2/3 jours. Après élimination du milieu H10, les cellules HeLa sont lavées avec 15 ml de DMEM puis incubées avec 4 ml de trypsine pendant 2 min à 37°C + 5 % CO<sub>2</sub>. Les cellules HeLa ainsi détachées sont récoltées en ajoutant 10 ml de milieu DMEM, puis centrifugées rapidement pendant 5 min à 1000 rpm pour inactiver l'action de la trypsine. Le culot cellulaire est alors repris dans du milieu H10 et réensemencé dans une nouvelle flasque. Les cellules HeLa sont conservées à une concentration cellulaire comprise entre 2.10<sup>6</sup> et 6.10<sup>6</sup> cellules/ml et une viabilité cellulaire supérieure à 90 % dans un milieu de conservation composé de 90 % de serum de veau fœtal + de 10 % de DMSO à -80 °C pendant 24h puis en azote liquide.

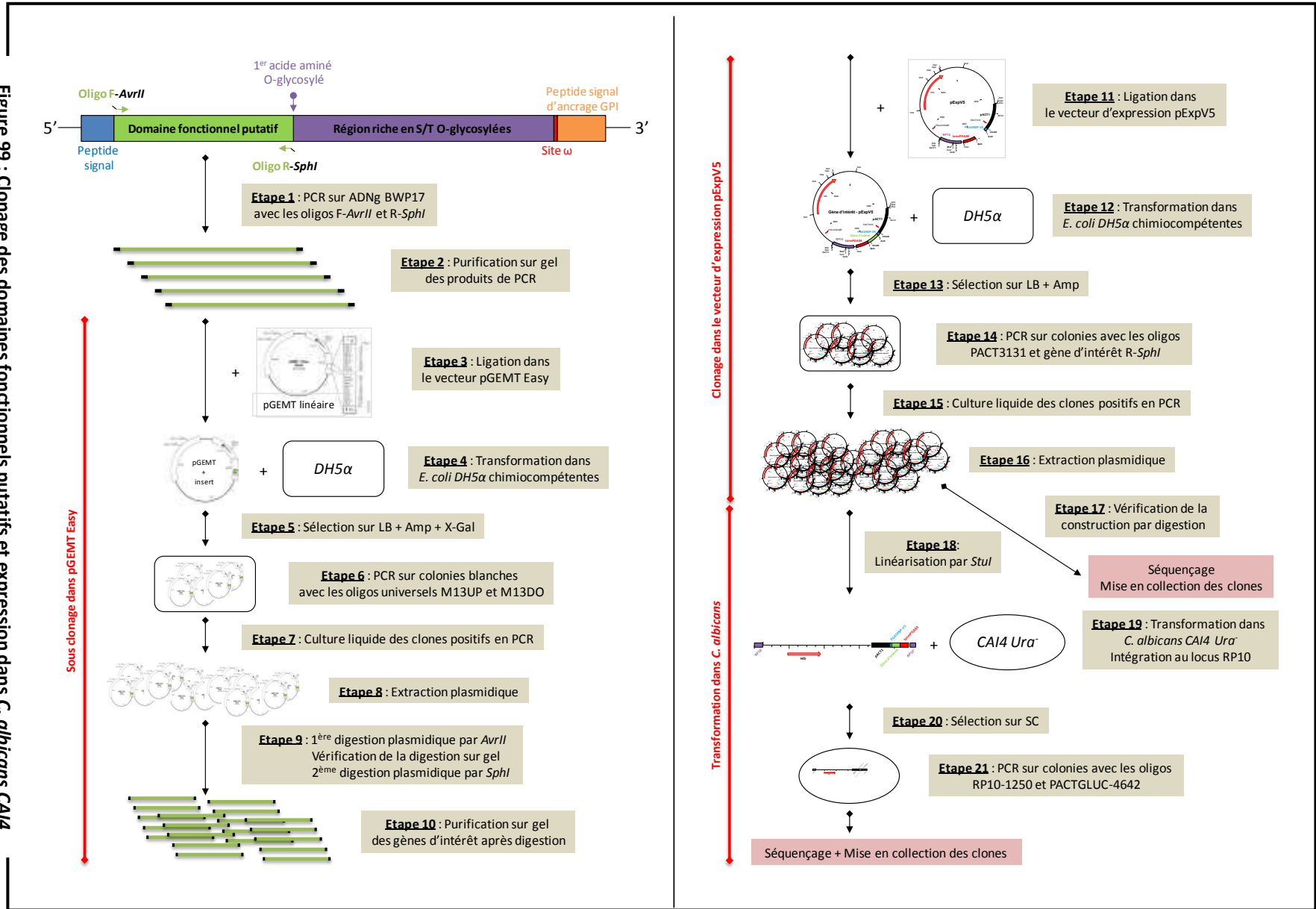
## II. 2 Macrophages

Les macrophages de la ligne J774A.1 sont issus d'une tumeur de souris BALB/c. Ces cellules aux propriétés adhérentes possèdent la capacité de phagocytose et sécrètent du lysosyme et de l'interleukine-1  $\beta$ . Le lot cellulaire utilisé au cours de nos expériences provient de l'ATCC (American Type Culture Collection, [www.atcc.org/](http://www.atcc.org/)). Les macrophages J774A.1 sont cultivés en flasque de 75 cm<sup>2</sup> dans un milieu D10 à 37°C + 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu D10 est composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de 10 % de serum de veau fœtal (Gibco) et de 100  $\mu$ g/ml de streptomycine et de 100  $\mu$ g/ml de pénicilline. Le milieu D10 est renouvelé tous les 2/3 jours. Après élimination du milieu D10, les macrophages sont lavés avec 15 ml de DMEM puis détachés par grattage mécanique dans 10 ml de DMEM. Les cellules récoltées sont centrifugées pendant 5 minutes à 1300 rpm et le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu D10 puis reensemencé dans une nouvelle flasque. Les macrophages J774A.1 sont conservés à une concentration cellulaire comprise entre 2.10<sup>6</sup> et 6.10<sup>6</sup> cellules/ml et une viabilité cellulaire supérieure à 90 % dans un milieu de conservation composé de 90 % de sérum de veau fœtal + de 10 % de DMSO à -80 °C pendant 24h puis en azote liquide.

## B/ Méthodes de biologie moléculaire

### I. Construction des souches de la banque de surexpression et de sécrétion

Les différentes étapes de la construction de la banque de surexpression et de sécrétion sont récapitulées dans la Figure 99. En quelques mots, les séquences codant les domaines fonctionnels putatifs ont été amplifiées en utilisant deux amorces spécifiques : l'amorce F située en aval du peptide signal qui contient un site *AvrII* et l'amorce R située en amont du premier acide aminé O-glycosylé qui contient un site *SphI*. Les fragments de PCR ont été sous-clonés dans le vecteur pGEMT Easy. Puis, les plasmides obtenus ont été digérés par les enzymes *AvrII* et *SphI* et les fragments d'ADN ont été clonés dans le vecteur d'expression pExpV5. Ces deux premiers clonages ont été réalisés dans la souche *E. coli DH5 $\alpha$* . Enfin, les plasmides pExpV5 ont été linéarisés par *StuI* permettant ainsi l'intégration au locus *RP10* chez *C. albicans CA14*.

Figure 99 : Clonage des domaines fonctionnels putatifs et expression dans *C. albicans* CAI4

## II. Construction des souches pour l'étude de la protéine Rbt1

### II. 1 Construction des souches d'expression hétérologue

Pour obtenir les constructions exprimant les protéines Rbt1SL, Rbt1FL et Eap1, les séquences codantes ont été amplifiées à partir de l'ADN génomique de BWP17 et clonées dans le vecteur d'expression pBC542 en utilisant le système Gateway (Figure 100).

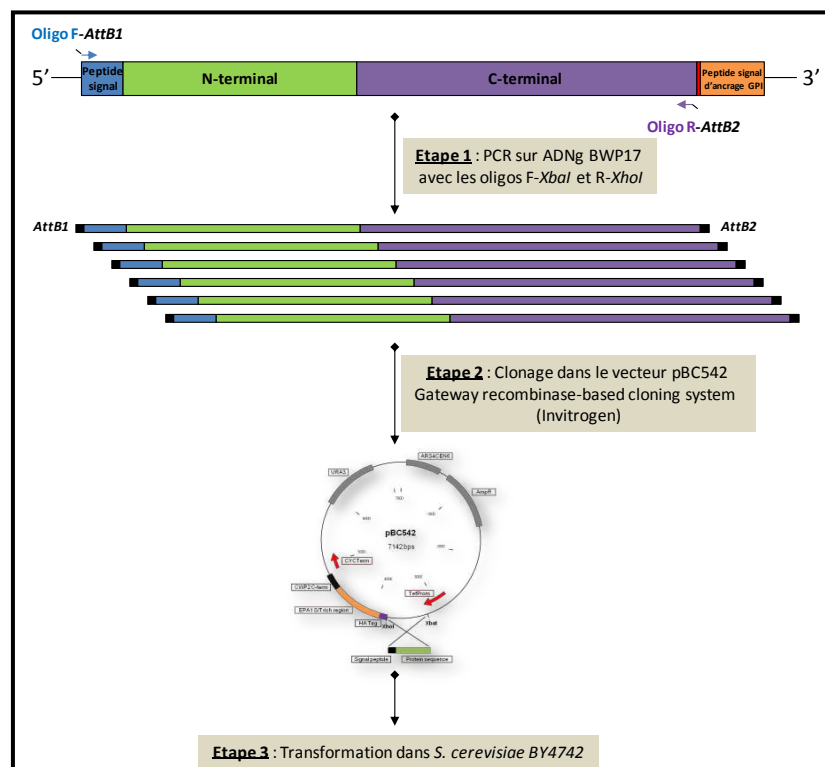


Figure 100 : Clonage des séquences codantes de Rbt1SL, Rbt1FL et Eap1 dans pBC542 en utilisant le système Gateway dans *S. cerevisiae* BY4742

Les séquences codantes des constructions N-term,  $\Delta$ NRbt1SL et  $\Delta$ NRbt1FL ont été clonées par digestion enzymatique dans le vecteur pBC542 (Figure 101). Brièvement, la séquence codante du domaine N-terminal a été amplifiée par PCR avec un couple d'amorces spécifiques du domaine N-terminal (l'amorce forward en amont du peptide signal permet l'ajout du site *XbaI* et l'amorce reverse en aval du domaine N-terminal permet l'ajout du site *XhoI*) puis les fragments de PCR sont digérés par *XbaI* et *XhoI* et clonés dans le vecteur pBC542. Les vecteurs recombinants sont ensuite transférés dans la souche de *S. cerevisiae* BY4742, tout comme le vecteur natif pBC542 afin d'obtenir un témoin négatif. Les constructions  $\Delta$ NRbt1SL et  $\Delta$ NRbt1FL ont été obtenus suite à deux PCR indépendantes permettant l'amplification d'une part du peptide signal et d'autre part du domaine C-terminal (de Rbt1SL ou de Rbt1FL), les fragments de PCR ont ensuite été digérés par *NheI* et *XbaI* puis

ligués entre eux avant digestion par *Xba*I et *Xho*I et clonage dans le vecteur pBC542. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage par la société GATC au stade pBC542.

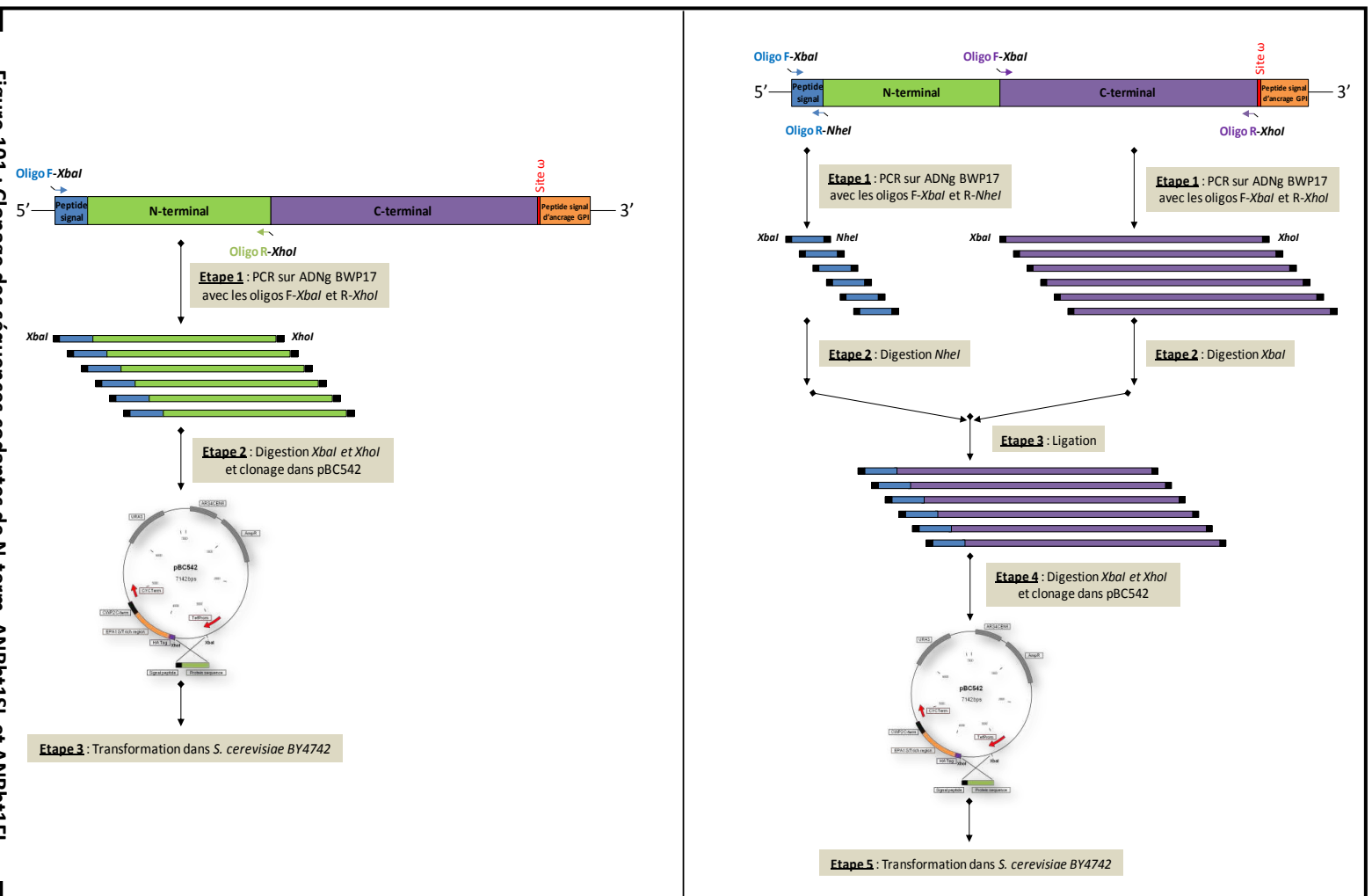


Figure 101 : Clonage des séquences codantes de N-term, ANRbt1SL et ANRbt1FL dans pBC542 et transformation dans *S. cerevisiae* BY4742

## II. 2 Construction des souches de surexpression

L'ADN plasmidique d'un vecteur pGEMT recombinant a été amplifié par PCR avec des amorces spécifiques permettant l'ajout d'une centaine de nucléotides identiques au promoteur *RBT1* à chaque extrémité d'une séquence codant le gène *HIS1* suivi du promoteur *TEF1*. Le produit de PCR a été purifié, concentré puis utilisé pour transformer la souche de *C. albicans* DAY286. L'échange de promoteur *RBT1* par le promoteur *TEF1* est alors effectué par double recombinaison homologue (Figure 102).

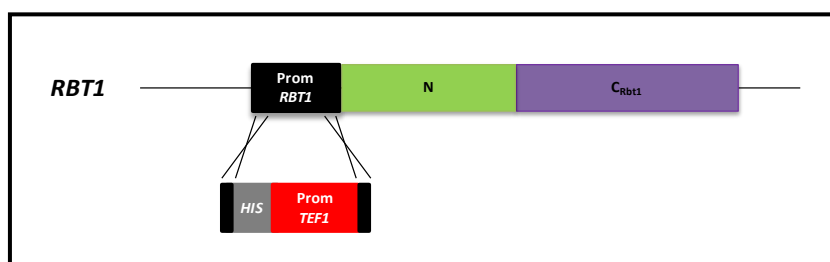


Figure 102 : Remplacement du promoteur natif de *RBT1* par le promoteur fort constitutif *TEF1* par double recombinaison homologue

## II. 3 Construction des souches étiquetées V5

Les souches étiquetées V5 pour les deux allèles de *RBT1* ont été obtenues après insertion de l'étiquette V5 (42 nucléotides) dans les séquences Rbt1SL et Rbt1FL entre le domaine N-terminal et C-terminal. Pour cela, deux réactions d'amplification par PCR ont été réalisées indépendamment : la première PCR a permis l'amplification des protéines Rbt1 à partir de l'ATG jusqu'à la fin du domaine N-terminal et d'ajouter en position 3' les 30 premiers acides aminés de l'étiquette V5 apportés par l'amorce reverse ; la seconde PCR a permis l'amplification des protéines Rbt1 à partir du domaine C-terminal jusqu'au codon STOP et d'ajouter, en position 5', les 30 derniers acides aminés de l'étiquette V5 apportés par l'amorce forward (Figure 103). Les produits de PCR ainsi obtenus possédant 18 nucléotides complémentaires ont été mélangés puis dénaturés, la température a ensuite été diminuée pour permettre l'hybridation entre les deux fragments de PCR. Les produits de PCR hybridés ont été amplifiés par une seconde PCR en utilisant les amorces ATG et STOP dans lesquelles les sites de restriction *HindIII* et *PstI* ont été respectivement intégrés. Les produits d'amplification ont été sous-clonés dans le vecteur pGEMT puis clonés dans le vecteur pExpV5 décrit précédemment (Projet 1, C/I p70). Les vecteurs recombinants avec l'allèle court de *RBT1* ou l'allèle long de *RBT1* étiquetés V5 ont été insérés dans la souche sauvage CAI4 au locus *RP10* après



linéarisation par *StuI* obtenant ainsi des souches exprimant les protéines Rbt1-V5 sous le contrôle du promoteur *ACT1*, ou au locus *RBT1* après linéarisation par *AflIII* obtenant ainsi des souches exprimant les protéines Rbt1-V5 sous le contrôle natif *RBT1*.

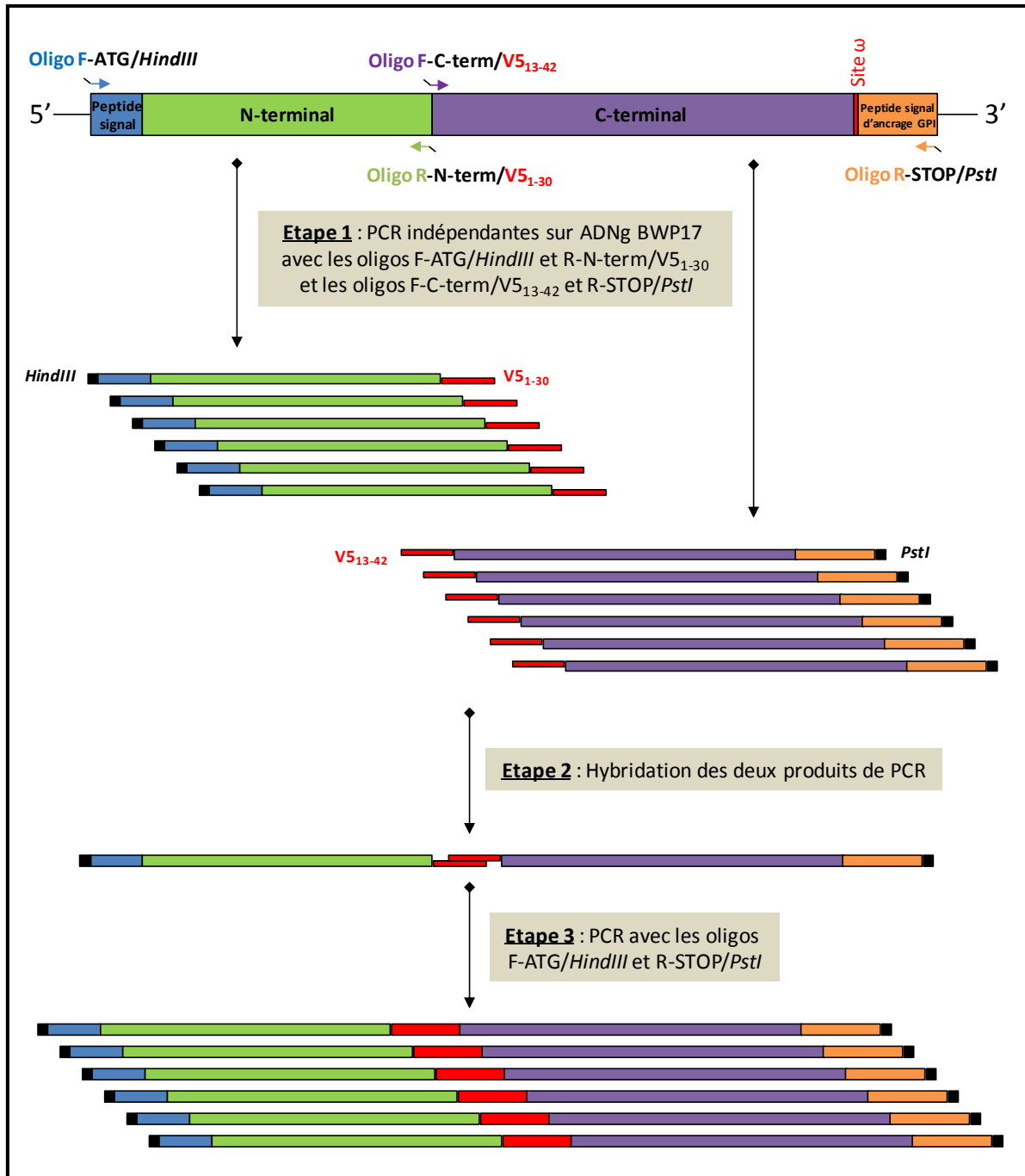


Figure 103 : Insertion d'une étiquette V5 entre les domaines N-terminal et C-terminal des allèles *RBT1*

### III. Séquençage

Les séquençages pour la vérification des plasmides ont été réalisés par la société GATC (<http://www.gatc-biotech.com/en/index.html>).

### IV. RT-qPCR

#### IV. 1 Préparation des cellules

##### a. Préparation des levures

A partir d'une préculture de 16h en milieu SC pH7 à 30°C, les cellules ont été diluées à DO=0,25 dans du milieu SC pH7 frais et incubées à 30°C jusqu'à DO=1. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 4000 rpm et 4°C puis le culot cellulaire a été congelé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C.

##### b. Préparation des hyphes

A partir d'une préculture de 16h en milieu SC pH5 à 30°C, les cellules ont été diluées à DO=1 dans du milieu SC pH7 frais et incubées à 37°C pendant 2h. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 4000 rpm et 4°C puis le culot cellulaire a été congelé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C.

#### IV. 2 Dosage par qPCR

##### a. Extraction des ARNs

Les ARNs ont été extraits en utilisant le kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) et en suivant les instructions du fabricant. Les cellules ont été broyées mécaniquement à l'aide de microbilles de verres couplées à l'utilisation de FastPrep de Q-Biogene (3 cycles de 60 secondes à la vitesse de 6,5 m/s). Les ARNs ont été traités à la DNase en suivant les instructions du kit TURBO DNA-free™ (Ambion) puis conservés à -80°C. La concentration des acides nucléiques a été mesurée au NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific).

### **b. Transcription inverse**

L'ADN complémentaire a été 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.

### **c. Quantification par qPCR**

Le taux d'expression des gènes a été déterminé 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 obtenu par transcription inverse a été dilué au 1/100<sup>e</sup>. Le mix de qPCR a été constitué en suivant les instructions du kit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I. Le programme utilisé 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 avec l'appareil ROCHE. Les mesures ont été réalisées en duplicat (répliquats techniques) et sur des échantillons provenant de deux expérimentations indépendantes. Le niveau d'expression des gènes a été exprimé de façon relative par rapport à l'expression du gène de l'actine.

## **C/ Outils bioinformatiques**

Séquence protéique : <http://www.candidagenome.org/>

Prédiction du peptide signal : <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Prédiction du peptide signal d'ancrage GPI : [http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html)  
<http://gpi.unibe.ch/>

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

Prédiction des sites de O-glycosylation : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

Prédiction des sites de N-glycosylation : <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

Prédiction de régions à fort potentiel de β-agrégation : <http://tango.crg.es/>

Alignement de séquences protéiques : <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

## D/Méthodes de biochimie

### I. Purification de protéines

Les souches de la banque de surexpression et de sécrétion ont été incubées pendant 48h à 30°C dans du milieu YNB N5000. Les surnageant de culture ont été centrifugés pendant 5 min à 4000 rpm puis concentrés 10 fois sur colonne Amicon 10 kDa. 500 µl de surnageant concentrés 10 fois ont été incubés avec 1 ml de PBS x1,5 + antiprotéase et 50 µl de billes d'agarose anti-V5 pendant une nuit à 4°C sur une roue tournante. Après centrifugation, les fractions non liées ont été conservées et les billes d'agarose anti-V5 lavées 3x en PBS. L'élution a été réalisée à 75°C avec 150 µl de PBS x1 + 1% SDS pendant 10 minutes (fraction éluée 1) puis avec 100 µl pendant 5 minutes (fraction éluée).

### II. Immunodétection

#### II. 1 Traitement à l'acide periodique

La solution d'acide periodique utilisée est obtenue après dissolution dans de l'eau d'acide periodique (11,4 g/L) et d'acétate de sodium (8,2 g/L). Cette solution est conservée à température ambiante. Les membranes de nitrocellulose (après transfert ou après dépôt) ont été traitées pendant 30 minutes sous agitation et à température dans la solution d'acide periodique. Après 30 minutes, la solution d'acide periodique a été éliminée et les membranes ont été saturées avec une solution de PBST (PBS + 0,05 % Tween 20) + 2 % lait avant détection par immunoempreinte.

#### II. 2 Western-blot

Les protéines sécrétées ou extraites ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante 10 % SDS en utilisant des gels précoulés NuPAGE<sup>®</sup>Novex Tris-acetate 3-8 % (Invitrogen) dans du tampon de migration NuPAGE<sup>®</sup>Novex Tris-acetate (Invitrogen) avec le système du fournisseur Invitrogen XCell Mini-Cell. Les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose (PROTRAN) pour l'analyse par western blot. Après transfert, les membranes sont rincées dans une solution PBS (Phosphate-Buffered Saline) puis bloquées par une solution PBST (PBS plus 0.1 % Tween 20) + 2 % lait (Difco) pendant une heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite lavées trois fois en PBST, puis incubées avec l'anticorps primaire anti-V5 dilué au

1/5000<sup>e</sup> pendant une heure à température ambiante sous agitation. Après trois lavages en PBST, l'anticorps secondaire conjugué avec la peroxydase (IgG anti-lapin, GE Healthcare) dilué au 1/10000<sup>e</sup> est ajouté à la membrane dans une solution PBST + 2% lait pendant une heure à température ambiante sous agitation. Les membranes sont lavées trois fois en PBST avant révélation 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).

