

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 Décembre 2010

Par Sofiane El-Kirat-Chatel

Né(e) le 02 Septembre 1982 à Le Havre

**Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour
l'étude des interactions *Candida* – phagocytes ;
Application à la caractérisation du gène *OLE2* codant une
désaturase chez *C. lusitaniae*.**

Membres du Jury

Monsieur le Professeur Jean-François MOREAU, PU-PH	Président
Monsieur le Docteur Christophe D'ENFERT, DR Institut Pasteur	Rapporteur
Monsieur le Docteur Thierry JOUAULT, CR1 Inserm.....	Rapporteur
Monsieur le Professeur Thierry NOËL, PU	Directeur de Thèse

Nous remercions le Pr Jean-François Moreau, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier de l'Université Bordeaux 2 d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Nous tenons également à remercier le Dr Christophe D'Enfert, Directeur de Recherche à l'Institut Pasteur et le Dr Thierry Jouault, Chargé de Recherche à l'INSERM, pour avoir accepté de juger ce travail.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité de l'Université Bordeaux 2, UMR-CNRS-Université 5234, sous la direction du Pr Thierry Noël de l'équipe « Candida et Pathogénicité ». Je te remercie particulièrement de m'avoir accueilli au sein de ton équipe et de m'avoir encadré tout au long de ce travail.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe, pour leur bonne humeur et leur soutien et particulièrement Karine Dementhon (Maître de Conférences) pour son implication continue dans la mise au point du modèle d'interaction et pour les nombreuses discussions accompagnées des inoubliables Karinades.

Je tiens aussi à remercier la Plateforme de cytométrie en flux de l'IFR66 et en particulier Vincent Pitard, Ingénieur de Recherche pour son aide dans la mise au point de l'analyse quantitative ainsi que Christel Poujol, Ingénieure d'Études au Bordeaux Imaging Center pour m'avoir formé à la vidéo-microscopie.

J'exprime aussi tous mes remerciements à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil. Merci de votre aide et de votre gentillesse. Les moments passés au laboratoire comme à l'extérieur ont été très agréables.

A Léa, à ma famille et à mes amis, merci pour votre soutien tout au long de ces années.

Sommaire

Liste des publications et des communications	9
ABRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
Introduction	12
1. Les levures du genre <i>Candida</i>	14
1.1. Taxonomie, morphologie et génome	14
1.2. <i>Candida</i> : agents pathogènes opportunistes	16
1.3. Incidence	20
1.4. Physiopathologie	20
1.5. Les facteurs de prédisposition aux candidoses	22
1.6. Les antifongiques	23
1.6.1. Traitements antifongiques	23
1.6.1.a. Inhibition de la synthèse protéique : les pyrimidines fluorées	23
1.6.1.b. Altération des stérols de la membrane cellulaire fongique : les polyènes et les azolés	23
1.6.1.c. Altération de la paroi fongique : les échinocandines ou lipopeptides	25
1.6.2. Résistance aux antifongiques	26
1.7. Facteurs de virulence des <i>Candida</i> spp.	27
1.7.1. Adhérence	27
1.7.2. Sécrétion et recrutement d'enzymes hydrolytiques	30
1.7.3. Transition morphogénétique	32
1.7.4. Formation de biofilm	33
1.7.5. Métabolisme	36
2. Les cellules phagocytaires de la réponse immunitaire innée :	40
2.1. Les mécanismes de reconnaissance des <i>Candida</i> par l'hôte	40
2.1.1. Les TLR	42
2.1.2. Les lectines de type C	43
2.2. Les cellules de la réponse immunitaire innée anti- <i>Candida</i>	45
2.2.1. Les monocytes et les macrophages	46
2.2.2. Les granulocytes neutrophiles	49
Conclusion	52
MATÉRIELS ET MÉTHODES	53
1. Matériel biologique	55
1.1. Levures	55
1.1.1. <i>Candida lusitanae</i>	55

1.1.2. <i>Candida albicans</i> et <i>Candida glabrata</i>	55
1.2. Bactéries	55
1.3. Cellules mammifères	55
1.3.1. Macrophages	55
1.3.2. Neutrophiles (Polymorphonucléaires, PMN)	55
1.4. Vecteurs plasmidiques	56
1.5. Oligonucléotides	56
1.6. Milieux et conditions de culture	58
1.6.1. Culture de levures	58
1.6.2. Culture de bactéries	58
1.6.3. Culture des macrophages	58
1.7. Détermination du nombre de cellules	59
1.8. Stockage et conservation des souches en milieu liquide	59
2. Techniques de biologie moléculaire	59
2.1. Extraction et purification des acides nucléiques	59
2.1.1. ADN génomique de levure	59
2.1.2. ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	60
2.2. Dosage des acides nucléiques	60
2.3. Amplification de séquences d'ADN génomique par PCR	60
2.4. Séquençage nucléotidique	61
2.5. Digestions enzymatiques	62
2.6. Techniques de clonage	62
2.7. Transformation des levures	62
2.8. Southern Blot	62
2.9. Electrophorèse sur gel d'agarose	63
2.10. Constructions moléculaires pour l'inactivation de gènes	63
2.10.1. Technique « cœur de gène »	63
2.10.2. Technique « PCR chevauchante »	63
3. Caractérisation phénotypique	64
3.1. Etude de l'assimilation <i>in vitro</i> des sources de carbone	64
3.2. Etude de la pseudofilamentation et de la reproduction sexuée	64
3.3. Mating tests et croisements génétiques	64
4. Infection de phagocytes	65
4.1. Infection de macrophages	65
4.1.1. Analyse de l'infection par cytométrie en flux	65
4.1.2. Analyse de l'infection par fluorimétrie classique	66
4.1.3. Détermination de la survie des levures	66
4.2. Infection de neutrophiles	66
4.3. Vidéo-microscopie	66
5. Analyses bioinformatiques et statistiques	67
5.1. Analyse des séquences	67

RÉSULTATS 69

Partie I Mise au point d'un modèle expérimental pour la caractérisation cellulaire et moléculaire de l'interaction entre les levures et les phagocytes 70

Introduction 71

A. Principe du modèle d'interaction in vitro.....	73
1. Choix des partenaires de l'infection.....	73
1.1. Les espèces de <i>Candida</i>	73
1.2. Les cellules phagocytaires.....	75
2. Détermination de la concentration des levures par mesure de turbidimétrie	77
3. Observation au microscope de l'interaction entre les macrophages et les trois espèces de <i>Candida</i>	77
4. Mise au point d'outils pour l'analyse quantitative des infections.....	80
4.1. Description des paramètres mesurés pour la comparaison quantitative des infections	80
4.2. Marquage des partenaires de l'infection	80
4.2.1. Marquage spécifique des cellules phagocytaires	80
4.2.1.a. La calcéine-AM : indicateur d'activité métabolique et d'intégrité membranaire	80
4.2.1.b. Les anticorps anti-CD16 couplés à l'allophycocyanine.....	80
4.2.2. Marquage spécifique des levures	83
4.2.2.a. Le CalcoFluor White	83
4.2.2.b. Le Bleu Trypan.....	86
4.3. Analyse quantitative des infections.....	88
4.3.1. Analyse quantitative de la population de phagocytes	88
4.3.1.a. Détermination de la survie des phagocytes	91
4.3.1.b. Détermination du pourcentage de phagocytes associés aux levures	91
4.3.2. Analyse quantitative des populations de levures au cours des infections	93
4.3.2.a. Quantification des levures totales et intramacrophagiques au cours du temps	93
4.3.2.b. Détermination de la survie des levures	93
Conclusion	95

B. Manuscrit de l'article n°1 : *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida lusitaniae* use different strategies to escape from macrophages and neutrophils phagocytosis. 96

Partie II Développement d'outils pour la mutagenèse de gènes chez *C. lusitaniae* ; caractérisation du gène *OLE2* codant pour une $\Delta 9$ désaturase 122

Introduction..... 123

1. Le modèle biologique : <i>Candida lusitaniae</i>	123
2. Construction de souches récipientes pour la sélection de mutants (manuscrit n°2).....	124
3. Développement d'une méthode rapide pour la délétion de gènes cibles (manuscrit de l'article n°2).....	125
Manuscrit de l'article n°2: A two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes in the opportunistic pathogenic yeast <i>Candida lusitaniae</i>	129
4. Inactivation des gènes <i>OLE1</i> et <i>OLE2</i> codant pour des $\Delta 9$ désaturases	142
4.1. Identification et analyse <i>in silico</i> des gènes <i>OLE1</i> et <i>OLE2</i> chez <i>C. lusitaniae</i>	143
4.1.1. Structure du locus <i>OLE1</i> de <i>C. lusitaniae</i>	143
4.1.2. Structure du locus <i>OLE2</i> de <i>C. lusitaniae</i>	145
4.2. Construction moléculaire pour l'inactivation des gènes <i>OLE1</i> et <i>OLE2</i> de <i>C. lusitaniae</i>	145
4.3. Caractérisation génotypique des transformants <i>ole2</i> Δ par PCR-RFLP.....	148
4.4. Caractérisation génotypique des transformants <i>ole2</i> Δ par Southern blot	149

5. Analyse phénotypique du mutant <i>ole2Δ</i>	152
5.1. Courbes de croissance et étude nutritionnelle	152
5.2. Etude de la pseudofilamentation et de la reproduction sexuée	153
5.2.1. Test de pseudofilamentation.....	153
5.2.2. Test de reproduction sexuée.....	155
5.3. Etude de la virulence <i>in vitro</i>	156
5.3.1. Infection de macrophages.....	156
6. Mutagenèse aléatoire et construction d'une banque de mutants chez <i>C. lusitaniae</i>	160
Conclusion et discussion	164
RÉSUMÉ DES TRAVAUX, CONCLUSION GÉNÉRALE	167
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	173
RÉSUMÉ.....	188

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la paroi de <i>Candida albicans</i>	15
Figure 2 : Espèces responsables de candidémies et leur répartition au CHU de Bordeaux entre 2005 et 2008.....	17
Figure 3 : Arbre consensus obtenu par la méthode de parcimonie et basé sur la comparaison de 4805 familles de protéines orthologues chez les Saccharomycotina.....	17
Figure 4 : Portes d'entrées des <i>Candida</i> chez l'homme.....	21
Figure 5 : Interaction de <i>C. albicans</i> avec les cellules de l'hôte et communication cellulaire dans les vaisseaux sanguins	22
Figure 6 : Ultrastructure d'une levure bourgeonnante montrant les cibles des différents antifongiques.....	24
Figure 7 : Mécanisme d'action de la flucytosine et principaux gènes et enzymes impliqués..	24
Figure 8 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse de l'ergostérol à partir de l'acétyl-CoA et de ses possibles ramifications	25
Figure 9 : Mécanismes cellulaires de résistance aux antifongiques.....	27
Figure 10 : Représentation de la structure peptidique des adhésines (a) Hwp1, (b) Als1, (c) Als5, (d) Int1 de <i>C. albicans</i>	28
Figure 11 : Rôle des gènes SAP dans la pathogénicité de <i>C. albicans</i>	31
Figure 12 : Régulation de la transition morphogénétique chez <i>C. albicans</i>	33
Figure 13 : Le développement d'un biofilm chez <i>C. albicans</i>	36
Figure 14 : Voie de biosynthèse du farnésol et rôle dans la signalisation	38
Figure 15 : Voies de biosynthèse des prostaglandines et leucotriènes chez les mammifères ..	39
Figure 16 : Microdomaine de tétraspanines permettant la reconnaissance et la liaison d'une	

levure par les PRR d'une cellule immunitaire.	41
Figure 17 : TLR impliqués dans la reconnaissance de <i>C. albicans</i> et voies de signalisation afférentes	43
Figure 18 : Schéma simplifié des lectines de types C impliquées dans la reconnaissance de <i>C. albicans</i>	45
Figure 19 : Les cellules phagocytaires de la défense anti- <i>Candida</i>	46
Figure 20 : Organisation du phagolysosome et fonctionnement de la NADPH oxydase	48
Figure 21 : Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	49
Figure 22 : NETs, Neutrophil Extracellular Traps	51
Figure 23 : Morphologie des trois espèces de <i>Candida</i> observée au microscope (x630).	74
Figure 24 : Macrophages de la lignée murine J774.A1 observés au microscope (x200).	76
Figure 25 : Neutrophile humain purifié à partir de couche leuco-plaquetaire. Coloration May-Grünwald Giemsa, observation au microscope (x630).	76
Figure 26 : Observation au microscope (x200) des infections après 1h d'interaction entre les macrophages et A. <i>C. albicans</i> , B. <i>C. lusitaniae</i> et C. <i>C. glabrata</i> (MOI 1M : 1L).	79
Figure 27 : Observation au microscope (x200) des infections après 5h d'interaction entre les macrophages et A. <i>C. albicans</i> , B. <i>C. lusitaniae</i> et C. <i>C. glabrata</i> (MOI 1M : 1L).	79
Figure 28 : Observation au microscope (x200) des infections après 24h d'interaction entre les macrophages et A. <i>C. albicans</i> , B. <i>C. lusitaniae</i> et C. <i>C. glabrata</i> (MOI 1M : 1L).	79
Figure 29 : Principe du marquage des phagocytes métaboliquement actifs par la calcéine-AM.	82
Figure 30 : Observation au microscope (x200) de macrophages marqués par la calcéine.	82
Figure 31 : Observation au microscope (x630) d'un macrophage infecté par des levures <i>C. glabrata</i> montrant le marquage spécifique de chaque partenaire de l'infection.	82
Figure 32 : Observation au microscope (x630) des levures fluorescentes après marquage au CFW	84
Figure 33 : Suivi de la multiplication des levures par mesure de la DO 600nm et de la fluorescence CFW	85
Figure 34 : Comparaison de la multiplication des levures dans du milieu cRPMI en présence ou en absence de CFW (5 µg/ml) par mesure de la DO 600nm	85
Figure 35 : Quenching de la fluorescence CFW des levures <i>C. lusitaniae</i> par le Bleu Trypan (BT)	87
Figure 36 : Analyse des infections par cytométrie en flux.	89
Figure 37 : Détermination de la survie des phagocytes par cytométrie en flux.	90
Figure 38 : Détermination du pourcentage de phagocytes associés à des levures par cytométrie en flux en exprimant la fluorescence CFW des événements doublement marqués par la calcéine et l'anticorps.	92
Figure 39 : Tri cellulaire des différentes populations d'une infection de macrophages par <i>C. lusitaniae</i> (MOI 1M : 1L, 5 h) sur la base de leur fluorescence en cytométrie en flux et analyse de chaque population triée par observation au microscope (x630).	92
Figure 40 : Suivi de la population de levures totale par mesure de la fluorescence CFW et de la proportion de levures internalisées, par mesure de la fluorescence CFW avant et après quenching par le BT, pendant 24h d'infection de macrophages par <i>C. lusitaniae</i>	94
Figure 41 : Séquences nucléotidique et peptidique du locus URA3 de la souche 6936 de <i>C. lusitaniae</i>	125
Figure 42 : Principe de l'inactivation de gène par la méthode dite « cœur de gène ».	126
Figure 43 : Séquence nucléotidique et peptidique du locus <i>LEU2</i> de la souche 6936 de <i>C. lusitaniae</i>	128
Figure 44 : Réaction de désaturation de l'acide stéarique en acide oléique par les $\Delta 9$ désaturases telles que Ole1 et Ole2.	142

Figure 45 : Alignement des protéines Ole1 et Ole2 de <i>C. lusitaniae</i> (lusi) et de <i>C. albicans</i> (Albicans).....	144
Figure 46 : Constructions moléculaires pour l'obtention de la cassette de délétion utilisée pour le remplacement du gène <i>OLE2</i> par le marqueur de sélection <i>URA3</i>	146
Figure 47 : Séquences nucléotidique et peptidique du locus <i>OLE2</i> de la souche 6936 de <i>C. lusitaniae</i>	148
Figure 48 : Carte génétique des loci <i>OLE2</i> sauvage et muté et caractérisation génotypique des transformants <i>ole2</i> par PCR-RFLP.....	149
Figure 49 : Caractérisation génotypique par Southern blot des souches 6936 (a), <i>ura3Δ360</i> (b) et du mutant <i>ura3Δ360, ole2Δ ::URA3 (ole2Δ)</i>	151
Figure 50 : Courbes de croissance obtenues par mesure de la densité optique (600 nm) en fonction du temps, pour le mutant <i>ole2Δ</i> (rose) et la souche sauvage 6936 (bleu) dans le milieu A. YPD, B. RPMI et C. cRPMI à 35°C.....	153
Figure 51 : Test de croissance en goutte pour le mutant <i>ole2Δ</i> et la souche sauvage 6936 sur milieu solide YNB + glucose (2%) ou YNB + acide gras (2%).....	152
Figure 52 : Analyse au microscope (x100) de la pseudofilamentation sur le pourtour des colonies de la souche sauvage 6936, de la souche <i>ura3Δ360</i> et de la souche <i>ole2Δ</i> en milieu solide YCB + <i>ura</i> et au temps 24h, 48h et 7 jours.....	154
Figure 53 : Observation au microscope (x630) des cellules prélevées sur le pourtour des colonies de la souche 6936, de la souche <i>ura3Δ360</i> et de la souche <i>ole2Δ</i> en milieu YCB + <i>ura</i>	155
Figure 54 : Analyse par observation au microscope de la reproduction sexuée à partir d'inocula prélevés sur YCB + <i>ura</i> à 24h (x400) et 48h (x630).....	156
Figure 55 : Analyse quantitative de la population de levures par cytométrie en flux.....	157
Figure 56 : Comparaison de l'infection de macrophages J774 en milieu RPMI par la souche sauvage 6936 et le mutant <i>ole2Δ</i> A. MOI 1M : 1L, B. MOI 1M : 5L.....	158
Figure 57 : Comparaison de l'infection de macrophages J774 en milieu RPMI par la souche sauvage 6936 et le mutant <i>ole2Δ</i> au MOI 5M : 1L.....	159
Figure 58 : Représentation du locus <i>URA3</i> de la souche 6936, des loci <i>ura3</i> des souches <i>ura3Δ360</i> et <i>ura3Δ990</i> et du vecteur pGUNv2 utilisé pour la mutagenèse aléatoire du génome de <i>C. lusitaniae</i> dans la souche <i>ura3Δ990</i>	160
Figure 59 : Caractérisation génotypique par Southern blot des souches 6936, <i>ura3Δ990</i> et de quatorze transformants aléatoires à l'aide de la sonde A. <i>URA3</i> (en bleu) et B. MtCP (en orange).....	162

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales espèces de <i>Candida</i> rencontrées en pathologie humaine.....	19
Tableau 2 : Répartition des patients atteints de candidémies selon l'étude de l'ECMM.....	21
Tableau 3 : Souches de <i>C. lusitaniae</i> utilisées au cours de ce travail.....	54
Tableau 4 : Amorces nucléotidiques utilisées au cours de ce travail.....	57
Tableau 5 : Mélanges réactionnels et paramètres de l'amplification par PCR.....	61
Tableau 6 : Correspondance entre DO600nm et concentration cellulaire de levures (CFU)...	76
Tableau 7 : Analyse comparative des séquences protéiques de Ole1 et Ole2 de <i>C. lusitaniae</i> et de <i>C. albicans</i>	144

Liste des publications et des communications

- Dans le cadre du doctorat (UMR 5234, Laboratoire MCMP, Département 2, équipe *Candida* et Pathogénicité) :

Sofiane El-Kirat-Chatel, Karine Dementhon and Thierry Noël. A two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes in the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitaniae*. **Accepté pour publication dans Yeast, (Octobre 2010).**

Sofiane El-Kirat-Chatel, Karine Dementhon and Thierry Noël. *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida lusitaniae* use different strategies to escape from macrophages and neutrophils phagocytosis. **(soumission).**

Communication orale au congrès Levures Modèles Outils IX : « Mise au point d'un modèle d'interaction *in vitro* pour la caractérisation cellulaire de l'interaction entre les *Candida* et les cellules phagocytaires. », Strasbourg, Septembre 2010. (Bénéficiaire d'une bourse de voyage).

Communication orale à l'IFR 66, Réseau Hôte Pathogène (Bordeaux 2, Avril 2009).

Communications écrites aux Journées Scientifiques de l'IFR66 et aux Journées de l'Ecole Doctorale (Bordeaux, 2007-2008-2009).

- Dans le cadre du Master (UMR 5234, Laboratoire MCMP, Département 1, équipe Expression génétique et réplication)

Ferandon C, El Kirat Chatel S, Castandet B, Castroviejo M, Barroso G. The *Agrocybe aegerita* mitochondrial genome contains two inverted repeats of the *nad4* gene arisen by duplication on both sides of a linear plasmid integration site. **Fungal Genet Biol. 2008 Mar ; 45(3):292-301.** Epub 2007 Oct 24.

ABREVIATIONS

aa	acides aminés
AA	acide arachidonique
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
APC	allophycocyanine
ARN	acide ribonucléique
ATCC	american type culture collection
°C	degré Celsius
CBS	centraalbureau voor schimmelcultures
CFU	colony forming units
CFW	calcofluor white
Da, kDa	Dalton, kiloDalton
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate où N représente une des 4 bases adénosine, cytidine guanosine et thymidine
DOX	densité optique où x représente la longueur d'onde
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	fluoresceine isothiocyanate
FOA	acide fluoro-orotique
g, mg, µg	gramme, milligramme, microgramme
g	accélération de la pesanteur
GPI	glycosyl-phosphatidylinositol
h	heure
IPTG	isopropylthiogalactoside
L, ml, µl	litre, millilitre, microlitre
LEU2	3-isopropylmalate déshydrogénase
M, mM, µM	molaire, millimolaire, micromolaire
m/v	masse/volume
min	minute
nt	nucléotide
PAMP	pathogen associated molecular pattern
pb, kpb, Mb	paire de bases, mille paire de bases, mégabase
PBS	phosphate buffer saline
PRR	pathogen recognition receptor
PCR	polymerase chain reaction
PGE2	prostaglandine E2
pH	potentiel d'hydrogène
OLE	stearoyl-CoA desaturase
ORF	open reading frame
Tris	tris-hydroxyméthyl-aminoéthane
URA3	orotidine-5'-phosphate décarboxylase
V	Volt
v/v	volume/volume
X-Gal	5-dibromo 4-chloro 3-indolyl α-D-galactopyranoside

INTRODUCTION

Introduction

L'amélioration des pratiques médicales et chirurgicales a permis l'allongement de la survie de patients profondément immunodéprimés et l'émergence de pathogènes opportunistes, notamment des levures du genre *Candida* au sein du règne fongique. *Candida albicans* est l'espèce majoritairement retrouvée dans les infections invasives, mais des espèces *Candida non-albicans* sont de plus en plus souvent rapportées. Malgré une meilleure prise en charge des candidoses systémiques et la mise à disposition de nouveaux antifongiques, la mortalité demeure élevée. La compréhension des mécanismes de virulence des *Candida* est donc nécessaire à la fois pour définir de nouvelles cibles pour les antifongiques et pour permettre une meilleure prise en charge des infections.

Les *Candida* sont des levures saprophytes que l'on retrouve à l'état commensal chez l'homme sur la peau et les muqueuses. Le passage de l'état saprophyte à l'état pathogène chez les levures *Candida* dépend de la balance entre les capacités de colonisation de la levure, l'expression de facteurs de virulence et le contrôle par les défenses du système immunitaire. Outre les barrières physiques que constituent la peau et les muqueuses, les phagocytes macrophages et granulocytes neutrophiles de l'immunité innée constituent la principale défense vis-à-vis des infections fongiques.

L'équipe «*Candida* et Pathogénicité», au sein de laquelle notre travail a été réalisé, a initié depuis quelques années des travaux de recherche sur les interactions entre les levures *Candida* et les phagocytes. Nous cherchons notamment à mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent aux levures de résister à la phagocytose et à la phagolyse macrophagique, en s'intéressant plus particulièrement au rôle potentiel des lipides et du métabolisme lipidique fongique au cours de cette interaction. Deux aspects sont explorés :

- l'étude du rôle de la β -oxydation des acides gras des levures *Candida* en tant que source de nutriments et d'énergie qui permettrait aux levures de survivre à la phagolyse,
- l'étude du rôle des lipides oxygénés d'origine fongique en tant que molécules de signalisation qui permettraient aux levures *Candida* d'interagir différenciellement avec les macrophages et avec les granulocytes neutrophiles.

C'est dans cette deuxième thématique que s'est inscrit mon travail de recherche. Afin d'aborder la question de fond dans des conditions optimales, il a été nécessaire de développer de nouveaux outils cellulaires et moléculaires pour mesurer les interactions entre les levures *Candida* et les phagocytes.

La première partie de nos travaux a porté sur la mise au point d'un modèle expérimental permettant le suivi qualitatif et quantitatif de l'infection de phagocytes par les levures. Pour mesurer ses performances et apporter une preuve de concept, nous avons choisi de valider ce modèle en comparant trois espèces de *Candida* aux caractéristiques morphogénétiques différentes lors de leur interaction avec des macrophages et des neutrophiles : *C. albicans*, levure commensale de l'homme capable de filenter ; *C. lusitaniae*, levure environnementale formant des pseudo-filaments ; *C. glabrata*, levure commensale de l'homme, ne se développant que sous forme blastospore (manuscrit n°1 soumis pour publication).

La deuxième partie de nos travaux a consisté à développer des outils moléculaires pour l'étude fonctionnelle de gènes chez notre modèle biologique principal *C. lusitaniae*. Nous

avons développé une méthode pour la délétion complète, « propre » et rapide de gènes de *C. lusitaniae* ; cette méthode repose sur deux étapes de transformation successives réalisées avec des cassettes d'ADN obtenues sans clonage par PCR chevauchantes (manuscrit n°2 soumis pour publication). Cette technique a été utilisée pour étudier le rôle de certains gènes dans la virulence. Parmi les facteurs de virulence des *Candida*, il a été décrit le rôle des oxylipides (ou lipides oxygénés) qui non seulement interviennent dans la régulation de la physiologie de la levure, mais qui pourraient également influencer la réponse immunitaire. Afin de mieux comprendre l'implication de ces oxylipides au cours de l'infection fongique, nous avons choisi d'inactiver chez *C. lusitaniae*, des gènes codant pour des désaturases d'acide gras intervenant dans les premières étapes de la biosynthèse des oxylipides, et nous avons caractérisé le phénotype des mutants, notamment lors de leur interaction avec les phagocytes. En parallèle, une banque de mutants aléatoires étiquetés a été construite chez cette même espèce. Le criblage de la banque de mutants en interaction avec les macrophages devrait permettre dans un proche avenir la mise en évidence de nouveaux gènes impliqués dans l'interaction levure – phagocyte, et donc potentiellement impliqués dans la virulence des *Candida*.

1. Les levures du genre *Candida*

Les *Candida* sont des champignons levuriformes dont l'appareil végétatif peut se présenter sous des formes variées (blastospores ovales de 2 à 5 µm, filaments ou pseudofilaments) et se multipliant par bourgeonnement. Certaines espèces ont conservé la capacité à se reproduire par voie sexuée et à faire la méiose (par exemple *Issatchenkia orientalis*, *Clavispora lusitaniae*). Les cellules de ces microorganismes eucaryotes ont la particularité, comme tous les champignons, d'avoir une paroi contenant de la chitine.

Les *Candida* sont habituellement commensaux des muqueuses et de la peau ou peuvent être des espèces environnementales. Certaines espèces peuvent se manifester en tant que pathogène animal.

Les infections causées par les espèces *Candida* sont connues sous le nom de candidoses. Mais il existe des noms communs décrivant des pathologies spécifiques tel que le Muguet (ou candidose buccale), par exemple. Du point de vue historique, c'est une pathologie bien connue puisque Hippocrate, initiateur de l'observation clinique, en fait la description au 4^{ème} siècle av. J.C.

Les pathologies associées sont extrêmement variées puisque virtuellement tout organe ou système du corps (sanguin, nerveux) peut être infecté. L'infection existe sous deux formes : l'une superficielle (cutanée et unguéale, digestive, génito-urinaire), l'autre disséminée ou septicémique (candidose profonde ou candidémie). La capacité de ce champignon à adhérer au tissu hôte, à sécréter des protéases et des phospholipases, à changer de morphologie et à moduler la défense de l'hôte constituent les déterminants majeurs de sa pathogénicité.

1.1. Taxonomie, morphologie et génome

La classification des champignons a beaucoup évolué. Celle présentée ici date de 2000 (Barnett, 2000):

Règne : Champignon

Phylum : *Ascomycota*

Classe : Hemiascomycètes

Ordre : Saccharomycétales

Famille : *Candidaceae*

Genre : *Candida* (Berkhout, 1923)

Le genre *Candida* regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices ou non de pseudomycélium, voire de mycélium. La plupart des *Candida spp.* ont la possibilité de changer de morphologie. Ainsi, par bourgeonnement et croissance des bourgeons selon un mode subcylindrique, les levures forment du pseudomycélium. Les ramifications du pseudomycélium sont dues aux bourgeonnements multiples. *Candida albicans* et *Candida dubliniensis* ont en plus la capacité de différencier un véritable mycélium, formé de filaments dont chaque article est séparé du voisin par un septum, cloison transversale percée d'un pore. Les septa permettent le passage intercellulaire du cytoplasme et d'organites. Chez les *Ascomycota*, ces pores sont obturés par des structures sphéroïdes, les corps de Woronin, qui permettent par exemple d'isoler un article du reste du filament en cas de lésion osmotique (Maruyama *et al.*, 2005).

Au niveau génétique, le genre *Candida* regroupe des levures haploïdes ou diploïdes, capables pour certaines espèces de reproduction sexuée. Ce clade est caractérisé par une variation du code génétique : le codon CUG est décodé en sérine plutôt qu'en leucine. De nombreux génomes sont séquencés. Leurs tailles varient de 10 Mb pour (*C. guilliermondii*) à

15 Mb (pour *Lodderomyces elongisporus*) et ils contiennent environ 6000 gènes (MIT, Harvard).

Les *Candida*, comme l'ensemble des cellules fongiques, sont entourés d'une paroi qui constitue le premier élément fongique reconnu par les phagocytes (**Figure 1**). Elle joue un rôle de protection contre les attaques physico-chimiques de l'environnement et permet de résister aux variations de la pression osmotique. Elle est composée d'éléments structuraux et d'une matrice qui assurent une balance entre résistance et plasticité. Le composant majeur de la paroi est le β -1,3 glucane lié covalamment à des β -1,6 glucanes et à la chitine (polymère de N-acétylglucosamine lié en β -1,4). Ces polymères forment des microfibrilles liées par des liaisons hydrogènes, et se situent dans les couches les plus basales de la paroi, notamment la chitine qui est proche de la membrane plasmique. La matrice est constituée de protéines glycosylées. L'ensemble de ces composants pariétaux est commun au règne fongique, mais chaque espèce peut avoir des composés spécifiques et une proportion et une répartition différente de chaque élément, ce qui peut modifier l'interaction avec les cellules de l'hôte. Chez *C. albicans*, les protéines pariétales majeures sont des protéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) qui permet leur liaison à la membrane plasmique. Ces protéines présentent une partie globulaire orientée vers l'extérieur de la cellule et un domaine riche en acides aminés sérine et thréonine permettant les liaisons O-mannosylés avec les composés structuraux de la paroi. Les protéines N-mannosylées sont liées par des acides aminés asparagine à de longues chaînes de carbohydrates. Les mannanes et les protéines pariétales forment les couches superficielles de la paroi (Netea *et al.*, 2008).

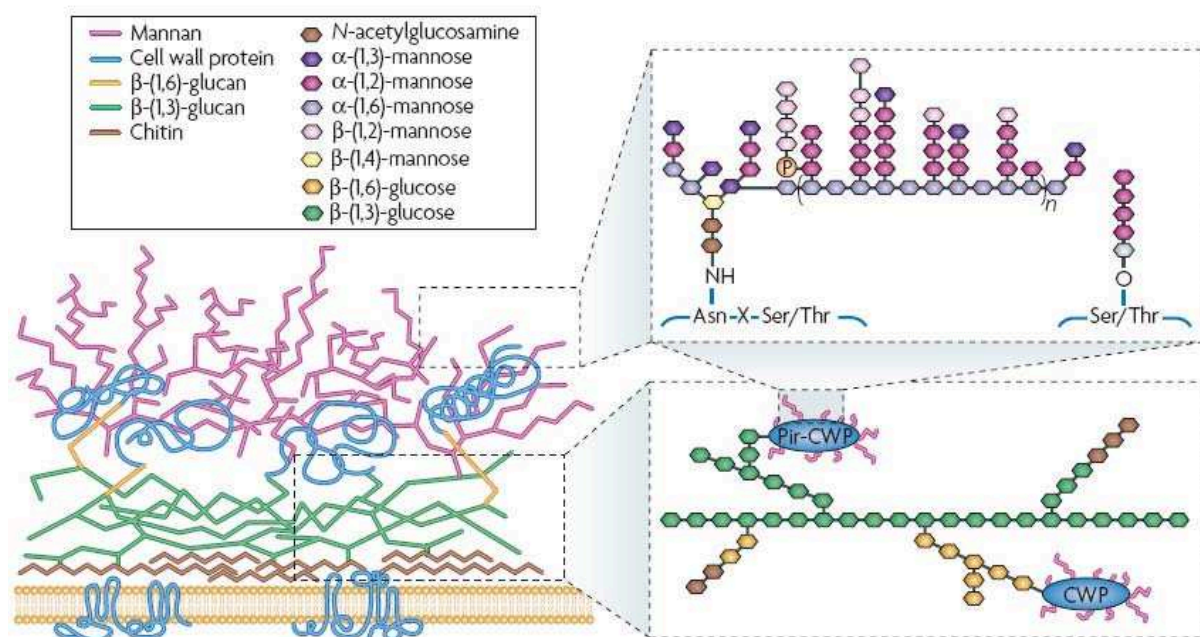


Figure 1 : Structure de la paroi de *Candida albicans* (Netea *et al.*, 2008). Le schéma représente l'organisation des composants majeurs de la paroi. Les β -(1,3)-glucanes et la chitine (poly- β -(1,4)-N acétylglucosamine) sont les principaux composants structuraux et sont proches de la membrane plasmique. Les couches superficielles sont riches en protéines pariétales (CWP) mannosylées et liées aux glucanes.

1.2. *Candida* : agents pathogènes opportunistes

Sur plus de 200 espèces composant le genre *Candida*, seules quelques-unes sont reconnues responsables d'infections opportunistes chez l'homme (candidoses) et représentent à elles seules près de 83 % des levures isolées chez l'homme (Develoux, 2005). Le biotope des espèces peut influencer leur pathogénicité. En effet, l'origine commensale ou environnementale des espèces est susceptible d'influencer l'interaction avec les phagocytes. Enfin, des espèces commensales de l'homme telles que *Candida albicans* et *Candida glabrata* ont une épidémiologie distincte des autres espèces de *Candida*.

- *Candida albicans* est la plus fréquemment isolée (60 à 70 % des isolats ; Eggimann *et al.*, 2003, Tortorano *et al.*, 2004, 51 % au CHU de Bordeaux entre 2005 et 2008, Accoceberry, Communication personnelle). Elle est responsable de plus de la moitié des candidémies (Eggimann *et al.*, 2003; Weinberger *et al.*, 2005, 49 % au CHU de Bordeaux entre 2005 et 2008) (**Figure 2**). Cette levure vit à l'état commensal dans le tube digestif et peut coloniser par contiguïté les voies génito-urinaires et respiratoires (Mavor *et al.*, 2005).

- *Candida glabrata* représente actuellement entre 5 et 20 % des *Candida spp.* isolées chez l'homme (Eggimann, 2002 ; Krcmery *et al.*, 2002 ; Tortorano *et al.*, 2004 ; Warnock, 2007) et 10 à 20 % des candidémies (Eggimann *et al.*, 2003 ; Tortorano *et al.*, 2004). Cette levure est commensale des voies génito-urinaires (5 à 15 % de la flore vaginale, (Buscemi *et al.*, 2004 ; Sobel *et al.*, 2007) et peut être isolée dans les prélèvements digestifs. Elle est fréquemment associée à *C. albicans* (Eggimann *et al.*, 2003). Cette espèce appartient au subphylum des *Saccharomycotina* mais les analyses phylogénétiques ont montré qu'elle n'appartient pas *stricto sensu* au clade des *Candida* (Fitzpatrick *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2009). En effet, le subphylum des *Saccharomycotina* comprend deux clades : le clade CTG qui comprend des espèces telles que *C. albicans* et *C. lusitaniae* qui décodent le codon CUG en sérine plutôt qu'en leucine, et le clade Whole Genome Duplication (WGD) qui comprend des espèces telles que *S. cerevisiae* ou *C. glabrata* pour lesquelles le génome a subi une duplication (**Figure 3**).

- Une dizaine d'autres espèces, saprophytes environnementales, peuvent se retrouver chez l'homme sur la peau ou les muqueuses à l'état commensal et sont de plus en plus souvent responsables de candidémies (Krcmery *et al.*, 2002 ; Eggimann *et al.*, 2003 ; Tortorano *et al.*, 2004 ; Develoux, 2005) (**Tableau 1**).

- *Candida tropicalis* (céréales, eau, sol), représente environ 4 % des *Candida spp.* isolées chez l'homme (tube digestif, voies urinaires et respiratoires) (Weinberger *et al.*, 2005) et 4 à 25 % des candidémies (Krcmery *et al.*, 2002 ; Eggimann *et al.*, 2003 ; Tortorano *et al.*, 2004 ; Develoux, 2005).

- *Candida parapsilosis*, *Candida famata* et *Candida guilliermondii* sont des levures surtout mises en évidence sur la peau chez l'homme. *C. parapsilosis*, la plus fréquente, possède notamment des capacités d'adhérence à l'acrylique et de croissance dans les solutés de nutrition parentérale : elle est notamment responsable de candidémie d'origine exogène (Weems, 1992 ; Almirante *et al.*, 2006). En pédiatrie, il s'agit du deuxième agent de candidémie après *C. albicans* (Krcmery *et al.*, 2002).

Espèces responsables de candidémies
au CHU de Bordeaux entre 2005 et 2008

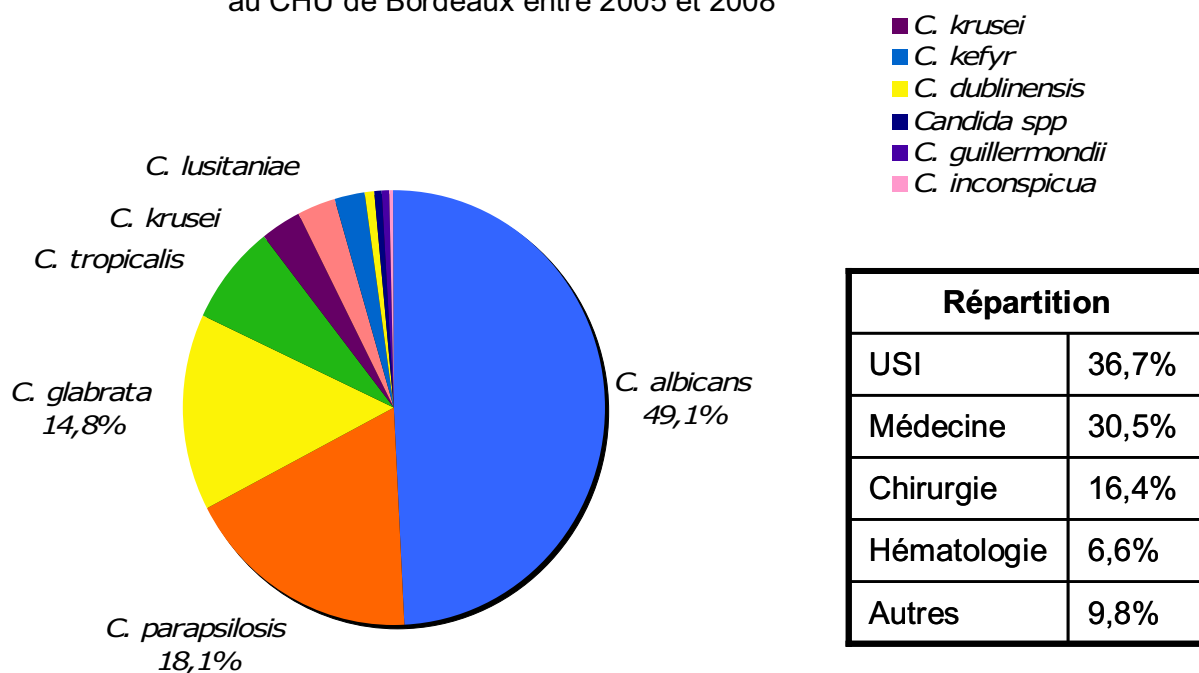


Figure 2 : Espèces responsables de candidémies et leur répartition au CHU de Bordeaux entre 2005 et 2008 (d'après I. Accoceberry, communication personnelle) (USI : Unité de Soins Intensifs).

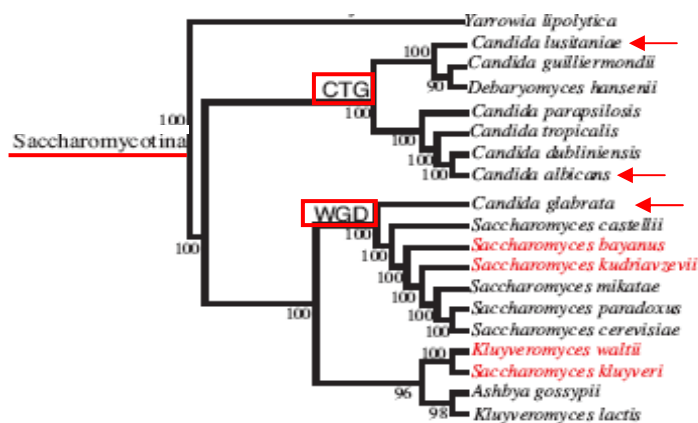


Figure 3 : Arbre consensus obtenu par la méthode de parcimonie et basé sur la comparaison de 4805 familles de protéines orthologues chez les *Saccharomycotina*. Le subphylum comprend le clade CTG et le clade WGD (encadrés en rouge). Les valeurs de bootstrap sont indiquées à la base de chaque embranchement. Les positions de *C. albicans*, *C. lusitanae* et *C. glabrata* sont indiquées par une flèche rouge (Fitzpatrick *et al.*, 2006).

- *Candida krusei* (jus de raisin), était rarement rencontrée jusqu'en 1988 (moins de 1 % des *Candida spp.* isolées chez l'homme). Sa résistance naturelle au fluconazole a permis son émergence qui est aussi liée à l'écologie locale. Malgré tout, elle représente moins de 5 % des candidémies (Eggimann *et al.*, 2003). On la retrouve dans le tube digestif, les voies respiratoires et urinaires (Krcmery *et al.*, 2002 ; Eggimann *et al.*, 2003).