### **II. 3 Dot blot**

Pour les tests en dot blot, 5 µl de polypeptides purifiés ont été directement déposés sur membrane de nitrocellulose (PROTRAN). Les membranes ont ensuite révélées par western blot détaillée dans le paragraphe précédent en utilisant : (i) soit le couple anticorps primaire anti-V5 / anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase ; (ii) soit le couple sérum de patients (dilution au 1/100<sup>e</sup>) / anticorps anti-IgG humain couplé à la peroxydase.

### **II. 4 Immunofluorescence**

Les cellules intactes sont préalablement fixées dans du formaldéhyde 37% dilué 8 fois pendant 40 minutes. Après plusieurs lavages successifs, elles sont placées sur des lames revêtues de polylysine, puis bloquées à l'aide de PBS + 0,5% de BSA. Les lames sont incubées successivement en présence d'anticorps monoclonaux anti-V5 anticorps (Invitrogen) et anti-IgG de souris Cy3 anticorps conjugués (Sigma) en présence de PBS + BSA 0,5% pendant 1 heure dans l'obscurité. Après lavages en PBS, la solution de DAPI a été ajoutée (2 mg / ml de concentration finale). Avant l'étape de montage les lames sont rincées.

Pour les cellules perméabilisées, celles-ci sont cultivées à DO = 1-2, lavées et remises en suspension dans du tampon phosphate pH 7,5 de concentration 5X avant d'être fixé à l'aide du formaldéhyde 37% dilué 8 fois pendant 40 minutes à température ambiante. Après 3 lavages dans un tampon phosphate, les cellules sont incubées pendant 20 minutes à 37°C dans un tampon sorbitol + Zymolyase 100T (0,5 mg/ml final). Avant centrifugation, 2 volumes de tampon sorbitol froid sont ajoutés puis 2 lavages sont effectués dans un tampon de sorbitol. Enfin, les cellules sont remises en suspension dans un tampon de sorbitol avant de procéder à l'immunofluorescence. Les cellules sont examinées par microscopie à fluorescence (Olympus BX51) avec une longueur d'onde d'excitation de

512nm et un filtre d'émission à 565-nm. Les objectifs utilisés sont l'Olympus 100X à immersion d'huile et l'oculaire 10X.

### III. Préparation des fractions cellulaires

Les cellules de *C. albicans* CAI-4 transformées ont été récoltées par centrifugation puis lavées avec 1mM de Tris-HCl contenant 10 mM de  $\text{NaN}_3$ . Après les avoir remises en suspension dans un tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH 7,5 NaCl 150 mM) complété d'anticorps anti-protéases (Complete, EDTA free, Roche) et de billes de verres, les cellules ont été lysées en quatre étapes de 20 secondes à l'aide du 24-Beater™ (MP Biomédical, Californie, USA), tout en prenant soin de les placer 5 minutes dans la glace entre chaque étape. Les parois cellulaires ont été ensuite récupérées par centrifugation (4000g pendant 10 min à 4°C) puis ont été lavées abondamment avec du NaCl 1M. Afin de solubiliser les protéines non covalentes de la paroi cellulaire et pour éliminer les protéines de la membrane plasmique, le culot est incubé deux fois 10 min au bain marie en présence de 50 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 10 mM, pH 8, SDS 2%. Après un lavage à l'eau, le culot de parois est re-suspendu dans 20mM NaAc pH 4,5, et est incubé pendant 3 heures à 37°C en présence de  $\beta$ -1,6-glucanase (Boisrame and Gaillardin, 2009). Après une centrifugation 5 min à 10000 g, le culot est éliminé et les protéines solubilisées ont été concentrés sur Microcon™ 50 (Millipore) avant analyse par western blot.

## E/ Méthodes d'analyses phénotypiques

### I. Dosage d'activité chitinase

Les souches de surexpression et de sécrétion ont été incubées pendant une nuit dans 3 ml de YPD à 30°C. Le lendemain, la préculture a été diluée au 1/100<sup>e</sup> dans 50 ml de YPD pendant 6h à 30°C afin d'obtenir une quantité de cellules ne dépassant pas 10<sup>7</sup> cellules/ml. Les surnageants de culture ont ensuite été concentrés 20 fois sur colonne Amicon 10 kDa. Le dosage de l'activité chitinase a été réalisé en microplaque 96 puits non transparentes. 20  $\mu$ l de surnageants ont été mélangés avec 5  $\mu$ l de substrat 4-methylumbelliferyl-N,N',N'',N''' tetra acetyl- $\beta$ -D-chitotetraoside (Sigma) + 80  $\mu$ l de tampon McIlvaine pH5 (10,3 ml de solution  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 9,7 ml de solution d'acide citrique). Pour le témoin négatif, le mélange est composé de 20  $\mu$ l de surnageant de culture concentré 10 fois + 80  $\mu$ l de tampon McIlvaine. Après distribution des échantillons dans les puits, la plaque est incubée

pendant 15°C à 37°C sous agitation dans le système de lecture Biotek. 200 µl de solution STOP pH 10,6 (50 ml de glycine 0,1 M + 45,5 ml de NaOH 0,1 M + 4,5 ml d'H<sub>2</sub>O) ont ensuite été ajoutés puis la plaque a été incubée 5 minutes à 40°C sous agitation. Après 5 minutes, la fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 450 nm.

## II. Tests en gouttes

La sensibilité à différents stress des souches de la banque de surexpression et de sécrétion a été étudiée par un test en gouttes. Deux clones indépendants de chacune des souches transformées ont été testés et leur croissance sur différents milieux a été comparée à celle de la souche de référence CAI4. Les différents milieux testés sont des milieux SC additionnés de caspofungine (16 et 32 µg/ml), ou de calcofluor (10, 25 et 50 µg/ml), ou d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 et 7,5 mM), ou de SDS (0,001 % et 0,005 %), ou d'acide citrique + citrate de sodium à 50 mM final (pH3), ou de glycine +NaOH (pH10). Les souches ont été cultivées une nuit à 30°C dans 3 ml de YPD puis diluées dans du YPD à une DO<sub>600nm</sub> = 1. 5 µl (ou 3 µl pour les milieux SDS) d'une série de six dilutions au dixième en cascade ont été déposés sur les milieux contenant les agents stressants. Les boîtes ont été incubées à 37°C puis observées après 24 et 48h.

## III. Test de survie au macrophage

La technique du « end point dilution » utilisée est un test à moyen débit réalisé en microplaque (Marcil et al., 2002). Précédemment à l'expérimentation, 10<sup>5</sup> macrophages sont inoculés dans 150 µl 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. La plaque est ensuite incubée à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub> pendant 24 heures. Les souches de levures sont cultivées une nuit à 30°C dans 3 ml de YPD puis elles sont lavées et resuspendues dans du milieu D10. 5.10<sup>3</sup> levures sont ensuite ajoutées aux 50 µl de D10 contenu dans chaque premiers puits de la microplaque, soit un facteur de MOI (Multiplicity Of Infection) de 1:20 (Figure 104). Ensuite, par dilution en cascade sur les puits suivant on réalise une succession de concentrations en levures décroissantes d'un facteur 4 entre chaque puits. La co-culture est incubée 48h à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Le dénombrement des colonies se fait sous le microscope optique. 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.

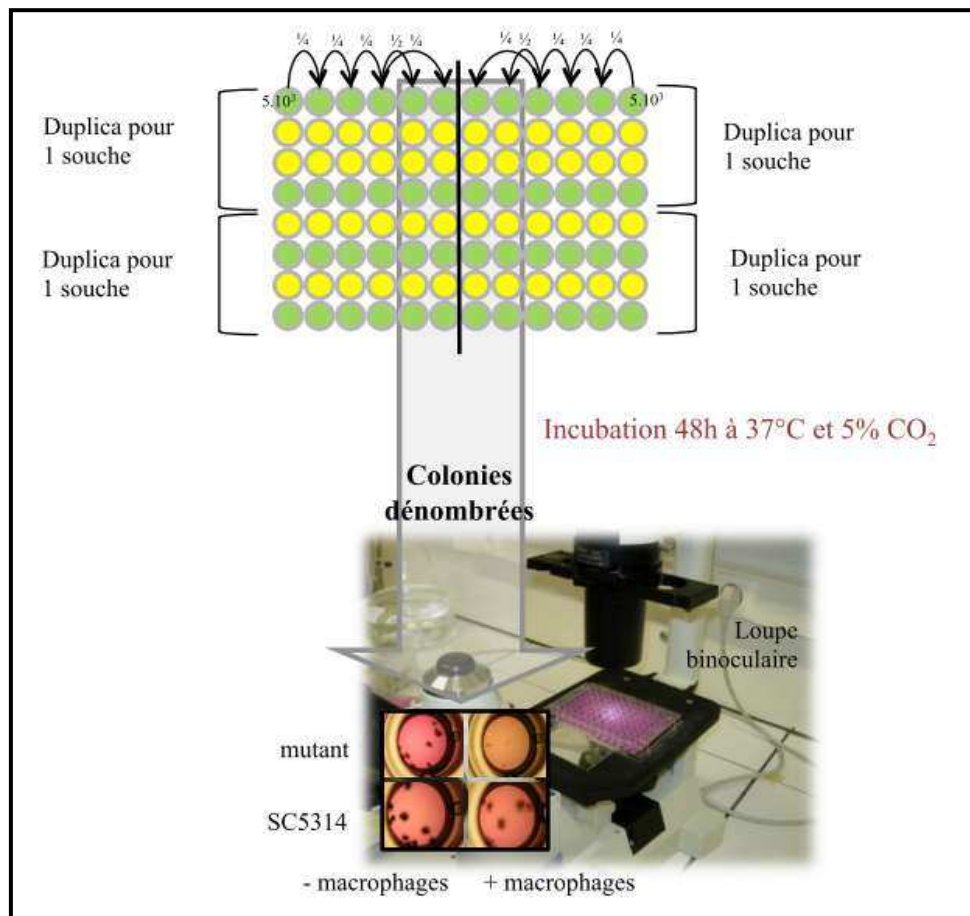


Figure 104 : Test de survie aux macrophages (Thèse A. Cornu)

## IV. Expériences d'adhésion et de formation de biofilm

### IV. 1 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. Pour cette expérience nous avons utilisé des plaques 6 puits traitées pour la culture cellulaire.  $4.10^5$  cellules HeLa sont ajoutées à 3 ml de D10 dans chaque puits pour obtenir des cellules à confluence deux jours plus tard. Un jour plus tard, les levures sont cultivées une nuit dans du YPD à 30°C. Le lendemain elles sont diluées à une  $DO_{600}$  de 0,2 dans 5 ml de SC, puis incubées 5 heures pour atteindre la phase exponentielle ( $DO_{600} = 0,8$ ). Le milieu D10 des plaques 6 puits est alors enlevé et 1 ml d'une suspension à  $10^4$  levures/ml de D10 est inoculé dans les 6 puits



(Figure 105). Après 45 minutes d'incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, les puits essais sont lavés 3 fois avec 5 ml de PBS 7.2 (1X) (Invitrogen) préalablement tempéré à 37°C. Ensuite, 1 ml de PBS est ajouté aux puits lavés et l'ensemble des cellules est décollé à l'aide d'un grattoir. Les cellules des puits contrôles non lavés sont récoltées directement à l'aide d'un grattoir. Les puits essais 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 sont dénombrées. Le nombre de cellules ayant adhéré est exprimé en fonction du nombre de cellules inoculées.

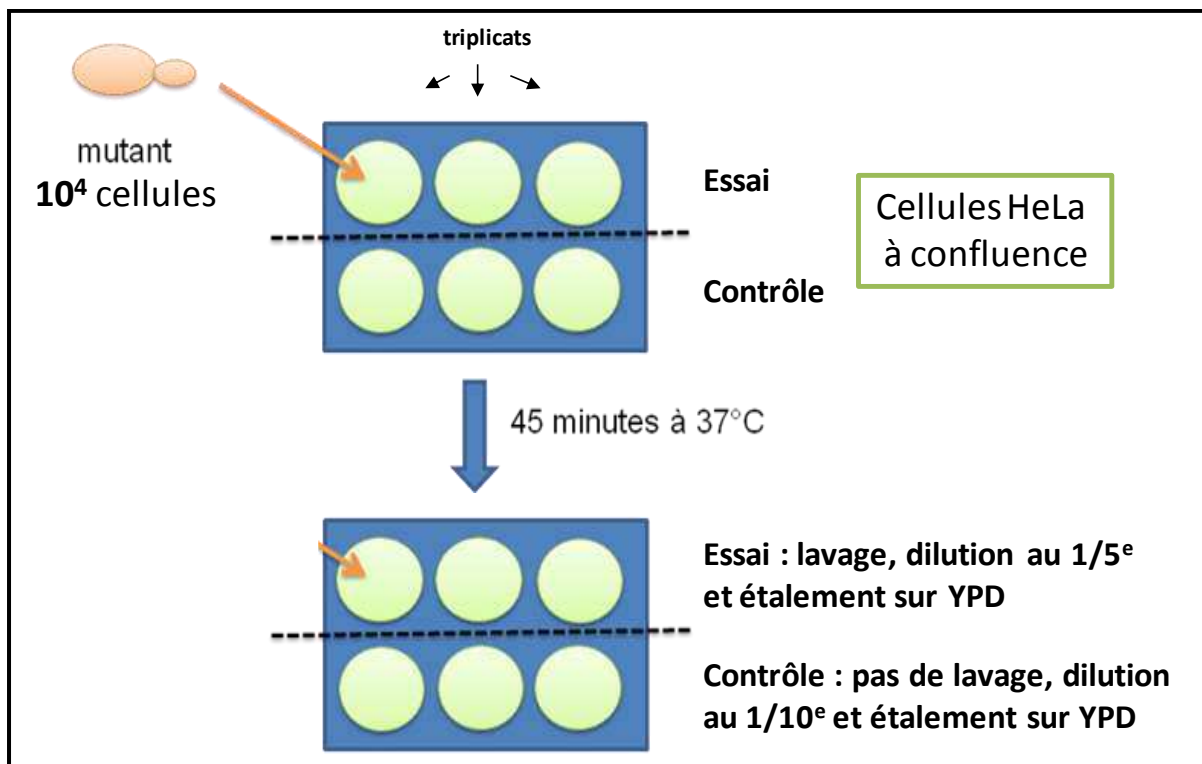


Figure 105 : Test d'adhésion aux cellules HeLa

## IV. 2 Surfaces abiotiques

### a. Polystyrène

Les souches de *S. cerevisiae* transformées sont cultivées pendant une nuit à 28°C en milieu liquide YNB N<sub>5000</sub> complété avec les acides aminés *ad hoc*, ici la leucine, l'histidine et la lysine. Les cellules ont été ajustées par du milieu frais pour obtenir une DO<sub>600nm</sub> de 1. L'adhérence des cellules est testée en plaçant 500 µl de la suspension cellulaire pendant 60 minutes à 28°C dans des puits de plaques de polystyrène stériles 24 puits traitées pour culture tissulaire (BD Falcon). Après 60 minutes, les cellules non adhérentes sont éliminées par trois lavages successifs effectués avec 1 ml de PBS. Pour la formation de biofilm, 500 µl de milieu frais YNB N<sub>5000</sub> ont été ajoutés et les plaques sont ensuite

mises en incubation pendant 24 heures à 28°C. L'adhésion et la formation de biofilm sont évaluées en colorant les cellules avec 500 µl de cristal violet 0,5 % pendant 10 min à température ambiante. Après deux lavages avec 1 ml de H<sub>2</sub>O, la plaque est incubée pendant 10 min dans 500 µl d'acide acétique à 10 %. L'absorbance de la solution obtenue après 10 minutes est alors mesurée à DO<sub>595nm</sub>.

### **b. Thermanox™**

Un inoculum a été préparé à partir d'une culture en phase stationnaire cultivées dans des fioles à 30°C sur un agitateur orbital et dilué à DO<sub>600nm</sub> = 1. Le biofilm a été réalisé en micro-fermenteur. Il est constitué d'un récipient en verre avec une chambre d'incubation de 40-ml dans lequel deux tubes de verre sont insérés pour permettre l'entrée de milieu et d'air. Un troisième tube permet d'évacuer le milieu utilisé. L'écoulement du fluide est rendu possible par une pompe de recirculation (Ismatec) et est poussé grâce à de l'air comprimé. Une barrette plastique (Thermanox™, Nunc) collée à une spatule en verre est alors immergée dans l'inoculum pendant 30 minutes à température ambiante. Après cette période d'adhésion, la spatule a été transféré à la chambre et incubées à 37°C pendant 40 heures avec le débit moyen fixées à 0,6 ml / min et à avec une adduction d'air de 105 Pa. La quantité de biofilm obtenue est alors quantifiée par mesure de la biomasse.

### **c. Silicone**

Les carrés de silicone de 1,5 cm de côté sont incubés toute la nuit dans du sérum bovin (Sigma) à température ambiante. En parallèle, les souches sont incubées à 30°C dans 3 ml de YPD. Le lendemain, les cellules sont diluées à DO<sub>600</sub> = 1 dans 2 ml de milieu SD + 50 mM glucose ou 0,4% + ajout de Methionine/AA et transférées dans un puits d'un plaque de culture cellulaire 6 puits. Les carrés de silicone coatés sont lavés dans du PBS puis distribués avec une avec une pince stérile dans les puits. La plaque est lors incubée sous agitation 150 rpm pendant 90°C à 37°C. Dans une nouvelle plaque, 2 ml de milieu frais sont ajoutés par puits. Après 90°C d'adhésion, les carrés de silicone sont lavés en PBS et transférés dans la nouvelle plaque. La plaque est alors recouverte d'un film poreux pour éviter l'évaporation puis de son couvercle et est incubée sous agitation pendant 60h à 37°C. Après 60h, les biofilms sont grattés et quantifiés par mesure de la biomasse.

## V. Détermination de l'hydrophobicité de surface

L'hydrophobicité de surface des cellules a été déterminée à partir de la méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvents) avec quelques modifications. Les cellules ont été cultivées pendant une nuit en milieu YNB N5000 supplémenté en leucine, histidine et lysine à 28°C pour les souches de *S. cerevisiae* ou à 30°C pour les souches de *C. albicans*. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois en eau physiologique et resuspendues à  $DO_{600} = 0,8$ . 150  $\mu$ l de décane a ensuite été ajouté à la suspension cellulaire. Les échantillons ont été agités pendant 15 secondes manuellement puis vortexés pendant 90 secondes. Après 15 minutes à température ambiante, la  $DO_{400nm}$  de la phase aqueuse a été mesurée correspondant à la valeur  $A_1$ . La  $DO_{400nm}$  du témoin sans décane correspond à la valeur  $A_0$ . L'hydrophobicité de surface des souches (CSH) est exprimée en pourcentage d'après la formule suivante :  $CSH = (1 - A_1/A_0) \times 100$ .

## VI. Test de filamentation

### VI. 1 En milieu semi-solide

Les tests de filamentation en milieu semi-solide ont été réalisés à partir du protocole décrit par Brown et ses collaborateurs (Brown et al., 1999). Les cellules ont été incubées dans 3 ml de YPD sous agitation à 30°C pendant une nuit. Après 16h de culture, les cellules ont été diluées à  $4.10^4$  cellules/ml dans 10 ml de YPD puis incubées pendant 4h sous agitation à 30°C. Ensuite, l'absorbance des cultures est mesurée et la quantité de cellules est estimée afin de déterminer le facteur de dilution pour avoir 100 cellules/boîte YPS. Le milieu YPS est composé de 1 % d'extrait de levure, 2 % de bacto peptone, 2 % de sucrose et 1 % d'agar afin d'obtenir un milieu « mou ». La suspension cellulaire obtenue après dilution est mélangée au milieu YPS après surfusion et après avoir repris en masse à une température assez refroidie pour ne pas tuer les cellules. Le mélange cellules/YPS est coulé dans des boîtes puis celles-ci sont incubées à 25°C pendant 72h à 144h.

### VI. 2 Sur milieu Spider

Le test de filamentation sur milieu solide a été réalisé sur milieu Spider (10 g Nutrient Broth, 10 g Mannitol, 2 g  $K_2HPO_4$  et 13,5 g/L Bacto-agar dans 1000 ml d' $H_2O$  puis ajusté à pH 7.2). Les souches ont été cultivées une nuit à 30°C dans 3 ml de YPD puis diluées dans du YPD à une  $DO_{600nm} = 1$ .

Ensuite 5  $\mu$ l d'une série de six dilutions au dixième en cascade ont été déposés sur les milieux contenant les agents stressants. Les boîtes ont été incubées à 37°C puis observées après 5 à 7 jours.

## VII. Expériences d'agrégation

Les expériences d'agrégation ont été réalisées en conditions levure et hyphe. Les cellules ont été incubées pendant une nuit dans 3 ml de milieu SC pH5 à 30°C. Le lendemain, les cellules sont diluées en milieu SC pH 7 à  $DO_{600} = 1$  puis incubées à 30°C pendant 24h pour la condition levure et en milieu SC pH 7 à  $DO_{600} = 1$  puis incubées à 37°C pendant pour la condition hyphe. Une observation macroscopique et microscopique des cultures a été réalisée au temps 1h, 2h, 3h, 4h et 24h d'incubation. Pour les expériences d'agrégation réalisées sur les formes hyphes en présence de peptides, 2  $\mu$ g/ml de peptide WT ou 20 $\mu$ g/ml de peptide V\*N ont été ajoutés au moment de la dilution de la préculture de nuit en SC pH5 à 30°C dans du milieu SC pH7. Les cellules ont alors été incubées pendant 2h à 37°C puis 24h à température ambiante. La formation d'agrégats a été évaluée par observation macroscopique et microscopique.



# ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***



**Al-Fattani, M.A., and Douglas, L.J. (2006).** Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* 55, 999-1008.

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

**Annaix, V., Bouchara, J.P., Tronchin, G., Senet, J.M., and Robert, R. (1990).** Structures involved in the binding of human fibrinogen to *Candida albicans* germ tubes. *FEMS Microbiol Immunol* 2, 147-153.

**Bahnan, W., Koussa, J., Younes, S., Rizk, M.A., Khalil, B., Sitt, S.E., Hanna, S., El-Sibai, M., and Khalaf, R.A. (2012).** Deletion of the *Candida albicans* PIR32 Results in Increased Virulence, Stress Response, and Upregulation of Cell Wall Chitin Deposition. *Mycopathologia* 174, 107-119.

**Barelle, C.J., Richard, M.L., Gaillardin, C., Gow, N.A., and Brown, A.J. (2006).** *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryot Cell* 5, 359-367.

**Barnhart, M.M., and Chapman, M.R. (2006).** Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* 60, 131-147.

**Bassetti, M., Taramasso, L., Nicco, E., Molinari, M.P., Mussap, M., and Viscoli, C. (2011).** Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One* 6, e24198.

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

**Blazek, J., Garg, R., Reed, B., and Alper, H.S. (2012).** Controlling promoter strength and regulation in *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic hybrid promoters. *Biotechnol Bioeng* 109, 2884-2895.

**Boisrame, A., Cornu, A., Da Costa, G., and Richard, M.L. (2011).** Unexpected role for a serine/threonine-rich domain in the *Candida albicans* Iff protein family. *Eukaryot Cell* 10, 1317-1330.

**Boisrame, A., and Gaillardin, C. (2009).** Heterologous expression and characterization of a beta-1,6-glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 82, 663-669.

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

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



- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998).** Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
- Brand, A., Shanks, S., Duncan, V.M., Yang, M., Mackenzie, K., and Gow, N.A. (2007).** Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. *Curr Biol* 17, 347-352.
- Braun, B.R., Head, W.S., Wang, M.X., and Johnson, A.D. (2000).** Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* 156, 31-44.
- Braun, B.R., and Johnson, A.D. (2000).** TUP1, CPH1 and EFG1 make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* 155, 57-67.
- Bromuro, C., Romano, M., Chiani, P., Berti, F., Tontini, M., Proietti, D., Mori, E., Torosantucci, A., Costantino, P., Rappuoli, R., et al. (2010).** Beta-glucan-CRM197 conjugates as candidates antifungal vaccines. *Vaccine* 28, 2615-2623.
- Brown, D.H., Jr., Giusani, A.D., Chen, X., and Kumamoto, C.A. (1999).** Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol Microbiol* 34, 651-662.
- Bruinsma, G.M., van der Mei, H.C., and Busscher, H.J. (2001).** Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* 22, 3217-3224.
- Brusca, M.I., Irastorza, R.M., Cattoni, D.I., Ozu, M., and Chara, O. (2012).** Mechanisms of interaction between *Candida albicans* and *Streptococcus* mutans: An experimental and mathematical modelling study. *Acta Odontol Scand*.
- Buffo, J., Herman, M.A., and Soll, D.R. (1984).** A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 85, 21-30.
- Bulawa, C.E., Miller, D.W., Henry, L.K., and Becker, J.M. (1995).** Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10570-10574.
- Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., and Gil, C. (2009).** Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics* 9, 4770-4786.
- Calderone, R.A., and Fonzi, W.A. (2001).** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9, 327-335.
- Calderone, R.A., Linehan, L., Wadsworth, E., and Sandberg, A.L. (1988).** Identification of C3d receptors on *Candida albicans*. *Infect Immun* 56, 252-258.
- Casanova, M., Lopez-Ribot, J.L., Monteagudo, C., Llombart-Bosch, A., Sentandreu, R., and Martinez, J.P. (1992).** Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. *Infect Immun* 60, 4221-4229.
- Cassone, A. (2008).** Fungal vaccines: real progress from real challenges. *Lancet Infect Dis* 8, 114-124.