- *Candida kefyr* (produits laitiers fermentés) peut être rencontrée chez l'homme dans le tube digestif mais aussi dans les voies respiratoires et urinaires.

- *Candida dublinensis* est une espèce identifiée chez les patients atteints de SIDA. Elle a longtemps été confondue avec *C. albicans*.

- *C. lusitaniae* se rencontre en milieu hospitalier. Organisme pathogène émergent, elle est responsable de 1 à 3 % des candidémies dans la plupart des études (Sanchez *et al.*, 1992 ; Hazen, 1995 ; Krcmery *et al.*, 2002 ; Viudes *et al.*, 2002 ; Favel *et al.*, 2003 ; Mavor *et al.*, 2005). Sa transmission d'origine exogène de patient à patient a notamment été prouvée en néonatalogie (Fowler *et al.*, 1998 ; Viudes *et al.*, 2002). Cette levure est également plus souvent isolée en oncohématologie (Krcmery *et al.*, 2002). Certaines souches de *C. lusitaniae* se distinguent par leur résistance à l'amphotéricine B, primaire (Guinet *et al.*, 1983 ; Hadfield *et al.*, 1987), ou d'apparition rapide en cours de traitement (Pappagianis *et al.*, 1979 ; Peyron *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Principales espèces de *Candida* rencontrées en pathologie humaine (Krcmery et al., 2002 ; Eggimann et al., 2003 ; Tortorano et al., 2004 ; Develoux, 2005).

<u>Espèces fréquemment isolées</u>	<i>Etat saprophyte</i>	<i>Manifestations cliniques</i>	<i>Remarques</i>
<i>C. albicans</i>	Commensal des muqueuses digestives et génitales	Infections cutanéomuqueuses, Pyélonéphrites Candidémies, candidoses profondes et disséminées	
<i>C. glabrata</i>	muqueuse digestive et voies urogénitales	Infections urogénitales Candidémies et candidoses systémiques	Plus fréquent en chirurgie digestive Sensibilité diminuée au fluconazole
<i>C. parapsilosis</i>	Peau	Candidémies Infections liées aux cathéters ou à une nutrition parentérale	Fréquemment en cause dans les candidémies du nouveau-né Sensibilité diminuée aux échinocandines
<i>C. tropicalis</i>	Sol, eau	Vaginites Candidémies, candidoses invasives	Plus fréquente en oncologie, surtout en onco-hématologie (immunodépression) Existence de souches résistantes au fluconazole
<i>C. krusei</i>	Produits laitiers, bière	Candidémies	Résistance naturelle au fluconazole
<u>Espèces plus rarement isolées</u>			
	<i>Etat saprophyte</i>	<i>Manifestations cliniques</i>	<i>Remarques</i>
<i>C. lusitaniae</i>	Environnement, tube digestif des animaux	Candidémies, candidoses disséminées	Possible résistance à l'amphotéricine B Plus fréquent en oncologie, néonatalogie
<i>C. dubliniensis</i>	Oiseaux Tube digestif	Candidoses oropharyngées de patients VIH+ Candidémies	Existence de souches résistantes au fluconazole
<i>C. guilliermondii</i>	Peau	Endocardites Candidoses systémiques	Sensibilité diminuée à l'amphotéricine B
<i>C. kefyr</i>	Produits laitiers	Candidoses systémiques	
<i>C. lipolytica</i>	Animaux et végétaux	Candidémies associée à un cathéter	
<i>C. norvegensis</i>	Tube digestif, Environnement hospitalier	Candidémies	Résistance au fluconazole
<i>C. inconspicua</i>	Tube digestif, Environnement hospitalier	Candidémies (pathogénicité discutée)	
<i>C. rugosa</i>	Eau, produits laitiers	Candidémies associée à un cathéter	Résistance aux polyènes Plus fréquent chez les patients brûlés
<i>C. famata</i>	Peau	Candidémies	

1.3. Incidence

L'épidémiologie des candidoses profondes, systémiques et disséminées s'est modifiée ces dernières années. Depuis deux décennies, l'amélioration des pratiques médicales et chirurgicales a notablement amélioré la survie des patients profondément immunodéprimés (transplantations, chimiothérapies, anti-cancéreuses, réanimation, traitements immunosuppresseurs), à haut risque d'infections opportunistes. Une proportion importante de ces patients ne meurt pas de leur pathologie sous-jacente mais de complications infectieuses. Parmi celles-ci, on retrouve les infections fongiques, généralement sévères chez ces patients et dont le diagnostic et le traitement sont difficiles. Les *Candida spp.* sont les agents les plus fréquemment responsables d'infections fongiques invasives (Eggimann *et al.*, 2003). Les candidémies représentent aujourd'hui 5 à 10 % des septicémies et les candidoses invasives jusqu'à 17 % des infections nosocomiales chez les patients hospitalisés en soins intensifs (Eggimann *et al.*, 2003 ; Maruyama *et al.*, 2005) (**Tableau 2**).

Si *C. albicans* reste la levure le plus souvent en cause, on observe une augmentation de la proportion des candidémies dues à des espèces de *Candida non-albicans*, représentant selon les études de 35 à 65% des isolats (Abi-Said *et al.*, 1997 ; Krcmery *et al.*, 2002 ; Eggimann *et al.*, 2003 ; Tortorano *et al.*, 2004 ; Bassetti *et al.*, 2006 ; Bassetti *et al.*, 2006 ; Warnock, 2007).

Une étude réalisée par notre équipe au CHU de Bordeaux entre 2005 et 2008 a mis en évidence 256 candidémies (**Figure 2**), soit une incidence de 0,75 pour 10000 journées d'hospitalisation. Quatre-vingt pour cent des candidémies étaient nosocomiales. Les résultats de cette enquête sont similaires à ceux décrits dans la littérature. Sur l'ensemble des 256 candidémies, *C. albicans* en représentait 49 %, *C. parapsilosis* 18 %, *C. glabrata* 15 % et *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* et *C. krusei* 5% chacune (**Figure 2**).

1.4. Physiopathologie

Les candidoses disséminées sont en nette augmentation en raison de la multiplication des facteurs favorisant leur apparition. Ils dépendent du champignon en cause mais surtout de l'organisme hôte. Les facteurs peuvent être locaux ou généraux. Ainsi, suite à un défaut d'immunité de l'hôte et/ou à une rupture de l'intégrité des barrières cutanéomuqueuses ou respiratoire (éventuellement iatrogène), les *Candida spp.* vont pouvoir pénétrer dans l'organisme, disséminer par voie hématogène et provoquer des abcès à distance (Mavor *et al.*, 2005) (**Figure 4**). Les candidémies peuvent être d'origine endogène ou exogène (**Figure 5**). La majorité se développe à partir de souches endogènes dont le patient est porteur, comme le montrent plusieurs études qui ont utilisé le génotypage (Stephan *et al.*, 2002 ; Develoux, 2005). L'origine de la souche responsable de candidémie est dans la majorité des cas digestive (Nucci *et al.*, 2001 ; Develoux, 2005). L'adhérence de la levure à la cellule hôte par l'intermédiaire d'adhésines constitue la première étape de l'invasion (Calderone *et al.*, 1994). La transition morphogénétique levure-(pseudo)filament et la sécrétion de protéases et de phospholipases permettent alors aux *Candida spp.* d'envahir les tissus (Naglik *et al.*, 2004). Des phénomènes de translocation directe des *Candida spp.* à travers la paroi digestive altérée ont déjà été observés (Calderone *et al.*, 2001 ; Leigh *et al.*, 2001) et peuvent également aboutir à une dissémination hématogène. L'autre voie de dissémination des *Candida spp.* est la violation des barrières cutanées, respiratoires ou du tractus urinaire par cathétérisme

vasculaire, implantation de matériel médical, plaies chirurgicales, traumatismes vasculaires, brûlures. Les chirurgies fréquemment en cause sont la chirurgie abdominale, cardiaque et les transplantations, en particulier hépatiques (Castaldo *et al.*, 1991 ; Ortega *et al.*, 2005). Selon les études, la responsabilité d'un cathétérisme (cathéters veineux centraux, dialyse péritonéale et cathétérismes cardiovasculaires) dans la survenue d'une candidémie a été suspectée ou prouvée dans 35 à 80 % des cas. Lorsque le cathéter est retiré et mis en culture, on retrouve la même espèce de *Candida* que dans les hémocultures dans 60 à 70 % des cas (Eggimann *et al.*, 2003 ; Eggimann *et al.*, 2004).

Tableau 2 : Répartition des patients atteints de candidémies selon l'étude de l'ECMM (European Confederation of Medical Mycology) (Tortorano *et al.*, 2004).

<i>Services</i>	<i>% de patients (Nombre)</i>
Chirurgie	44,7 (933)
Unité de soins intensifs	40,2 (839)
Tumeur solide	22,5 (471)
Oncohématologie	12,3 (257)
Néonatalogie, prématurés	6 (125)
Transplantation d'organe solide	3,5 (74)
Infection à VIH	3 (63)
Grands brûlés	1,4 (29)

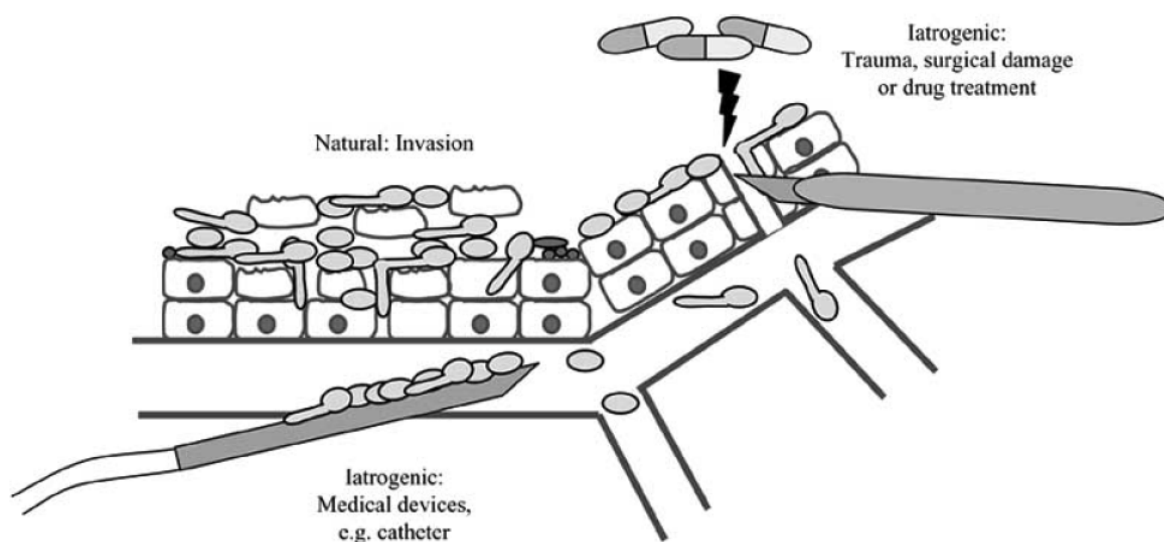


Figure 4 : Portes d'entrées des *Candida* chez l'homme (Mavor *et al.*, 2005).

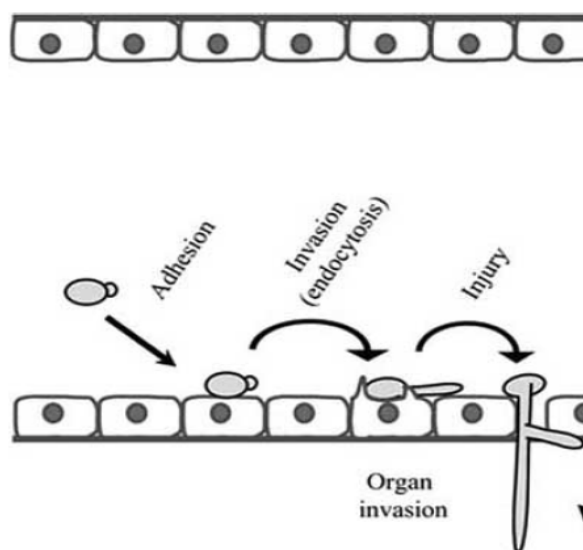


Figure 5 : Interaction de *C. albicans* avec les cellules de l'hôte et communication cellulaire dans les vaisseaux sanguins (Mavor *et al.*, 2005). Après adhésion aux cellules épithéliales, la levure provoque son endocytose et peut envahir les tissus.

La contamination du cathéter peut être directe, d'origine cutanée (notamment démontrée dans les candidémies à *C. parapsilosis* (Mavor *et al.*, 2005), ou secondaire à une colonisation du cathéter lors d'une candidémie transitoire qui s'est développée à partir d'un autre foyer. Tant que le cathéter colonisé n'est pas remplacé ou retiré, il permet la dissémination sanguine continue de la levure présente à sa surface. Enfin, la transmission exogène, nosocomiale de levures, à partir de solutés injectables contaminés ou des mains du personnel, a été décrite mais reste rare (Fanello *et al.*, 2001).

La principale voie de dissémination des *Candida* est hématogène. Dans des modèles murins d'infection par voie intraveineuse, les levures inoculées ne peuvent être réisolées de la circulation sanguine que pendant des intervalles de temps très courts après l'infection (Mavor *et al.*, 2005). En effet, cinq à quinze minutes après l'injection, au moins 90% des levures sont captés par le foie et les poumons (Baine *et al.*, 1974 ; Katz *et al.*, 1993). Une large proportion de ces levures est encore viable après 15 minutes, certaines adhérant encore à l'endothélium (Sawyer *et al.*, 1976). Le mécanisme exact par lequel les *Candida spp.* sortent de la circulation sanguine reste obscur mais l'interaction avec les cellules endothéliales semble primordiale (**Figure 5**). La première étape est l'adhérence de la levure aux cellules (Hoyer *et al.*, 1995) ce qui induit alors sa propre endocytose par les cellules endothéliales *via* les cadhérines (Mavor *et al.*, 2005 ; Phan *et al.*, 2007).

1.5. Les facteurs de prédisposition aux candidoses

Les facteurs généraux favorisant les candidoses sont multiples : âge (prématuré, vieillard), thérapeutiques (antibiotiques, corticoïdes, immunosuppresseurs), états pathologiques (diabète, maladie de Hodgkin, SIDA, leucémie...), états physiologiques particuliers (grossesse). D'autres facteurs locaux tels que l'humidité, la macération, l'acidité et la radiothérapie sont également favorisants. Les principaux facteurs endogènes prédisposant à l'infection par *Candida* sont essentiellement les neutropénies, les dysfonctionnements du

système immunitaire, les thérapies aux corticostéroïdes, les transplantations de moelle, les dysfonctionnements métaboliques ou encore la malnutrition.

1.6. Les antifongiques

1.6.1. Traitements antifongiques

Candida, comme son hôte humain, est un organisme eucaryote, et de ce fait, le nombre de cibles thérapeutiques potentielles est limité. Une bonne molécule thérapeutique est caractérisée par un large spectre d'action dans le règne fongique, une action fongicide plutôt que fongistatique et peu ou pas d'effets sur les cellules de l'hôte. Les premiers traitements par la nystatine et l'amphotéricine B, qui ont pour cible l'ergostérol de la membrane plasmique, ont été disponibles dans les années 50. L'arsenal antifongique s'est considérablement enrichi ces dernières années avec la commercialisation des nouvelles formulations lipidiques de l'amphotéricine B et le développement de molécules originales dans des classes d'antifongiques nouvelles. Cependant, il n'existe encore que quatre classes principales d'antifongiques à usage systémique agissant sur trois cibles fongiques (**Figure 6**).

1.6.1.a. Inhibition de la synthèse protéique : les pyrimidines fluorées

La flucytosine (5-FC, Ancotil[®]) est un analogue fluoré de la cytosine. C'est une prodrogue qui est transportée dans la cellule fongique par une cytosine perméase puis qui est convertie par la cytosine désaminase en fluorouracile (5-FU). Le 5-FU, véritable produit toxique, exerce son action antimétabolique selon deux voies : transformé en 5-fluorodéoxyuridine monophosphate, il inhibe la thymidylate synthétase, enzyme nécessaire à la synthèse de thymidine et donc à la réplication de l'ADN ; transformé en 5-fluorouridine triphosphate, il inhibe la synthèse protéique en s'incorporant à l'ARNm à la place de l'uridine (**Figure 7**) (Vermes *et al.*, 2000 ; Accoceberry *et al.*, 2006 ; Papon *et al.*, 2007). Les résistances étant fréquentes, il est indispensable d'utiliser la 5-FC en association pour éviter la sélection de mutants résistants. Avec l'amphotéricine B ou le fluconazole, elle agit en synergie sur les souches de *Candida spp.* et de *Cryptococcus* (Taguchi *et al.*, 1992 ; Siau *et al.*, 1998).

1.6.1.b. Altération des stérols de la membrane cellulaire fongique : les polyènes et les azolés (**Figure 8**)

- Les polyènes : produite par *Streptomyces nodosus*, l'amphotéricine B (Fungizone[®]) est active sur pratiquement tous les champignons. Après plus de 50 ans d'utilisation, ce polyène reste un antifongique de référence. Il a une action fongicide *in vitro*. L'amphotéricine B se lie de façon covalente à l'ergostérol pour former des pores dans la membrane plasmique à travers lesquels les électrolytes vont transiter de façon incontrôlée et provoquer la mort du champignon. La fréquence de résistance est faible (Accoceberry *et al.*, 2006). Cependant, l'amphotéricine B est particulièrement difficile d'utilisation en pratique clinique à cause de sa toxicité rénale et des troubles métaboliques associés qui concernent jusqu'à 80% des patients.

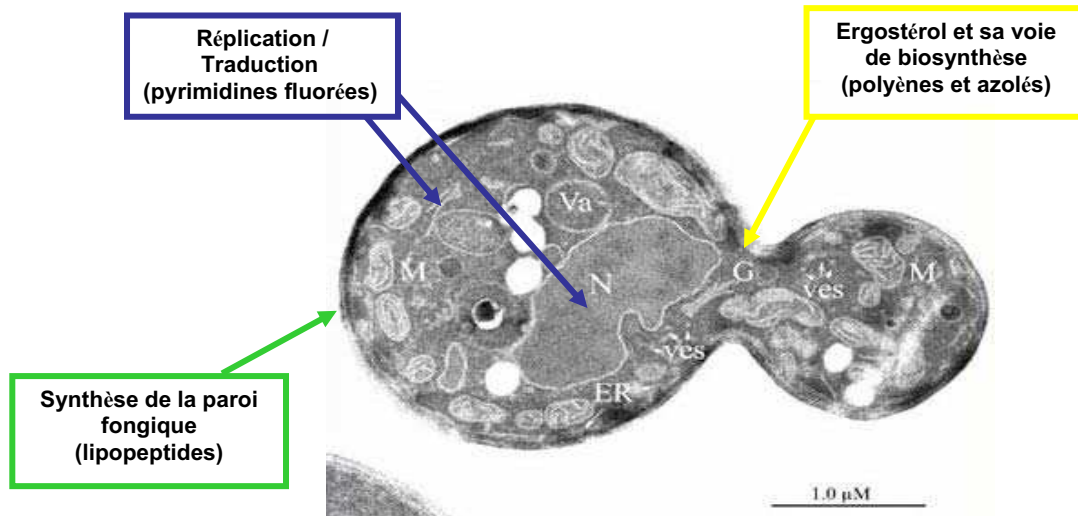


Figure 6 : Ultrastructure d'une levure bourgeonnante montrant les cibles des différents antifongiques. N : Noyau ; Va : Vacuole ; ves : Vésicules ; M : Mitochondrie ; ER : Réticulum Endoplasmique ; G : Golgi.

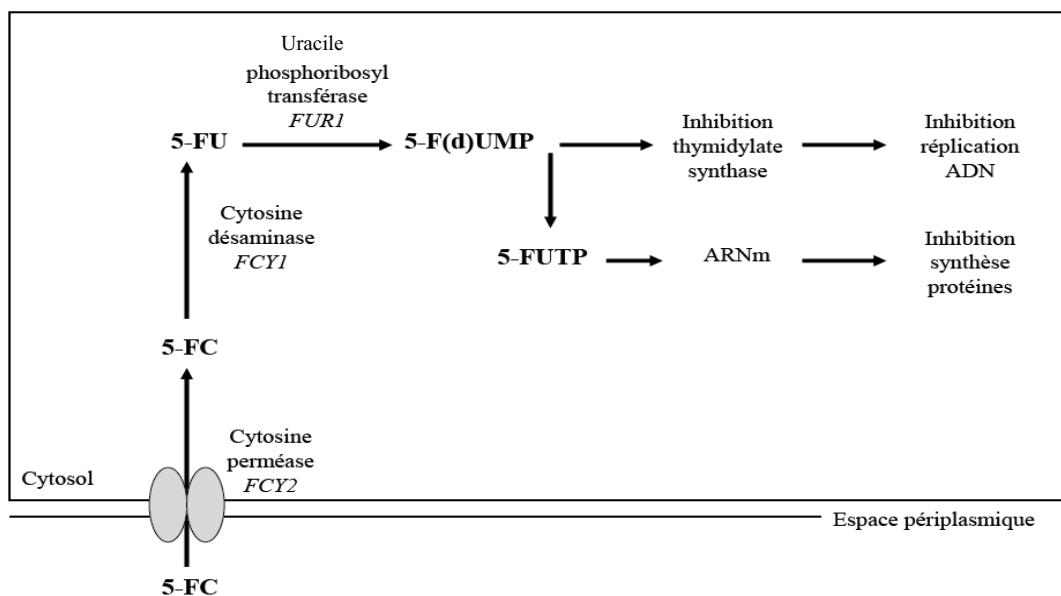


Figure 7 : Mécanisme d'action de la flucytosine et principaux gènes et enzymes impliqués (Accoceberry *et al.*, 2006). 5-FC : Flucytosine (5-fluorocytosine) ; 5-FU : 5-fluorouracile ; 5-F(d)UMP : 5-fluorodésoxyuridine monophosphate ; 5-FUTP : 5-fluorouridine triphosphate.

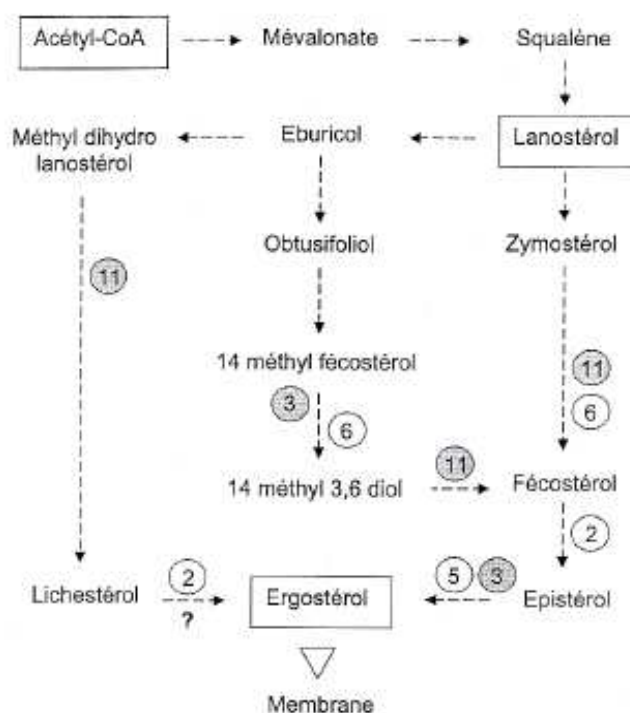


Figure 8 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse de l'ergostérol à partir de l'acétyl-CoA et de ses possibles ramifications (Accoceberry *et al.*, 2006). Les numéros correspondent aux principaux gènes *ERG* qui peuvent être impliqués dans la résistance à l'amphotéricine B et aux azolés. *ERG2* : $\Delta 8,7$ isomérase ; *ERG3* : $\Delta 5,6$ désaturase ; *ERG5* : C22 stérol désaturase ; *ERG6* : C24 stérol méthyl transférase ; *ERG11* : C14 α déméthylase.

- Les triazolés : en inhibant la C14- α -déméthylase (codée par le gène *ERG11*), ils empêchent la synthèse de l'ergostérol à partir du lanostérol. Il en résulte une accumulation de stérols toxiques pour le champignon et une déplétion en ergostérol. L'activité oxydative du cytochrome C 30 mitochondrial est également réduite et les peroxydes s'accumulent. Au final, la membrane cytoplasmique fongique est altérée. Le fluconazole (Triflucan®), hydrosoluble, présente une excellente biodisponibilité (90 %) et une distribution adéquate dans la plupart des tissus. L'efficacité n'est pas établie dans les infections dues à *C. glabrata*, et à *C. krusei* (espèces habituellement résistantes). Le voriconazole (Vfend®) est intrinsèquement plus actif que le fluconazole sur les souches de *Candida spp.* (Johnson *et al.*, 2003). Il conserve également *in vitro* une activité satisfaisante à l'égard des souches de *C. albicans* ou de *C. glabrata* résistantes au fluconazole, ainsi que sur celles de *C. krusei* (Johnson *et al.*, 2003 ; Scott *et al.*, 2007).

1.6.1.c. Altération de la paroi fongique : les échinocandines ou lipopeptides

Les échinocandines représentent une nouvelle classe d'agents antifongiques administrés par voie parentérale. Elles inhibent la glucane synthase, responsable de la synthèse du β -(1,3)-D-glucane, constituant majeur de la paroi fongique. En brisant l'intégrité structurale de la cellule fongique, elles entraînent un déséquilibre osmotique, puis finalement sa lyse (Denning, 2003). La caspofungine (Cancidas®) et la micafungine (Mycamine®) sont les seules molécules commercialisées en France ; elles dérivent respectivement de produits de fermentation de

Glarea lozoyensis et de *Coleophoma empetri*. Les échinocandines sont métabolisées par acétylation et hydrolyse au niveau hépatique. Elles sont fortement liées aux protéines plasmatiques et elles possèdent une activité fongicide *in vitro* sur *Candida spp.* (Datry *et al.*, 2006).

1.6.2. Résistance aux antifongiques

La virulence des *Candida spp.* est également favorisée par l'acquisition de mécanismes de résistance aux antifongiques (Figure 9). La résistance peut provenir :

- D'un défaut de transport ou de pénétration de l'antifongique à l'intérieur de la cellule fongique. Un des mécanismes de résistance à la 5-FC est l'inactivation de la cytosine perméase, codée par le gène *FCY2* et qui permet l'import de la flucytosine dans la cellule fongique (**Figure 7**) (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Papon *et al.*, 2007).

- D'un défaut de transformation de l'antifongique en forme active toxique. Des mutations au niveau des gènes nécessaires au métabolisme de la 5-FC, comme celui de la cytosine désaminase (*FCY1*), empêchent sa transformation en 5-FU et confèrent à la levure une résistance totale à la 5-FC (**Figure 7**) (Sanglard, 2002 ; Papon *et al.*, 2007).

- D'une surproduction de la cible cellulaire de l'antifongique. Ce type de mécanisme de résistance est fréquent : la surexpression des gènes de la thymidylate synthase ou de la C14- α -déméthylase (*ERG11*) aboutissent respectivement à une résistance à la 5-FC ou aux azolés (Song *et al.*, 2004). La surexpression du gène *ERG11* peut être la conséquence de l'action d'un facteur de transcription, tel que Upc2 (Znaidi *et al.*, 2008) ou bien d'un mécanisme d'aneuploïdie et de formation d'isochromosome chez *C. albicans* (Selmecki *et al.*, 2006).

- D'une modification de la cible cellulaire de l'antifongique, qui conduit à la diminution de son affinité pour l'antifongique. Certaines mutations ponctuelles du gène *ERG11* peuvent se traduire par la substitution d'acides aminés importants pour la structure tridimensionnelle de la protéine et conduire à la diminution de l'affinité de la protéine pour l'antifongique azolé (Sanglard, 2002).

- D'une disparition de la cible et de son remplacement par le recrutement ou le détournement d'un autre métabolite. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la résistance à l'amphotéricine B. Dans un premier temps, la voie de biosynthèse de l'ergostérol serait bloquée afin de soustraire la cible à l'action de l'antifongique. Dans un deuxième temps, l'ergostérol serait remplacé dans les membranes par d'autres stérols viables. Cependant, une mutation du gène *ERG3* (qui code pour une $\Delta 5,6$ désaturase) pourrait conférer à elle seule une résistance croisée à l'amphotéricine B et aux azolés, en empêchant la formation de 14-méthyl-3,6- diol toxique et en permettant l'accumulation de 14-méthyl-fécostérol, un stérol méthylé qui pourrait suppléer l'ergostérol (Zhang *et al.*). Ce mécanisme a été évoqué chez *C. albicans* (Kelly *et al.*, 1996 ; Nolte *et al.*, 1997). Plus récemment, il a été montré qu'un isolat clinique de *C. albicans* possédant une mutation dans les gènes *ERG11* et *ERG5* (C22 désaturase) avait une résistance croisée au fluconazole et à l'amphotéricine B (Martel *et al.*).

- D'un efflux actif de l'antifongique. Deux principales familles de transporteurs sont impliquées dans la résistance aux azolés chez les levures. Elles se distinguent par l'énergie nécessaire à leur fonctionnement et par les différents substrats antifongiques qui peuvent les emprunter. Les transporteurs de type MF (Major Facilitator), codés par le gène *MDR1* chez *C.*

albicans (Sanglard *et al.*, 1995), fonctionnent à l'aide d'un gradient électrochimique de protons. Ces pompes ont parmi les azolés un seul substrat, le fluconazole. Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette), codés par les gènes *CDR1* et *CDR2* chez *C. albicans*, utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) pour exporter hors du cytoplasme la plupart des antifongiques azolés (Sanglard *et al.*, 1997 ; Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003). En situation normale, les transporteurs Mdr ou Cdr sont exprimés à un niveau de base dans la cellule fongique, même quand elle n'est pas exposée à un antifongique. La résistance résulte de la surexpression des gènes et de l'accumulation des pompes dans la membrane. Cette surexpression est sous le contrôle de facteurs de transcription, comme *TAC1* (Coste *et al.*, 2009).

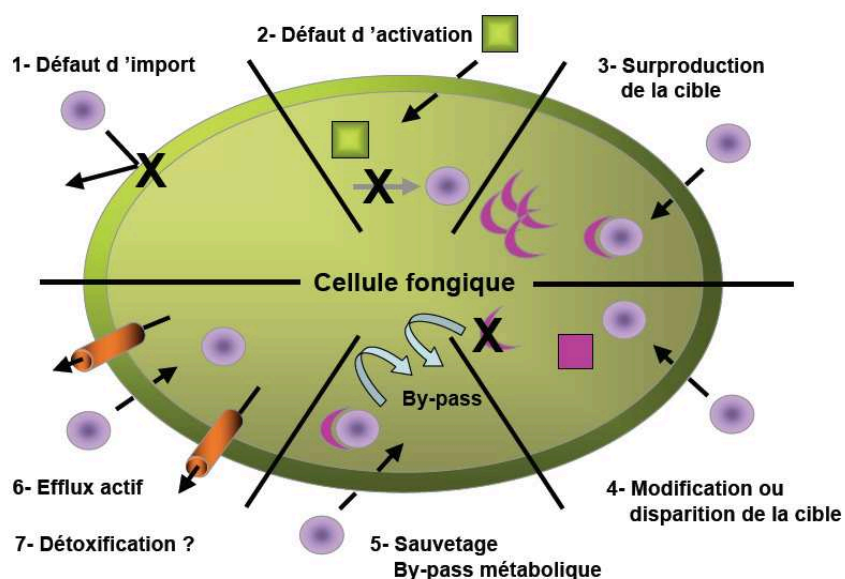


Figure 9 :
Mécanismes cellulaires de résistance aux antifongiques.

1.7. Facteurs de virulence des *Candida* spp.

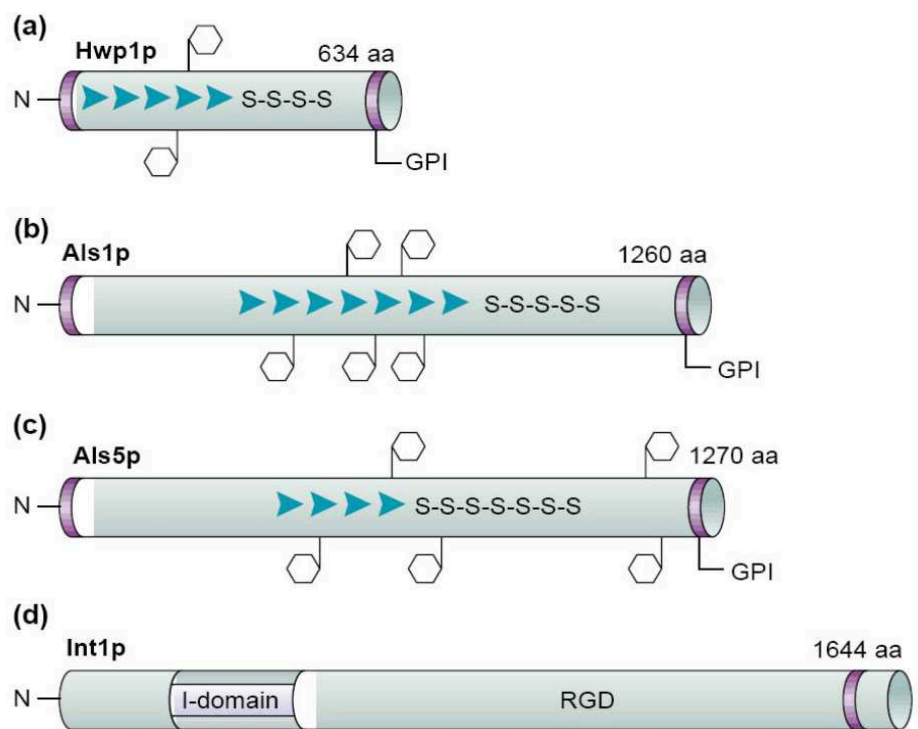
Comme pour d'autres pathogènes, la virulence des *Candida* spp. est liée à de nombreux facteurs. Adhérer aux cellules ou aux tissus de l'hôte permet la colonisation et l'infection. La sécrétion d'enzymes hydrolytiques et la possibilité pour la levure de changer de morphologie jouent un rôle important dans la virulence. La capacité des *Candida* spp. à s'adapter à leur environnement, notamment à résister aux antifongiques est également déterminante. Le métabolisme, en fournissant l'énergie et les ressources nécessaires au développement chez l'hôte, occupe une place prépondérante dans la virulence.

1.7.1. Adhérence

Les *Candida* spp. sont capables d'adhérer à différents substrats et tissus par l'intermédiaire de molécules dénommées adhésines. La famille de gènes *ALS* (agglutinin-like sequence) de *C. albicans*, qui code pour des glycoprotéines de surface, a été nommée ainsi à cause d'une similarité avec l' α -agglutinine de *Saccharomyces cerevisiae*, glycoprotéine de surface facilitant la reproduction sexuée entre deux cellules haploïdes (Lipke *et al.*, 1989 ;

Hoyer *et al.*, 1995). Depuis la caractérisation du premier gène, des études d'hybridation et des recherches d'homologie dans la *Candida* genome database ont indiqué que cette famille comprenait au moins 9 membres (Hoyer, 2001). Des protéines orthologues ont été identifiées chez certaines espèces de *Candida* non *albicans* (Hoyer *et al.*, 2001). Les protéines Als sont également liées aux β 1,6- glucanes pariétaux (Hoyer, 2001). Chaque gène *ALS* comporte trois domaines (**Figure 10**) (Hoyer, 2001):

- Un domaine 5' conservé (55 à 90% d'identité dans la famille *ALS*), constitué de 1299 à 1308 paires de base (pb) codant pour la partie N-terminale de la protéine. L'analyse de la structure tertiaire du fragment N-terminal de Als1 a révélé qu'il comportait plusieurs motifs constitués de feuillets β , comme dans la superfamille des immunoglobulines (Sheppard *et al.*, 2004). L'identification de régions hypervariables, par analyses bioinformatiques, explique en partie les différentes fonctions de ces protéines Als (Sheppard *et al.*, 2004). La séquence aminotermine comporte également un signal de sécrétion, responsable de l'export à la surface de la levure (Hoyer *et al.*, 1995).



TRENDS in Microbiology

Figure 10 : Représentation de la structure peptidique des adhésines (a) Hwp1, (b) Als1, (c) Als5, (d) Int1 de *C. albicans* (Calderone *et al.*, 2001). Les sites consensus de N-glycosylation sont indiqués par les hexagones ; chaque protéine est probablement fortement O-glycosylée. Les régions hydrophobes apparaissent en violet : elles servent de signal de sécrétion (N-terminal), de site de liaison à une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) en C-terminal, ou se situent en position transmembranaire. Als1p et Als5p comprennent 3 domaines: le domaine N-terminal, peu glycosylé ; le domaine central comprenant des répétitions en tandem (flèches), variant en longueur mais fortement conservées ; et le domaine C-terminal riche en sérine-thréonine (S), le plus conservé parmi la famille de protéine Als. Int1p comprend un I-domaine (permettant la liaison aux ligands) et un domaine RGD riche en arginine, glycine et acide aspartique, homologue à une protéine de *Staphylococcus aureus*, ClfA, liant le fibrinogène.

- Un domaine central comportant un nombre variable de répétitions en tandem d'un motif de 108 pb.

- Un domaine 3', de longueur variable, qui code pour une séquence peptidique riche en sérines et en thréonines. Ces acides aminés sont responsables de l'affinité de Als5 pour la fibronectine (Rauceo *et al.*, 2006). La séquence carboxyterminale peut être très conservée entre deux membres : ainsi *ALS2* et *ALS4* présentent plus de 95% d'identité nucléotidique (Hoyer *et al.*, 1998). Elle comporte un site d'addition d'une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) permettant la liaison à la membrane fongique (Hoyer *et al.*, 2001).

Les Als sont fortement glycosylées, en particulier au niveau des domaines central et carboxyterminal. Ainsi les résidus glycosylés représentent presque 80% du poids moléculaire de la protéine Als1 située dans la paroi fongique (Hoyer, 2001). Des expériences ont montré que l'expression hétérologue de gènes *ALS* de *C. albicans* chez *Saccharomyces cerevisiae*, levure non adhérente, lui permettait d'adhérer à des matrices protéiques extracellulaires (Gaur *et al.*, 1997) et aux cellules endothéliales (Fu *et al.*, 1998). Ces découvertes ont montré que le domaine N-terminal, possédant un motif immunoglobuline-like, est responsable de ces interactions. Une étude sur modèle murin de candidémie a par ailleurs conclu que Als1 est une protéine essentielle à la virulence de *C. albicans* (Calderone *et al.*, 2001). Il a récemment été montré que Als3 était impliquée dans les processus d'invasion par liaison aux cadhérines N et E, respectivement indispensables à la formation des complexes de jonction au niveau des endothéliums et épithéliums, et présentes à la surface des cellules endothéliales ou oroépithéliales (Phan *et al.*, 2007). L'adhérence de *C. albicans* aux cadhérines induit son endocytose. Afin de lui échapper, il est possible que la levure provoque l'apoptose de la cellule endothéliale (Mavor *et al.*, 2005). La réponse des cellules endothéliales à l'infection par *Candida spp.* met en jeu *in vitro* la sécrétion d'interleukines (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α) et de molécules d'adhésion leucocytaire et endothéliale. Si la réponse recrute un nombre suffisant de leucocytes, le processus d'invasion peut être stoppé (Mavor *et al.*, 2005). *C. albicans* peut également se fixer à divers ligands protéiques, comme la laminine, les collagènes I et IV et la fibronectine par l'intermédiaire d'Int1 (intégrine-like protéine) (Gale *et al.*, 1996).

L'expression hétérologue d'*INT1* chez *S. cerevisiae* permet à la levure de filer et d'adhérer à des cellules épithéliales humaines. A l'inverse, sa délétion chez *C. albicans* inhibe la filamentation et diminue l'adhérence aux cellules épithéliales de 40%. La souche *int1* Δ est également moins virulente sur un modèle murin de candidémie (Gale *et al.*, 1998).

La protéine pariétale Hwp1 (Hyphal Wall Protein), mannoprotéine liée de façon covalente aux β 1-6 glucanes de la paroi par sa partie C-terminale (Staab *et al.*, 1999), est spécifique du stade hyphal de *C. albicans* (Sharkey *et al.*, 1999). Chez Hwp1 comme chez les protéines Als, la partie C-terminale est riche en sérines et thréonines et comporte un signal d'addition d'une ancre GPI (**Figure 10**). On note également des répétitions en tandem dans la partie centrale. La partie N-terminale de Hwp1, riche en proline et glutamine, est un substrat pour les transglutaminases des cellules épithéliales (notamment buccales), ce qui permet à *C. albicans* sous forme hyphale d'y adhérer de manière stable et covalente. En effet chez *C. albicans* le mutant nul *hwp1* Δ /*hwp1* Δ , incapable de se lier de façon stable aux cellules épithéliales (Staab *et al.*, 1999), est hypovirulent dans un modèle murin de candidémie. Les souches hétérozygote *HWP1/hwp1* Δ et sauvage ont respectivement une virulence intermédiaire et conservée (Staab *et al.*, 1999). Les capacités de filamentation intrarénale et de

dommage aux cellules endothéliales du mutant nul sont diminuées (Tsuchimori *et al.*, 2000). Hwp1 joue également un rôle crucial dans la formation des biofilms (Nobile *et al.*, 2006). D'autres protéines sont impliquées dans l'adhérence des *Candida spp* (Navarro-Garcia *et al.*, 2001), à l'instar de Mnt1 et Pmt1 qui sont des mannosyltransférases essentielles à la synthèse des radicaux mannanes. Ces derniers, constituants majeurs de la paroi fongique, permettent la reconnaissance des levures par l'hôte et l'adhérence aux cellules épithéliales. Le déficit en Pmt1 est létal pour *C. albicans* (Timpel *et al.*, 1998).