- Chaffin, W.L. (2008).** *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 495-544.
- Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., and Martinez, J.P. (1998).** Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 130-180.
- Chen-Wu, J.L., Zwicker, J., Bowen, A.R., and Robbins, P.W. (1992).** Expression of chitin synthase genes during yeast and hyphal growth phases of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 6, 497-502.
- Cheng, S.C., Joosten, L.A., Kullberg, B.J., and Netea, M.G. (2012).** Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun* 80, 1304-1313.
- Chi, H.W., Yang, Y.S., Shang, S.T., Chen, K.H., Yeh, K.M., Chang, F.Y., and Lin, J.C. (2011).** *Candida albicans* versus non-albicans bloodstream infections: the comparison of risk factors and outcome. *J Microbiol Immunol Infect* 44, 369-375.
- Chiang, L.Y., Sheppard, D.C., Bruno, V.M., Mitchell, A.P., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G. (2007).** *Candida albicans* protein kinase CK2 governs virulence during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol* 9, 233-245.
- Chiu, Y.S., Chang, S.C., Hsueh, P.R., Wang, J.L., Sun, H.Y., and Chen, Y.C. (2006).** Survey of amphotericin B susceptibility of *Candida* clinical isolates determined by Etest. *J Microbiol Immunol Infect* 39, 335-341.
- Choi, W., Yoo, Y.J., Kim, M., Shin, D., and Jeon, H.B. (2003).** Identification of proteins highly expressed in the hyphae of *Candida albicans* by two-dimensional electrophoresis. *Yeast* 20, 1053-1060.
- Dalle, F., Wachtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., Labruere, C., Bonnin, A., and Hube, B. (2010).** Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol* 12, 248-271.
- Davis, D., Wilson, R.B., and Mitchell, A.P. (2000).** RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 20, 971-978.
- De Bernardis, F., Liu, H., O'Mahony, R., La Valle, R., Bartollino, S., Sandini, S., Grant, S., Brewis, N., Tomlinson, I., Basset, R.C., et al. (2007).** Human domain antibodies against virulence traits of *Candida albicans* inhibit fungus adherence to vaginal epithelium and protect against experimental vaginal candidiasis. *J Infect Dis* 195, 149-157.
- de Groot, P.W., de Boer, A.D., Cunningham, J., Dekker, H.L., de Jong, L., Hellingwerf, K.J., de Koster, C., and Klis, F.M. (2004).** Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* 3, 955-965.
- De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M. (2003).** Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20, 781-796.

**Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167-193.

**Douglas, C.M., D'Ippolito, J.A., Shei, G.J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J.A., Li, W., Abruzzo, G.K., Flattery, A., Bartizal, K., et al. (1997).** Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 2471-2479.

**Douglas, L.J. (2003).** *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11, 30-36.

**Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., et al. (2004).** Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35-44.

**Dunkler, A., Walther, A., Specht, C.A., and Wendland, J. (2005).** *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* 42, 935-947.

**E****dwards, J.E., Jr. (2012).** Fungal cell wall vaccines: an update. *J Med Microbiol* 61, 895-903.

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

**Eggimann, P., Garbino, J., and Pittet, D. (2003b).** Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis* 3, 772-785.

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

**Ene, I.V., and Bennett, R.J. (2009).** Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 8, 1909-1913.

**Ener, B., and Douglas, L.J. (1992).** Correlation between cell-surface hydrophobicity of *Candida albicans* and adhesion to buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 78, 37-42.

**F****arah, C.S., Elahi, S., Pang, G., Gotjamanos, T., Seymour, G.J., Clancy, R.L., and Ashman, R.B. (2001).** T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 69, 6110-6118.

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

**Fernandez-Arenas, E., Cabezon, V., Bermejo, C., Arroyo, J., Nombela, C., Diez-Orejas, R., and Gil, C. (2007).** Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction. *Mol Cell Proteomics* 6, 460-478.

- Fidel, P.L., Jr. (1999).** Host defense against oropharyngeal and vaginal candidiasis: Site-specific differences. *Rev Iberoam Micol* 16, 8-15.
- Filler, S.G. (2006).** *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol* 9, 333-339.
- Fitzpatrick, D.A., Logue, M.E., Stajich, J.E., and Butler, G. (2006).** A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* 6, 99.
- Fonzi, W.A. (1999).** PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol* 181, 7070-7079.
- Fonzi, W.A., and Irwin, M.Y. (1993).** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717-728.
- Fortun, J., Martin-Davila, P., Gomez-Garcia de la Pedrosa, E., Pintado, V., Cobo, J., Fresco, G., Meije, Y., Ros, L., Alvarez, M.E., Luengo, J., et al. (2012).** Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect* 65, 64-70.
- Fournier, P., Schwebel, C., Maubon, D., Vesin, A., Lebeau, B., Foroni, L., Hamidfar-Roy, R., Cornet, M., Timsit, J.F., and Pelloux, H. (2011).** Antifungal use influences *Candida* species distribution and susceptibility in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 66, 2880-2886.
- Fowler, D.M., Koulov, A.V., Alory-Jost, C., Marks, M.S., Balch, W.E., and Kelly, J.W. (2006).** Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* 4, e6.
- Fraisse, T., Crouzet, J., Lachaud, L., Durand, A., Charachon, S., Lavigne, J.P., and Sotto, A. (2011).** Candiduria in those over 85 years old: a retrospective study of 73 patients. *Intern Med* 50, 1935-1940.
- Frank, A.T., Ramsook, C.B., Otoo, H.N., Tan, C., Soybelman, G., Rauceo, J.M., Gaur, N.K., Klotz, S.A., and Lipke, P.N. (2010).** Structure and function of glycosylated tandem repeats from *Candida albicans* Als adhesins. *Eukaryot Cell* 9, 405-414.
- Frieman, M.B., McCaffery, J.M., and Cormack, B.P. (2002).** Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol* 46, 479-492.
- Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Chen, Y.C., French, S.W., Cutler, J.E., Filler, S.G., and Edwards, J.E., Jr. (2002).** *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol* 44, 61-72.
- Fu, Y., Luo, G., Spellberg, B.J., Edwards, J.E., Jr., and Ibrahim, A.S. (2008).** Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 7, 483-492.
- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W.A., Belanger, P.H., Edwards, J.E., Jr., and 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.
- Fukazawa, Y., and Kagaya, K. (1997).** Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 35, 87-99.

- Galagan, J.E., Henn, M.R., Ma, L.J., Cuomo, C.A., and Birren, B. (2005).** Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome Res* 15, 1620-1631.
- Garcera, A., Castillo, L., Martinez, A.I., Elorza, M.V., Valentin, E., and Sentandreu, R. (2005).** Anchorage of *Candida albicans* Ssr1 to the cell wall, and transcript profiling of the null mutant. *Res Microbiol* 156, 911-920.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M., and d'Enfert, C. (2004).** *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* 3, 536-545.
- Garcia, M.C., Lee, J.T., Ramsook, C.B., Alsteens, D., Dufrene, Y.F., and Lipke, P.N. (2011).** A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. *PLoS One* 6, e17632.
- Garcia, M.G., O'Connor, J.E., Garcia, L.L., Martinez, S.I., Herrero, E., and del Castillo Agudo, L. (2001).** Isolation of a *Candida albicans* gene, tightly linked to URA3, coding for a putative transcription factor that suppresses a *Saccharomyces cerevisiae* aft1 mutation. *Yeast* 18, 301-311.
- Gatti, E., Popolo, L., Vai, M., Rota, N., and 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., and Klotz, S.A. (1997).** Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 65, 5289-5294.
- Gaur, N.K., Smith, R.L., and Klotz, S.A. (2002).** *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* expressing ALA1/ALS5 adhere to accessible threonine, serine, or alanine patches. *Cell Commun Adhes* 9, 45-57.
- Gemmill, T.R., and Trimble, R.B. (1999).** Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* 1426, 227-237.
- Gillum, A.M., Tsay, E.Y., and Kirsch, D.R. (1984).** Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. *Mol Gen Genet* 198, 179-182.
- Goossens, K.V., and Willaert, R.G. (2012).** The N-terminal domain of the Flo11 protein from *Saccharomyces cerevisiae* is an adhesin without mannose-binding activity. *FEMS Yeast Res* 12, 78-87.
- Gow, N.A., Brown, A.J., and Odds, F.C. (2002).** Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 5, 366-371.
- Gow, N.A., Robbins, P.W., Lester, J.W., Brown, A.J., Fonzi, W.A., Chapman, T., and Kinsman, O.S. (1994).** A hyphal-specific chitin synthase gene (CHS2) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6216-6220.

**Gow, N.A., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J., and Netea, M.G. (2012).** *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 10, 112-122.

**Granger, B.L. (2012).** Insight into the antiadhesive effect of yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 11, 795-805.

**Granger, B.L., Flenniken, M.L., Davis, D.A., Mitchell, A.P., and Cutler, J.E. (2005).** Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Microbiology* 151, 1631-1644.

**Grimme, S.J., Colussi, P.A., Taron, C.H., and Orlean, P. (2004).** Deficiencies in the essential Smp3 mannosyltransferase block glycosylphosphatidylinositol assembly and lead to defects in growth and cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology* 150, 3115-3128.

**Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschlager, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., et al. (2009).** Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459, 433-436.

**Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., and Fink, G.R. (2000).** A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12158-12163.

**Hajishengallis, G., and Lambris, J.D. (2011).** Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 11, 187-200.

**Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M., and 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., Simon, E.N., Mugusi, F., Mikx, F.H., Helderma, W.H., Rijs, A.J., van der Ven, A.J., and Verweij, P.E. (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.

**Hashimoto, R., Fujitani, N., Takegawa, Y., Kuroguchi, M., Matsushita, T., Naruchi, K., Ohyabu, N., Hinou, H., Gao, X.D., Manri, N., et al. (2011).** An efficient approach for the characterization of mucin-type glycopeptides: the effect of O-glycosylation on the conformation of synthetic mucin peptides. *Chemistry* 17, 2393-2404.

**Hawser, S.P., and Douglas, L.J. (1994).** Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* 62, 915-921.

**Hayek, P., Dib, L., Yazbeck, P., Beyrouthy, B., and Khalaf, R.A. (2010).** Characterization of Hwp2, a *Candida albicans* putative GPI-anchored cell wall protein necessary for invasive growth. *Microbiol Res* 165, 250-258.

**Haynes, M.P., Chong, P.L., Buckley, H.R., and Pieringer, R.A. (1996).** Fluorescence studies on the molecular action of amphotericin B on susceptible and resistant fungal cells. *Biochemistry* 35, 7983-7992.

- Hazen, B.W., and Hazen, K.C. (1988).** Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. *Infect Immun* 56, 2521-2525.
- Hazen, K.C., and Glee, P.M. (1994).** Hydrophobic cell wall protein glycosylation by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Can J Microbiol* 40, 266-272.
- Hennessey, J.P., Jr, Schmidt, C. S., Ibrahim, A., Filler, S., White, C. J., and Yeaman, M., Fu, Y. & Edwards, J. E. (2011).** A Phase 1 clinical evaluation of NDV3, a vaccine to prevent disease caused by *Candida* spp. and *Staphylococcus aureus*. . In 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Herrero, A.B., Magnelli, P., Mansour, M.K., Levitz, S.M., Bussey, H., and Abeijon, C. (2004).** KRE5 gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties. *Eukaryot Cell* 3, 1423-1432.
- Hobson, R.P., Munro, C.A., Bates, S., MacCallum, D.M., Cutler, J.E., Heinsbroek, S.E., Brown, G.D., Odds, F.C., and Gow, N.A. (2004).** Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition. *J Biol Chem* 279, 39628-39635.
- Hodgetts, S., Nooney, L., Al-Akeel, R., Curry, A., Awad, S., Matthews, R., and Burnie, J. (2008).** Efungumab and caspofungin: pre-clinical data supporting synergy. *J Antimicrob Chemother* 61, 1132-1139.
- Hogan, D.A., and Kolter, R. (2002).** *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* 296, 2229-2232.
- Hogan, D.A., Vik, A., and Kolter, R. (2004).** A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* 54, 1212-1223.
- 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.
- Hontelez, S., Sanecka, A., Netea, M.G., van Spriel, A.B., and Adema, G.J. (2012).** Molecular view on PRR cross-talk in antifungal immunity. *Cell Microbiol* 14, 467-474.
- Hope, W.W., Taberner, L., Denning, D.W., and Anderson, M.J. (2004).** Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4377-4386.
- Hostetter, M.K. (2008).** The iC3b receptor of *Candida albicans* and its roles in pathogenesis. *Vaccine* 26 Suppl 8, I108-112.
- Hoyer, L.L., Fundyga, R., Hecht, J.E., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., and 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., and Zhao, X. (2008).** Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* 46, 1-15.
- Hoyer, L.L., and Hecht, J.E. (2001).** The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. *Yeast* 18, 49-60.

**Hurtrel, B., and Lagrange, P.H. (1981).** Comparative effects of carrageenan on systemic candidiasis and listeriosis in mice. *Clin Exp Immunol* 44, 355-358.

**Ibrahim, A.S., Spellberg, B.J., Avanesian, V., Fu, Y., and Edwards, J.E., Jr. (2006).** The anti-*Candida* vaccine based on the recombinant N-terminal domain of Als1p is broadly active against disseminated candidiasis. *Infect Immun* 74, 3039-3041.

**Jacobsen, I.D., Wilson, D., Wachtler, B., Brunke, S., Naglik, J.R., and Hube, B. (2012).** *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10, 85-93.

**Jakab, E., Paulsson, M., Ascencio, F., and Ljungh, A. (1993).** Expression of vitronectin and fibronectin binding by *Candida albicans* yeast cells. *APMIS* 101, 187-193.

**Jensen, J., Warner, T., and Balish, E. (1993).** Resistance of SCID mice to *Candida albicans* administered intravenously or colonizing the gut: role of polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *J Infect Dis* 167, 912-919.

**Jentoft, N. (1990).** Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15, 291-294.

**Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N., Magee, P.T., et al. (2004).** The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7329-7334.

**Jouault, T., Bernigaud, A., Lepage, G., Trinel, P.A., and Poulain, D. (1994).** The *Candida albicans* phospholipomannan induces in vitro production of tumour necrosis factor-alpha from human and murine macrophages. *Immunology* 83, 268-273.

**Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P.A., Sacchetti, P., Lefebvre, P., Akira, S., and Poulain, D. (2003).** *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis* 188, 165-172.

**Kandasamy, R., VEDIYAPPAN, G., and Chaffin, W.L. (2000).** Evidence for the presence of pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 186, 239-243.

**Kaneko, Y., Ohno, H., Kohno, S., and Miyazaki, Y. (2010).** Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis* 63, 355-357.

**Kang, J.Y., Hong, Y., Ashida, H., Shishioh, N., Murakami, Y., Morita, Y.S., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2005).** PIG-V involved in transferring the second mannose in glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* 280, 9489-9497.

**Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Muller, W.H., Andel, A., Verkleij, A.J., Makarow, M., Van Den Ende, H., and Klis, F.M. (2000).** The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* 35, 601-611.



- Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Dijkgraaf, G.J., and Klis, F.M. (1994).** Identification of beta-1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol* 65, 402-407.
- Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Dijkgraaf, G.J., Van den Ende, H., and Klis, F.M. (1995).** Covalent association of beta-1,3-glucan with beta-1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 177, 3788-3792.
- Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H., and Klis, F.M. (1999).** The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* 1426, 373-383.
- Kempf, M., Apaire-Marchais, V., Saulnier, P., Licznar, P., Lefrancois, C., Robert, R., and Cottin, J. (2007).** Disruption of *Candida albicans* IFF4 gene involves modifications of the cell electrical surface properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 58, 250-255.
- Kirkpatrick, C.H. (1994).** Chronic mucocutaneous candidiasis. *J Am Acad Dermatol* 31, S14-17.
- Kleinegger, C.L., Lockhart, S.R., Vargas, K., and Soll, D.R. (1996).** Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. *J Clin Microbiol* 34, 2246-2254.
- Klis, F.M., Brul, S., and De Groot, P.W. (2010).** Covalently linked wall proteins in ascomycetous fungi. *Yeast* 27, 489-493.
- Klis, F.M., de Groot, P., and Hellingwerf, K. (2001).** Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 1-8.
- Klis, F.M., Sosinska, G.J., de Groot, P.W., and Brul, S. (2009).** Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Res* 9, 1013-1028.
- Klotz, S.A., Drutz, D.J., and Zajic, J.E. (1985).** Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun* 50, 97-101.
- Klotz, S.A., Gaur, N.K., De Armond, R., Sheppard, D., Khardori, N., Edwards, J.E., Jr., Lipke, P.N., and El-Azizi, M. (2007).** *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Med Mycol* 45, 363-370.
- Kondoh, O., Tachibana, Y., Ohya, Y., Arisawa, M., and Watanabe, T. (1997).** Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* 179, 7734-7741.
- Korting, H.C., Hube, B., Oberbauer, S., Januschke, E., Hamm, G., Albrecht, A., Borelli, C., and Schaller, M. (2003).** Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol* 52, 623-632.
- Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., and Ghannoum, M.A. (2002).** Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 70, 878-888.

- Kumamoto, C.A., and Vinces, M.D. (2005).** Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 7, 1546-1554.
- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Sanders, S.A., Reinking, J., Savchenko, A., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., and Yakunin, A.F. (2005).** Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 29, 263-279.
- Lakhdari, O., Cultrone, A., Tap, J., Gloux, K., Bernard, F., Ehrlich, S.D., Lefevre, F., Dore, J., and Blottiere, H.M. (2010).** Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF-kappaB modulation in the human gut. *PLoS One* 5.
- Lamarre, C., Deslauriers, N., and Bourbonnais, Y. (2000).** Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Mol Microbiol* 35, 444-453.
- Lay, K.M., and Russel, C. (1977).** *Candida* species and yeasts in mouths of infants from a special care unit of a maternity hospital. *Arch Dis Child* 52, 794-796.
- Leidich, S.D., Drapp, D.A., and Orlean, P. (1994).** A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem* 269, 10193-10196.
- Li, F., and Palecek, S.P. (2003).** EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* 2, 1266-1273.
- Li, F., and Palecek, S.P. (2008).** Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions. *Microbiology* 154, 1193-1203.
- Li, F., Svarovsky, M.J., Karlsson, A.J., Wagner, J.P., Marchillo, K., Oshel, P., Andes, D., and Palecek, S.P. (2007).** Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryot Cell* 6, 931-939.
- Lin, L., Ibrahim, A.S., Baquir, B., Avanesian, V., Fu, Y., and Spellberg, B. (2009a).** Immunological surrogate marker of rAls3p-N vaccine-induced protection against *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55, 293-295.
- Lin, L., Ibrahim, A.S., Xu, X., Farber, J.M., Avanesian, V., Baquir, B., Fu, Y., French, S.W., Edwards, J.E., Jr., and Spellberg, B. (2009b).** Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog* 5, e1000703.
- Lipke, P.N., Garcia, M.C., Alsteens, D., Ramsook, C.B., Klotz, S.A., and Dufrene, Y.F. (2011).** Strengthening relationships: amyloids create adhesion nanodomains in yeasts. *Trends Microbiol* 20, 59-65.
- Liu, Y., and Filler, S.G. (2011).** *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell* 10, 168-173.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997).** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.

**Lo, W.S., and Dranginis, A.M. (1996).** FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* 178, 7144-7151.

**Lo, W.S., and Dranginis, A.M. (1998).** The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9, 161-171.

**Lockhart, S.R., Pujol, C., Daniels, K.J., Miller, M.G., Johnson, A.D., Pfaller, M.A., and Soll, D.R. (2002).** In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* 162, 737-745.

**Lorenz, M.C., and Fink, G.R. (2002).** Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell* 1, 657-662.

**Lortholary, O.D., F; Dannaoui E (2002).** Associations d'antifongiques.

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

**Luo, G., Ibrahim, A.S., French, S.W., Edwards, J.E., Jr., and Fu, Y. (2011).** Active and Passive Immunization with rHyr1p-N Protects Mice against Hematogenously Disseminated Candidiasis. *PLoS One* 6, e25909.

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

**Maartens, G., and Wood, M.J. (1991).** The clinical presentation and diagnosis of invasive fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 28 Suppl A, 13-22.

**Maddi, A., Bowman, S.M., and Free, S.J. (2009).** Trifluoromethanesulfonic acid-based proteomic analysis of cell wall and secreted proteins of the ascomycetous fungi *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* 46, 768-781.

**Mah, T.F., and O'Toole, G.A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9, 34-39.

**Mao, Y., Zhang, Z., Gast, C., and Wong, B. (2008).** C-terminal signals regulate targeting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to the cell wall or plasma membrane in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 7, 1906-1915.

**Marcil, A., Gadoury, C., Ash, J., Zhang, J., Nantel, A., and Whiteway, M. (2008).** Analysis of PRA1 and its relationship to *Candida albicans*-macrophage interactions. *Infect Immun* 76, 4345-4358.

**Marcil, A., Marcus, D., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2002).** *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect Immun* 70, 6319-6329.

**Mardon, D., Balish, E., and Phillips, A.W. (1969).** Control of dimorphism in a biochemical variant of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 100, 701-707.

- Marquis, M., Lewandowski, D., Dugas, V., Aumont, F., Senechal, S., Jolicoeur, P., Hanna, Z., and de Repentigny, L. (2006).** CD8+ T cells but not polymorphonuclear leukocytes are required to limit chronic oral carriage of *Candida albicans* in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. *Infect Immun* 74, 2382-2391.
- Martinez-Lopez, R., Monteoliva, L., Diez-Orejas, R., Nombela, C., and Gil, C. (2004).** The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology* 150, 3341-3354.
- Martinez-Lopez, R., Nombela, C., Diez-Orejas, R., Monteoliva, L., and Gil, C. (2008).** Immunoproteomic analysis of the protective response obtained from vaccination with *Candida albicans* ecm33 cell wall mutant in mice. *Proteomics* 8, 2651-2664.
- Martinez-Lopez, R., Park, H., Myers, C.L., Gil, C., and Filler, S.G. (2006).** *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryot Cell* 5, 140-147.
- Martinez, A.I., Castillo, L., Garcera, A., Elorza, M.V., Valentin, E., and Sentandreu, R. (2004).** Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall. *Microbiology* 150, 3151-3161.
- Martinez, J.P., Lopez-Ribot, J.L., and Chaffin, W.L. (1994).** Heterogeneous surface distribution of the fibrinogen-binding protein on *Candida albicans*. *Infect Immun* 62, 709-712.
- McCreath, K.J., Specht, C.A., and Robbins, P.W. (1995).** Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2544-2548.
- Mille, C., Janbon, G., Delplace, F., Iyata-Ombetta, S., Gaillardin, C., Strecker, G., Jouault, T., Trinel, P.A., and Poulain, D. (2004).** Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem* 279, 47952-47960.
- Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y., Tabuchi, H., Inoue, S.B., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Watanabe, T., and Yamada-Okabe, H. (1997a).** Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* 179, 4096-4105.
- Mio, T., Yamada-Okabe, T., Yabe, T., Nakajima, T., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1997b).** Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* KRE6 and SKN1: expression and physiological function. *J Bacteriol* 179, 2363-2372.
- Miyazato, A., Nakamura, K., Yamamoto, N., Mora-Montes, H.M., Tanaka, M., Abe, Y., Tanno, D., Inden, K., Gang, X., Ishii, K., et al. (2009).** Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by Deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infect Immun* 77, 3056-3064.
- Montagna, M.T., Lovero, G., De Giglio, O., Iatta, R., Caggiano, G., Montagna, O., and Laforgia, N. (2010).** Invasive fungal infections in neonatal intensive care units of Southern Italy: a multicentre regional active surveillance (AURORA project). *J Prev Med Hyg* 51, 125-130.

**Mora-Montes, H.M., Netea, M.G., Ferwerda, G., Lenardon, M.D., Brown, G.D., Mistry, A.R., Kullberg, B.J., O'Callaghan, C.A., Sheth, C.C., Odds, F.C., et al. (2011).** Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun* 79, 1961-1970.

**Morales, D.K., and Hogan, D.A. (2010).** *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog* 6, e1000886.

**Mormeneo, M., Pastor, F.J., and Zueco, J. (2012).** Efficient expression of a *Paenibacillus barcinonensis* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39, 115-123.

**Morschhauser, J. (2010).** Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 47, 94-106.

**Moyes, D.L., Runglall, M., Murciano, C., Shen, C., Nayar, D., Thavaraj, S., Kohli, A., Islam, A., Mora-Montes, H., Challacombe, S.J., et al. (2010).** A biphasic innate immune MAPK response discriminates between the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* in epithelial cells. *Cell Host Microbe* 8, 225-235.

**Munro, C.A., Whitton, R.K., Hughes, H.B., Rella, M., Selvaggini, S., and Gow, N.A. (2003).** CHS8-a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth. *Fungal Genet Biol* 40, 146-158.

**Munro, C.A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J.M., Brown, A.J., Bulawa, C.E., and Gow, N.A. (2001).** Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol* 39, 1414-1426.

**Munro, C.A., Richard, M.L. (2012).** The cell wall: glycoproteins, remodeling, and regulation. In *Candida and candidiasis, 2nd edition*, Calderone RA, Clancy CJ (eds), pp 197-223. Washington DC: ASM Press).

**Muskett, H., Shahin, J., Eyres, G., Harvey, S., Rowan, K., and Harrison, D. (2011).** Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. *Crit Care* 15, R287.

**N**aglik, J.R., Moyes, D., Makwana, J., Kanzaria, P., Tsihlaki, E., Weindl, G., Tappuni, A.R., Rodgers, C.A., Woodman, A.J., Challacombe, S.J., et al. (2008). Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* 154, 3266-3280.

**Naglik, J.R., Moyes, D.L., Wachtler, B., and Hube, B. (2011).** *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* 13, 963-976.

**Nakagawa, Y., Toda, Y., Yamamura, H., Hayakawa, M., and Imura, Y. (2011).** FLO11 is essential for pellicle formation by wild pellicle-forming yeasts isolated from contaminated wines. *J Biosci Bioeng* 111, 7-9.

**Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., and Gow, N.A. (2008).** An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6, 67-78.

**Netea, M.G., Kullberg, B.J., and Van der Meer, J.W. (2004).** Proinflammatory cytokines in the treatment of bacterial and fungal infections. *BioDrugs* 18, 9-22.

**Nobbs, A.H., Vickerman, M.M., and Jenkinson, H.F. (2010).** Heterologous expression of *Candida albicans* cell wall-associated adhesins in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals differential specificities in adherence and biofilm formation and in binding oral *Streptococcus gordonii*. *Eukaryot Cell* 9, 1622-1634.

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

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

**Nobile, C.J., Schneider, H.A., Nett, J.E., Sheppard, D.C., Filler, S.G., Andes, D.R., and Mitchell, A.P. (2008a).** Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol* 18, 1017-1024.

**Nobile, C.J., Solis, N., Myers, C.L., Fay, A.J., Deneault, J.S., Nantel, A., Mitchell, A.P., and Filler, S.G. (2008b).** *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol* 10, 2180-2196.

**O**rlan, P., and Menon, A.K. (2007). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycosphospholipids. *J Lipid Res* 48, 993-1011.

**Ortega, M., Marco, F., Soriano, A., Almela, M., Martinez, J.A., Lopez, J., Pitart, C., and Mensa, J. (2011).** *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect* 77, 157-161.

**Otoo, H.N., Lee, K.G., Qiu, W., and Lipke, P.N. (2008).** *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell* 7, 776-782.

**P**adovan, A.C., Chaves, G.M., Colombo, A.L., and Briones, M.R. (2009). A novel allele of HWP1, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. *Med Mycol* 47, 824-835.

**Panagoda, G.J., Ellepola, A.N., and Samaranayake, L.P. (2001).** Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 44, 29-35.

**Pardini, G., De Groot, P.W., Coste, A.T., Karababa, M., Klis, F.M., de Koster, C.G., and Sanglard, D. (2006).** The CRH family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects cell wall organization and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 281, 40399-40411.

**Park, H., Myers, C.L., Sheppard, D.C., Phan, Q.T., Sanchez, A.A., J, E.E., and Filler, S.G. (2005).** Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol* 7, 499-510.