1.7.2. Sécrétion et recrutement d'enzymes hydrolytiques

La famille des Secreted Aspartyl Protease (Sap), enzymes protéolytiques, est la mieux caractérisée. Elle comporte au moins 10 membres chez *C. albicans*. Des Sap ont également été identifiées chez *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* (Monod *et al.*, 1994 ; Zaugg *et al.*, 2001) et récemment chez *C. glabrata* (Kaur *et al.*, 2007). Les gènes *SAP* codent pour des préproenzymes (constitués d'environ 60 acides aminés de plus que l'enzyme mature) qui seront transformées au cours de la sécrétion. La séquence peptidique d'une Sap mature comporte deux résidus aspartate au sein du site actif et plusieurs cystéines permettant le maintien de la structure tridimensionnelle. La plupart des Sap présente des sites de N-glycosylation. A la différence des Sap1 à Sap8, Sap9 et Sap10 possèdent des séquences consensus en C-terminal permettant un ancrage GPI (Naglik *et al.*, 2003). Selon l'environnement, les gènes *SAP* sont régulés différemment (**Figure 11**). Ainsi, *SAP2* est exprimé en milieu acide, tandis que d'autres (*SAP4* et *SAP6*) le sont à pH neutre. De même, l'expression de Sap6 est spécifique du stade hyphal (Calderone *et al.*, 2001). Le stade de l'infection influe également (Staib *et al.*, 2000). Par exemple, Sap2 permettrait l'invasion au travers de la barrière endothéliale. *SAP5* s'exprime au cours d'une infection péritonéale puis systémique, Sap4 et Sap6 sont produites après dissémination hématogène. La contribution de l'activité hydrolytique des Sap aux dommages tissulaires et à l'invasion a été confirmée en présence de pepstatine A, un inhibiteur des aspartyl protéases. Ainsi, un traitement par la pepstatine A avant ou pendant une infection à *C. albicans* réduit significativement la mortalité chez les souris infectées par voie intra-nasale ou intrapéritonéale mais pas chez les souris infectées par voie intraveineuse (Mavor *et al.*, 2005). Dans un modèle murin de candidémie, la délétion des gènes *SAP4*, *SAP5* et *SAP6* chez *C. albicans* se traduit par une atténuation de la virulence des mutants (Sanglard *et al.*, 1997). Leur rôle dans la virulence a également été démontré chez *C. glabrata* (Kaur *et al.*, 2007).

Le rôle de la phospholipase B (Plb1) dans le déroulement du processus infectieux au cours des candidoses a également été bien établi chez *C. albicans* (Leidich *et al.*, 1998 ; Sugiyama *et al.*, 1999). Durant l'invasion tissulaire, l'activité de Plb1 a été localisée dans la partie apicale du filament (Sugiyama *et al.*, 1999). La délétion de *PLB1* diminue les capacités d'invasion sans altérer l'adhérence *in vivo* (Leidich *et al.*, 1998). Une troisième famille d'enzymes hydrolytiques, la famille des lipases, comprend au moins dix gènes. Comme pour les gènes *SAP*, l'expression des gènes *LIP* diffère selon le stade et les sites de l'infection (Hube *et al.*, 2000). *LIP2* et *LIP9* ne sont exprimés qu'en absence de lipides, ce qui suggère leur rôle dans l'acquisition des nutriments. Actuellement, aucune étude n'a démontré un rôle des lipases dans la virulence, ce qui pourrait s'expliquer par des redondances fonctionnelles étant données leurs similarités structurales (Mavor *et al.*, 2005).

En plus de la sécrétion d'enzymes lytiques qui leurs sont propres, les *Candida* produisent aussi des protéines capables de recruter des enzymes lytiques de l'hôte (Meri *et al.*, 2002). Le facteur H et la protéine C4B du complément sont recrutés par *C. albicans* et permettent à la levure d'inactiver le complément (Meri *et al.*, 2002 ; Meri *et al.*, 2004 ; Luo *et al.*, 2009). La protéine Pra1 produite par *C. albicans* se retrouve après sécrétion, libre dans

l'environnement de la levure ou réassociée à la paroi fongique. Cette protéine est capable de fixer le facteur H et le plasminogène de l'hôte par des liaisons ioniques (Luo *et al.*, 2009). Une fois recrutés, le facteur H et le C4B restent actifs et permettent à la levure d'inactiver l'action du complément puisqu'ils constituent des co-facteurs de la sérine protéase facteur I qui clive le C3b en C3bi inactif (Luo *et al.*, 2009). Ainsi, Pra1 permet indirectement d'inactiver une protéine essentielle à l'action lytique du complément. La liaison au plasminogène permet quant à elle de dégrader le fibrinogène de la matrice extracellulaire après conversion en plasmine active (Luo *et al.*, 2009). La protéine Pra1 participe donc à la virulence des *Candida* en recrutant des protéines de l'hôte qui lui permettent de se masquer du système immunitaire, d'inactiver l'action du complément et de faciliter sa dissémination au travers des tissus (Luo *et al.*, 2009).

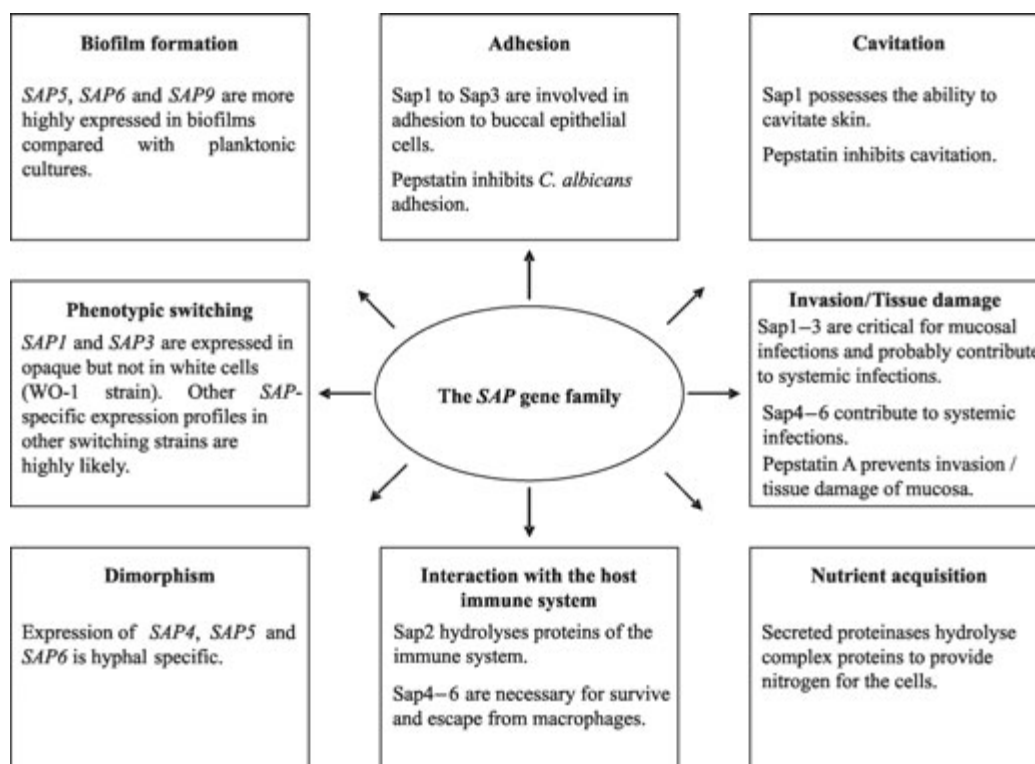


Figure 11 : Rôle des gènes *SAP* dans la pathogénicité de *C. albicans* (Naglik *et al.*, 2004). Les SAP (Secreted Aspartyl Proteinases) sont impliquées dans un large spectre de fonctions physiologiques dont certaines peuvent constituer des facteurs de virulence chez *C. albicans* : biofilm, transition morphogénétique, adhérence, invasion et dommage tissulaire, nutrition, relation avec l'hôte.

1.7.3. Transition morphogénétique

La transition morphogénétique permet à la levure de passer de manière réversible d'une forme unicellulaire (blastospore) à une forme filamenteuse (hyphe). Il peut s'agir d'un véritable filament (*C. albicans* et *C. dubliniensis*) ou d'un pseudofilament (la plupart des *Candida*, y compris certaines souches d'espèces anciennement incluses dans le genre *Torulopsis*) (Odds *et al.*, 1997 ; Csank *et al.*, 2000).

Deux principales voies de transduction (parallèles et distinctes) activent la filamentation chez *C. albicans*. Les premiers régulateurs morphologiques mis en évidence sont des homologues des gènes *STE* de *S. cerevisiae*, chez qui la pseudofilamentation et la reproduction sexuée sont sous la dépendance de Ste12 (Liu *et al.*, 1994). L'orthologue de Ste12 chez *C. albicans*, Cph1, se situe en aval de la cascade des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases). Cette voie est activée par certains signaux comme par exemple une carence en ammonium, détectée par une ammonium perméase couplée à la protéine G Gpa1 (Brown *et al.*, 1999 ; Calderone *et al.*, 2001 ; Liu, 2001). La deuxième voie de régulation morphogénétique chez *C. albicans* aboutit au facteur de transcription Efg1 et passe par l'AMP cyclique. Les signaux transduits peuvent être par exemple une carence en glucose, décelée par un récepteur au glucose (Gpr1) couplé à la protéine G Gpa2 (Brown *et al.*, 1999), mais également la présence de sérum (Gow, 2002) ou d'hémoglobine (Pendrak *et al.*, 2007).

D'autres voies de signalisation impliquent Efg1 (

Figure 12) (Liu, 2001). La morphologie est régulée en fonction du pH extracellulaire par le facteur de transcription Rim101. A pH acide, *C. albicans* est sous forme levure tandis qu'un pH neutre ou alcalin permet le développement d'un filament (Davis *et al.*, 2000 ; El Barkani *et al.*, 2000). Si la levure est englobée dans une matrice semi-solide, le facteur de transcription Czf1 stimule la filamentation (Vinces *et al.*, 2006). Une autre voie, régulée par Tec1 et Cph2 est sous la dépendance de Efg1 sans que la nature du signal transduit soit réellement connue (Lane *et al.*, 2001 ; Liu, 2001). Flo8 est également identifié comme un facteur de transcription agissant avec Efg1 (Cao *et al.*, 2006).

Plusieurs répresseurs de la filamentation ont également été mis en évidence. Ainsi, Tup1 agit avec deux protéines liant l'ADN, Nrg1 et Rfg1, afin de réprimer l'expression de gènes impliqués dans la filamentation (Calderone *et al.*, 2001 ; Liu, 2001 ; Murad *et al.*, 2001 ; Gow, 2002). Rbf1 semble également impliquée dans la filamentation puisqu'un mutant dont le gène *RBF1* a été invalidé se présente principalement sous la forme filament (Calderone *et al.*, 2001). Enfin, d'autres voies sont également requises pour la morphogénèse (Calderone *et al.*, 2001) comme celles informant sur l'intégrité de la paroi fongique (médiée par la protéine kinase C) ou assurant l'osmorégulation (Hog1).

Un aperçu de la complexité des voies de transduction et de régulation morphogénétique est représenté dans la

Figure 12. Ainsi, plusieurs études montrent que la virulence de mutants déficients en facteurs de transcription et réduits à un seul stade morphologique, est affectée (Schweizer *et al.*, 2000 ; Calderone *et al.*, 2001 ; Liu, 2001 ; Gow, 2002 ; Cao *et al.*, 2006). Chez *C. albicans*, le double mutant *efg1Δ/cph1Δ*, dont les deux principales voies induisant la filamentation sont bloquées, est avirulent dans un modèle murin de candidémie (Lo *et al.*, 1997). Ces résultats pourraient laisser penser que les levures incapables de filamenter ne sont plus pathogènes. Or, d'autres mutants constitutifs sous forme filamenteuse (*tup1Δ* ou *nrg1Δ*) sont hypovirulents (Liu *et al.*, 1994 ; Calderone *et al.*, 2001 ; Murad *et al.*, 2001 ; Gow, 2002). Certains gènes, spécifiquement exprimés au stade levure ou filament (enzymes Sap, Hwp1,...), sont régulés par des facteurs contrôlant également la transition morphogénétique. L'interprétation d'une atténuation de la virulence observée pour un mutant déficient en un facteur de transcription régulant la morphologie est donc délicate : elle peut être la

conséquence directe du déficit morphologique (un seul stade possible) ou liée au défaut d'expression de certaines protéines spécifiques d'un stade morphologique donné. La croissance hyphale est guidée par un phénomène de contact, le thigmotropisme, permettant à la levure de naviguer selon la topographie et de localiser les points de faiblesse de la structure. La transition levure-filament est ainsi souvent associée au passage du commensalisme à l'infection (Gow, 2002).

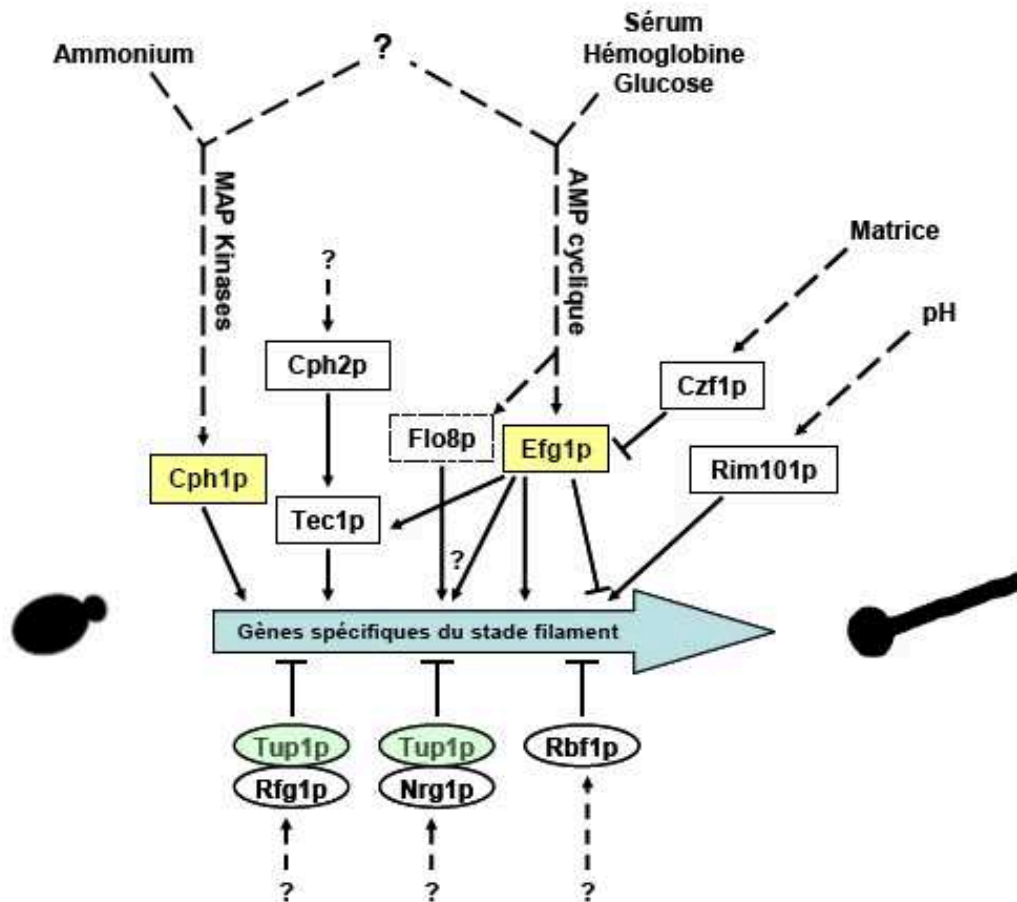


Figure 12 : Régulation de la transition morphogénétique chez *C. albicans* (d'après (Liu, 2001)). Les flèches symbolisent une activation et les barres une inhibition. Pour simplification, toutes les voies de signalisation ne sont pas représentées et les deux voies passant par les MAP kinases et l'AMP cyclique ne sont pas détaillées. De même, il n'est pas précisé que les protéines Ras seraient capables d'activer ces deux voies (Liu, 2001 ; Gow, 2002). Rim101 et Czf1 semblent pouvoir agir au travers ou en coopération avec Efg1. La place exacte de Flo8 reste à préciser (Cao *et al.*, 2006).

1.7.4. Formation de biofilm

Les biofilms sont des communautés de microorganismes adhérentes à une surface et produisant une matrice exopolymérique (Blankenship *et al.*, 2006). Les biofilms générés par les *Candida spp.* représentent un problème clinique émergent. Ils peuvent se former sur des surfaces naturelles telles qu'un endothélium vasculaire endommagé. L'hypothèse qu'un tel processus soit à l'origine des candidoses vaginales récidivantes est actuellement avancée (Douglas, 2003). Mais ils se forment le plus souvent sur une surface synthétique, comme celle d'un cathéter veineux central (Andes *et al.*, 2004), d'un dentier (Douglas, 2003) ou d'une

valve cardiaque (Douglas, 2003). Les expérimentations *in vitro* et plus récemment *in vivo*, ont permis de décrire quatre phases dans le développement d'un biofilm chez *C. albicans* (**Figure 13**) (Douglas, 2003 ; Blankenship *et al.*, 2006). Tout d'abord, les cellules à l'état de blastospore doivent adhérer à la surface du support puis commencer à se multiplier pour former des microcolonies, constituant la couche basale du biofilm. La croissance du biofilm se poursuit avec la production de pseudomycélium et de mycélium, et d'une matrice extracellulaire. Après maturation, l'épaisseur du biofilm atteint au moins 200µm. La cinétique et la séquence des événements dépendent du substrat, de l'espèce de *Candida* en cause, voire de la souche (Douglas, 2003 ; Li *et al.*, 2003 ; Parahitiyawa *et al.*, 2006).

Le développement d'un biofilm débute donc par l'adhérence des *Candida spp.* à une surface. Certaines adhésines de la famille Als sont impliquées. Une réduction de l'expression de *ALS2* conduit à une diminution de la biomasse du biofilm (Zhao *et al.*, 2005). L'analyse de mutants *als3Δ* a montré l'importance d'Als3 dans la formation d'un biofilm *in vitro*. Si la partie N-terminale permet l'adhérence aux cellules oroépithéliales, ce serait la partie C-terminale de Als3 qui serait impliquée dans ce cas (Zhao *et al.*, 2006). Hwp1 est aussi essentiel au développement d'un biofilm *in vivo* (Nobile *et al.*, 2006).

Plusieurs facteurs de transcription sont également impliqués. Tec1, important pour la régulation des gènes spécifiques du stade hyphal, contrôle la transcription de Bcr1 qui à son tour contrôle l'expression des adhésines Als1, Als3, Hwp1 (Nobile *et al.*, 2006). Ainsi, les mutants dont les gènes *TEC1*, *BCR1*, *ALS3* ou *HWPI* sont invalidés ne forment que des biofilms rudimentaires (Blankenship *et al.*, 2006 ; Nobile *et al.*, 2006 ; Nobile *et al.*, 2006 ; Zhao *et al.*, 2006). L'observation *in vitro* et *in vivo* de l'architecture stratifiée des biofilms (Ramage *et al.*, 2001 ; Douglas, 2003 ; Andes *et al.*, 2004 ; Nobile *et al.*, 2005) suggère que la conversion morphogénétique joue un rôle important dans la maturation des biofilms de *C. albicans*. L'étude comparative des transcriptomes d'une souche sauvage (capable de filenter) et d'une souche mutante *cph1Δ*, *efg1Δ* (incapable de filenter) par micro-array a permis de mettre en évidence que pas moins de 86 gènes exprimés seulement à l'état filament étaient induits lors du développement d'un biofilm (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004). En outre, des mutants de *C. albicans*, défectifs en facteur de régulation morphogénétique (comme Efg1) et donc incapables de filenter, ne peuvent développer que des biofilms rudimentaires (Richard *et al.*, 2005 ; Nobile *et al.*, 2006 ; Nobile *et al.*, 2006). La filamentation, en renforçant la structure du biofilm, permettrait le développement de biofilms robustes (Richard *et al.*, 2005).

La matrice extracellulaire, également appelée substance exopolymérique, est fabriquée par les cellules englobées dans le biofilm. Sa composition (principalement glucose, galactose et autres glucides, hexosamines, protéines, phosphore) (Baillie *et al.*, 2000) et son abondance varient en fonction des espèces de *Candida* (Mukherjee *et al.*, 2004 ; Al-Fattani *et al.*, 2006). Ainsi, les biofilms formés par *C. parapsilosis* renferment moins de matrice extracellulaire (Kuhn *et al.*, 2002). La quantité de cette matrice est également fonction des conditions environnementales : plus un biofilm est soumis à de fortes pressions hydrodynamiques, plus l'épaisseur de la matrice sera importante (Baillie *et al.*, 2000). Un autre aspect essentiel est la communication entre les différentes cellules du biofilm, ou « quorum sensing ». Cette stratégie est nécessaire à l'équilibre du biofilm en prévenant la surpopulation et en contrôlant les ressources en nutriments (Blankenship *et al.*, 2006). Elle joue également un rôle important dans le processus infectieux, plus particulièrement dans la dissémination et le développement d'infections à distance (Ramage *et al.*, 2005). Farnésol et tyrosol semblent être les deux molécules clés de cette communication. La première inhibe la filamentation et le développement d'un biofilm chez *C. albicans* (Hornby *et al.*, 2001). A l'inverse, le tyrosol

stimule la filamentation et diminue le temps de latence précédant la phase exponentielle de croissance (Chen *et al.*, 2004). Son action est plus marquée au cours des premières étapes de la formation d'un biofilm (Alem *et al.*, 2006).

Ces dernières années, plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer pourquoi les levures *C. albicans* constituant un biofilm était plus résistantes aux traitements antifongiques. La première, selon laquelle la matrice exopolymérique empêcherait l'accès des molécules antifongiques aux levures en croissance, est controversée. La résistance s'observerait rapidement après l'adhérence de *C. albicans* au substrat et donc avant la sécrétion de la matrice (Ramage *et al.*, 2002). De plus, un biofilm se développant sous une faible stringence hémodynamique produit moins de matrice extracellulaire mais est tout autant résistant aux antifongiques (Blankenship *et al.*, 2006). En revanche, le système de détoxification cellulaire à l'aide des pompes d'efflux Mdr1 et Cdr1 semble jouer un rôle indéniable dans la résistance précoce aux antifongiques des biofilms. La tolérance au fluconazole est induite très précocément dans le développement d'un biofilm : chez *C. albicans*, les gènes *MDR1* et/ou *CDR1* sont surexprimés dans les 15 minutes suivant l'adhérence des levures à une surface de silicone (Mateus *et al.*, 2004). Au sein des biofilms matures, la résistance semble liée à d'autres mécanismes (Blankenship *et al.*, 2006). Une protéine de la voie des MAPkinases, Mkc1, serait un régulateur majeur de la résistance aux azolés (Kumamoto, 2005) : un biofilm formé par un mutant *mkc1* Δ possède une architecture altérée et une sensibilité conservée au fluconazole. Récemment, il a été observé qu'au cours de la maturation d'un biofilm s'opérait une modification de la paroi fongique : elle comporte plus de β -1,3 glucanes et s'épaissit nettement, augmentant l'imperméabilité cellulaire aux antifongiques (Nett *et al.*, 2007). Il semblerait même que les glucanes interagiraient avec les azolés et l'amphotéricine B, les empêchant d'atteindre leur cible (Nett *et al.*, 2007). LaFleur *et al.* ont mis en évidence au sein de biofilms que certaines levures résistantes à l'amphotéricine B et à la chlorhexidine n'apparaîtraient qu'après la phase d'adhérence au substrat (LaFleur *et al.*, 2006). Le mécanisme mis en jeu n'est pas encore précisé mais ne semble pas lié aux pompes d'efflux.

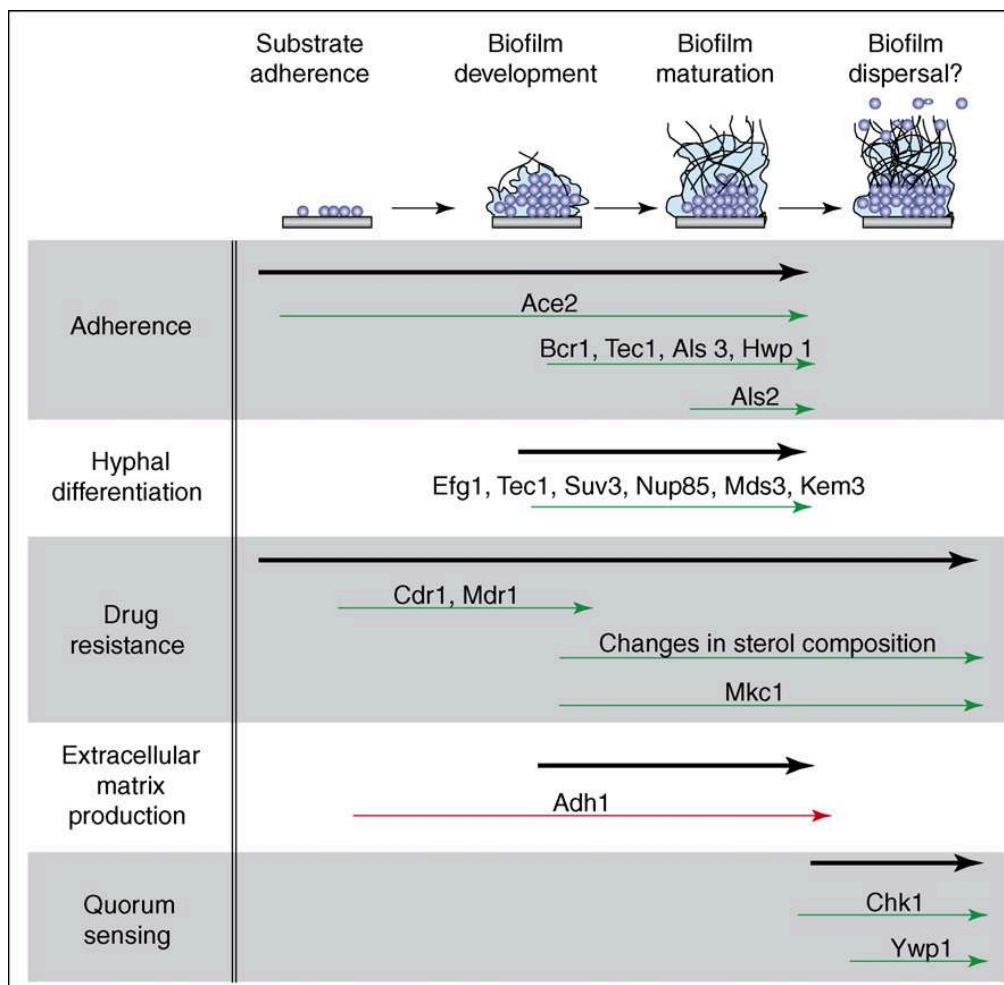


Figure 13 : Le développement d'un biofilm chez *C. albicans* (Blankenship *et al.*, 2006). Les différentes étapes de la formation d'un biofilm sont représentées en haut. Les flèches noires représentent la période durant laquelle chaque processus est impliqué. Les flèches fines vertes représentent les protéines positivement impliquées dans chaque étape. Les flèches rouges correspondent aux protéines ayant un rôle négatif sur la formation du biofilm. L'implication de Suv3, Nup85, Mds3 et Kem3 est décrite par Richard *et al.* (Richard *et al.*, 2005).

1.7.5. Métabolisme

Au cours d'une infection fongique, la phagocytose par les cellules immunitaires de l'hôte expose les levures à des enzymes lysosomales, à un stress oxydatif et une carence nutritionnelle. Plusieurs gènes fongiques répondent à ces conditions dans le but d'échapper à la phagolyse.

En réponse au stress oxydatif, la levure surexprime les gènes codant pour les superoxyde dismutases, les catalases et les complexes glutathione peroxydase/glutathion réductase et thiorédoxine peroxydase/thiorédoxine réductase (Chauhan *et al.*, 2006). L'ensemble de ces protéines permet d'inactiver les espèces réactives de l'oxygène produites par les cellules phagocytaires.

Le rôle de gènes du métabolisme dans la virulence est également bien établi mais peut être soumis à controverse. Certains codent pour des enzymes impliquées dans le métabolisme nucléotidique (entre autres, *URA3*) ou dans la biosynthèse d'acides aminés (*LEU2*, *HEM3*,...)

ou des lipides (*NMT1*, *FAS2*,...). Ils permettent aux levures de fabriquer les éléments nécessaires à leur croissance (Navarro-Garcia *et al.*, 2001). D'autres permettent de contrôler les apports en nutriments et notamment en fer, essentiel au développement fongique. Ainsi *FTR1*, qui code pour une perméase possédant une haute affinité pour le fer est impliquée dans la virulence (Ramanan *et al.*, 2000). Une troisième famille de gènes essentiels à la virulence permet de fournir l'énergie nécessaire au développement des *Candida spp.* au cours de l'infection. En particulier, il a été montré que le métabolisme péroxysomal, en particulier le cycle glyoxylique, est essentiel à la survie des levures internalisées par les macrophages (Lorenz *et al.*, 2001). En effet, des travaux portant sur l'expression différentielle de gènes de *C. albicans* au cours de la phagocytose macrophagique ont montré la surexpression de gènes répondant à une carence en glucose. Parmi ces gènes, la carnitine acétyl transférase codée par le gène *CAT3* permet le transport, entre les compartiments cellulaires, de l'acétyl qui est le précurseur de l'acétylCoA jouant un rôle central dans le métabolisme (Prigneau *et al.*, 2003). Ainsi, ce transporteur permet la réorientation du métabolisme du pathogène (Prigneau *et al.*, 2003 ; Lorenz *et al.*, 2004). Le gène *ICL1* codant l'isocitrate lyase, une enzyme clef du cycle glyoxylique, est également surexprimé et il est maintenant admis que ce gène est impliqué dans la virulence de *C. albicans* (Lorenz *et al.*, 2001).

Les levures semblent donc capables de s'adapter rapidement au milieu hostile que présentent les cellules phagocytaires, pas uniquement grâce à des facteurs de virulence stricts, mais aussi grâce à une capacité d'adapter rapidement leur métabolisme aux conditions hostiles.

En plus de ce métabolisme primaire, plusieurs métabolites secondaires, non essentiels au développement de la levure, jouent un rôle dans la virulence des *Candida*. Les oxylipides, lipides polyinsaturés oxygénés, font partie de ces métabolites secondaires ayant une fonction biologique. Les gènes impliqués dans le métabolisme des oxylipides codent pour des enzymes nécessaires à leur synthèse ou encore pour des transporteurs de ces molécules. Les oxylipides interviennent dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires des levures (reproduction sexuée, morphogénèse, pathogénicité) (Noverr *et al.*, 2003 ; Shea *et al.*, 2006) mais aussi des cellules de mammifères (croissance, différenciation, signalisation, apoptose...) (Hannun *et al.*, 2002 ; Noverr *et al.*, 2003 ; Becker *et al.*, 2005 ; Shea *et al.*, 2006).

Le farnésol est un oxylipide qui a été décrit comme la première molécule impliquée dans le quorum sensing chez les eucaryotes (**Figure 14**). Il s'agit d'un sesquiterpène avec une fonction alcool et constitué de trois unités isoprènes. Il dérive de la voie de biosynthèse de l'ergostérol et présente des effets différents selon l'espèce fongique (Shea *et al.*, 2006).

Chez les deux pathogènes opportunistes *Aspergillus nidulans* (ascomycète filamenteux) et *Cryptococcus neoformans* (levure basidiomycète), le farnésol est décrit comme ayant respectivement un rôle proapoptotique et un rôle dans le mating sexuel (Semighini *et al.*, 2006 ; Shea *et al.*, 2006). Concernant *C. albicans*, la production de farnésol permet d'inhiber la filamentation et d'induire la formation de blastospores. Ainsi, à forte densité cellulaire, dans les biofilms matures il induit la formation de blastospores pour la dissémination de l'infection (Mosel *et al.*, 2005 ; Shea *et al.*, 2006). Il permet également la régulation de gènes impliqués dans la résistance au stress oxydatif (Westwater *et al.*, 2005), aux antifongiques (Hornby *et al.*, 2004) et dans l'acquisition de fer (Shea *et al.*, 2006). Le farnésol présente donc de multiples fonctions qui peuvent être différentes selon les espèces étudiées.

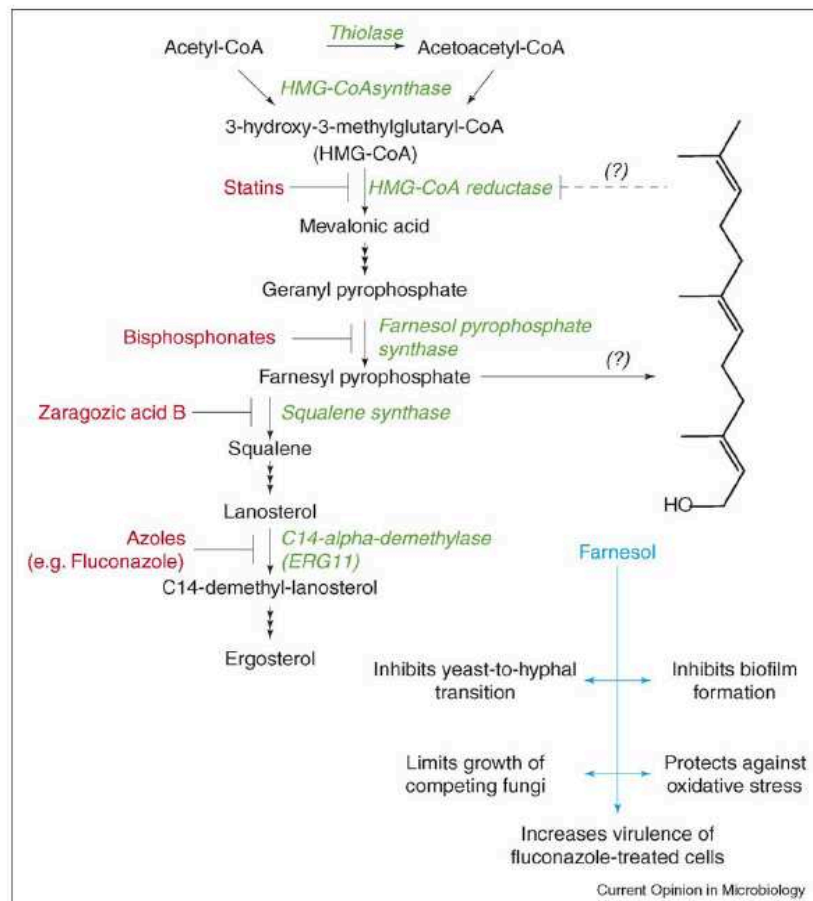


Figure 14 : Voie de biosynthèse du farnésol et rôle dans la signalisation (Shea *et al.*, 2006). La HMG-CoA réductase permet de générer des isoprènes qui forment du farnésyl pyrophosphate et du géranylgeranyl pyrophosphate et de l'ergostérol. Les enzymes catalysant chaque réaction sont représentées en vert et les inhibiteurs en rouges. Le rôle du farnésol dans le quorum sensing est indiqué en bleu.

D'autres oxylipides existent dans le règne fongique. La classe la plus représentée d'oxylipide dans le monde vivant est celle des eicosanoïdes comprenant d'une part les prostaglandines et les thromboxanes, et d'autre part les leucotriènes (Noverr *et al.*, 2003). Leur découverte est récente dans le monde fongique mais chez les animaux, leur fonction a été largement décrite. Chez ces derniers, les eicosanoïdes dérivent tous de l'acide arachidonique (C20 :4), acide gras essentiel provenant des végétaux et libéré à partir des membranes après activation de la phospholipase A2 au cours de l'inflammation (Marks, 1999). Les prostaglandines et thromboxanes sont synthétisés par des cyclooxygénases, inhibées par l'acide acétylsalicylique (Rowley, 1998 ; Vane *et al.*, 1998), et les leucotriènes sont synthétisés par des lipooxygénases, inhibées par le zileuton (Rowley, 1998) (**Figure 15**). Ces eicosanoïdes agissent à très faible concentration (de l'ordre du nanomolaire) et ont une demi-vie très courte suggérant une action locale et une synthèse stimuli-dépendante (Funk, 2001).

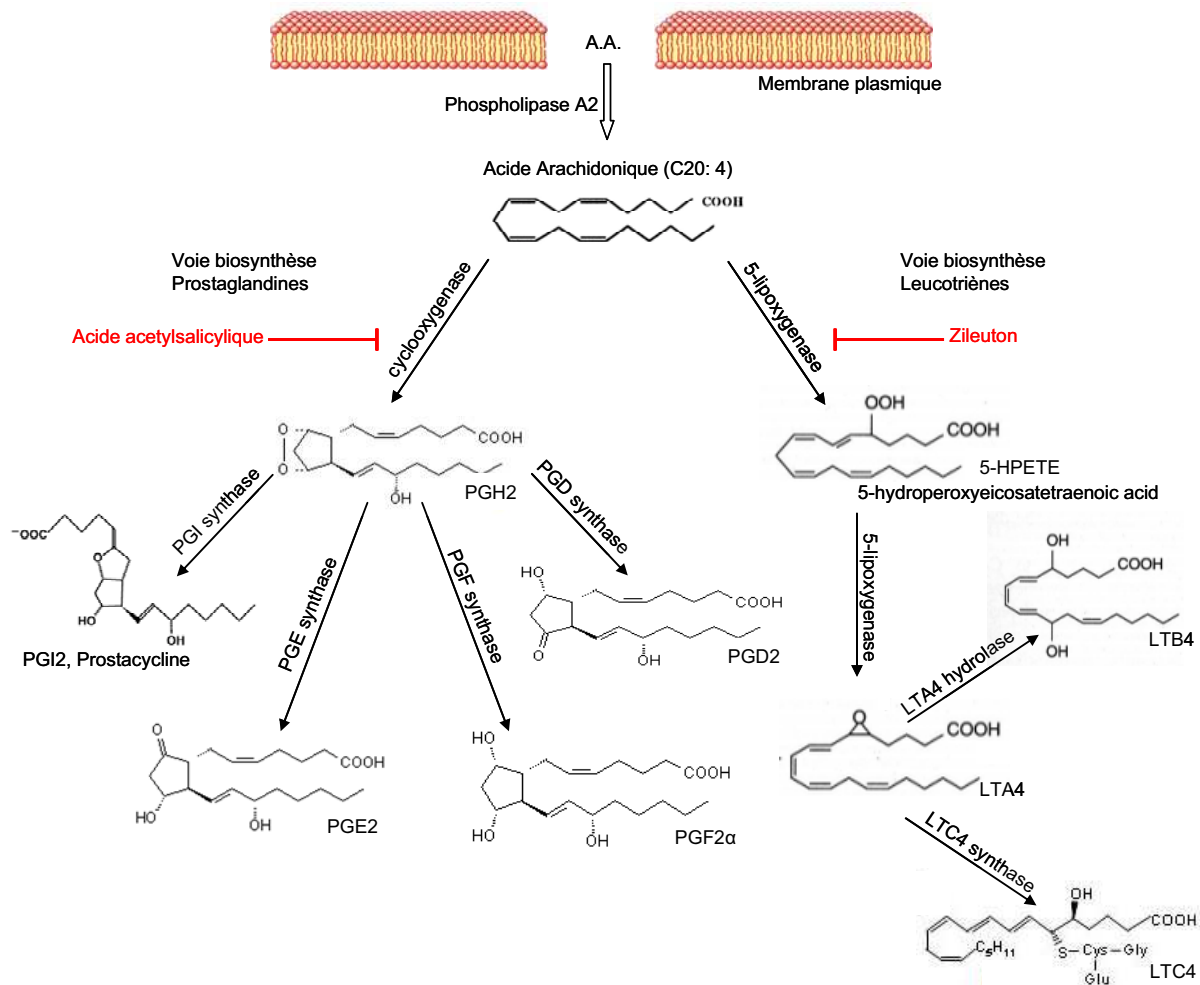


Figure 15 : Voies de biosynthèse des prostaglandines et leucotriènes chez les mammifères (d'après (Noverr *et al.*, 2003)). A.A : Acide Arachidonique ; PG : Prostaglandine ; LT : Leucotriène ; PLA2 : Phospholipase A2.

Les prostaglandines peuvent avoir une action anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion de cytokines médiatrices de l'inflammation et de la réponse pro-inflammatoire Th1 et en activant plutôt une réponse anti-inflammatoire de type Th2 (Betz *et al.*, 1991 ; Demeure *et al.*, 1997 ; Matsuoaka *et al.*, 2000 ; Noverr *et al.*, 2003). Les eicosanoïdes étant diffusibles au travers des membranes, leur action peut se faire au niveau intracellulaire. En effet, il a été montré qu'ils constituent des ligands des récepteurs intracellulaires PPAR (Peroxisome Prolifération-Activated Receptor) alpha et gamma, qui sont des facteurs de transcription entraînant par exemple une polarisation M2 (anti-inflammatoire) des macrophages et la neutralisation de la polarisation M1 (pro-inflammatoire) (Kliwer *et al.*, 1995 ; Gales *et al.*, 2010).

Les leucotriènes sont plus souvent associés à des actions pro-inflammatoires, entraînant une augmentation de l'expression d'adhésines sur les cellules immunes et les cellules endothéliales, stimulant la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et la phagocytose (Mancuso *et al.*, 2001). L'action des leucotriènes passerait également par l'intermédiaire des récepteurs PPARγ (Chawla *et al.*, 2001).

Tous les types d'eicosanoïdes ont été retrouvés dans le règne fongique, mais leurs voies de biosynthèse sont encore mal connues. L'acide arachidonique n'est pas présent naturellement chez de nombreux champignons, mais l'ajout de celui-ci au milieu permet

d'augmenter la quantité d'eicosanoïdes synthétisés, indiquant comme chez les mammifères, son utilisation potentielle comme précurseur (Noverr *et al.*, 2003 ; Ells *et al.*, 2010). *In vivo*, la source d'acide arachidonique pour les pathogènes peut provenir de l'hôte, soit par action de phospholipases fongiques, soit par son relargage direct grâce à la phospholipase A2 de la cellule hôte, dans le but de synthétiser des oxylipides en réponse à l'inflammation (**Figure 15**). De la même manière, l'aspirine qui inhibe les cyclooxygénases chez les mammifères entraîne une baisse de production de prostaglandine chez les champignons. Cela suggère l'existence d'enzymes de biosynthèse d'eicosanoïdes communes entre les deux règnes (Nucci *et al.*, 2001 ; Shea *et al.*, 2006). Cependant, plusieurs oxylipides fongiques ne dérivent pas de l'acide arachidonique mais plutôt de l'acide linoléique et linoléique (Noverr *et al.*, 2003) et sont synthétisés par d'autres cascades enzymatiques inconnues à l'heure actuelle, mais certainement proches de celles décrites pour le jasmonate chez les plantes. D'autres mécanismes non enzymatiques, en réponse au stress oxydatif et générant des isoprostanes proches des prostaglandines, pourraient être impliqués (Morrow *et al.*, 1996 ; Marks, 1999).

Les eicosanoïdes ont été décrits comme des régulateurs de diverses fonctions cellulaires chez de nombreux champignons. Les plus étudiés sont les facteurs *psi* (precocious sexual inducer) synthétisés par la famille des *ppo* (*psi* producing oxygénase) et qui régulent le cycle sexuel chez les *Aspergillus* (Tsitsigiannis *et al.*, 2007). De plus, chez *A. fumigatus*, des conidies *ppoCΔ* sont plus sensibles au stress oxydatif et à l'action des macrophages, suggérant un rôle des facteurs *psi* dans la virulence (Dagenais *et al.*, 2008). Chez *C. albicans*, l'oxylipide 3,18-diHETE (3,18-dihydroyeicosatetraenoic acid) est spécifiquement produit par les formes filamenteuses et la prostaglandine E2 (PGE2) induit la filamentation (Noverr *et al.*, 2001).