**Paulick, M.G., and Bertozzi, C.R. (2008).** The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* 47, 6991-7000.

**Peters, B.M., Ovchinnikova, E.S., Krom, B.P., Schlecht, L.M., Zhou, H., Hoyer, L.L., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., Jabra-Rizk, M.A., and Shirtliff, M.E. (2012).** *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. *Microbiology*.

**Phan, Q.T., Fratti, R.A., Prasadarao, N.V., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G. (2005).** N-cadherin mediates endocytosis of *Candida albicans* by endothelial cells. *J Biol Chem* 280, 10455-10461.

**Phan, Q.T., Myers, C.L., Fu, Y., Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Ibrahim, A.S., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G. (2007).** Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* 5, e64.

**Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H.M., McKinnon, A., Gow, N.A., Gaillardin, C., Munro, C.A., and Richard, M.L. (2008).** Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet Biol* 45, 1404-1414.

**Ponniah, G., Rollenhagen, C., Bahn, Y.S., Staab, J.F., and Sundstrom, P. (2007).** State of differentiation defines buccal epithelial cell affinity for cross-linking to *Candida albicans* Hwp1. *J Oral Pathol Med* 36, 456-467.

**Qian, Q., Jutila, M.A., Van Rooijen, N., and Cutler, J.E. (1994).** Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* 152, 5000-5008.

**Rabinovich, G.A., van Kooyk, Y., and Cobb, B.A. (2012).** Glycobiology of immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1253, 1-15.

**Raggam, R.B., Salzer, H.J., Marth, E., Heiling, B., Paulitsch, A.H., and Buzina, W. (2011).** Molecular detection and characterisation of fungal heat shock protein 60. *Mycoses* 54, e394-399.

**Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T.F., Wickes, B.L., and Lopez-Ribot, J.L. (2002).** Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 49, 973-980.

**Ramsook, C.B., Tan, C., Garcia, M.C., Fung, R., Soybelman, G., Henry, R., Litewka, A., O'Meally, S., Otoo, H.N., Khalaf, R.A., et al. (2010).** Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell* 9, 393-404.

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

**Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2001).** Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291, 878-881.

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

**Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R., and Kumamoto, C.A. (1999).** Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun* 67, 3649-3652.

**Robert, R., Mahaza, C., Miegerville, M., Ponton, J., Marot-Leblond, A., and Senet, J.M. (1996).** Binding of resting platelets to *Candida albicans* germ tubes. *Infect Immun* 64, 3752-3757.

**Rollenhagen, C., Wollert, T., Langford, G.M., and Sundstrom, P. (2009).** Stimulation of cell motility and expression of late markers of differentiation in human oral keratinocytes by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 11, 946-966.

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

**Sandini, S., La Valle, R., Deaglio, S., Malavasi, F., Cassone, A., and De Bernardis, F. (2011).** A highly immunogenic recombinant and truncated protein of the secreted aspartic proteases family (rSap2t) of *Candida albicans* as a mucosal anticandidal vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62, 215-224.

**Santos, M.A., Gomes, A.C., Santos, M.C., Carreto, L.C., and Moura, G.R. (2011).** The genetic code of the fungal CTG clade. *C R Biol* 334, 607-611.

**Sanz, M., Carrano, L., Jimenez, C., Candiani, G., Trilla, J.A., Duran, A., and Roncero, C. (2005).** *Candida albicans* strains deficient in CHS7, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology* 151, 2623-2636.

**Sarthy, A.V., McGonigal, T., Coen, M., Frost, D.J., Meulbroek, J.A., and Goldman, R.C. (1997).** Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology* 143 ( Pt 2), 367-376.

**Saville, S.P., Lazzell, A.L., Chaturvedi, A.K., Monteagudo, C., and Lopez-Ribot, J.L. (2008).** Use of a genetically engineered strain to evaluate the pathogenic potential of yeast cell and filamentous forms during *Candida albicans* systemic infection in immunodeficient mice. *Infect Immun* 76, 97-102.

**Schaefer, D., Cote, P., Whiteway, M., and Bennett, R.J. (2007).** Barrier activity in *Candida albicans* mediates pheromone degradation and promotes mating. *Eukaryot Cell* 6, 907-918.

**Schild, L., Heyken, A., de Groot, P.W., Hiller, E., Mock, M., de Koster, C., Horn, U., Rupp, S., and Hube, B. (2011).** Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eukaryot Cell* 10, 98-109.



- Selvaggi, S., Munro, C.A., Paschoud, S., Sanglard, D., and Gow, N.A. (2004).** Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150, 921-928.
- Sendid, B., Cotteau, A., Francois, N., D'Haveloose, A., Standaert, A., Camus, D., and Poulain, D. (2006).** Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis* 6, 80.
- Sheppard, D.C., Yeaman, M.R., Welch, W.H., Phan, Q.T., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Filler, S.G., Zhang, M., Waring, A.J., and Edwards, J.E., Jr. (2004).** Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 279, 30480-30489.
- Shirliff, M.E., Peters, B.M., and Jabra-Rizk, M.A. (2009).** Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 299, 1-8.
- Simonetti, N., Strippoli, V., and Cassone, A. (1974).** Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature* 250, 344-346.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M., and Soll, D.R. (1987).** "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 169, 189-197.
- Smits, G.J., van den Ende, H., and Klis, F.M. (2001).** Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* 147, 781-794.
- Soll, D.R., Galask, R., Schmid, J., Hanna, C., Mac, K., and Morrow, B. (1991).** Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical locations of the same healthy women. *J Clin Microbiol* 29, 1702-1710.
- Spellberg, B., Ibrahim, A.S., Yeaman, M.R., Lin, L., Fu, Y., Avanesian, V., Bayer, A.S., Filler, S.G., Lipke, P., Otoo, H., et al. (2008).** The antifungal vaccine derived from the recombinant N terminus of Als3p protects mice against the bacterium *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 76, 4574-4580.
- Spellberg, B.J., Ibrahim, A.S., Avanesian, V., Fu, Y., Myers, C., Phan, Q.T., Filler, S.G., Yeaman, M.R., and Edwards, J.E., Jr. (2006).** Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. *J Infect Dis* 194, 256-260.
- Spiliopoulou, A., Dimitriou, G., Jelastopulu, E., Giannakopoulos, I., Anastassiou, E.D., and Christofidou, M. (2012).** Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. *Mycopathologia* 173, 219-228.
- Spreghini, E., Davis, D.A., Subaran, R., Kim, M., and Mitchell, A.P. (2003).** Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation. *Eukaryot Cell* 2, 746-755.
- Staab, J.F., Bahn, Y.S., and Sundstrom, P. (2003).** Integrative, multifunctional plasmids for hypha-specific or constitutive expression of green fluorescent protein in *Candida albicans*. *Microbiology* 149, 2977-2986.
- Staab, J.F., Bahn, Y.S., Tai, C.H., Cook, P.F., and Sundstrom, P. (2004).** Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-

bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J Biol Chem* 279, 40737-40747.

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

**Staib, P., and Morschhauser, J. (2007).** Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50, 1-12.

**Stalnaker, S.H., Stuart, R., and Wells, L. (2011).** Mammalian O-mannosylation: unsolved questions of structure/function. *Curr Opin Struct Biol* 21, 603-609.

**Stevens, D.A., Ichinomiya, M., Koshi, Y., and Horiuchi, H. (2006).** Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3160-3161.

**Stevens, D.A., White, T.C., Perlin, D.S., and Selitrennikoff, C.P. (2005).** Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51, 173-178.

**Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E., and Ernst, J.F. (1997).** Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J* 16, 1982-1991.

**Sudbery, P., Gow, N., and Berman, J. (2004).** The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12, 317-324.

**Sudbery, P.E. (2001).** The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol Microbiol* 41, 19-31.

**Sudbery, P.E. (2011).** Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* 9, 737-748.

**Sun, J.N., Solis, N.V., Phan, Q.T., Bajwa, J.S., Kashleva, H., Thompson, A., Liu, Y., Dongari-Bagtzoglou, A., Edgerton, M., and Filler, S.G. (2010).** Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog* 6, e1001181.

**Sundstrom, P., Balish, E., and Allen, C.M. (2002).** Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis* 185, 521-530.

**Taschdjian, C.L., Burchall, J.J., and Kozinn, P.J. (1960).** Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *AMA J Dis Child* 99, 212-215.

**Theiss, S., Ishdorj, G., Brenot, A., Kretschmar, M., Lan, C.Y., Nichterlein, T., Hacker, J., Nigam, S., Agabian, N., and Kohler, G.A. (2006).** Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol* 296, 405-420.

**Thom, K., and Forrest, G. (2006).** Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. *Curr Opin Gastroenterol* 22, 18-23.

**Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., and Presterl, E. (2011).** Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*.

**Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., De Bernardis, F., Berti, F., Galli, C., Norelli, F., Bellucci, C., Polonelli, L., Costantino, P., et al. (2005).** A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 202, 597-606.

**Torosantucci, A., Chiani, P., Bromuro, C., De Bernardis, F., Palma, A.S., Liu, Y., Mignogna, G., Maras, B., Colone, M., Stringaro, A., et al. (2009).** Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One* 4, e5392.

**Trinel, P.A., Maes, E., Zanetta, J.P., Delplace, F., Coddeville, B., Jouault, T., Strecker, G., and Poulain, D. (2002).** *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* 277, 37260-37271.

**Trinel, P.A., Plancke, Y., Gerold, P., Jouault, T., Delplace, F., Schwarz, R.T., Strecker, G., and Poulain, D. (1999).** The *Candida albicans* phospholipomannan is a family of glycolipids presenting phosphoinositolmannosides with long linear chains of beta-1,2-linked mannose residues. *J Biol Chem* 274, 30520-30526.

**Tronchin, G., Bouchara, J.P., Robert, R., and Senet, J.M. (1988).** Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. *Infect Immun* 56, 1987-1993.

**Umeyama, T., Kaneko, A., Watanabe, H., Hirai, A., Uehara, Y., Niimi, M., and 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 Burik, J.A., and Magee, P.T. (2001).** Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol* 55, 743-772.

**Vecchiarelli, A., Pericolini, E., Gabrielli, E., and Pietrella, D. (2012).** New approaches in the development of a vaccine for mucosal candidiasis: progress and challenges. *Front Microbiol* 3, 294.

**Vediyappan, G., Rossignol, T., and d'Enfert, C. (2010).** Interaction of *Candida albicans* biofilms with antifungals: transcriptional response and binding of antifungals to beta-glucans. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2096-2111.

**Verstrepen, K.J., and Fink, G.R. (2009).** Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi. *Annu Rev Genet* 43, 1-24.

**Vialas, V., Perumal, P., Gutierrez, D., Ximenez-Embun, P., Nombela, C., Gil, C., and Chaffin, W.L. (2012).** Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. *Proteomics* 12, 2331-2339.

**Villar, C.C., and Dongari-Bagtzoglou, A. (2008).** Immune defence mechanisms and immunoenhancement strategies in oropharyngeal candidiasis. *Expert Rev Mol Med* 10, e29.

**Villar, C.C., Kashleva, H., Nobile, C.J., Mitchell, A.P., and Dongari-Bagtzoglou, A. (2007).** Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun* 75, 2126-2135.

**Viudes, A., Lazzell, A., Perea, S., Kirkpatrick, W.R., Peman, J., Patterson, T.F., Martinez, J.P., and Lopez-Ribot, J.L. (2004).** The C-terminal antibody binding domain of *Candida albicans* mp58 represents a protective epitope during candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* 232, 133-138.

**Viudes, A., Perea, S., and Lopez-Ribot, J.L. (2001).** Identification of continuous B-cell epitopes on the protein moiety of the 58-kiloDalton cell wall mannoprotein of *Candida albicans* belonging to a family of immunodominant fungal antigens. *Infect Immun* 69, 2909-2919.

**Vonk, A.G., Wieland, C.W., Netea, M.G., and Kullberg, B.J. (2002).** Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* blastoconidia by neutrophils and macrophages: a comparison of different microbiological test systems. *J Microbiol Methods* 49, 55-62.

**W**achtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., and Hube, B. (2011). From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One* 6, e17046.

**Wadsworth, E., Prasad, S.C., and Calderone, R. (1993).** Analysis of mannoproteins from blastoconidia and hyphae of *Candida albicans* with a common epitope recognized by anti-complement receptor type 2 antibodies. *Infect Immun* 61, 4675-4681.

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

**Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., and Edmond, M.B. (2004).** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39, 309-317.

**Y**ang, Y.L., Li, S.Y., Cheng, H.H., and Lo, H.J. (2005). Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2002. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51, 179-183.

**Yoshijima, Y., Murakami, K., Kayama, S., Liu, D., Hirota, K., Ichikawa, T., and Miyake, Y. (2010).** Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses* 53, 221-226.

**Younes, S., Bahnan, W., Dimassi, H.I., and Khalaf, R.A. (2011).** The *Candida albicans* Hwp2 is necessary for proper adhesion, biofilm formation and oxidative stress tolerance. *Microbiol Res* 166, 430-436.

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

**Zakikhany, K., Naglik, J.R., Schmidt-Westhausen, A., Holland, G., Schaller, M., and Hube, B. (2007).** In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol* 9, 2938-2954.

**Zarembinski, T.I., Hung, L.W., Mueller-Dieckmann, H.J., Kim, K.K., Yokota, H., Kim, R., and Kim, S.H. (1998).** Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15189-15193.

**Zhang, L., and Ten Hagen, K.G. (2011).** The cellular microenvironment and cell adhesion: a role for O-glycosylation. *Biochem Soc Trans* 39, 378-382.

**Zhao, X., Daniels, K.J., Oh, S.H., Green, C.B., Yeater, K.M., Soll, D.R., and Hoyer, L.L. (2006).** *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology* 152, 2287-2299.

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

**Zhao, X., Oh, S.H., and Hoyer, L.L. (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.

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

**Zheng, X., and Wang, Y. (2004).** Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO J* 23, 1845-1856.

**Zhu, W., and Filler, S.G. (2010).** Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol* 12, 273-282.

**Zipfel, P.F., Skerka, C., Kupka, D., and Luo, S. (2011).** Immune escape of the human facultative pathogenic yeast *Candida albicans*: the many faces of the *Candida* Pra1 protein. *Int J Med Microbiol* 301, 423-430.

**Zupancic, M.L., Frieman, M., Smith, D., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., and Cormack, B.P. (2008).** Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* 68, 547-559.






# ***ANNEXES***



## Annexe 1 : Analyse bioinformatique des protéines à ancre GPI inconnues





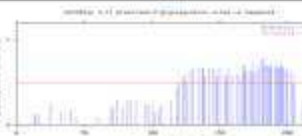
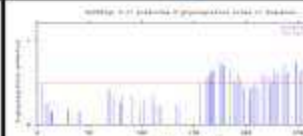


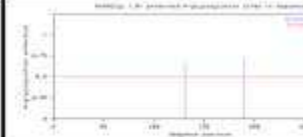
En vert : les protéines inconnues de la banque de surexpression et de sécrétion

En orange : les protéines témoins de la banque de surexpression et de sécrétion

Nom		PGA2	PGA4
Alias		SOD4	GAS2
Numéro d'ORF		orf19.2062	orf19.4035
Taille en aa		232	451
Séquence protéique		MKYLISIVALALAGDSPSTDSK GKAPLVARFKKTSKSDIEGT IKFEPANNGTVLVSVDLTGLSPGVGPPYHYVHEKPVPEKNC ATGMHFNPFNGSTTAKTPAALELGDLSGRHGNITSEFVE YDYSYISLNKDSKAYIGGLSVVHSNNNTRLNCANITLDEGD DTASAATWSNSSSSSSSSKSNSTNGSSGSSTASQGGSGRA EISGFLAAGIAGVVAALI	MLFRSLVITYLSLVSSVLSIASIKVGNFAFWDSSEGDREYIRGV DYQPGGSSSELEDPLADTNVCRDVKYFQELGINIRVYSIDNT KNHTECMDTLAKAGIYVILDVNTPHSSITRSDAACSNTDYL QEVFASIVEFADFNTLGFAGNEVINDDPSLEAAPVVKAVV RDMKTFIKNRGFRTPVGVSAASVDEYRLPSGLYFNCDDDD MARIOMYINDYSWCGDASMTTSQYSQQMKDFANITYVPL FFSEFGCNAKRPRPFSEIEAIYSTEMSSVFSGLVYVESEASN YGLVELKGDVTTNDDFDNLKSKQFETKNPSGGDGYLKSTG GNKCPPKSNINWVTEEPDTPKGLKYLKGLAEPDTHGDFDAY VQGCNCAKGNVDDTGNYSSTASSRASPSQTSQVSSSSA TSANSTSSKKNAAVEGAGFLSVIALAAGIALL
Peptide signal	Prediction présence	0.982	0.953
	Position	15-16	18-19
	Prediction position	0.594	0.407
Schéma domaine transmembranaire			
Ancre GPI	Choix	Best Alternative	Best Alternative
	Site de clivage (site D)	A211 S209	D430 N429
O-glycosylation	1 <sup>er</sup> aa O-glycosylé	T86	T400
	Schéma predictions		
N-glycosylation	Schéma predictions		
	Selection	OUI	OUI
Description		Copper- and zinc-containing superoxide dismutase; role in response to host innate immune ROS; regulated on white-opaque switching; ciclopirox olamine induced; caspofungin repressed; member of family that includes SOD1, SOD4, SOD5, and SOD6	Cell-surface protein; predicted glycosylphosphatidylinositol (GPI) lipid anchor; similar to <i>S. cerevisiae</i> Gas1p; fungal-specific (no human or murine homolog); transcription is upregulated in RHE model of oral candidiasis
Mutants		Homozygous null * Viable * Wild-type response to host	Heterozygous null * Viable Homozygous null * Cell wall abnormal * Viable Homozygous null (inferred) * Viable
Homologies dans <i>Candida albicans</i>		<i>C. albicans</i> fungus CA6836 PGA3 Similar to superoxide dismutase, Identities = 125/171 (73%), Positives = 146/171 (85%) <i>C. albicans</i> fungus CAJ797 PGA9 putative superoxide dismutase, Identities = 67/168 (39%), Positives = 99/168 (58%), Gaps = 3/168 (1%)	<i>C. albicans</i> fungus CA6837 PHR3 surface glycoprotein, Identities = 155/306 (50%), Positives = 208/306 (68%), Gaps = 8/306 (2%) <i>C. albicans</i> fungus CA6837 PHR1 GPI anchor protein response, Identities = 148/351 (42%), Positives = 210/351 (59%), Gaps = 19/351 (5%) <i>C. albicans</i> fungus CA2847 PHR2 pH-regulated protein 2, Identities = 187/345 (54%), Positives = 212/345 (61%), Gaps = 12/345 (3%) <i>C. albicans</i> fungus CAJ105 PGAS unknown function, Identities = 141/373 (37%), Positives = 202/373 (54%), Gaps = 34/373 (9%)



PGA7	PGA15	PGA21
CRW3		RBR2
orf19.5635	orf19.2878	orf19.532
219	165	168
MHFIFYLILLVSAADYGNFGTYPKYPKTASINGFADPIYDLLPD CAKECVKFTSNTPCPYWDTGFCVMPQWAGLVGQCVAQ KCKGEDVASARFLATSLCSVVGANTWMMPPASISSMLSTAA GDAKEVITIEGKTAKSWYTPAGSSAAGSVVSETGSASETGSSE SAQSTTTGSSSTGSSSTGSSSSSSPSSSAAFVAVLQTTGGIGSV ILGFMMYLLV	MKFIILFTLUSIVTAAQRIYKDYSSYYGCSNYCDKASDQEDAC GYDDDDVSYQDYYGCLCGNEIFLSNLKSCDFTSIIASVSKSV CSKAIEDSDWGYDDSTSSIMDFFADNTPASNTGMTTQT DGAINDNQNTGSKTSQGAANYLTSFSIGTFFVFLGLI	MRFAFITVSLSLSSLVASEAASSDVQFLTALVGDYQDHKT DYIKFFATAKDVPGDLSTLATKVLTYTDDSYTLLNDDSLNVS NLEAYATSLPWYSRIGADAGGKGSASGASGSGSAKSTASA EKSSGSSASASSTAGGSSKGGVSELVAPVAVVAVGALAVL M
0.984	0.999	1.000
13-14	16-17	22-23
0.719	0.605	0.491
Best	Best	Best
N197	S143	S143
T130	T92	S111
OUI	OUI	OUI
Protein described as a putative precursor of a hyphal surface antigen; putative GPI-anchor; induced by ciclopirox olamine, ketoconazole, or by Rim101p at pH 8; regulated during planktonic growth; induced during cell wall regeneration	Putative GPI-anchored protein of unknown function Predicted Gpi-Anchored	Cell wall protein; expression is repressed by Rim101p; expression is regulated upon white-opaque switching; transcription is repressed in response to alpha pheromone in SpiderM medium; macrophage-induced gene Repressed By Rim101
Homozygous null * Viable	-	Homozygous null * Viable
<i>C. albicans</i> fungus [CA4181] (PGA10 unknown function, Identities = 79/134 (58%), Positives = 92/134 (68%), Gaps = 4/134 (2%)) <i>C. albicans</i> fungus [CA2556] (RBT5 repressed by TUP1 protein S, Identities = 77/120 (64%), Positives = 90/120 (75%), Gaps = 3/120 (2%)) <i>C. albicans</i> fungus [CA5585] (CSA) (hyphal surface antigen by homology, Identities = 71/131 (54%), Positives = 88/131 (67%), Gaps = 8/131 (6%))	-	-

PGA24	PGA28	PGA31
YWP1		
orf19.3618	orf19.5144	orf19.5302
533	226	293
MKVSTIFAASALFAATTTLAQDVACLVDNQVAVVDLDT GVCFPTIPASLAFAFFTVSLEEVNQFYIVVNNVRYNDIRN AGKVINVPARNLYGAGAVPFQVHLEKQLEANSTAARRRL MGETPIVKRDQDDFIASIENTEGTALGSLLEVYVPGSS5 ASPSGASPSGSESGSOSATIRSTTVVSSSSCESSGSAAT ATGANGESTVTEQNTVVVITTSCHNDACHATTVPATASIGV TTVHGTEFTIFTYPLSSYETVESYKVIITSCSENKQETTVEA TPSTATTVSEGVTVEVYTCVPSVETVASTKIVITVACDEHK CHETTAVATPEVTTVVEGSTHVVYKPTGSGPTQGETYAT NAITSEGVVYPKTTAVTTHGSTFETVAVIITVKATPTKGGEQ HQPGSPAGAATSAPGAPAGASGAHASTANKVTEAQATP GTLTPENTVAGGVNGEQVAVSAKTTISQTTVAKASGSGKAA ISTFEGAAAASAGASVLALALILPLAYFI	MKFFAYFAVIALSSASLNLKFRATANGCEVESYKAHQTLIN SCNGAFDFNCLCNLPQSYFQNLVDCSKSCDTLQESDIHSPSOI RSIYCEAASNSIYFSDISLDMIGYSDFETDIEATTGSDTRTK AATGATTSAGTVTKTSETGGVSTANSEAKSGSVTTSKSGS TSISEKTSGSSSSGKSSSTSSASSQQTSHAGGASGAPVSL LG(LFAALL)	MKFLTAASLLTLSSALAAIKQIYAQSSNNEVDFGISSRH EGAALNYLFLAAPGVAENLYDDETKTYTELKAGSSTVRQP LNVGNTVLQLGSSGDKTKVDIAEDGTLFSDGSDSVGAAKNI NDPYNYSKDSYAVVKGDDGAIKLVAKFTGDDKESASSSSSS AAPEPTASSSEAPKETPVYSNSTVLTLYTVCPLSTTLTVCSD VCTPTVIETSGSVTVSSVQVPSKATSEAAAPPKTTVDSVSKPA PSGKKPTAAVTSFEGAANALTGGSVAVIAVAAIIGLVF
1.000	0.988	1.000
21-22	26-27	18-19
0.976	0.463	0.925
		
Best Alternative	Best Alternative	Best Alternative
A512 G511	S204 G208	G271 N274
S165	T120	S162
		
		
<b>OUI</b>	<b>OUI</b>	<b>OUI</b>
Protein with suggested role in dispersal in host; mutation causes increased adhesion and biofilm formation; putative GPI-anchor; cell wall and secreted; has stable propeptide; regulated by growth phase, phosphate, Ssk1p, Sin6p, Efg1p, Efh1p Yeast-form Wall Protein	Protein similar to <i>S. cerevisiae</i> Wsc2p, which has roles in stress- and cell-wall-related processes; predicted Kex2p substrate; putative GPI-anchored protein Predicted Gpi-Anchored	Cell wall protein; putative GPI anchor; expression is regulated upon white-opaque switching; induced during cell wall regeneration; possibly spurious ORF (Annotation Working Group prediction) Predicted Gpi-Anchored
Heterozygous null * Adhesion abnormal * Viable Homizygous null * Adhesion abnormal * Viable * Biofilm formation abnormal * Wild-type virulence	-	Homozygous null * Cell wall abnormal * Viable
<i>C. albicans</i> fungus (CA0527) (PF1180 unknown function, Identities = 120/400 (30%), Positives = 169/400 (42%), Gaps = 57/400 (14%))	-	<i>C. albicans</i> fungus (CA5475) (PGA30 unknown function, Identities = 134/261 (51%), Positives = 169/261 (64%), Gaps = 20/261 (7%)) <i>C. albicans</i> fungus (CA5476) (PGA29 unknown function, Identities = 20/140 (50%), Positives = 94/140 (67%), Gaps = 3/140 (2%)) <i>C. albicans</i> fungus (CA8850) (PF26671 unknown function, Identities = 58/132 (43%), Positives = 85/132 (64%), Gaps = 7/132 (5%))