Ainsi, la production d'eicosanoïdes par les levures pourrait être impliquée dans la virulence à plusieurs niveaux. Elle permettrait une régulation de la morphogenèse et du cycle cellulaire du champignon pour une adaptation à l'environnement, mais aussi une communication entre la levure et les cellules de l'hôte, notamment en modulant la réponse immunitaire (Tsitsigiannis *et al.*, 2007). Ces oxylipides fongiques pourraient donc avoir un rôle clé dans l'installation de l'infection, et la spécificité de leurs voies de biosynthèse en fait des cibles intéressantes pour les traitements antifongiques.

2. Les cellules phagocytaires de la réponse immunitaire innée :

Le développement de candidoses et de candidémies dépend de l'interaction entre les *Candida* et les cellules immunitaires de l'hôte. En effet, la colonisation des tissus de l'hôte par les cellules fongiques et l'installation de l'infection est fonction d'une balance entre l'expression de facteurs de virulence de la levure qui vont assurer sa prolifération et sa dissémination, et la reconnaissance, le contrôle et l'élimination des levures par les cellules immunitaires.

2.1. Les mécanismes de reconnaissance des *Candida* par l'hôte

L'élimination des *Candida* par le système immunitaire nécessite la coopération de plusieurs types de cellules immunitaires. Etant donné qu'aucune donnée scientifique ne rapporte de rôle du complément ou de l'immunité adaptative sur le contrôle des levures *Candida*, la réponse anti-*Candida* semble se faire principalement, voire exclusivement, par les cellules phagocytaires de l'immunité innée (Casadevall, 1995 ; Triebel *et al.*, 2003). Les macrophages

et les granulocytes neutrophiles sont probablement les cellules effectrices les plus impliquées dans l'élimination des *Candida*. L'action de ces cellules protectrices nécessite la reconnaissance du pathogène par des récepteurs. Ces récepteurs appartiennent à la famille des *pattern recognition receptors* (PRR) ayant pour ligands un ensemble de molécules spécifiques de micro-organismes désigné comme les *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP). Chaque pathogène présente un PAMP qui lui est spécifique et qui est reconnu par plusieurs PRR. Les PRR impliqués dans la reconnaissance sont à l'origine de cascades de signalisation intracellulaire, pouvant être redondantes et aboutissant à une réponse concertée pour la défense de l'hôte. Les tétraspanines sont des protéines à quatre domaines transmembranaires permettant cette concertation. Elles créent des microdomaines regroupant plusieurs PRR afin d'obtenir une meilleure reconnaissance du pathogène et une réponse intracellulaire spécifique (Figdor *et al.*, 2009 ; Van Spriël *et al.*, 2009) (**Figure 16**). Chez les *Candida*, les PAMP comprennent principalement des composés de la paroi cellulaire tels que les protéines O-mannosylées et N-mannosylées, les sucres β -D-glucanes, le mannose et la chitine (**Figure 1**). Les PRR reconnaissant ces composés fongiques font partie des Toll-like récepteurs (TLR) et des C-type lectin-like récepteurs.

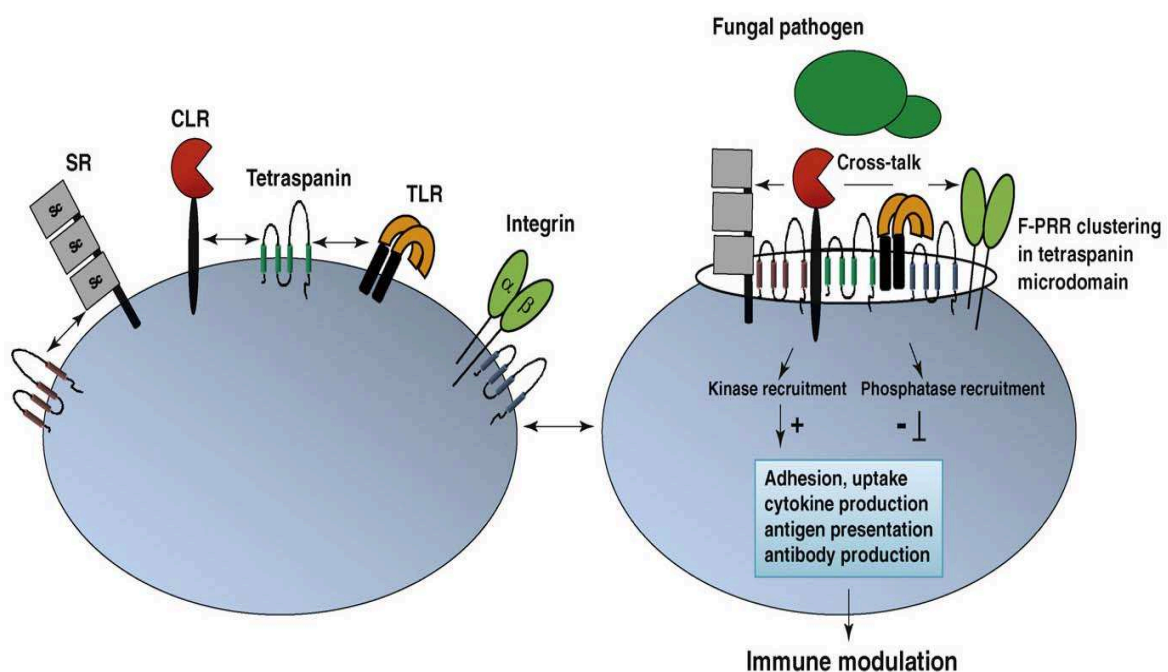


Figure 16 : Microdomaine de tétraspanines permettant la reconnaissance et la liaison d'une levure par les PRR d'une cellule immunitaire. (Figdor *et al.*, 2009). A gauche, la membrane plasmique présente plusieurs tétraspanines ainsi que des PRR tels que les TLR (Toll Like Receptor), les CLR (C-Lectine Receptor), les intégrines et les SR (Scavenger Receptor, reconnaissant les lipoprotéines et dont la fonction est peu connue pour la reconnaissance des *Candida*). A droite, l'interaction avec la cellule fongique entraîne la formation de microdomaines formant des clusters de PRR pour la coordination de la réponse intracellulaire vers une réponse pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire.

2.1.1. Les TLR

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires présents à la surface des cellules (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) ou dans des vésicules intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). Ils possèdent un domaine extracellulaire permettant la reconnaissance du pathogène et composé de régions répétées riches en leucine (LRR) et un domaine cytoplasmique TIR (Toll Interleukine 1 Receptor-like) pour l'activation de la cascade de signalisation. Des adaptateurs intracellulaires tels que MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) permettent la transmission du signal extracellulaire et entraînent l'activation de facteurs de transcription. Ces voies de signalisation vont permettre de contrôler la réponse immunitaire innée et adaptative en régulant la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires et l'expression de facteurs anti-microbiens comme les défensines (**Figure 17**). L'importance des récepteurs TLR dans la réponse anti-*Candida* a été démontrée indirectement *in vivo* par la sensibilité accrue d'un modèle murin KO pour le gène MyD88 (MyD88 *-/-*), le principal adaptateur des TLR (Bellocchio *et al.*, 2004 ; Netea *et al.*, 2008). Les études réalisées *in vitro* montrent en effet que des macrophages de souris MyD88 *-/-* s'associent deux fois moins aux levures *Candida* et sécrètent 2 à 3 fois moins de cytokines telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor) (Marr *et al.*, 2003). L'implication des TLR dans la réponse anti-*Candida* a également été démontrée *in vivo* par l'étude de modèles murins KO pour le gène TLR2 (TLR2 *-/-*) ou le gène TLR4 (TLR4 *-/-*) (Bourgeois *et al.*, 2010).

Le TLR4 est activé par la liaison aux résidus O-mannosylés de la paroi fongique (**Figure 17**). Cette activation entraîne, entre autre par l'intermédiaire du facteur de transcription NF κ B, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels que l'interleukine-8 (IL-8), l'interleukine-12 (IL-12) et l'interféron γ (IFN γ). L'ensemble de ces cytokines dirige le système immunitaire vers une réponse pro-inflammatoire de type Th1.

Le TLR2 reconnaît les phospholipomannanes (PLM) qui sont des glycolipides de la paroi. Cette liaison induit la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF α mais aussi la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, le TGF β (Transforming Growth Factor) et l'IL10. Ainsi, la fixation au TLR2 a tendance à inactiver la réponse de type Th1 pro-inflammatoire et à activer une réponse anti-inflammatoire de type Th2 ou Treg (regulatory T cells).

Le TLR6 reconnaît également les phospholipomannanes de la paroi et le TLR9 intracellulaire reconnaît l'ADN fongique mais leurs rôles dans la sécrétion de cytokines semblent moins importants. En effet, la sécrétion de cytokines par des macrophages TLR6 *-/-* stimulés par *C. albicans* n'est que faiblement réduite et l'absence de TLR9 n'induit qu'une augmentation mineure de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, suggérant que ce dernier aurait plutôt un rôle proche du TLR2.

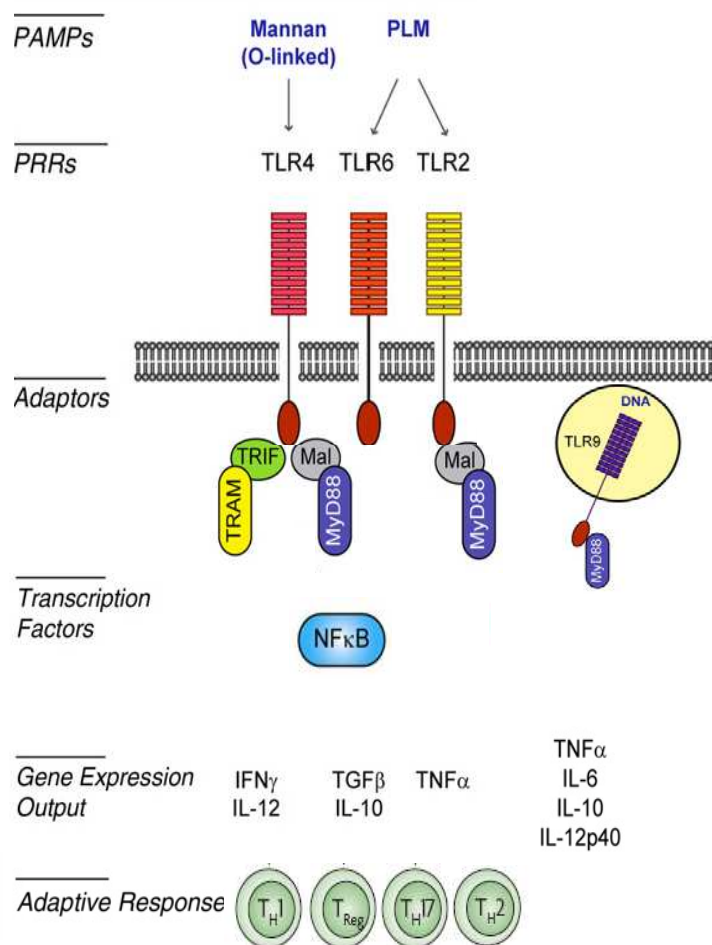


Figure 17 : TLR impliqués dans la reconnaissance de *C. albicans* et voies de signalisation afférentes (d'après (Bourgeois *et al.*, 2010). Les PAMP des cellules fongiques sont reconnus par les domaines LRR (Leucine Rich Repeat) des TLR (Toll Like Receptor). Les domaines TIR (Toll Interleukine 1 Receptor-like) cytoplasmiques des TLR sont des adaptateurs qui permettent la transduction du signal en activant des facteurs de transcription tels que NF κ B qui vont ensuite contrôler l'expression de gènes codant pour des cytokines entraînant une réponse pro- (Th1, Th17) ou anti-inflammatoire (Th2, Treg).

2.1.2. Les lectines de type C

Les lectines de type C sont des récepteurs calcium-dépendants, reconnaissant les sucres de la paroi fongique. Alors que les TLR interviennent uniquement dans l'orientation de la réponse immune par la sécrétion de cytokines, les lectines de type C ont aussi pour fonction de stimuler la phagocytose par les cellules immunitaires (**Figure 18**).

Le récepteur Mannose (RM), identifié comme principal récepteur des macrophages, reconnaît les résidus α -oligomannoses et N-mannosylés de la paroi fongique (Linehan *et al.*, 2000 ; Taylor *et al.*, 2005 ; Netea *et al.*, 2006). Ce récepteur collabore avec le TLR4 pour l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF α (Netea *et al.*, 2006 ; Bourgeois *et al.*, 2010).

Le récepteur Dectine-1, présent sur les cellules myéloïdes, lie les résidus β -1,3 glucanes de la paroi. La liaison à ce récepteur permet, via le domaine ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) intracellulaire, d'activer la phagocytose et le « burst oxydatif » mais aussi la maturation des cellules dendritiques et la sécrétion de cytokines telles que le TNF α , l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-23. Ces cytokines vont permettre d'induire les réponses pro-inflammatoires Th1 (IL-12) et Th17 (IL-23) (Saijo *et al.*, ; De Luca *et al.*, 2007 ; Hara *et al.*, 2007 ; Taylor *et al.*, 2007 ; Reid *et al.*, 2009).

Le récepteur Dectine-2 reconnaît les résidus N-mannosylés de la paroi avec une forte affinité pour les formes filamenteuses de *Candida albicans*. Son association au récepteur membranaire FC γ R induit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-6 (Graham *et al.*, 2009) et de leucotriènes cystéinylés par les cellules dendritiques (Barrett *et al.*, 2009). L'activation de ce récepteur permet aussi la sécrétion de cytokines déclenchant les réponses pro-inflammatoires Th1 et Th17. Cependant l'implication respective des récepteurs Dectine-1 et Dectine-2 dans le déclenchement de la réponse Th17 est encore controversée (Saijo *et al.*, ; Netea *et al.*, 2008).

Le récepteur Mincle est principalement exprimé par les macrophages. Il est également associé à FC γ R et reconnaît les résidus N-mannosylés. Ce récepteur ne semble pas indispensable à la phagocytose macrophagique mais intervient plutôt dans l'induction d'une réponse protectrice en stimulant fortement la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-6 (Wells *et al.*, 2008).

Le récepteur à mannose et le récepteur DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM (intercellular adhesion molecule)-Grabbing Nonintegrin) reconnaissent aussi les résidus N-mannosylés et induisent principalement la phagocytose mais aussi la sécrétion respectivement du TNF α et de IL-1 β , et de l'IL-10 (Cambi *et al.*, 2003 ; Romani, 2004).

Les résidus mannosylés peuvent également être reconnus par le récepteur Galectine-3 (initialement appelé Mac-2). Ce récepteur reconnaît les β -1,2 oligomannosides de la paroi et particulièrement des β -galactoses (Fradin *et al.*, 2000).

En plus des récepteurs Dectine-1, les β -glucanes peuvent être reconnus par le récepteur β 2-intégrine CR3 (Complement Receptor 3 correspondant au CD11b/CD18 ou Mac1). Cette reconnaissance se fait par un domaine lectine du récepteur distinct du domaine de liaison au fragment inactivé du complément C3bi (Diamond *et al.*, 1993 ; Thornton *et al.*, 1996). CR3 permet la reconnaissance des β -glucanes de *C. albicans* et la phagocytose mais contrairement à Dectine-1, il n'entraîne pas d'activation du « burst oxydatif » (Wright *et al.*, 1983 ; Netea *et al.*, 2008).

Le rôle des récepteurs scavenger SCARF1 et CD36 a récemment été mis en évidence dans la reconnaissance des β -glucanes de la paroi fongique (Means *et al.*, 2009). Ces récepteurs permettraient d'induire la phagocytose mais leur rôle précis n'a pas été décrit.

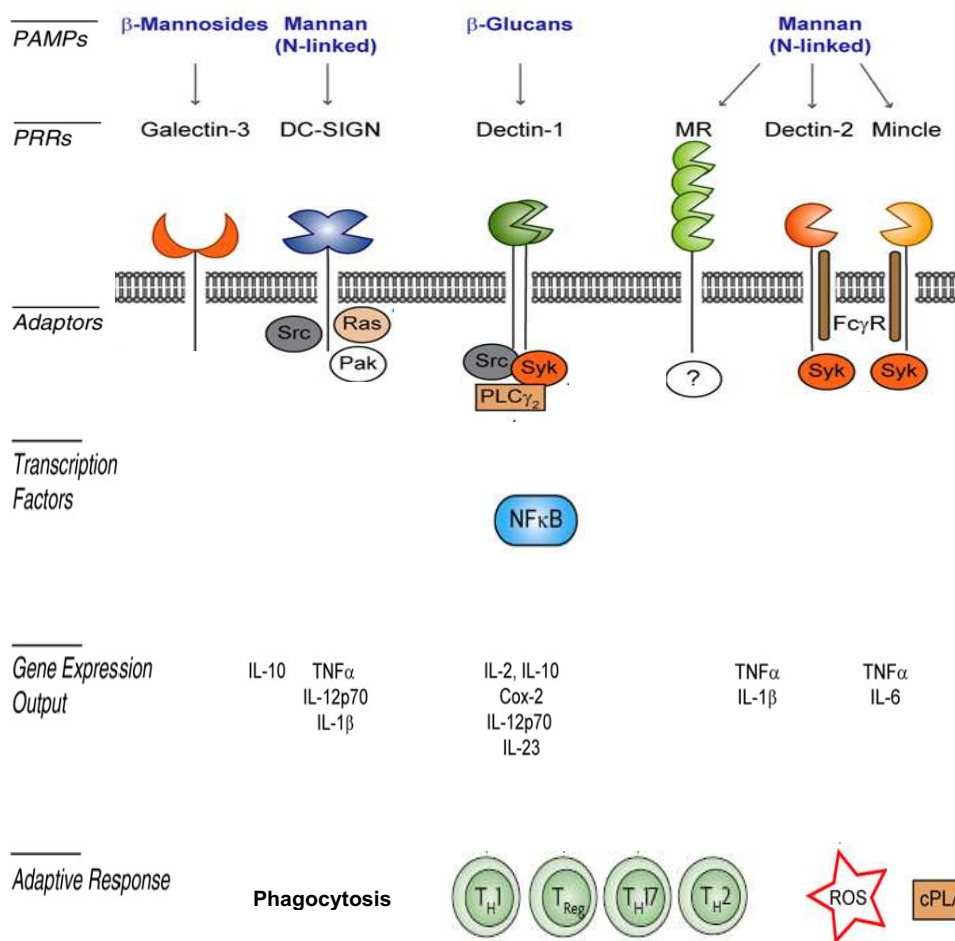


Figure 18 : Schéma simplifié des lectines de types C impliquées dans la reconnaissance de *C. albicans* (d'après (Bourgeois *et al.*, 2010)). Les PAMP des cellules fongiques sont reconnus par les domaines lectines récepteurs. La liaison à ces récepteurs induit la phagocytose des levures et l'activation des mécanismes oxydatifs (production de ROS : Reactive Oxygen Species) et de phospholipases (PLA₂ : cytoplasmic Phospholipase A₂). De plus, la transduction du signal par les domaines cytoplasmiques entraîne l'activation des facteurs de transcription tels que NF κ B qui vont contrôler l'expression de gènes codant pour des cytokines provoquant une réponse pro-inflammatoire (Th1, Th17) ou anti-inflammatoire (Th2, Treg). (MR : Mannose Receptor, DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific ICAM (intercellular adhesion molecule)-Grabbing Nonintegrin).

2.2. Les cellules de la réponse immunitaire innée anti-*Candida*

L'ensemble des récepteurs reconnaissant les *Candida* permet d'organiser la réponse des cellules du système immunitaire inné pour la défense de l'hôte. Les monocytes, les macrophages et les granulocytes neutrophiles sont les principales cellules effectrices de la réponse à l'infection. Les PRR présents à leur surface reconnaissent les PAMP des levures. Ainsi, elles phagocytent les levures, les exposent à des granules cytoplasmiques contenant un arsenal anti-microbien oxygène-dépendant ou indépendant, pouvant conduire à l'élimination du pathogène et sécrètent des cytokines afin d'orienter la réponse immunitaire (**Figure 19**).

Les cellules dendritiques, présentatrices d'antigènes, ont plutôt une fonction de régulation de la réponse immune.