RBT1	ALS3
orf19.1327	orf19.1816
721	1155
<p>MRFATAGLAALAYLLEATPFLGDGFCNHPVCTDLGLPHDSLSLGSKN          KREAEIANKDGTEKTRFSAGVWNGPNAHVAHAKLSGSSVQ(DCMKFSQSSV          QUNSAFGRKIKCLLSTOTQVDSLSLGNANPFDWSASLKYKAEVWQICCLPSGFI          INTDFENCGYTHSKFTLLGLLGLKVTGGCDLQDFWCCQCDTPSPSTTYS          ETEELSNQGYTHSKFTLLGLLGLKVTGGCDLQDFWCCQCDTPSPSTTYS          SAPSTPSSAPSTTIVTSSSPVFPSSAPSTTIVTSSVPEITPSSAPSTTIVTSS          VPSTPSSAPSTTIVTSSSPVFPSSAPSTTIVTSSVPEITPSSAPSTTIVTSS          LTTTAAQTIVTIVTSSCMALCSLTVTVVVVSEDTYITFCLETTPVPSVDS          TSVTSAPETTPSTAPSSAPSSAPSSAPVETITPSPVSTVTEQATVITTCAN          ACSEKVTIVVVVTSDDIVYITFCLETTPATSSASESAPATSSVPTESAPVAP          ESSAPGTEAPTESAPATESAPVAGTETTPATGAESEFVTVVAPESAPAVESV          VMPGVETTPVAPVAPSTAKTSALVSTTEGPTTLESVWQPSANSSPTASVSSPL          GAGNINRLLTGAAGLGAAL)</p>	<p>MLQQYTLMLVSVATAKITGVNFSMSTLWSNAATYNYKGGPTWNAVLGWSLDGTSASPGDFTLNMPCVFKFTTSQTSVDLTAHGKYYAT          CQFQAGEEFMTSTLCTVSNLTPSICALGTVLPVAFNVGGTSSVLEDSKCFAGTNTVTFNDGGKISNVDFERSNVDPKGYLTDNRVPSL          NKVSTLIVAPQICANGYSGTNGFAN TYGVQVQDCSNHVVGTGLNDWNYPVSSSESPTKCSSAGIFTYKXVPAQYRPFVDAYSATDWNYSYL          SVANEYTCAGGYWQRAFTLRWTVGYNSSDAGSNGVIVATRTVDSSTAVTLPFDVNRDKTKTIELKXPTTITTSVGVTSYSYKTAFIGETA          TVIVDIPYHTTTVTSKWGTGTTTHTNPTDSIDTVVQVPSNPVITTEYWSQSFATTTITGPPGNDTVLREPPNHTVITTEYWSYTTTS          TFTAAPGGTDSVIREPNPTVITTEYWSYTTTITVAPGGTDTVIREPNHTVITTEYWSQSYTTTITVIAAPGGTDSVIREPNPTVITTEY          WSQSYATTTITAPGETDTVUREPNHTVITTEYWSQSYATTTITAPGETDTVUREPNHTVITTEYWSQSYTTTITVIAAPGGTDSVIREP          NPTVITTEYWSQSYATTTITAPGETDTVUREPNHTVITTEYWSQSYATTTITAPGETDTVUREPNHTVITTEYWSQSYATTTITVTAAPG          GTDTVIREPNHTVITTEYWSQSYATTTITAPGETDTVUREPNHTVITTEYWSQSYATTTITVTAAPGGTDTVUREPNHTVITTEYWSQSYATTTITVTAAPG          HTLWSTTWVETKTIETSCGDKGCSWVSVSTRVITPNNIETPMVINTVDTTITESTLQSPSGFSESQSVETESSTFTTAQTNPSPVPTTESEV          FTTXGNNQNGPYESPSTNVKSSMDENSEFTTAASTSDRENETIATTSVSEASSPSSADETTTITVTAESTVIEQQTMNNGGNGNAPSATST          SPSTTTTANSQSVTSTSTNSQSQSQNSDTQQTLTQQMSSLSVHMLTTFDGSQSVQSTWLCQTLTSLFI</p>
0.945	0.863
20-21	17-18
0.742	0.752
Best Alternative	Best
G700 N703 T279	P1134 T364
<b>QUI</b>	<b>TEM01N</b>
<p>Cell wall protein with similarity to Hwp1p, required for virulence; predicted to be cell-wall attached and glycosylated; Tup1p repressed; serum, hyphal and alkaline induced; farnesol, alpha factor induced; Rfg1p, Rim101p-regulated</p>	<p>ALS family cell wall adhesin; role in epithelial adhesion; endothelial invasiveness; allelic variation in adhesiveness; immunoprotective in mice; promotes biofilm formation by binding to SspB adhesin of <i>S. gordonii</i>; fluconazole-repressed</p>
<p>Heterozygous null *Viable *Virulence defect          Homozygous null *Cell wall abnormal *Viable *Virulence defect</p>	<p>Heterozygous null * adhesion: decreased          Homozygous null * adhesion: decreased * biofilm formation: abnormal * biofilm formation: decreased * germ tube formation: normal * interaction with host/environment: abnormal * utilization of Iron source: decreased * virulence: decreased          Null * biofilm formation: decreased * virulence: normal          Repressible * adhesion decreased</p>
<p><i>C. albicans</i> fungus   CA2925   HWP1 Hyphal wall protein, Identities = 34/46 (73%), Positives = 41/46 (89%), Gaps = 1/46 (2%)</p>	<p>Family ALS</p>

HWP1	CHT2	PLB5
orf19.1321	orf19.3895	orf19.5102
634	583	754
MRLSTAQIAIAYMISGATVPQVGGGTEEAQKRSYDYQEP DDYPOQDDQDEPCDYPOQDDQDEPCDYPOQDDQDEPCDYPOQ QDEPCDYPOQDEPCDYPOQDEPCDYPOQDEPCDYPOQDEPCDY ONPPQDQPCDNPPQDPCDNPPQDQPCDNPPQDQPCDNPPQDQ TDWIPDQPKPTTATTNPNATTTTSSSSSSSSSSSTPKTSASTPES SVPATTNPTSSSTPTSSSTPTSSSTPTSSSTPTSSSTPTSSST PNTSVPNTTTEAKSSSTPLTTTTEHDTTAVTSSSSVCTESEVTGVI VITSKDIYTYQPLTEFTFVSTAPATEFTFVSTVSTEQSTVITVTS SSCTESEVTTGVVVSEETVYTFPLTENTPGDSTPEASIPMETIP AGSESSMPAGETSPAVPKSDVPATESAPFEMTPAGSQSPAGETS PAVPKSDVPATESAPFEMTPAGTETKPAAPKSSAPATEPSPVAGTE SAPAGPGASSPSSVLAESTSPAPGATAPAGSSGATPSSAVVST TEGAIPITLESVLAQPSANYSVAPSTFEGAGNNMRLTGAAGJIA AFLI	MILSPKSLAAAVYASSALASASVQVALYWGQNGAGGOERLAQYQ ETDWDVILSLFLFPDPLNANFANQCGNTTFESGLLHCSQIGADKTCQ SIGKTVLLIIGGGVGGYGFSDVASATKADTLWNKFGAGDEPERPFD DAVVDDGDFDIEHGGATGYPPLATALRKGFKDTSKNYFLSAAPQCP YFDASLGDLLSKVPLDFAQIQYNNYCSNGQFNVDTSKFAQDAPNK NKKLVGVPATSNIAQVDTSKLSSAEIKCDSHFAGVSLWDASGAWL NTDEKGNFVQVQKNNLQACVAPSSAATQSTTTTSSAATQSTTT TSAAITQSATTTSAAVTTKSNQIVTSSSSSSSSIFYGNSTTESSTGATG VUPTGSHENAAATGGSSNTKLAISTVDVQKTVITTSCEHKCVATPV TGWVVDIDTIVYTYCLPQSNQVYVYQTVCTEETCVPSPTSTAGK PKASTHKGVEKGLTTSYVVFTEGVKVVTTSAQVGSSTKYVTEILT STTTPVYPTSVASNGTNTVPVFTTEGGAAVANSLNSVWVPPVFLA ATAF	MKVNLKLISSINQADAWWPDSSGSSSSSSDSSPSETSSGGTFFDLFSGSSSTO SSSAQASSTKSTSSASSTSSSIFSSSSSSSSWYDTFLDGGSSGQKTDYAPNLTCP SKKTRITASEJSSQSSDYHKKRGTTRNRLIDFLSKRANLSDFAKSPINDVAPNH NTIGLSPSSGGFRAMLAGAGLGLDGRFEDANMHLGLLDDSTVYVGLSGG NWLVSALNFWLSDVIGVYKSTWQLDRLNPSUMRDKTAYYYLQAAV QAKEDAGPOTVDTWGRALSYFFEDSSGGGANTWSSRNLSFQHSMP PFFVANQPTPQVYMBNSIFESPYLEQWDPSSLSPSDQYLSVYNNQNPNT DQVNNFQWAGTIMGTSSSIFNGKIQLDVMSYSAKMLDXVLDVSDYEDAVVE PWFPGASASKSTTNDLYLDDGSDLVNYPYIQNREYDNTAFONASDT NNSWPNQTSQETKQDFKQGGSTPFPAPKTFIDNNSGDKPFFGKSSSL EDLWAWHEDKHWYDVPVYVYTSRMSYNSPSTLSSYQDSDGAFRAGET VTRNLETGDNWSTVSCAIRQDRLGEEQSDCKKCFQEWGFRDAAS VSSVSGSGLAAKTHSSGTSSTTQDTSYTTSSSNGGSSSTGSSSKKXGGQV NGGVPSPVRLGLLAWL
0.878	1.000	0.977
27-28	21-22	19-20
0.397	0.567	0.914
Best	-	Best
G633	G560	N732
T174	T315	S32
TEMOIN	TEMOIN	TEMOIN
Hyphal cell wall protein; covalently crosslinked to epithelial cells by host transglutaminase; opaque- and a-specific, alpha-factor induced; at MTLA side of conjugation tube; assessment of virulence role complicated by URA3 effects.	Chitinase; putative N-terminal catalytic domain, GPI anchor, O-mannosylated region, signal peptide; 3 N-glycosylation motifs; ownregulated in core caspofungin response; induced in yeast-form cells; Cyr1p-, Efg1p-, pH-regulated	Putative phospholipase B, fungal-specific (no human or murine homolog); null mutation eliminates cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence; putative GPI anchor
<i>Heterozygous null</i> *Hyphal growth abnormal *Wild-type virulence *Virulence defect <i>Homozygous null</i> *Hyphal growth abnormal *Wild-type adhesion *Wild-type virulence *Adhesion abnormal *Wild-type filamentous growth *Cell wall abnormal *Viable *Biofilm formation abnormal *Virulence defect *Wild-type hyphal growth	<i>Deletion</i> *Viable <i>Heterozygous null</i> *Viable <i>Homozygous null</i> *Filamentous growth abnormal *Hyphal growth abnormal *Viable *Colony morphology abnormal	<i>Heterozygous null</i> *Viable <i>Homozygous null</i> *Viable *Virulence defect
<i>C. albicans</i> fungus   CA2830 RBT1 repressed by TUP1 protein 1, Identities = 123/268 (45%), Positives = 129/268 (48%), Gaps = 73/268 (27%)	<i>C. albicans</i> fungus   CA5987 CHT3 chitinase 3 precursor, Identities = 150/291 (51%), Positives = 196/291 (67%), Gaps = 10/291 (3%) <i>C. albicans</i> fungus   CA5859 CHT1 endochitinase 1 precursor, Identities = 144/263 (54%), Positives = 184/263 (69%), Gaps = 7/263 (2%)	Family PLB

PRA1
orf19.3111
299
<p>MNYLLFCLFFAFSVAAPVTVTRFVDSPTGYDWRADWVKG            FPIDSSCNATQYVQLSTGLQEAQLAEHARDHTURFGSKSPF            FRKYFGNDTASAEVVGHFENVVGDKSSILFLCDLDKCK            NDGWAGYWRGNSHSDQTIICDLSPVTRRYLSQLCSGGYTVS            KSKTNIFWAGDLLHRFWHLKSGQLVIEHYADTYEEVLELAQ            ENSTYAVRNSNLIYYALDYYAYDYVTPGECNGDGTYSKKS            DFSSFEDSDSGSDGASSTASSHQHTSDSNPSATTDANSHC            HTHADGEVHC</p>
0.981
15-16
0.848
Pas GPI
5265
TEM01N
<p>Cell surface protein that sequesters zinc from host tissue; enriched at hyphal tips; released extracellularly; binds to host complement regulators; mediates leukocyte adhesion and migration; immunogenic in mouse; produced at ambient pH</p>
<p><i>Homoglossum nyl1</i> * adhesion: decreased      * cellular morphology: abnormal * germ tube formation: decreased *      induction of host response: decreased * resistance to killing by host      cells: increased * viable * virulence: increased  <i>Homoglossum nyl2</i> * viable  <i>Homoglossum nyl3</i> * colony appearance: normal * competitive fitness:      normal * vegetative growth: normal rate * viable  <i>Homoglossum nyl4</i> * viable</p>





## Annexe 2 : Article envoyé aux co-auteurs avant soumission

**Distinct Rbt1 domains govern adhesion of *Candida albicans* hyphae through amyloid-forming sequence and hydrophobicity**

Céline Monniot <sup>1</sup>, Grégory Da Costa <sup>1</sup>, Muriel Chauvel <sup>2</sup>, Marc Sautour <sup>3</sup>, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine<sup>4</sup>, Christophe d'Enfert <sup>2</sup>, Frédéric Dalle<sup>3</sup>, Mathias L. Richard <sup>\*1</sup> and Anita Boisramé <sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> INRA AgroParisTech, UMR1319 Micalis, "Virulence et Infection Fongique", Thiverval-Grignon, France

<sup>2</sup> Pasteur Institute, Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques, Paris, France

<sup>3</sup> UMR Agroécologie 1347 Agrosup/INRA/Université de Bourgogne, Laboratoire Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire (M.E.R.S.), Dijon, France

<sup>4</sup> INRA AgroParisTech, UMR1319 Micalis, "Bioadhésion Biofilms et Hygiène des Matériaux" Massy, France,

\*Correspondence should be addressed to A. Boisramé or M.L. Richard, Institut Micalis, UMR1319 INRA AgroParisTech, CBAI, 78850 Thiverval-Grignon, FRANCE

Tel : 33-1-30-81-55-82 ; Fax: 33-1-30-81-54-57

E-mail: [anita.boisrame@grignon.inra.fr](mailto:anita.boisrame@grignon.inra.fr) or [mathias.lavie-richard@grignon.inra.fr](mailto:mathias.lavie-richard@grignon.inra.fr)

**Abstract**

Cell wall proteins are to date the main virulence factors of *Candida albicans*: adhesins, proteins involved in biofilm formation or in fungal-bacterial interactions have recently been described. Hwp1, Hwp2 and Rbt1 form a cell surface protein family, which is hypha-associated. Hwp1 and Hwp2 have been associated with adhesion and other virulence traits but Rbt1 is still poorly described. To determine the functions of *C. albicans* Rbt1 protein in interactions with abiotic surface, fungal cells and host cells independently of the morphological state of the fungus, heterologous expression and promoter swap strategies were applied. We took advantages of the existence of two different alleles in our laboratory strain to precisely identify the motif or sequence involved in each of these interactive properties. First, the N-terminal domain which matched the Flo11 superfamily was found to confer adhesiveness to polystyrene through increased cell surface hydrophobicity. Second, a 42 amino acid-long domain localized in the central part of the protein was showed to enhance both the adhesive function and the hydrophobic property of the protein. Indeed, the presence of two copies of this repeat was correlated to stronger cell-to-cell adhesion which resulted in bigger biofilms in comparison with the presence of only one copy. We proved that a VTTGVVVVT motif within the 42 amino acid domain displayed a high  $\beta$ -aggregation potential and was responsible for these cell-to-cell interactions by promoting hyphae aggregation. Third we showed that Rbt1 exposure on the cell surface differed with the morphological state: while directly accessible to the antibodies in hyphae, the structure of the yeast cell wall was masking Rbt1.

## Introduction

*Candida albicans* is one of the main species of opportunistic fungal pathogens (Enoch et al., 2006). It can cause both superficial mucosal infections and life-threatening systemic infections in healthy and immunocompromised individuals respectively (Pfaller et al, 2007). In the latter case the mortality rate can reach 50%. *C. albicans* pathogenicity is a multi factorial process: the major characteristics of *C. albicans* are its ability to switch between yeast and filamentous growth modes (Jacobsen et al, 2012), to adhere to various substrates and to resist to the immune system. It is generally accepted that hyphae represent the invasive morphological form as showed by histological pictures of *C. albicans* invading kidney (Saville et al, 2003). However, yeast cells can also be found in infected organs (Lionakis et al, 2011) and it appears that this morphology is important for dissemination within the bloodstream (Uppuluri et al, 2010). Dimorphism is controlled by transcriptional factors such as Efg1 and Cph1 (Whiteway et al, 2007) or by repressors like Nrg1 and Tup1 (Braun et al, 2000; Braun et al, 1997 ; Murad et al, 2001). Morphology is not the only trait governed by these regulators: expression of several morphology-associated genes is also controlled by these factors. Indeed, hypha formation is concomitant to adhesins induction and cell surface exposure, which in turns contributes to adhesion. Adhesins mediate the attachment of cells to the plastic surfaces or host cells but also the adherence of cells to one another and thereby contribute to biofilm formation (Nobile et al, 2006). The ability to form biofilms on surfaces in the host or on implanted medical devices enhances *C. albicans* virulence by allowing the colonization of various niches and by providing reservoirs for infection and conditions favoring resistance to antimicrobial drugs.

Amongst the genes regulated during the yeast to hyphae transition, cell surface proteins and adhesins have been identified. Two well-described adhesins Als3 and Hwp1, specifically expressed in hyphae are members of two GPI-anchored protein families. Als3 belongs to the Als (Agglutinin like sequence) family and was shown to play a crucial role in many different pathogenic processes such as adhesion, along with Als1 and Als5 (Liu et al, 2011). Expression of *ALS3* in a *Saccharomyces cerevisiae* surface display system allowed attachment of the recombinant strain to epithelial cells, endothelial cells and extracellular matrix proteins (Sheppard et al, 2004) as well as to polystyrene (Nobbs et al, 2010). A serine and threonine-rich central domain of Als3 is associated with an increased adherence when the number of a 36 amino acid long tandem repeat is augmented in different *ALS3* alleles expressed in *C. albicans* (Oh et al, 2005). Hwp1 is required for the covalent attachment of *C. albicans* to host epithelial cells and biofilm formation. Staab's study showed that its N-terminal domain was recognized as a substrate by host transglutaminases (Staab et al, 1999). A role of Hwp1 in biofilm formation was demonstrated both *in vitro* and *in vivo* (Nobile et al, 2006) and Nobile and collaborators further found that a mixture of biofilm-defective  $\Delta\Delta hwp1$  and  $\Delta\Delta als1$ ,  $\Delta\Delta als3$  mutant strains can form a hybrid biofilm both *in vitro* and *in vivo* in a catheter infection model, suggesting complementary function between Hwp1, Als1 and Als3 (Nobile et al, 2008).

Hwp1 is member of a 3 proteins family with Hwp2/Pga8 and Rbt1 (Family 12 in Chapter14, *Candida and Candidiasis*, 2nd Edition). This family is roughly conserved in *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* (3 proteins, 2 Rbt1 no Hwps and 2 Rbt1 no Hwps, respectively) but absent from other fungi. Resemblances between the three proteins lay on the C-terminal half of the protein. Hwp2/Pga8 has been involved in tolerance to oxidative stress, invasive growth, adhesion and biofilm formation in the last two years (Hayek et al, 2010; Younes et al, 2011). Rbt1 has been overall less studied than the 2 other members of the family. Braun and collaborators initially characterized Rbt1 as a protein Regulated By Tup1 (Braun et al, 2000) along with Hwp1. In that paper, the authors further showed in a rabbit cornea model and a mouse systemic infection model that the  $\Delta\Delta rbt1$  strain had a significantly reduced virulence, but no restoration of the wild type phenotype was observed after *RBT1* re-integration. Ene and Bennett demonstrated the contribution of this family in both mating and biofilm formation (Ene et al, 2009), and a recent work showed that *RBT1* was up regulated in mature biofilms (Bonhomme et al, 2011). Although this protein has been predicted to be GPI-anchored, no data confirms this by direct localization.

We were interested in characterizing more precisely the interactive properties of Rbt1 depending on the substrates and in elucidating the role of each domain or motif of the protein. Using the *S. cerevisiae* surface display heterologous expression system, we showed that the N-terminal part of Rbt1 protein was responsible for the adherence to polystyrene and for the cell surface hydrophobicity. Moreover two alleles with a 139 amino acids difference in size were characterized which displayed variation in their ability to form biofilm. Study of two *C. albicans* strains overexpressing one or the other of these two alleles allowed us to confirm that the C-terminal part of the protein mediated cell-to-cell aggregation and that these intercellular interactions involved a sequence motif with high  $\beta$ -aggregation potential. Expression of an epitope-tagged Rbt1 protein under its own *RBT1* promoter confirmed that Rbt1 was specifically detected on hypha cell surface. Moreover, high constitutive expression of Rbt1 under the control of the *ACT1* promoter revealed differences in the exposure of Rbt1 at *C. albicans* cell surface depending on the morphological state: indeed while the epitope was directly accessible on hyphae, the V5 tag was masked on yeast cells.

## Materials and methods

### *Strains*

The *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 strain (Brachmann et al, 1998) was used for heterologous expression of *C. albicans* Rbt1 protein. The *C. albicans* strain used for DNA amplification was BWP17, constitutive expression of *RBT1* was performed in a DAY286 context and CAI-4 (Fonzi et al, 1993) was used for expression of the tagged copies of Rbt1-V5. BY4742 and its derivatives were grown either in liquid YPD (2% glucose, 2% bacto peptone, 1% yeast extract) or in liquid YNB N<sub>5000</sub> (0.67% yeast nitrogen base with ammonium sulphate and without amino acid from Difco + 2% glucose) supplemented for auxotrophy at 28°C. *C. albicans* overexpressing strains and recombinant CAI-4 strains was cultivated in liquid synthetic medium (0.67% yeast nitrogen base with ammonium sulphate and without amino acid from Difco, 2% glucose and 0.17% amino acid drop out mix) supplemented for auxotrophy at 30°C. For biofilm formation in microfermentor, synthetic medium was supplemented with arginine, histidine, uridine and methionine. For filamentation induction, cultures were switched to synthetic medium buffered at pH7 with Hepes and incubated at 37°C. A  $\Delta\Delta rbt1$  mutant strain and its wild type control from Ene and collaborators were included in this study (Ene et al, 2009).

### *Construction of Saccharomyces cerevisiae expression vectors*

To express *C. albicans* Rbt1 protein at the *S. cerevisiae* cell surface, the two fragments of the coding sequences amplified on BWP17 genomic DNA template using the primers 1 and 2 listed in Table 1 were cloned in the pBC542 vector (Zupancic et al, 2008) using the Gateway recombinase-based cloning system (Invitrogen). The Eap1 sequence, amplified using the couple of primers 3 and 4 (Table 1) was also cloned in this vector by the same strategy as a positive control of adherence. To express two Rbt1 copies deleted of their N-terminal domain, two different fragments were produced: (i) the Rbt1 signal peptide using primers 5 and 7; (ii) and the Rbt1 C-terminal sequences from amino acid 273 using primers 8 and 9. After restriction with *NheI* and *XbaI* and further ligation of the two fragments, the final products digested at their extremities with *XbaI* and *XhoI* were cloned in the pBC542 vector at the *XbaI* and *XhoI* unique sites. The recombinant plasmids were sequenced and transferred into BY4742 as well as the native pBC542 plasmid to have a negative control.

### *Construction of the two RBT1 overexpressing strains*

To exchange the *RBT1* native promoter for the *TEF1* promoter, the two primers JRBT1PUp and JRBT1PDo (see Table 1, 10-11) were used to generate a PCR product containing successively: a 100

Number	Name	Sequence
<b>Construction of the pBC542 recombinant vectors expressing entire proteins</b>		
1	RBT1AttB1ATG	GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCAACTATGAGATTGCAACTGC
2	RBT1AttB22098R	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTTCGAATGAAGAGACTGAAGC
3	EAP1AttB1ATG	GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAAAATGAAAGTTTCTCAAATTTACC
4	EAP1AttB21894R	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCAAAGTGAAACTTGAGC
<b>Construction of the pBC542 recombinant vectors expressing truncated proteins</b>		
5	RBT1XbaATG	CCCTCTAGACTATGAGATTGCAACTGCC
6	RBT1Xho824R	CCCCTCGAGGGGGTGTACATTGACAGTC
7	RBT1Nhe60R	CCCCTAGCCTCAGTGGATAAAATGTAG
8	RBT1Xba805	CCCTCTAGAGACTGTCAATGTGACCC
9	RBT1Xho2090R	CCCCTCGAGGAAGAGACTGAAGCAATAGTG
<b>Exchange of the <i>RBT1</i> promoter for the <i>TEF1</i> promoter</b>		
10	JRBT1PUp	CTTAATATCTACAAAGATAGCCTGCTGTAATGACAGTATTTTCTTTAATTGCTCATGTCAATT AGTATTTACGAAAATGAGTCTGGACGATACATCGATTTCCAGTCACGACGTTCC
11	JRBT1PDo	GTGGAATACAATTAAGATGTCACCCAATAATGGGAAAGTAGCCTCAGTGGATAAAATGTA GTAAGCGAGGGCAGCGAGTTGGGCAGTTGCAAATCTCATGATTGATTATGACTATAATGTG
12	PTEF <sub>Mlu</sub> F	ACGCGTGTAACGCTGATACGGCAT
<b>Construction of RBT1 V5-tagged copy</b>		
13	RBT1ATGHind	GCAAGCTTCAACTATGAGATTGCAACTGCC
14	RBT1V5F820	CCAAATCCATTGTTGGGTTTGGATTCAACTACCCATCTCCATCAACTACC
15	RBT1V5R819	ACCCAACAATGGATTGGAATTGGTTTACCGTCACATTGACAGTCCCAAC
16	Rbt1STOPPst	CCCTGCAGCAAGACCAATAATAGC
17	RP10-1250R	CGTATTCACCTAATCCCACT
18	PGLUC-4652	GTTTTGTACCTATATGACTCTTC
19	PRBT1F	AAATCTCGTATTAGTCATTCGC
20	V5R	CCAAACCCAACAATGGATTTGG
RT-PCR		
21	RBT1qFb	TCAATGCCGCATTTGTCGTGTCT
22	RBT1qRb	AAGGCCAGGTTCAATTGGACAG

Table 1: List of primers used in this study

nucleotide-long sequence at its 5' terminus identical to the *RBT1* promoter sequence located at position -1567 from the *RBT1* start codon, the *HIS1* gene, a 412 nucleotide-long sequence corresponding to the *TEF1* promoter and at its 3' terminus 100 nucleotides of the *RBT1* coding sequence from the ATG. The template is a pGEMT-Easy recombinant vector containing the *HIS1* gene cloned close to the *TEF1* promoter. Promoter exchange was expected after a double recombination event between the native promoter and the *RBT1* promoter flanking regions of the amplicon. The PCR product was purified, concentrated and used for transformation of the *C. albicans* DAY286 strain, subsequent selection was made using the histidine auxotrophy. Correct integration of the promoter was verified by PCR on the genomic DNA.

#### *Construction of epitope-tagged copies of the two Rbt1 proteins*

To allow detection of the Rbt1 protein, a V5-tagged version was constructed in which the V5 epitope was inserted in the Rbt1 sequence between amino acid 273 and 274. For this purpose, two couples of primers were designed (see Table 1, 13-16) and used separately in a first amplification. Since the RBT1V5F820 and RBT1V5R819 contained 18 complementary bases, the two PCR products were mixed, denatured and the temperature was slowly decreased to allow cross-hybridization between the simple brands of the two amplicons. A second amplification was then performed using this reaction as template and the two external primers (RBT1ATGHind and Rbt1STOPPst). The product was cloned in pGEMT-Easy (Promega), sequenced and then subcloned in the pExp-V5 expression vector (Boisrame et al, 2011) at the *HindIII* and *NsiI* unique restriction sites. Each of the two alleles was cloned and the recombinant vectors were inserted in CAI-4 either at the *RP10* locus after linearization by *StuI* or at the *RBT1* locus after linearization by *AflIII* which cut in the *RBT1* coding sequence. While the first strains expressed *RBT1* under the control of the *ACT1* promoter, the second ones expressed the Rbt1 V5-tagged proteins under their native promoter. In both strains, a second copy of each allele was present under their native promoter and under the control of the *ACT1* promoter respectively, but the expressed proteins were not tagged.

#### *Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans transformation*

BY4742 Ura<sup>+</sup> recombinant strains were selected on minimal medium supplemented for lysine, histidine and leucine. For the construction of *RBT1* constitutively expressing strains, His<sup>+</sup> clones were selected on SC plates after transformation of DAY286 and replacement of the *RBT1* promoter by the *TEF1* promoter was checked by PCR using a *TEF1* forward primer internal to the cloned sequence: PTEFMluF (Table 1, 12) and a *RBT1* reverse primer complementary to a portion of the coding sequence: RBT1Xho2290R (Table 1, 9). Two strains, OEx*RBT1SL* and OEx*RBT1FL* corresponding respectively to the expression of the short *RBT1* allele and the long *RBT1* allele under the control of the *TEF1* promoter were obtained. Ura<sup>+</sup> clones obtained after transformation with the recombinant



Rbt1-V5 expression vectors either at the *RP10* locus or the *RBT1* locus of CAI-4 were screened by PCR for correct integration using respectively the couple of primers: RP10-1250R and PACTGLUC-4652 (Table 1, 17-18) or PRBT1F and V5R (Table 1, 19-20).

#### *RT-qPCR analysis*

To measure *RBT1* expression in the two overexpressing strains, we performed semi-quantitative RT-qPCR in yeast and in hypha forms. For yeast form, cells were grown overnight at 30°C in SC pH7, diluted at  $OD_{600}=0.25$  and further grown in the same conditions to  $OD_{600}=1$ . To obtain hyphae, cells were grown overnight at 30°C in SC pH5, diluted in SC pH7 at  $OD_{600}=1$  and then further incubated for 2 hours at 37°C. The yeast and hypha forms were treated with the same protocol described below. The cultures were centrifuged and the pellets were frozen in liquid azote and conserved at -80°C. Total RNA was extracted following the instructions of RNeasy Mini QIAGEN kit. To eliminate genomic-DNA contamination, total RNA was treated with RNase-free DNase I (DNase Ambion). RNA was measured using the Nanodrop (ref ???) to evaluate the concentration and the quality with A260/280 and A260/230 ratios. A RT reaction was then performed with a Transcription Reverse Superscript III Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Expression levels of *RBT1* in the two cell forms were determined using primers RBT1qFb and RBT1qRb (Table 1, 21-22) in the two overexpressing strains and their control (DAY185) and compared to the *ACT1* expression.

#### *Adhesion to polystyrene and biofilm formation*

*Saccharomyces cerevisiae* transformed cells were grown overnight at 28°C in liquid YNB N<sub>5000</sub> medium supplemented with leucine, histidine and lysine. Cells were adjusted in fresh medium with to  $OD_{600}=1$ . 500 µl of cell suspension were allowed to adhere for 60 minutes at 28°C to wells of sterile 24-wells polystyrene plates treated for tissue culture (BD Falcon). After 60 minutes, cells that did not adhere were removed by washing three times with 1 ml of PBS. For biofilm formation, 500 µl of fresh supplemented YNB N<sub>5000</sub> medium were added and plates were further incubated for 24 hours at 28°C. Adherence and biofilm formation were assessed by cells staining with 500 µl of 0.5% crystal violet during 10 min at room temperature. After two washes with 1 ml of H<sub>2</sub>O, biomass was quantified after addition of 500 µl of 10% acid acetic and measurement of the  $OD_{595}$  of the solution after 10 minutes of incubation and centrifugation.

#### *Cell surface hydrophobicity*

Cell surface hydrophobicity was determined by the previously described MATS method (for Microbial Adhesion to Solvents) with some modifications. Cells grown overnight in liquid YNB N<sub>5000</sub> medium supplemented with leucine, histidine and lysine at 28°C, were washed twice in physiological water and

resuspended at an  $OD_{600}=0.8$ . 150  $\mu$ l of decan was added to 1.5 ml of cell suspension. The samples were shaken 15 seconds in the hand and then vortexed 90 seconds. After 15 minutes at room temperature, the  $OD_{400}$  of the aqueous phase  $A_1$  was measured. The  $OD_{400}$  of the sample without decan corresponded to  $A_0$ . To calculate the percentage of cell surface hydrophobicity (CSH), we used the formula:  $CSH = (1 - A_1/A_0) \times 100$ .

#### *Biofilm formation on Thermanox™ in micro-fermenter*

An inoculum was prepared from an early stationary-phase culture grown in flasks at 30°C in an orbital shaker and diluted to  $OD_{600}=1$ . Biofilm was produced in micro-fermenter. It consists of a glass vessel with a 40-ml incubation chamber where two glass tubes are inserted to drive the entry of medium and air. Used medium is evacuated through a third tube. Medium flow is controlled by a recirculation pump (Ismatec) and pushed by the pressured air. Plastic slide (Thermanox™, Nunc) glued to a glass spatula was immersed in the inoculum for 30 minutes at room temperature. After this adhesion period, the spatula was transferred to the chamber and incubated at 37°C for 40 hours with the medium flow set to 0.6 ml/min and air supplied at 105 Pa.

#### *Adherence to HeLa and Caco-2 cells*

For adherence to HeLa cells, *C. albicans* cells were grown to  $OD_{600}=0.8$  in minimal SC medium buffered at pH7 at 30°C. Cells were resuspended at a concentration of  $10^4$  cells/ml in H10 (Supplemented DMEM Gluta Max from Gibco + 1% of non-essential amino acids + 1% of 5 ml Penicillin and Streptomycin + 10% of foetal bovin serum). 1 ml/well of the cell suspension was added to confluent HeLa cell monolayer in 6-wells culture cell plates (BD Falcon) and plates were incubated for 45 minutes at 37°C. After this incubation time, half of the plate (3 wells) was washed three times with 5 ml of warm PBS. These wells constituted the assay and the unwashed wells represented the inoculum. HeLa and yeast cells of each well were then scrapped in 1 ml of PBS and collected in 1.5 ml Eppendorf tube. Cells were diluted at  $1/10^6$  for the inoculum and at  $1/5^6$  for the assay in PBS and 100  $\mu$ l were spread on solid YPD plates and colonies were counted after 48h of incubation at 30°C. Adhesion was quantified as the number of colonies on plates corresponding to the assay divided by the number of yeast cells initially added to the HeLa monolayer.

For adherence to Caco-2 cells, assays were performed according to a previously described protocol (Dalle *et al.*, 2003). Briefly, Caco-2 cells grown on 12 mm glass coverslips were inoculated with  $\sim 10^4$  log phase yeast cells of *C. albicans* Rbt1SL and Rbt1FL overexpressing strains and control. After 30 minutes at 37°C, the cells were washed three times with PBS to remove non-adherent yeasts and cells were fixed with paraformaldehyde 3.6 % for 10 minutes. Adherent *C. albicans* cells were stained with calcofluor white and quantified by epifluorescence (Eclipse E600, Nikon) using a filter set to detect

calcofluor white. The percentage of adhesion in each culture was determined as the ratio of the number of adherent *C. albicans* cells on the entire surface of the coverslip to the number of *C. albicans* cells inoculated. Each condition was tested in quadruplicate.

#### *Cell cytotoxicity on Caco-2 cell line*

Caco2 cells were infected with  $\sim 5 \times 10^5$  *Candida* cells for 24 hours at 37°C, in 96-wells plate culture. After infection, Caco-2 cells were washed with DMEM to remove the non-interacting yeast cells in suspension and stained 10 minutes with a specific cell death fluorophore (Sytox® orange, Invitrogen). Fluorescent intensity was quantified by measurements of the fluorescence using the plate reader Victor™ (Perkin ELmer). For each strain tested, cytotoxicity was expressed as the percentage of variation as compared to the reference strain. Each assay was tested in quadruplicate.

#### *Cell lysis and preparation of cell walls and soluble protein fractions*

*Candida albicans* CAI-4 transformed cells were harvested by centrifugation, washed with 10 mM Tris-HCl containing 10 mM  $\text{NaN}_3$  and disrupted in ice after resuspension in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl) containing anti-proteases (complete, EDTA-free from Roche) and glass beads in a Bead-Beater 24™ (MP Biomedicals, California, USA) four times for 20 seconds each with 5 minutes in ice between each round. Subsequently, cell walls were collected by centrifugation at 1,000 x g for 10 minutes at 4°C and washed extensively with 1 M NaCl. For cell wall protein extraction, NaCl washed-cell walls from the low-speed pellet were boiled twice in the presence of 50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA pH8, 2% SDS to solubilize the non-covalently linked cell wall proteins and to remove any contaminant derived from the cytosol and/or plasma membrane. SDS-extracted cell walls were extensively washed with  $\text{H}_2\text{O}$ , resuspended in 20 mM NaAc pH4.5 and incubated for 3 hours at 37°C with the purified recombinant  $\beta$ -1,6-glucanase (Boisramé et al; 2009). After a 5 minutes centrifugation at 10,000 x g, the insoluble material was discarded and the solubilized proteins were concentrated on Microcon™ 50 (Millipore) before Western blot analysis.

#### *Western blot analysis*

Secreted or extracted proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on NuPAGE<sup>®</sup>Novex Tris-acetate 3-8% pre-cast gels (Invitrogen) in NuPAGE<sup>®</sup>Novex Tris-acetate Running buffer (Invitrogen) using the XCell Mini-Cell system from Invitrogen. The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (PROTRAN) for Western blot analysis. Following transfer, membranes were rinsed in Phosphate-Buffered Saline (PBS) and blocked in PBST (PBS plus 0.1% Tween 20) + 2% skimmed milk from Difco for one hour at room temperature. The membrane was then incubated overnight at 4°C in PBST containing a 1:5000 dilution of the monoclonal anti-V5

antibody (Invitrogen). After 3 washes in PBST, one-hour incubation in the presence of peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibodies (GE Healthcare) was performed. The membranes were washed three times before detection of the signal using the Enhanced Chemi Luminescence (ECL)<sup>+</sup> detection system (GE Healthcare).

#### *Immunofluorescence detection*

Cells were fixed in 8-fold diluted 37% formaldehyde for 40 minutes and after washes were placed on polylysine coated slides, then blocked in PBS + 0.5% BSA and incubated successively in the presence of monoclonal anti-V5 antibodies (Invitrogen) and anti-mouse IgG-Cy3 conjugated antibodies (SIGMA) in PBS + 0.5% BSA for 1 hour in the dark. After washes in PBS, DAPI was added (2 µg/mL final concentration) and rinsed before the mounting step. For permeabilization, cells grown to OD=1-2 were washed and resuspended in phosphate buffer pH 7.5 with a 5X concentration before being fixed in 8-fold diluted 37% formaldehyde and incubation for 40 minutes at room temperature. After 3 washes in phosphate buffer, cells were incubated for 20 minutes at 37°C in Sorbitol buffer + Zymolyase 100T (0.5 mg/mL final). 2 volumes of cold sorbitol buffer were added before centrifugation and 2 washes in sorbitol buffer. Cells were resuspended in sorbitol buffer before proceeding with immunofluorescence. Cells were examined by fluorescence microscopy (Olympus BX51) with 512-nm excitation and 565-nm emission filters using an Olympus 100X oil immersion objective and 10X oculars.

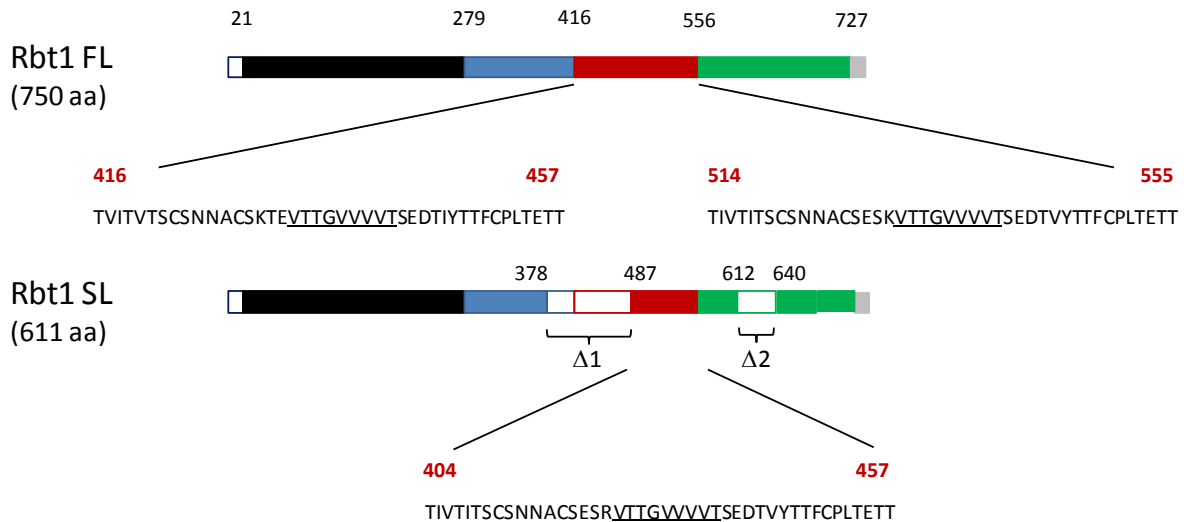


Figure 1: Schematic representation of the two Rbt1 proteins domain organization with, from left to right, the signal peptide sequence (white box), the N-terminal domain matching the Flo11 superfamily (black box) starting at amino acid 21, the Ser/Thr-rich region containing the imperfect repeats (blue box circles) starting at amino acid 279, the central part of the C-terminal domain from amino-acid 416 to 555 containing the two 42 amino acid-long repeats (red box) comprising the sequence with a high b-aggregation potential (underlined) and the PATES-rich region (green box) which precedes the GPI anchor addition signal (grey box). The two deletions in the Rbt1SL protein ( $\Delta 1$  and  $\Delta 2$ ) are symbolized by empty boxes.

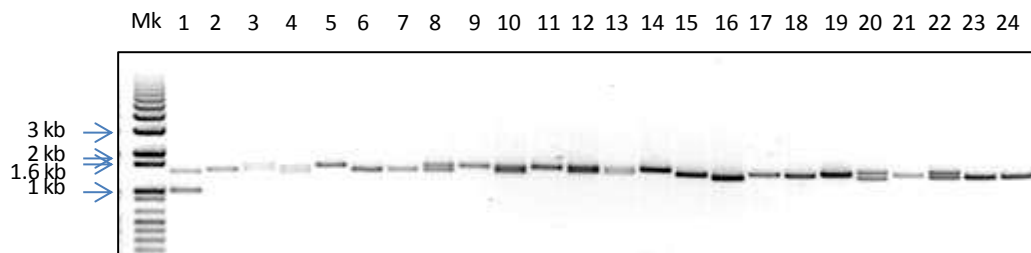


Figure 2: *RBT1* allelic variation in 23 different clinical isolates representing 11 clades of *C. albicans* (isolated from different countries in different body niches), based on 0.8% agarose gel electrophoresis of the PCR product obtained from genomic DNA extracted after 24 h of culture in YPD. Lanes: Mk, 1-kb Plus marker (Invitrogen); lane 1, BWP17. Lanes 2 to 24 are clinical isolates; 2, M15; 3, M21; 4, M29; 5, Niger12; 6, Niger14; 7, M4; 8, M5; 9, M26; 10, H14; 11, Bourn11; 12, Bourn14; 13, M47; 14, M61; 15, APRURC3; 16, Bourn6; 17, Bourn7; 18, Bourn9; 19, Bourn10; 20, Bourn15; 21, F-E; 22, F-J; 23, DPC63; 24, BCHURS6.

## Results

### *Rbt1: a protein with multiple domains and sequence variability*

Rbt1 seems to promote adhesion to plastic (Nobbs et al, 2010) which suggest a potential role in the pathogeny of *C. albicans*. After a detailed analysis of Rbt1 structure using protein BLAST algorithm we distinguished different domains within the protein (Figure 1): the N-terminus of Rbt1, from amino acid 71 to 216, matched to the Flo11 superfamily of the NCBI Conserved Domain Database (CDD) (**pfam10182**) (Punta et al, 2012). This domain is found at the N-terminus of the *S. cerevisiae* Flo11 protein required for diploid pseudohyphal formation and haploid invasive growth (Lo et al, 1996; Lo et al, 1998). The rest of the protein could be divided in three different regions on the basis of both similarity and amino acid composition. The first domain lies from amino acid 279 to amino acid 400 and displays 4 repetitions of a 20 amino acid-long motif containing more than 50% of serine and threonine residues followed by 4 shorter repetitions of a “PESSAPE” motif. The second domain extends from amino acid 416 to 555 and shows 2 copies (respectively from amino acid 416 to 457 and 514 to 555) of another conserved domain recently created and reported as flocculin type 3 repeat (**pfam13928**) which is found in the *S. cerevisiae* flocculation protein Flo9 close to its C-terminus (Figure 1). This later motif is also found in two copies in Hwp1 as well as in the adhesins Eap1 and Hwp2 but is absent in the Als family. In Rbt1, in contrast to Hwp1, the two copies are more distant and the sequence that separates them resembles the last repetitions of the first domain with 2 “PESSAPE” repeats. The last domain ranging from amino acid 556 to the C-terminal GPI anchoring signal is mainly composed of Proline, Alanine, Threonine, Glutamic acid, Serine, Valine, and Glycine residues. The omega site for GPI anchor addition is predicted to be a glycine at position 729 using the big-PI Fungal Predictor (Eisenhaber et al, 2004). The last 60 amino acids display 81% of identity with Hwp1 C-terminus.

Amplification of the entire CDS using two external primers (see Material and Methods) on BWP17 genomic DNA template yielded two different fragments: after sequencing, the longer sequence was shown to encode a Rbt1 protein composed of 750 amino acid residues while the shorter one was translated into a 611 amino acid-long protein. The two proteins, respectively called Rbt1FL (full length) and Rbt1SL (short length), shared the same N-terminal domain; the main difference was found in the second domain: indeed, the shorter protein displayed a 110 amino acid long deletion between amino acid 377 and 488 and therefore contained only one copy of the motif present in this domain. The second deletion was shorter (29 amino acid residus) and is localized in the last domain between amino acid 611 and 641 (Figure 1).

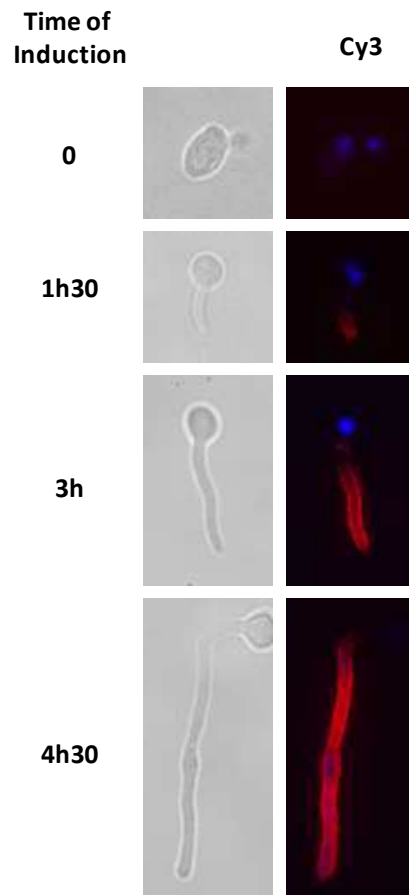


Figure 3: *In vivo* localization of Rbt1. The V5-tagged Rbt1 expressed under the control of the *RBT1* promoter was detected by immunofluorescence after three different times of hypha induction. Fixed cells were directly treated first with anti-V5 antibodies and then with anti-mouse IgG-Cy3 coupled antibody, and immunofluorescence was observed using an Olympus BX51 microscope.

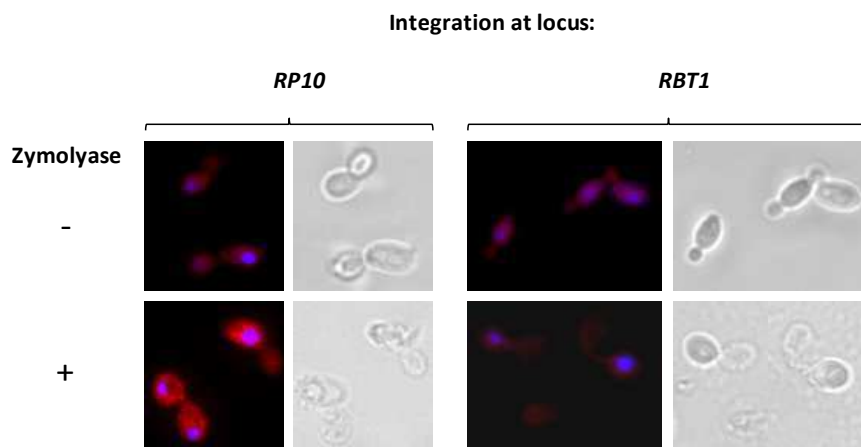


Figure 4: *In vivo* localization of Rbt1 in yeast cells. The V5-tagged Rbt1 expressed either under the control of the *ACT1* promoter (left) or the *RBT1* promoter (right) was detected by immunofluorescence after cell permeabilization (bottom) or without any treatment (top). Fixed cells were incubated first with anti-V5 antibodies and then with anti-mouse IgG-Cy3 coupled antibody, and immunofluorescence was observed using an Olympus BX51 microscope.

We used the different *C. albicans* clinical isolates looking for the presence of these two alleles. Interestingly, as shown in Figure 2, although several tested strains contained two different alleles none of them showed that large deletion identified in BWP17 (lane 1). Sequence analysis showed hot spots of either deletion or insertion in the “PESSAPE” repetitions: deletion of 9 or 19 amino acids at position 377 of the full length protein or insertion of 28 amino acids at position 480. The clade repartition of this variability is interestingly organized: the strains showing clear heterozygosis are all but one part of Clade 2 (data not shown).

#### *Localization of the Rbt1 protein*

In order to localize Rbt1, an epitope-tagged copy of each of the two alleles was constructed by insertion of the V5 tag between amino acid 273 and 274 (see Material and Methods). These copies were targeted to the *RBT1* locus to express the tagged proteins under the control of the native *RBT1* promoter. Since *RBT1* expression was shown to be controlled by Tup1 (Braun et al, 2000), we first performed immunofluorescence without permeabilization on the recombinant strains after 3 different times of hypha induction. Figure 3 clearly indicates that Rbt1 signal, which was absent on yeast cells, progressively increased with the time of hypha induction covering the entire hypha and only the hypha. An identical pattern was observed for the two alleles (data not shown). This experiment confirmed that Rbt1 was an hypha-associated protein, that the protein was exposed on cell surface of hyphae exclusively and indirectly indicated that Rbt1 was GPI-anchored.

In a second set of strains, the epitope-tagged protein was expressed under the control of the *ACT1* promoter as already reported for Iff proteins (Boisrame et al, 2011). The immunofluorescence experiment was performed on intact fixed yeast cells and hyphae. In hypha form, this construction gave a signal similar to the one obtained with the locus-targeted copy (data not shown). Unexpectedly as we observed for yeasts expressing *RBT1-V5* under its own promoter, no signal was detectable on yeast cells that constitutively expressed the *RBT1-V5* copy (Figures 3 and 4), suggesting that the tag was not accessible to the antibody from the surface. Consequently, a permeabilization step was performed by zymolyase treatment before the incubation with anti-V5 antibodies. As a result, yeasts that constitutively expressed the *RBT1-V5* copy were specifically labeled in such conditions (Figure 4, bottom left panel) while logically no signal appeared in yeast cells expressing the tagged copy under its own promoter (Figure 4, bottom right panel). Thus the V5-tagged protein was indeed present but seemed to be embedded in the cell wall matrix in the yeast form.

To localize Rbt1 in the cells, a fractionation experiment was performed on strains expressing the Rbt1-V5 protein under the control of *ACT1p*. A strong signal was detected in the SDS-extracted fraction of a low speed pellet (Figure 5) in both yeast and hyphal growth conditions. Since this fraction mainly contained plasma membrane proteins as shown for Dcw1 (Boisrame et al, 2011), Rbt1-V5 thus behaved as a plasma membrane GPI-anchored protein in both morphological states.



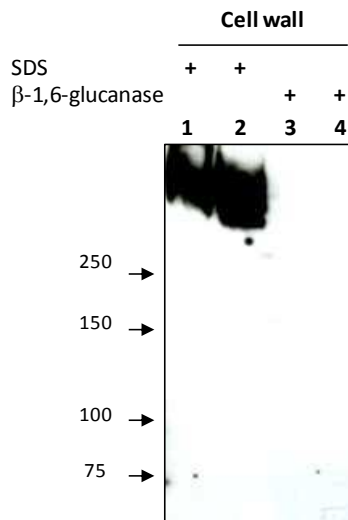


Figure 5: Cellular localization of the Rbt1FL proteins. Western blot analysis of cell walls of strains expressing the *RBT1FL* allele under the control of the *ACT1* promoter grown either as yeast cells (lanes 1 and 3) or as hyphae (lanes 2 and 4): non-covalently linked proteins were first extracted from the cell wall fraction ( $C_{1000g}$ ) in the presence of 2% SDS for 10 minutes at 100°C (lanes 1 and 2) and the resulting pellet washed in  $H_2O$  was further incubated in NaAc buffer + 2U of  $\beta$ -1,6-glucanase for 3 hours at 37°C (lanes 3 and 4) Samples were separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immuno-blotted with monoclonal anti-V5 antibodies.

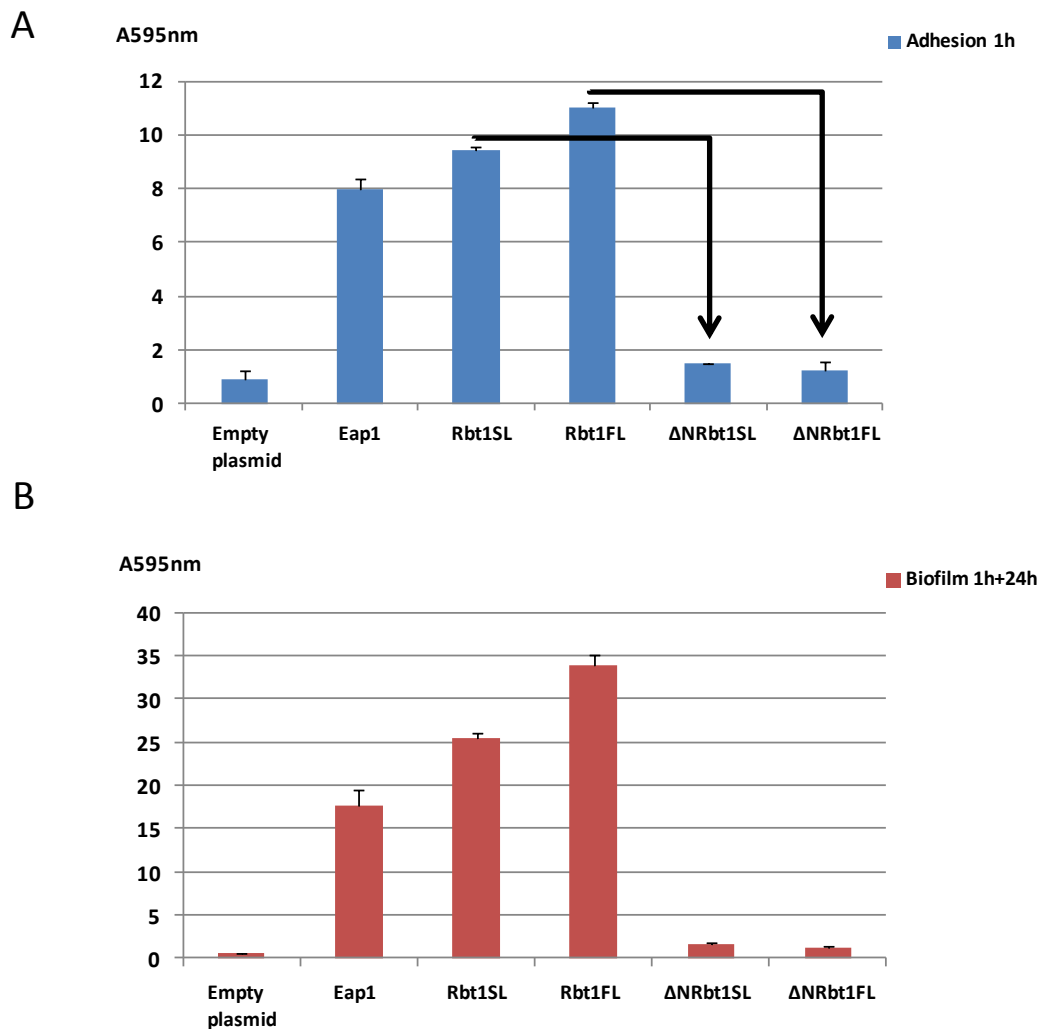


Figure 6: Adhesion and biofilm formation on polystyrene plates treated for cell culture by *S. cerevisiae* cells expressing entire or truncated Rbt1 variants. *S. cerevisiae* cells expressing Rbt1SL, Rbt1FL,  $\Delta$ NRbt1SL and  $\Delta$ NRbt1FL together with the control protein Eap1 and the pBC542 vector alone, were incubated in polystyrene plates for 1 h at 28°C. Non-adherent cells were removed, and total biomass was measured immediately by crystal violet staining (A) or after additional 24h of incubation at 28°C in minimal medium (B). Values given represent mean  $\pm$  standard deviation (SD) of results of one experiment performed in duplicate and representative of three independent experiments.

*Role of Rbt1 in adhesion to polystyrene*

In order to further characterize Rbt1 and identify the different roles of its domains, we decided to test the adhesion properties conferred by different subdomains of Rbt1 using the *S. cerevisiae* surface display system (Zupancic et al, 2008). The two *RBT1SL* and *RBT1FL* coding sequences from BWP17, except the 27 last amino acid residues predicted to act as a GPI anchor addition signal, as well as two truncated proteins deleted for their N-termini from amino acid 21 to 268 were cloned in the pBC542 vector. In this plasmid, the tested sequences are fused to a HA tag followed by the *Candida glabrata* Epa1 Ser/Thr-rich region and the *S. cerevisiae* Cwp2 cell wall targeting signal (Zupancic et al, 2008). The heterologous expression at *S. cerevisiae* cell surface of the entire or the truncated Rbt1 proteins as well as the Eap1 adhesin was confirmed by an immunofluorescence experiment (data not shown).

The adhesion properties on polystyrene of each of these strains were thus investigated. *S. cerevisiae* cells expressing each of the Rbt1 constructions together with the Eap1 positive control and cells containing the empty vector were incubated in 24-well culture cell-treated plates for 1 h at 28°C. Non-adherent cells were removed and the biomass was quantified by crystal violet staining. As shown in Figure 6A, after 1 hour of incubation, we observed that expression of the two entire Rbt1 proteins substantially enhanced *S. cerevisiae* adhesion to polystyrene. Indeed, the biomass levels were respectively 10.6-fold and 12.4-fold higher for yeasts expressing the Rbt1SL and the Rbt1FL protein than the biomass observed for the control strain containing the empty vector. In the same experiment, the biomass level of the strain expressing the Eap1 adhesin was only 9-fold higher. Moreover, the *S. cerevisiae* recombinant strains which expressed the C-terminal part of each of these two Rbt1 proteins displayed levels of biomass similar to these measured for the strain carrying the empty vector, suggesting that the N-terminal domain of the Rbt1 protein was essential to mediate Rbt1 adherence to polystyrene.

Initial attachment was followed in parallel by a 24h-incubation and biomass levels were further measured to examine the formation of biofilm. Figure 6B showed that the two forms of Rbt1 contributed to biofilm formation: indeed OD values reached respectively 25 and 34 for the shorter and the longer Rbt1 proteins. The ratio between biomass accumulation and initial adhesion was 3.1 for the full length Rbt1 and 2.7 for the short one. These results thus confirmed that Rbt1 was both involved in cell-substrate and in cell-to-cell adhesion and that the Rbt1FL protein was more efficient in these two functions.

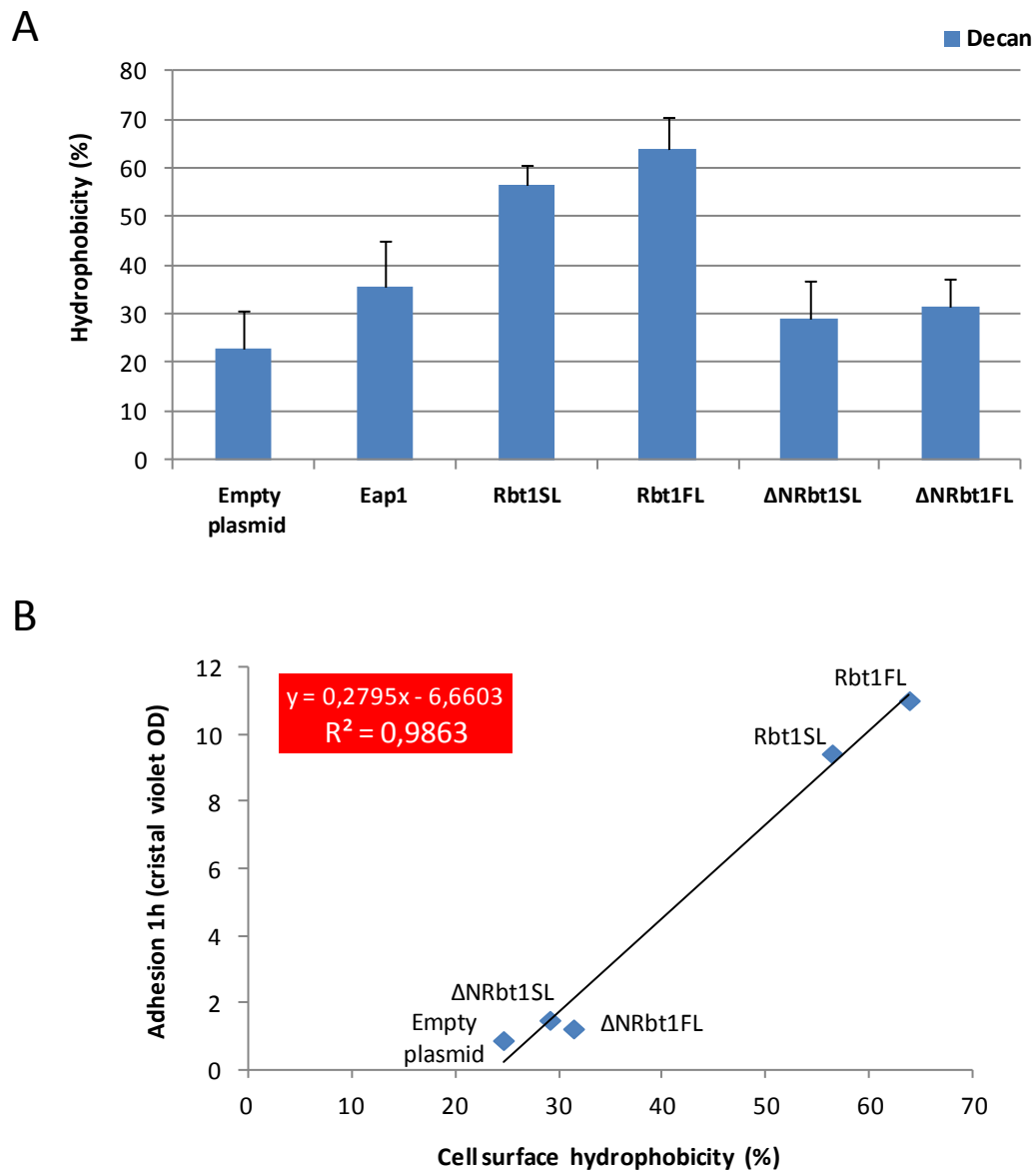


Figure 7: Cell surface hydrophobicity of *S. cerevisiae* cells expressing entire or truncated Rbt1 variants. Affinity to decan of *S. cerevisiae* recombinant strains was determined using the MATS method and the percentage of hydrophobicity was calculated for cells expressing the Rbt1SL, Rbt1FL, ΔNRbt1SL and ΔNRbt1FL proteins together with the control protein Eap1 and the pBC542 vector alone (A). Values given represent mean ± standard deviation (SD) of results of one experiment performed in duplicate and representative of three independent experiments. Correlation curve between adhesion to polystyrene and cell surface hydrophobicity for the four Rbt1 constructs and the negative control (B).

### *Cell surface hydrophobicity of the S. cerevisiae recombinant strains*

Since polystyrene adhesion and cell surface hydrophobicity seemed to evolve in the same way, we drew a trend curve with polystyrene adhesion values in the y-axis and cell surface hydrophobicity values in the x-axis (Figure 7B). The correlation factor,  $R^2$ , obtained with the five strains expressing either Rbt1SL, Rbt1FL,  $\Delta$ NRbt1SL,  $\Delta$ NRbt1FL or containing the empty vector was 0.9863. This value indicates that the adherence property of the Rbt1 protein was mainly due its hydrophobicity, a characteristic linked to its N-terminal domain.

### *Adhesion and biofilm properties of two RBT1 overexpressing strains*

In order to study the adhesiveness conferred by Rbt1 in *C. albicans* independently of the hypha-induced adhesins, we decided to construct two strains which could constitutively express high levels of Rbt1. For this purpose, the *RBT1* natif promotor was exchanged for the *TEF1* promotor for each of the two alleles in two different strains (see Material and Methods). Real time semi quantitative PCR analysis showed that in yeast form *RBT1* mRNA levels reached 47.1% and 40.1% of those of the *ACT1* for the short and the long allele respectively while *RBT1* mRNA represented less than 0.1% of *ACT1* mRNA in the wild type strain. In hyphae, the percentages of *RBT1* mRNAs in comparison with *ACT1* mRNA respectively increased to 61.4 and 47.2 for the *RBT1SL* and the *RBT1FL* allele. In the wild type context, the levels of *RBT1* mRNA represented 8.3% of these of *ACT1* mRNA. Thus these two new strains OExRbt1FL and OExRbt1SL overexpressed *RBT1* in both yeast and hypha forms.

Adhesion and biofilm formation properties of these new strains were tested on polystyrene culture cell-treated plates. A slight increase in both adherence and biofilm formation was measured for the two overexpressing strains in comparison with the control strain (data not shown); indicating that Rbt1 also functioned as an adhesin in *C. albicans*. Surface hydrophobicity was also determined for these two strains and the percentages calculated for the OExRbt1FL and the OExRbt1SL strains reached respectively 46.3 and 31.1 in comparison with the 17.6 of the control strain confirming here again the link between adherence to cell culture-treated polystyrene and surface hydrophobicity.

Biofilm formation assays were also performed on Thermanox™ in micro-fermenters as described by García-Sánchez and collaborators (Garcia-Sanchez et al, 2004). The results obtained in these conditions showed a more important biofilm for the two overexpressing strains (see Figure 8) with a biomass measured for the OExRbt1SL and the OExRbt1FL strains after 40 hours of incubation representing respectively 120% and 142% of the biomass formed by the control strain, indicating that the full length protein had a higher capacity to form biofilm than the short length protein. Microscopic observation of the Thermanox™ slides after the adhesion step did not reveal any difference between the three strains (data not shown).

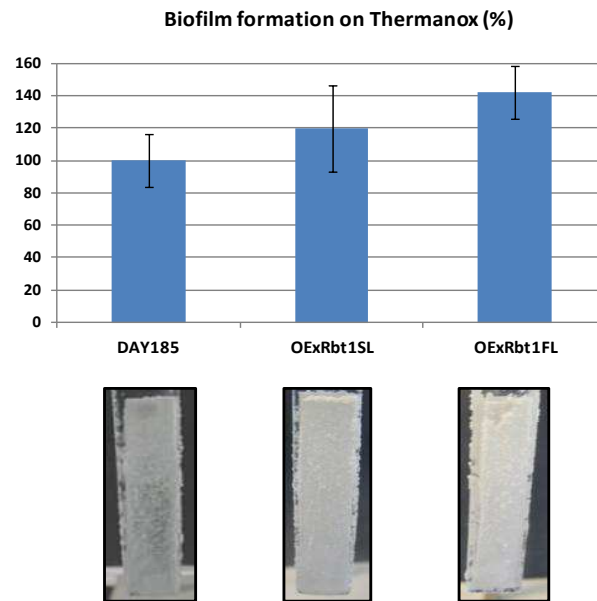


Figure 8: Biofilm formation on Thermanox™ in microfermentor of *C. albicans* strains overexpressing the Rbt1SL and Rbt1FL proteins. After an initial immersion period of 30 minutes in the inoculums, plastic slides were further incubated for 40 hours at 30°C in microfermentor. Dried weight of each biofilm was measured. The percentages of biomass obtained for the two overexpressing strains were calculated in comparison to those of the wild type control strain which was fixed to 100%. Values given represent mean  $\pm$  standard deviation (SD) of results of one experiment performed in duplicate and representative of three independent experiments. Bottom: photographs of the three biofilms formed on the Thermanox lamella after 40 hours.

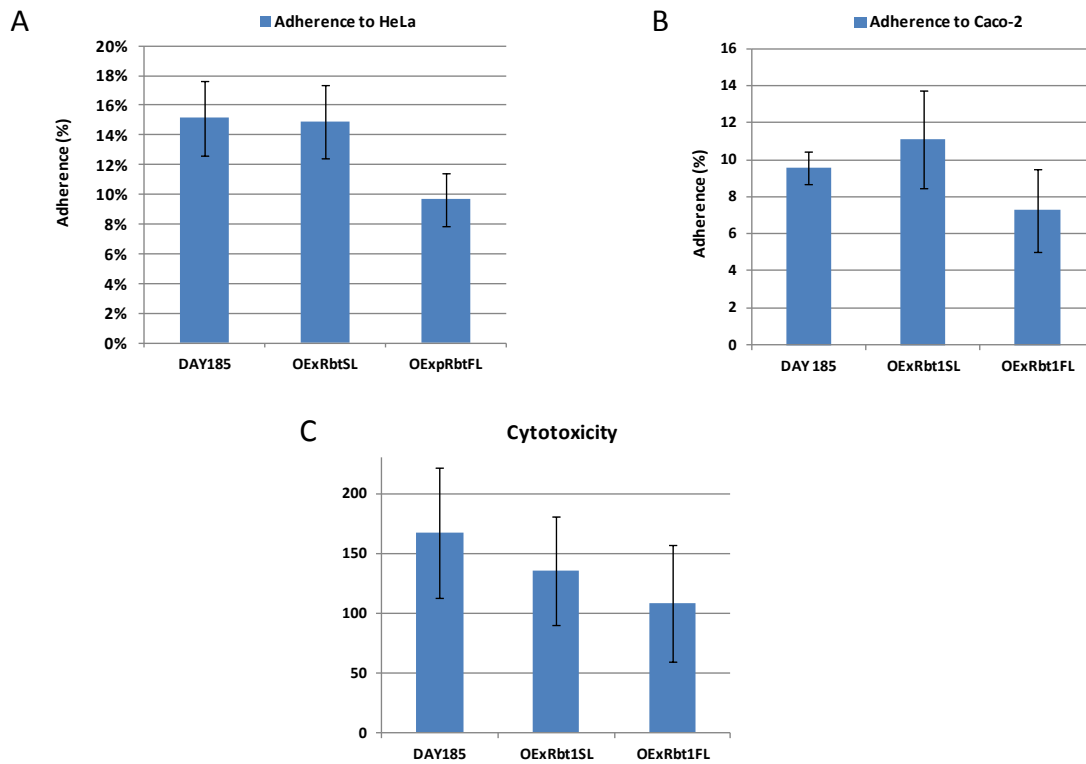


Figure 9: Adherence of *C. albicans* strains overexpressing the Rbt1SL and Rbt1FL proteins to human cells. Yeasts cells were incubated with confluent HeLa cells for 45 minutes (A) or with Caco2 cells for 30 minutes (B). The percentage of adhesion represents the number of adherent yeasts reported to the number of yeasts in the inoculums (C).

### *Adhesion of the two overexpressing strains to human cells and cytotoxicity*

We then tested the adherence to host cells of the two overexpressing strains using two models: human HeLa epithelial cells and human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2). As shown in Figure 9A, while adhesion to HeLa cells of the *C. albicans* strain expressing constitutively the short length Rbt1 protein was similar to the adhesion of the control strain, the recombinant strain expressing the full length Rbt1 protein had a reduced percentage of adhesion in comparison with the two first strains (p value < ?). This result suggests that the wild type adherence of *C. albicans* was impaired by the expression of the longer *RBT1* allele in yeast cells. With Caco-2 cells again adherence of the OExRbt1FL strain showed a slight decrease in comparison with the control and the OExRbt1SL strain (p value < ?) (Figure 9B).

Cellular cytotoxicity on Caco-2 cells was tested with the same strains and displayed comparable results with a weaker cytotoxicity of OExRbt1FL than the reference strain DAY185 or even OExRbt1SL (Figure 9C).

### *Aggregation properties of the two overexpressing strains*

In a recent study, Ramsook and collaborators identified sequences with a high  $\beta$ -aggregation potential in Rbt1 using the prediction program TANGO (<http://tango.crg.es/>) (Fernandez-Escamilla et al, 2004). These sequences are highly enriched for the  $\beta$ -branched aliphatic amino acids such as isoleucine, threonine and valine. They showed that Als5 formed amyloids *in vivo* and that the formation of such structures was responsible for cells aggregation (Ramsook et al, 2010). Prediction for Rbt1 revealed the presence of two VTTGVVVVT sequences in the full length Rbt1 protein (at position 433 and 531, see Figure 1) while only one was present in the short length protein at position 421. We thus tested the ability of the two overexpressing strains to aggregate. Cells were grown either in unbuffered medium for one night at 30°C or in buffered medium (pH7) for one night at 37°C in order to obtain cells in either yeast form or hypha form. As illustrated in Figure 10A, while no aggregate were detected when cells were in yeast form, hyphae were able to form aggregates. Moreover, the OExRbt1FL strain formed much bigger aggregates than the OExRbt1SL strain; indicating that the aggregation potential was correlated to the number of  $\beta$ -aggregation-prone sequences. Consequently to the large aggregates formed, Rbt1FL overexpressing strain flocculated quicker than the two other strains as shown in Figure 10B. To confirm the role of Rbt1 in hyphae aggregation the previously published  $\Delta\Delta rbt1$  strain from Ene and collaborators was used in a similar aggregation assay (Ene et al, 2009). Formation of aggregates was abolished in the *rbt1*<sup>-/-</sup> null mutant in comparison with the control strain as presented in Figure 10C. We also confirmed, as already published in Ene's study, that this strain was impaired in biofilm formation using polystyrene plates treated for cell culture (Ene et al, 2009) (data not shown).

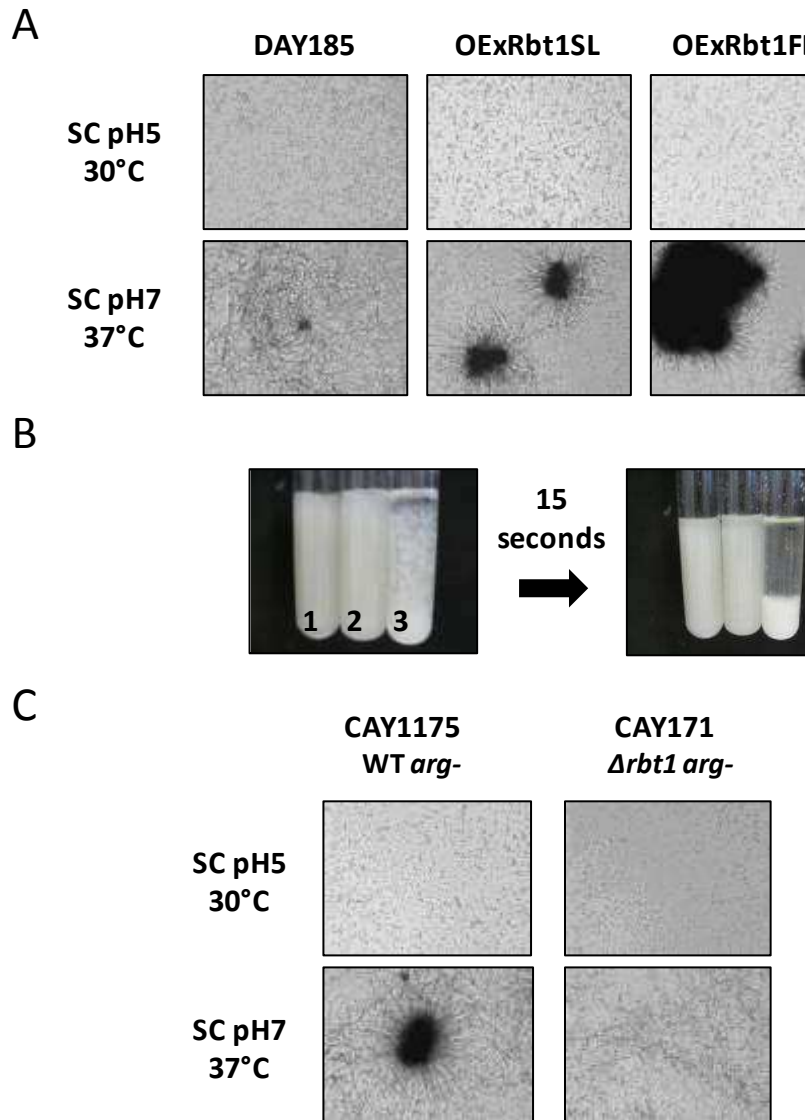


Figure 10: Aggregation assay of *C. albicans* strains overexpressing the Rbt1SL and Rbt1FL proteins (A) or deleted for the Rbt1 protein (C). Tested and control strains were cultivated either in unbuffered medium at 30°C or in pH7 buffered medium at 37°C for one night and examined by light microscopy ( $\times 40$  magnification). Sedimentation of aggregates was allowed for the first set of strains and tubes were photographed after 15 seconds (B).

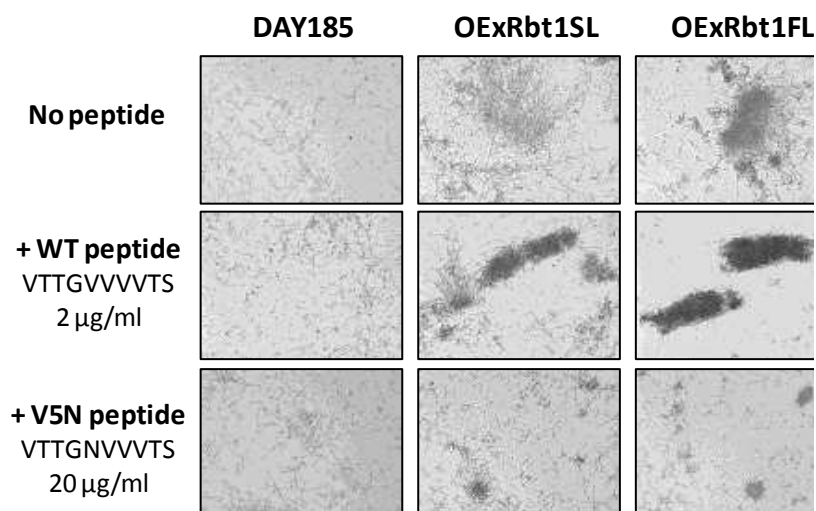


Figure 11: Aggregation stimulation and aggregation inhibition in the presence of wild type (VTTGVVVVTS) and mutated (VTTGNVVVTS) peptides. Filamentation was induced for tested and control strains that were further incubated for 24 hours in the presence of the wild type high  $\beta$ -aggregation potential peptide or a mutated peptide. Cells were then examined by light microscopy ( $\times 40$  magnification).

To confirm that the sequences with high  $\beta$ -aggregation propensity were directly involved in this phenomenon, we set up an experiment using two different peptides: (i) a wild type peptide corresponding to the sequence found in both alleles; (ii) and a mutated peptide in which the valine in position 5 was replaced by an asparagine residue. The TANGO predictor no longer detected any  $\beta$ -aggregation potential for this mutated peptide (V5N). Filamentation was induced by growing cells in buffered medium for 2 hours at 37°C and cultures were stored for 24 hours at room temperature. Figure 11 clearly shows that the presence of the wild-type peptide enhanced aggregation for the two overexpressing strains in comparison with the culture without any peptide. On the contrary, incubation in the presence of the V5N peptide inhibited aggregation, demonstrating that the VTTGVVVVT sequence triggered the formation of aggregates and was thus critical for cell-to-cell association when *C. albicans* was in hyphae form.



## Discussion

### *Rbt1 is expressed and unmasked exclusively on hyphae cell surface*

Rbt1 possesses a GPI anchor sequence signal at its C-terminus, like the two other members of the Family 12: Hwp1 and Hwp2 (Chapter14, *Candida and Candidiasis*, 2nd Edition). It is commonly accepted that these predictions of GPI anchoring are not 100% accurate due to the difficulties to define an exact C-terminus consensus for GPI-anchored proteins (GpiPs) (Richard et al, 2007). Experimental demonstration is thus required to confirm localization to the cell envelope but also to demonstrate cell surface exposure, which is not the case of all GpiPs. To do so, two epitope-tagged versions of Rbt1 were constructed and inserted either at the *RBT1* locus with the *RBT1* native promoter or at the *RP10* locus with the *ACT1* promoter. The first set of strains allowed us to perform a time-course experiment with various times of hypha induction, showing the gradual emergence of Rbt1 which appeared at the tip of the germ tube and progressed along its growth on all the hyphae. These observations are in agreement with the results of Vialas and collaborators which specifically identified Rbt1 as a hyphal surface protein using a trypsin treatment on live *C. albicans* yeast cells and hyphae (Vialas et al, 2012). According to our construction, the second set of strains should have expressed the V5-tagged protein both in yeast and in hypha forms. Intriguingly, while direct immunofluorescence gave a very strong signal on hyphae, no signal was detected on yeast cells. Similar amount of the V5-tagged protein were shown in both forms after cell extraction and western blot analysis thus excluding the hypothesis that the protein was absent but suggesting that the tagged protein might have been too deep embedded in the cell wall matrix to be reached by anti-V5 antibodies. Indeed, a signal was detected in this second set of strains after permeabilization of the yeast cell wall. We previously investigated in our laboratory cell surface exposure through the study of the Iff/Hyr GPI anchored-protein family (Boisrame et al, 2011). Our results showed that the 714 amino acid-long cell wall-anchored Iff8 protein was not long enough to be cell surface-exposed in the yeast form. Thus concerning Rbt1 since the full length protein comprises 750 amino acid residues and the V5 tag was inserted between amino acid 273 and 274, permeabilization requirement was not surprising. An immunoblot was performed on sub-cellular fractions of the different strains that clearly showed that the two proteins (full length and short length) were anchored in the plasma membrane both in yeast and in hypha forms indicating that the difference in the accessibility of the V5 tag between these two morphological states is not linked to a modification of the cell wall anchorage. These data thus implied that to be surface-exposed in hypha Rbt1 has to cross through the cell wall network, which raised different interesting points: (i) this protein of 750 amino acids is long enough to cross the hyphal cell wall; (ii) and more importantly the cell wall organization seems to change remarkably between yeast and hypha.

Regarding the first remark, since around one third of the protein is reachable by antibodies in non-permeabilization conditions, we can say that the minimal size required to expose an epitope on hyphal cell surface is reduced to 480 amino acids, confirming important modifications of the cell wall in structure or thickness between yeast and hypha. The main difference reported to date between yeast and hypha cell wall is the presence of a fimbriae layer, mainly composed of mannoproteins, in the yeast form which is greatly reduced in hypha, this modification allowing perhaps parietal proteins hitherto hidden or hypha-specific to be exposed to the outside (Fukazawa et al, 1997). These data can be compared with those obtained on Rbt1 cellular exposure: the size of this fimbriae layer might explain partially why Rbt1-V5 was invisible and inaccessible from the yeast surface. Concerning the second point raised by these experiments, two of our results were in favor of a modification of the cell wall structure and property upon hypha induction: first, despite similar levels of *RBT1* mRNA and thus probably of Rbt1 protein in both yeast cells and hyphae when the protein was expressed under the control of the *TEF1* promoter, no aggregation phenotype was observed when the cells were in yeast form but only when hyphae were present, suggesting that the Rbt1 proteins could not self-interact in the yeast form because the proteins were embedded in the cell wall; second, determination of the affinity to decan of these two strains in hypha form showed that the cell surface hydrophobicity of the OExRbt1FL strain reached 90% while those of the wild type strain increased from 17,6% to 50%, indicating that hydrophobic regions of Rbt1 and of other hypha-specific proteins were specifically exposed on cell surface of hyphae.

*The Rbt1 N-terminus domain plays a crucial role in cell surface hydrophobicity and in adhesion to abiotic surfaces*

Hwp1, Hwp2 are sharing similarities with Rbt1 mostly on the C-terminal domain, they all have been described as involved in adhesion to different substrates. Hwp1 was first described as a substrate to host transglutaminase making this protein essential for attachment to buccal epithelial cells (Staab et al, 1999) then Hwp1 involvement in biofilm formation and adhesion to plastic was precisely portrayed by different studies in the last six years (Ene et al, 2009; Nobbs et al, 2010; Nobile et al, 2006). Additionally, Hwp2 and Rbt1 mutant strains or Hwp2 and Rbt1 expression in a surrogate host like *S. cerevisiae* were used to illustrate a role of these two other family members in adhesion or biofilm formation (Ene et al, 2009; Nobbs et al, 2010). Rbt1 expression on *S. cerevisiae* surface was used to test its involvement in adhesion to saliva treated surface, polystyrene, silicone and *Streptococcus gordinii* cells, showing a small adhesion to plastic and silicone but no real impact on interaction with saliva-coated surface or bacterial cells (Nobbs et al, 2010). Ene and collaborators showed a slight decrease in biofilm formation for the *rbt1*<sup>-/-</sup> mutant and a very strong effect for the triple *hwp1*<sup>-/-</sup>, *hwp2*<sup>-/-</sup>, *rbt1*<sup>-/-</sup> mutant (Ene et al, 2009). Similarity of the Rbt1 N-terminal domain with the N-terminus of *S. cerevisiae* Flo11 suggested that the adhesiveness of Rbt1 was mediated by this part of

the protein. Flo11 is a member of the flocculin family in *S. cerevisiae*, which also includes Flo1, Flo5, Flo9 and Flo10 proteins. Flocculins participate to flocculation, a phenomenon where yeast cells aggregate in clumps and sediment rapidly. While the N-terminal domain of Flo1 was characterized as a lectin domain which binds highly branched mannose polymers located in the cell walls of adjacent cells, leading to cell-to-cell adhesion (Kobayashi et al, 1998); the mechanism of cellular adhesion mediated by Flo11p is not well understood. Goossens and Willaert showed that the N-terminal domain of Flo11 that does not contain the mannose-binding domain PA14 present in the other flocculins Flo1, Flo5, Flo9 and Flo10 was unable to bind mannose. They suggested that the ability of this domain to self-interact might explain the cell-to-cell interaction capacity of *FLO11*-expressing cells (Goossens et al, 2012). Indeed, Flo11 involvement in cell-surface adhesion during invasive growth as well as in cell-to-cell interaction during biofilm formation has been previously reported (Guo et al, 2000; Reynolds et al, 2001). Thus, in addition to the entire Rbt1 protein, we characterized the Rbt1 protein trimmed of its N-terminal domain. We confirmed the data obtained by Nobbs and co-workers, showing adhesion of the *S. cerevisiae* cells expressing the entire Rbt1. On the other hand, the shortened protein deleted of its N-terminus, although detected at *S. cerevisiae* cell surface, was unable to promote adhesion of the recombinant yeasts to polystyrene, confirming that the adhesiveness of Rbt1 to polystyrene relied on its N-terminal domain. Determination of the surface characteristics of these strains allowed us to observe that only *S. cerevisiae* recombinant cells expressing the entire Rbt1 showed an increased cell surface hydrophobicity therefore linking surface hydrophobicity to adhesiveness.

Interestingly when Rbt1 was overexpressed in *C. albicans* the same results were observed, the strains were more adherent to polystyrene, formed more biofilm and this was correlated to an increase in hydrophobicity. These results together suggested that high level expression of a cell surface protein might modify unspecifically the cell surface physico-chemical properties like its hydrophobicity and thus modify the cell adhesiveness strongly although the protein specific function is not responsible for this modification of behavior. On the other hand the modification of its surface hydrophobicity can be a mean for the cell to change its behavior. Modification of surface hydrophobicity has been described many years ago mainly by Hazen which suggested that the cell surface hydrophobicity was an important factor in adhesion of *C. albicans* to epithelial cells. Ultrastructural and biochemical analyses further indicated that *C. albicans* hydrophobicity is not determined by differences in surface hydrophobic proteins but by the presence of hydrophilic surface fibrils (Hazen et al, 1992). They showed that alteration of this fibrillar outer layer results in exposure of cryptic hydrophobic proteins. Ywp1 which is specifically expressed in yeast cells is a good candidate to be component of this fibrillar layer. Indeed, a *ywp1*<sup>-/-</sup> mutant strain was recently shown to be more adhesive (Granger et al, 2012). Rbt1 as a hypha-specific surface protein may thus contribute to the conversion of *C. albicans* surface hydrophilicity to hydrophobicity that accompanies yeast-to-hypha transition.

*Rbt1 governs hyphae aggregation through its central domain and a repeated motif with amyloid properties*

In addition to the N-terminal domain sharing similarities with the *S. cerevisiae* Flo11 N-terminus, Rbt1 possesses a C-terminus containing two 42 amino acid-long motifs shared by previously characterized *C. albicans* adhesins such as Hwp1 and Eap1 (see Figure 1). Amplification of the *C. albicans RBT1* coding sequence gave us an unexpected result: two alleles with a 420 nucleotides-difference in size were amplified on the laboratory strain BWP17: Rbt1FL and Rbt1SL. BLAST of our longer coding sequence gave 99% of similarity with the sequence submitted by Braun (Accession number: AAG09787.1) with 5 substitutions among 750 amino acids. Two other sequences existed in the databases: EEQ45143.1 which corresponded to the WO-1 778 amino acids-long Rbt1 protein (Butler et al, 2009) and XP\_709966.1 which was the SC5314 Rbt1 sequence submitted by Jones and collaborators (Jones et al, 2004) and differed substantially in the last part of the C-terminal domain. Braun and collaborators mentioned also that two alleles were present in SC5314 but the deleted sequence corresponded only to the second deletion mentioned in BWP17 strain in the results (Braun et al, 2000), however, Rbt1SL did not exist in any databases. Looking at *RBT1* loci in different clinical isolates, we were able to show that the size of the *RBT1* alleles varied from one strain to another and that the two alleles in a same strain were quite different but none of the studied strains contained the BWP17 smaller allele, suggesting that this allele recently emerged, probably resulting from a recombination event between repeats. Indeed, the sequence that separates the two 42 amino acid-long motifs in the longer allele is quite similar to the sequence found upstream of the first motif. Such allelic variation was already observed for several adhesins: *ALS3* was shown to vary in size (Hoyer et al, 2001), the 2 alleles of *EAPI* encode 2 very different proteins of respectively 653 and 1121 amino acids and a novel *HWPI* allele was recently isolated from *C. albicans* blood isolates (Padovan et al, 2009). Verstrepen and Klis consider that this variation in the number of tandem repeats allows pathogenic yeast to create variability. This mechanism by which cell surfaces of pathogens change so rapidly could be central to their capacity to adhere to different types of tissues, cells, or even host species and to shield pathogens from the host immune system (Verstrepen et al, 2006).

These two different alleles gave us the material to understand which domain of Rbt1 was involved in the adhesion properties. Biofilm formation needs cell-to-cell interactions, the Rbt1FL protein exhibited a higher capacity to form biofilm both on culture cell-treated polystyrene substrate and on Thermanox™ slide in comparison with the SL protein. We hypothesized that the difference in the length of the serine and threonine-rich region between the two proteins might influence their capacity to recognize their partners either: (i) directly because the sequence(s) mediating cell-to-cell interaction is (are) contained in this domain and thus partially absent in the shorter protein; (ii) or indirectly by modifying the exposure of the interacting-domain. Such a deficiency in biofilm formation was

observed by Padovan and collaborators for the new Hwp1 protein that displayed a 34 amino acid-long deletion in a serine and threonine-enriched domain (Padovan et al, 2009).

Aggregation represents a comparable phenomenon of cell-to-cell interaction and a recent publication gave evidence that amyloid-forming sequences contributed to cell aggregation and biofilm formation (Garcia et al, 2011). Since two sequences with a high  $\beta$ -aggregation potential (VTTGVVVVT) were predicted for the longer Rbt1 protein and only one for the shorter protein, we hypothesized that the strains overexpressing one or the other of these two alleles would have a different aggregation phenotype. Liquid aggregation assay was unsuccessful when cells were grown as yeasts but once filamentation was induced, we observed a massive aggregation of hyphae for the strain that expressed the full length Rbt1 protein in comparison with the wild type strain while the strain overexpressing the short length protein displayed an intermediate aggregation phenotype, thus confirming the role of these sequences in the phenomenon. To further confirm that the  $\beta$ -aggregation potential of these motifs was responsible for cell-to-cell aggregation, peptides either similar to the wild type sequence or containing a mutation (VTTGNVVVT), which abrogated its  $\beta$ -aggregation potential, were used in a second aggregation assay. While the wild type peptide was shown to enhance the cellular aggregation for all the strains, much smaller aggregates were formed in the presence of the mutated peptide for the three strains. In their paper Garcia and collaborators showed that amyloid-dependent clustering of Als5 increases the avidity and the strength of adherence mediated through the N-terminal domain. Such mechanism might be of use with the Rbt1 N-terminus as the “substrate-binding domain” where the putative amyloid-forming sequences could induce the clustering of different molecules of Rbt1 thereby increasing the adhesiveness and the cell-to-cell interaction. The presence of two sequences in the full-length Rbt1 protein thus conferred higher cell-substrate and cell-to-cell adhesion capacities than the presence of only one sequence in the shorter protein. The difference of aggregation observed between yeast and hyphae could explain the observation of a more fragile biofilm in *C. albicans* strain and the micro-fermenter experiments. Indeed the biofilm structure is described to be composed of a layer of yeast cells upon which a mixture of pseudo-hyphae and hyphae are forming the mature biofilm embedded in the cellular matrix. In the case of Rbt1 overexpressing strains the mature layer would have been weakly attached to the support due to fragile interactions with the layer of yeast cells but would have formed a compact layer easily washed off by the flow through.

Most of the adhesins characterized in *C. albicans* not only mediate adhesion to abiotic surface but also interact with human cells, for instance Eap1 was shown to confer adhesion of recombinant *S. cerevisiae* to human HEK293 kidney epithelial cells (Li et al, 2008) and Hwp1 was shown to be covalently cross-linked to mammalian epithelial cells (Staab et al, 1999). Consequently, we tested if Rbt1 could confer some adherence properties to host cells. Two types of human cells were used and while adhesion of the strain overexpressing Rbt1SL was similar than adhesion of the wild type strain,

adhesion of the strain overexpressing Rbt1FL was reduced, indicating that the presence of the longer protein had an inhibitory effect on the adhesion of yeast cells. Thus Rbt1 does not seem involved in adherence to human epithelial cells, however results of these experiments suggested that its presence could either mask other proteins necessary for such interaction (Hwp1 for example) or prevent them to interact by forming intermolecular bounds. Indeed, since Hwp1 and Eap1 also displayed amyloid-forming sequences, multimers of these different proteins could be formed as in the model drawn by Ramsook and collaborators (Ramsook et al, 2010) and such clustering could interfere with the attachment to host cells. Additionally, the self-aggregation of the tested strains could account for part of the decrease observed simply for technical questions: CFU can be underestimated in this conditions as well as cytotoxicity when only parts of the cells are actually interacting with the host cells.

In conclusion, Rbt1 is a membrane associated protein that protrudes from the cell wall only in hyphae conditions, conditions in which the *RBT1* gene is induced and the cell wall network is modified to allow the unmasking of such protein. The N-terminal domain was shown to participate to the cell surface hydrophobicity and consequently to the adherence to abiotic surfaces. However, we also observed differences of hydrophobicity between the FL and SL Rbt1 proteins. This indicates that the C-terminus also contributed to the hydrophobicity of the protein and thereby to its adhesiveness. This emphasizes the critical importance of physico-chemical properties of *C. albicans* surface, which accounts for many aspect of its initial colonization on various substrates. Importantly, a region with high amyloid potential has been validated and is present in two copies in the full length Rbt1. This domain is involved in the cell-to-cell aggregation phenomenon observed with *C. albicans* hyphae.

### **Acknowledgement**

We thank Marie-Elisabeth Bougnoux for providing the clinical isolates from different *C. albicans* clades presented Figure 1.

This work was supported by the EU Program FP7-214004-2 FINSysB.

## References

- Boisrame, A., A. Cornu, G. Da Costa & M. L. Richard, (2011) Unexpected role for a serine/threonine-rich domain in the *Candida albicans* Iff protein family. *Eukaryot Cell* 10: 1317-1330.
- Bonhomme, J., M. Chauvel, S. Goyard, P. Roux, T. Rossignol & C. d'Enfert, (2011) Contribution of the glycolytic flux and hypoxia adaptation to efficient biofilm formation by *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 80: 995-1013.
- Brachmann, C. B., A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter & J. D. Boeke, (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115-132.
- Braun, B. R., W. S. Head, M. X. Wang & A. D. Johnson, (2000) Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* 156: 31-44.
- Braun, B. R. & A. D. Johnson, (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* 277: 105-109.
- Butler, G., M. D. Rasmussen, M. F. Lin, M. A. Santos, S. Sakthikumar, C. A. Munro, E. Rheinbay, M. Grabherr, A. Forche, J. L. Reedy, I. Agrafioti, M. B. Arnaud, S. Bates, A. J. Brown, S. Brunke, M. C. Costanzo, D. A. Fitzpatrick, P. W. de Groot, D. Harris, L. L. Hoyer, B. Hube, F. M. Klis, C. Kodira, N. Lennard, M. E. Logue, R. Martin, A. M. Neiman, E. Nikolaou, M. A. Quail, J. Quinn, M. C. Santos, F. F. Schmitzberger, G. Sherlock, P. Shah, K. A. Silverstein, M. S. Skrzypek, D. Soll, R. Staggs, I. Stansfield, M. P. Stumpf, P. E. Sudbery, T. Srikantha, Q. Zeng, J. Berman, M. Berriman, J. Heitman, N. A. Gow, M. C. Lorenz, B. W. Birren, M. Kellis & C. A. Cuomo, (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459: 657-662.
- Dalle, F., T. Jouault, P.A. Trinel, J. Esnault, J.M. Mallet, P. d'Athis, D. Poulain & A. Bonnin, (2003) Beta-1,2 and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. *Infect Immun* 71: 7061-7068.
- Eisenhaber, B., G. Schneider, M. Wildpaner & F. Eisenhaber, (2004) A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* 337: 243-253.
- Ene, I. V. & R. J. Bennett, (2009) Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 8: 1909-1913.
- Enoch, D. A., H. A. Ludlam & N. M. Brown, (2006) Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 55: 809-818.
- Fernandez-Escamilla, A. M., F. Rousseau, J. Schymkowitz & L. Serrano, (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol* 22: 1302-1306.

- Fonzi, W. A. & M. Y. Irwin, (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134: 717-728.
- Fukazawa, Y. & K. Kagaya, (1997) Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 35: 87-99.
- Garcia-Sanchez, S., S. Aubert, I. Iraqui, G. Janbon, J. M. Ghigo & C. d'Enfert, (2004) *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* 3: 536-545.
- Garcia, M. C., J. T. Lee, C. B. Ramsook, D. Alsteens, Y. F. Dufrene & P. N. Lipke, (2011) A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. *PLoS One* 6: e17632.
- Goossens, K. V. & R. G. Willaert, (2012) The N-terminal domain of the Flo11 protein from *Saccharomyces cerevisiae* is an adhesin without mannose-binding activity. *FEMS Yeast Res* 12: 78-87.
- Granger, B. L., (2012) Insight into the antiadhesive effect of yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 11: 795-805.
- Guo, B., C. A. Styles, Q. Feng & G. R. Fink, (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12158-12163.
- Hayek, P., L. Dib, P. Yazbeck, B. Beyrouthy & R. A. Khalaf, (2010) Characterization of Hwp2, a *Candida albicans* putative GPI-anchored cell wall protein necessary for invasive growth. *Microbiol Res* 165: 250-258.
- Hazen, K. C. & B. W. Hazen, (1992) Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* 60: 1499-1508.
- Hoyer, L. L., (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 9: 176-180.
- Jacobsen, I. D., K. Grosse & B. Hube, (2012) Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi. *Methods Mol Biol* 845: 487-496.
- Jones, T., N. A. Federspiel, H. Chibana, J. Dungan, S. Kalman, B. B. Magee, G. Newport, Y. R. Thorstenson, N. Agabian, P. T. Magee, R. W. Davis & S. Scherer, (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7329-7334.
- Kobayashi, O., N. Hayashi, R. Kuroki & H. Sone, (1998) Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol* 180: 6503-6510.
- Li, F. & S. P. Palecek, (2008) Distinct domains of the *Candida albicans* adhesin Eap1p mediate cell-cell and cell-substrate interactions. *Microbiology* 154: 1193-1203.
- Lionakis, M. S., J. K. Lim, C. C. Lee & P. M. Murphy, (2011) Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. *J Innate Immun* 3: 180-199.
- Liu, Y. & S. G. Filler, (2011) *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell* 10: 168-173.



Lo, W. S. & A. M. Dranginis, (1996) FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* 178: 7144-7151.

Lo, W. S. & A. M. Dranginis, (1998) The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9: 161-171.

Murad, A. M., P. Leng, M. Straffon, J. Wishart, S. Macaskill, D. MacCallum, N. Schnell, D. Talibi, D. Marechal, F. Tekaia, C. d'Enfert, C. Gaillardin, F. C. Odds & A. J. Brown, (2001) NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J* 20: 4742-4752.

Nobbs, A. H., M. M. Vickerman & H. F. Jenkinson, (2010) Heterologous expression of *Candida albicans* cell wall-associated adhesins in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals differential specificities in adherence and biofilm formation and in binding oral *Streptococcus gordonii*. *Eukaryot Cell* 9: 1622-1634.

Nobile, C. J. & A. P. Mitchell, (2006) Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol* 8: 1382-1391.

Nobile, C. J., J. E. Nett, D. R. Andes & A. P. Mitchell, (2006) Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* 5: 1604-1610.

Nobile, C. J., H. A. Schneider, J. E. Nett, D. C. Sheppard, S. G. Filler, D. R. Andes & A. P. Mitchell, (2008) Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol* 18: 1017-1024.

Oh, S. H., G. Cheng, J. A. Nuessen, R. Jajko, K. M. Yeater, X. Zhao, C. Pujol, D. R. Soll & L. L. Hoyer, (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.

Padovan, A. C., G. M. Chaves, A. L. Colombo & M. R. Briones, (2009) A novel allele of HWP1, isolated from a clinical strain of *Candida albicans* with defective hyphal growth and biofilm formation, has deletions of Gln/Pro and Ser/Thr repeats involved in cellular adhesion. *Med Mycol* 47: 824-835.

Pelletier, C., C. Bouley, C. Cayuela, S. Bouttier, P. Bourlioux & M. N. Bellon-Fontaine, (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus strains*. *Appl Environ Microbiol* 63: 1725-1731.

Pfaller, M. A. & D. J. Diekema, (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-163.

Punta, M., P. C. Coggill, R. Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Boursnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E. L. Sonnhammer, S. R. Eddy, A. Bateman & R. D. Finn, (2012) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 40: D290-301.

Ramsook, C. B., C. Tan, M. C. Garcia, R. Fung, G. Soybelman, R. Henry, A. Litewka, S. O'Meally, H. N. Otoo, R. A. Khalaf, A. M. Dranginis, N. K. Gaur, S. A. Klotz, J. M. Rauceo, C. K. Jue & P. N. Lipke, (2010) Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryot Cell* 9: 393-404.

Reynolds, T. B. & G. R. Fink, (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878-881.

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

Saville, S. P., A. L. Lazzell, C. Monteagudo & J. L. Lopez-Ribot, (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2: 1053-1060.

Sheppard, D. C., M. R. Yeaman, W. H. Welch, Q. T. Phan, Y. Fu, A. S. Ibrahim, S. G. Filler, M. Zhang, A. J. Waring & J. E. Edwards, Jr., (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 279: 30480-30489.

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

Uppuluri, P., C. G. Pierce, D. P. Thomas, S. S. Bubeck, S. P. Saville & J. L. Lopez-Ribot, (2010) The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. *Eukaryot Cell* 9: 1531-1537.

Verstrepen, K. J. & F. M. Klis, (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* 60: 5-15.

Vialas, V., P. Perumal, D. Gutierrez, P. Ximenez-Embun, C. Nombela, C. Gil & W. L. Chaffin, (2012) Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. *Proteomics* 12: 2331-2339.

Whiteway, M. & C. Bachewich, (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 61: 529-553.

Younes, S., W. Bahnan, H. I. Dimassi & R. A. Khalaf, (2011) The *Candida albicans* Hwp2 is necessary for proper adhesion, biofilm formation and oxidative stress tolerance. *Microbiol Res* 166: 430-436.

Zupancic, M. L., M. Frieman, D. Smith, R. A. Alvarez, R. D. Cummings & B. P. Cormack, (2008) Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* 68: 547-559.

---

## **Les protéines à ancre GPI de *Candida albicans* dans l'interaction avec l'hôte : de l'étude de domaines solubles à la caractérisation de la protéine Rbt1**

---

### **RESUME**

---

*Candida albicans* est un pathogène opportuniste présent à l'état commensal chez 75 % de la population. Il s'agit du premier pathogène d'origine fongique (4<sup>ème</sup> cause d'infections nosocomiales) responsable d'infections superficielles chez les personnes immunocompétentes ou d'infections profondes chez les personnes immunodéprimées. Les protéines à ancre GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) de *C. albicans*, situées à l'interface entre la levure et les cellules de l'hôte, semblent être les plus aptes à moduler la réponse immunitaire. Au cours de cette étude, une banque de surexpression et de sécrétion d'une vingtaine de domaines fonctionnels putatifs issus de protéines à ancre GPI potentiellement exposées à la surface a été construite. Le crible réalisé a permis d'identifier sept polypeptides impliqués dans la modulation de la réponse des cellules macrophages et trois polypeptides ayant des propriétés immunogènes. Dans un deuxième projet, nous avons démontré que la protéine à ancre GPI Rbt1 spécifique des hyphes de *C. albicans* avait des propriétés d'adhésion aux substrats abiotiques et contribuait à la formation de biofilm et d'agrégats. La caractérisation de cette protéine a permis d'apporter des données nouvelles concernant l'exposition en surface de protéines membranaires suivant la forme morphologique de *C. albicans*.

### **MOTS CLES**

---

*Candida albicans*, protéines, GPI, réponse immunitaire, Rbt1, adhésion, agrégation, paroi

---

## **GPI-anchored proteins of *Candida albicans* in host interactions: from soluble domains study to Rbt1 protein characterization**

---

### **ABSTRACT**

---

*C. albicans* is an opportunistic pathogen present as commensal in 75% of the population. This is the first fungal pathogen (4<sup>th</sup> cause of nosocomial infections) responsible for superficial infections in immunocompetent patients or deep infections in immunocompromised patients. *C. albicans* GPI-anchored proteins (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) present at the interface between the yeast and the host cells appear to be the proteins most capable of modulating the immune response. In this study, a library overexpressing and secreting twenty functional domains from GPI-anchored proteins potentially exposed to the surface was constructed. We identified seven polypeptides involved in the modulation of the macrophage response and three polypeptides with immunogenic properties. In a second project, we demonstrated the properties of the hyphae specific GPI-anchored protein Rbt1 in adhesion, biofilm formation and aggregation. The characterization of this protein gives us new data on surface exposure of membrane proteins depending to *C. albicans* morphological state.

### **KEY WORDS**

---

*Candida albicans*, proteins, GPI, immune response, Rbt1, adhesion, aggregation, cell wall