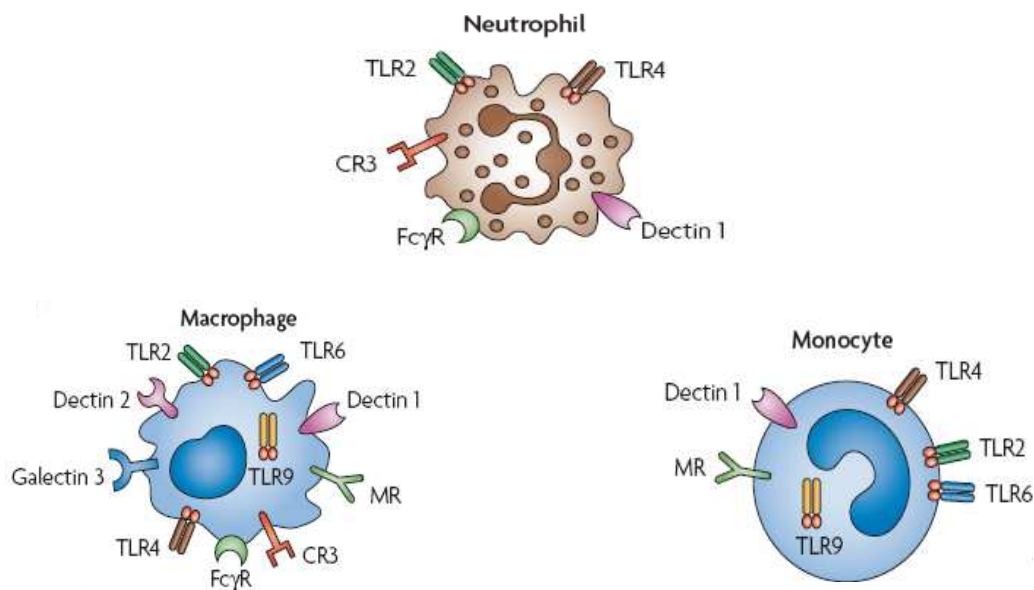


Figure 19 : Les cellules phagocytaires de la défense anti-*Candida* (Netea *et al.*, 2008). Le neutrophile est représenté en marron avec un noyau polylobé et plusieurs granules cytoplasmiques, le monocyte en bleu avec un pourtour lisse et le macrophage en bleu avec une surface irrégulière. Les PRR spécifiques de chaque type cellulaire sont représentés. (TLR : Toll Like Receptor, MR : Mannose Receptor, CR3 : Complement Receptor 3, FcγR : Fcγ Receptor).

2.2.1. Les monocytes et les macrophages

Les monocytes sont des cellules phagocytaires présentes dans la circulation sanguine. Leur rôle direct dans la défense anti-*Candida* semble mineur puisque le passage des *Candida* dans la circulation sanguine semble limité dans le temps. En revanche, une importante fonction des monocytes dans la réponse anti-*Candida* est leur rôle de progéniteur de macrophages au cours de leur passage dans les tissus. Cette différenciation se fait sous l'action de plusieurs cytokines. Le TNF α active les cellules endothéliales qui vont, *via* la sécrétion de chémokines et l'expression de récepteurs d'adhésion, permettre le recrutement des monocytes. Ensuite, d'autres cytokines, en particulier le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), vont induire la différenciation des monocytes sanguins en macrophages tissulaires.

Les macrophages résident uniquement dans les tissus. Ils présentent de nombreux pseudopodes, sont très mobiles et acquièrent au cours de leur différenciation une machinerie de biosynthèse protéique importante avec un réticulum endoplasmique granuleux et un appareil de Golgi très développés. Ces cellules sont impliquées dans l'homéostasie tissulaire, permettent le nettoyage des corps apoptotiques et contrôlent les infections en phagocytant les pathogènes. Au cours d'une infection, les macrophages ont un rôle essentiel dans le déclenchement de la réponse immunitaire pro-inflammatoire Th1 en sécrétant les cytokines

TNF α et IFN γ . Après l'élimination des pathogènes, l'inflammation doit être stoppée en inhibant la réponse immunitaire de type Th1 afin de limiter les dommages tissulaires. Cette réorientation anti-inflammatoire est également contrôlée par les macrophages qui sécrètent de l'IL-10 et du TGF β qui induisent la prolifération des cellules T-reg (T régulatrices) ainsi que des cytokines pro-Th2 tels que l'IL-4 et l'IL-13.

Plusieurs récepteurs lectines tels que Dectine-1 (Herre *et al.*, 2004), RM (Ezekowitz *et al.*, 1990 ; Porcaro *et al.*, 2003) et DC-SIGN (Cambi *et al.*, 2009) contribuent à la phagocytose de *Candida* par les macrophages. Cependant, le rôle du RM a été remis en cause car son expression hétérologue dans des cellules non phagocytaires n'a pas permis d'observer de phagocytose (Le Cabec *et al.*, 2005). D'autres travaux ont permis de démontrer un recrutement séquentiel des récepteurs au cours de la phagocytose de *C. albicans*. En effet, il semble que le CR3 et Dectine-1 soient accumulés au site de contact et de phagocytose de la levure tandis que le RM est recruté plus tardivement au niveau du phagosome (Heinsbroek *et al.*, 2008). Le RM interviendrait dans l'induction de la production de cytokines telles que le TNF α , plutôt que dans l'induction de la phagocytose.

Après phagocytose, le phagosome formé fusionne avec les lysosomes cytoplasmiques pour former le phagolysosome. Cette maturation du phagosome s'accompagne d'une acidification jusqu'à un pH 5 et la levure est alors exposée à l'arsenal antimicrobien oxygène-dépendant et -indépendant du macrophage.

Les mécanismes oxydatifs regroupent des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote. La NADPH oxydase (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) est assemblée au niveau membranaire suite à l'activation du macrophage (**Figure 20**). Ce complexe produit l'anion superoxyde (O_2^{2-}) toxique à partir d'oxygène. L' O_2^{2-} permet de générer d'autres espèces oxydantes telles que le radical hydroxyl (OH^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La formation du phagolysosome permet également l'activation de la myéloperoxydase (MPO) qui forme à partir d' H_2O_2 ou d' O_2^{2-} et de Br^- , d' I^- ou de Cl^- des dérivés halogénés hautement oxydatifs comme l'acide hypochlorique HOCl. L'importance de la myéloperoxydase dans la défense anti-*Candida* a été démontrée par l'augmentation de la sensibilité aux infections à *Candida* de modèles murins déficients pour cette enzyme (Aratani *et al.*, 1999). Le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) constitue une autre espèce radicalaire produite lors de l'activation des macrophages. Il est produit par des NO synthases à partir de L-arginine et constitue un précurseur à d'autres espèces réactives plus toxiques comme le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$) produit après réaction avec l' O_2^{2-} . Le peroxyde d'azote se décompose en OH^{\cdot} et en NO_2^- (MacMicking *et al.*, 1997), capables d'oxyder les groupements thiols, les lipides, l'ADN et les tyrosines (

Figure 21). L'ensemble de ces mécanismes oxydatifs compose le « burst oxydatif » qui est déclenché par la phagocytose mais son induction est également stimulée par des cytokines. En effet, le traitement de macrophages péritonéaux de souris par de l'IFN γ et de l'IL3 permet d'augmenter la production d' O_2^{2-} et entraîne une augmentation de l'efficacité d'élimination des *Candida*.

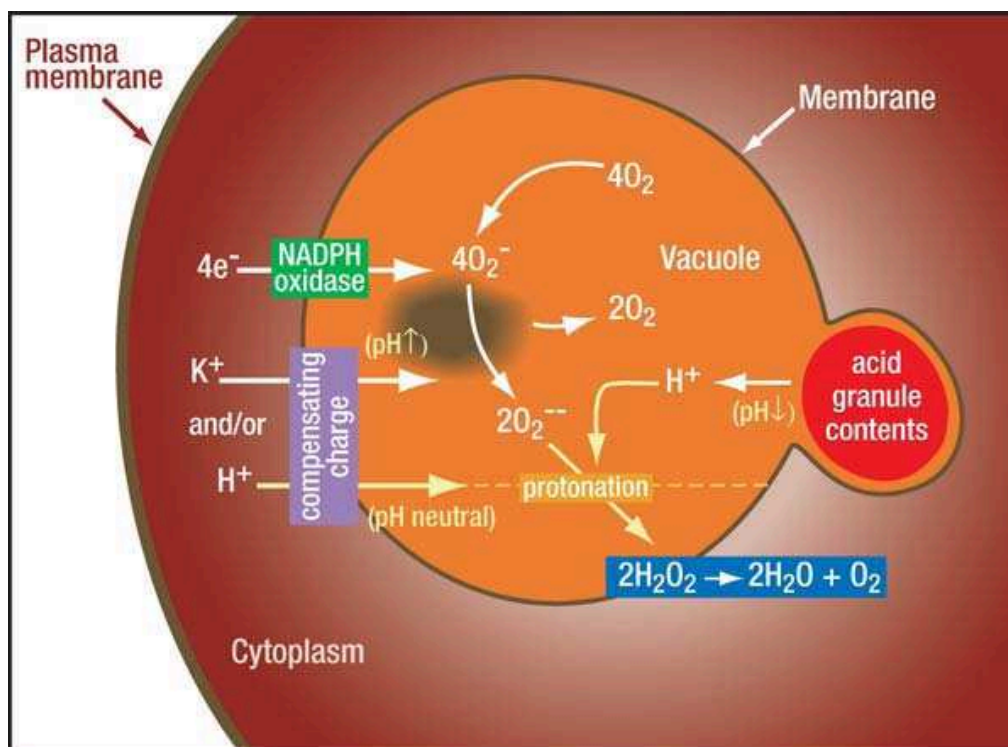


Figure 20 : Organisation du phagolysosome et fonctionnement de la NADPH oxydase (Segal, 2005). L'activité NADPH oxydase dépolairise la membrane. L'entrée des charges compensatoires permet de modifier le pH et la force ionique. Les électrons sont transportés au travers de la membrane pour former l'ion superoxyde O_2^- , dismuté en $O_2^{\cdot-}$. Ces deux espèces ioniques sont ensuite protonées pour former de l' H_2O et de l' H_2O_2 . La NO synthase (NOS) et la myéloperoxydase (MPO) permettent la formation de espèces réactives de l'azote et d'acides halogénés, respectivement.

Les mécanismes non oxydatifs sont activés par l'acidification du phagolysosome. Le lysozyme et les hydrolases acides lysosomales telles que des estérases et des glucosidases sont des enzymes lytiques dégradant le pathogène. La famille des défensines regroupe de petites protéines cationiques de 18 à 45 acides aminés, riches en cystéines et qui permettent de former des pores perméables aux ions dans la membrane des pathogènes ce qui induit leur dégradation par rupture de l'homéostasie cytoplasmique.

En plus de l'activation des mécanismes anti-*Candida*, la phagocytose permet d'induire la sécrétion de cytokines pour le déclenchement d'une réponse inflammatoire. Le $TNF\alpha$ induit la mort des cellules environnantes, l'IL-1 permet d'activer les cellules T_H (lymphocyte T helper), la sécrétion de facteurs du complément et d'enzymes lysosomales permettent d'induire une réponse pro-inflammatoire. Les macrophages activés sécrètent également de l'IL-6 et du GM-CSF (Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor) qui vont stimuler l'hématopoïèse et organiser la réponse immune au site d'infection.

Plusieurs travaux portant sur l'interaction des macrophages avec *C. albicans in vitro* ont montré une relative inefficacité de ces cellules phagocytaires à éliminer les levures (Mansour *et al.*, 2002 ; Prigneau *et al.*, 2003 ; Fradin *et al.*, 2005 ; Urban *et al.*, 2006). Après phagocytose macrophagique, des gènes de la levure codant pour les superoxydes dismutases, la catalase, la glutathion peroxydase sont surexprimés et permettent de contrer les mécanismes oxydatifs produits dans les phagolysosomes (

Figure 21). L'importance des superoxyde dismutases dans la virulence et la persistance de *Candida albicans* a d'ailleurs été montrée par l'hypovirulence de souches déficientes pour Sod1p et Sod5p dans des modèles murins (Martchenko *et al.*, 2004). Des études de transcriptomique à l'aide de miroarrays de *C. albicans* ont permis d'analyser le profil transcriptionnel des levures internalisées par les macrophages humains. La levure est alors exposée à une carence nutritionnelle. Il y a une diminution de la synthèse protéique, activation des voies de biosynthèse de la méthionine et de l'arginine, inhibition de la glycolyse au profit d'autres sources de carbone via la β -oxydation et le cycle du glyoxylate et activation de la réponse au stress oxydatif (Prigneau *et al.*, 2003 ; Lorenz *et al.*, 2004). En plus de ces réponses au stress intramacrophagique, Ibata-Ombetta *et al.* ont montré que les phospholipomannanes de la paroi fongique étaient capables d'induire l'apoptose des macrophages (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003). L'ensemble de ces réponses de *C. albicans* à la phagocytose macrophagique permet au pathogène de résister à la phagolyse mais également de continuer de croître puisque les levures intramacrophagiques sont capables d'entamer une transition morphogénétique aboutissant à la formation d'un filament qui perce la cellule phagocytaire. Ainsi, les macrophages permettent de reconnaître la présence des *Candida* en tant que pathogènes, ils les phagocytent, induisent et organisent la réponse inflammatoire mais ne semble pas efficaces pour l'élimination du pathogène à eux seuls.

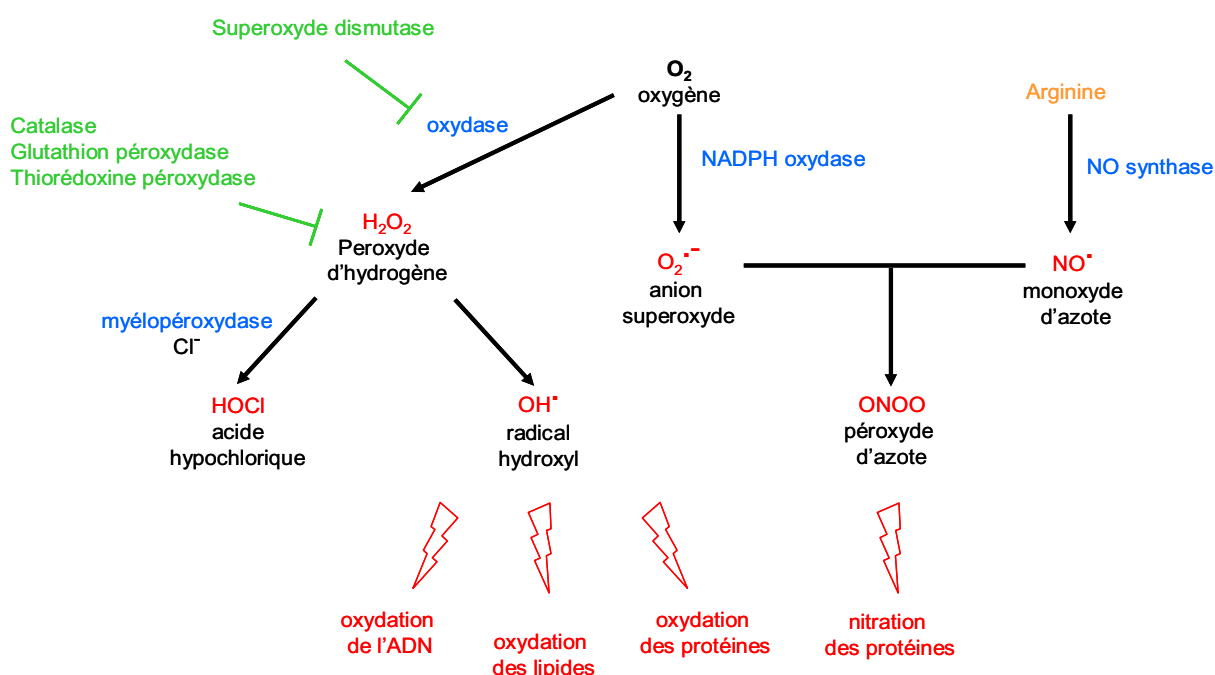


Figure 21 : Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (d'après (Favier, 2006)). Les espèces réactives et leurs effets sont représentés en rouge, les enzymes intervenant dans leur synthèse en bleu et les mécanismes fongiques contrant les attaques oxydatives en vert.

2.2.2. Les granulocytes neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules myéloïdes à courte durée de vie et circulant dans le sang. Leur noyau est polylobé et leur cytoplasme contient un grand nombre de granules. Le rôle de ces cellules phagocytaires est d'éliminer la présence de pathogènes dans le sang mais également au cours d'infections tissulaires. En effet, les neutrophiles sont recrutés au niveau

tissulaire grâce aux cytokines pro-inflammatoires qui induisent leur adhérence aux cellules épithéliales et leur migration. Les neutrophiles sont décrits comme des cellules phagocytaires plus efficaces que les macrophages dans l'élimination des pathogènes mais leur implication conduit souvent également à leur propre mort. Ils produisent un « burst oxydatif » plus important et leur cytoplasme contient différents granules composés de substances anti-microbiennes plus variées et agressives que les lysosomes macrophagiques.

Les principaux récepteurs impliqués dans la reconnaissance des *Candida* par les neutrophiles sont le TLR2 et le TLR4 qui vont permettre d'orienter le devenir de la réponse immune par la sécrétion de cytokines, les récepteurs Dectine-1 et Dectine-2 qui induisent la phagocytose et la production de cytokines et le CR3 qui active la phagocytose (**Figure 19**).

De la même manière que pour les macrophages, la reconnaissance et l'internalisation des pathogènes déclenchent les mécanismes anti-*Candida* oxygène-dépendants ou -indépendants des neutrophiles.

Les mécanismes oxygène-dépendants sont les mêmes que ceux décrits dans le macrophage (**Figure 21** et Erreur ! Source du renvoi introuvable. **21**). Cependant, l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles est largement supérieure. Des pathologies telles que la CGD (Chronic Granulomatous Disease), dans laquelle les neutrophiles sont déficients en NADPH oxydase et pour lesquelles on observe une plus grande sensibilité aux infections opportunistes, illustrent l'importance de ce complexe oxydatif dans la réponse défensive de ces phagocytes (Segal, 2005). Ce complexe permet la formation d' O_2^{2-} qui est à l'origine de la production d' OH^- , d' H_2O_2 et d' $HOCl$ par la myéloperoxydase. Les neutrophiles produisent également des espèces réactives de l'azote grâce à la NO synthase, ce qui aboutit à la formation de OH^- et de NO_2^- . En plus de ce « burst oxydatif » plus efficace que dans les macrophages, les mécanismes non oxydatifs contenus dans les granules des neutrophiles sont aussi plus toxiques.

Les granules azurophiles sont larges et denses, proches des lysosomes et contiennent la myéloperoxydase qui participe au « burst oxydatif » ainsi que les protéases agissant à pH neutre, cathepsine G, protéinase 3 et élastase. Ces granules sont les premiers à fusionner avec le phagosome. Les granules secondaires sont spécifiques des neutrophiles. Ils contiennent la lactoferrine (liant et séquestrant le fer et le cuivre), de la transcobalamine (liant la cyanocobalamine) et du lysozyme. L'importance de l'arsenal des neutrophiles a été montrée par des études utilisant des modèles murins de candidémie à *C. albicans*. Des souris déficientes pour la cathepsine G et/ou l'élastase présentent une mortalité plus élevée après infection par *C. albicans* (Reeves *et al.*, 2002). L'inactivation de la MPO des phagocytes entraîne également un développement plus rapide des candidoses disséminées et une mortalité plus élevée des souris (Aratani *et al.*, 1999).

En plus des mécanismes oxygène-dépendants ou -indépendants permettant la lyse intracellulaire des pathogènes, les granulocytes neutrophiles sont capables d'attaquer les pathogènes sans phagocytose. Ils sont capables de former des filets extracellulaires anti-microbiens nommés NETs (Neutrophil Extracellular Traps) (**Figure 22**) (Brinkmann *et al.*, 2004). Les NETs sont composés de chromatine, ayant une action anti-microbienne et formant le filet, et du contenu des granules des neutrophiles qui exercent leur activité lytique à l'extérieur de la cellule. *In vitro* et sans opsonisation, la présence de *C. albicans* sous forme levure ou filament est suffisante à induire la formation de NETs par des neutrophiles humains purifiés (Urban *et al.*, 2006). Ces NETs sont capables de tuer *C. albicans*. L'action des histones, déjà décrites comme bactéricides (Hirsch, 1958), semble inefficace contre les levures (Urban *et al.*, 2006). L'effet candidicide des NETs est donc plutôt attribué au contenu des granules (Urban *et al.*, 2006). Des travaux récents ont permis d'analyser le contenu

protéique des NETs et ont mis en évidence la présence de calprotectine ayant une action antifongique dans les NETs (Urban *et al.*, 2009). Les mécanismes de formation des NETs semblent indissociables du déclenchement du « burst oxydatif » puisque les neutrophiles de souris déficientes pour la NADPH oxydase sont incapables de former des NETs (Ermert *et al.*, 2009). Ce mécanisme extracellulaire de lutte contre le pathogène semble être un moyen efficace pour la destruction des levures. Cependant, la formation des NETs semble être un ultime recours puisque la libération du contenu cytoplasmique et l'expulsion de la chromatine est un système particulier de mort programmée.

L'arsenal anti-microbien des neutrophiles est donc plus efficace pour l'élimination des levures. En effet, plusieurs études utilisant des modèles murins de candidémie ou portant sur l'analyse de l'interaction entre les levures et les neutrophiles ont démontré l'efficacité et la nécessité de ces cellules dans l'élimination des *Candida* (Fradin *et al.*, 2005 ; Netea *et al.*, 2008). Les travaux de Fradin *et al.* comparant le profil transcriptionnel de *C. albicans* en présence de sang total ou de différents éléments figurés du sang (érythrocytes, polynucléaires ou monocytes) montrent que ce sont les neutrophiles qui dominent la réponse transcriptionnelle de la levure dans le sang (Fradin *et al.*, 2005). En présence des neutrophiles, le profil transcriptionnel de *C. albicans* correspond à une réponse à la carence nutritionnelle en acides aminés et à un stress oxydatif. Les analyses de survie et de morphologie, réalisées avec les mêmes fractions sanguines, montrent également que seule la fraction correspondant aux neutrophiles purifiés inhibe la filamentation de *C. albicans* et réduit significativement la survie des levures.

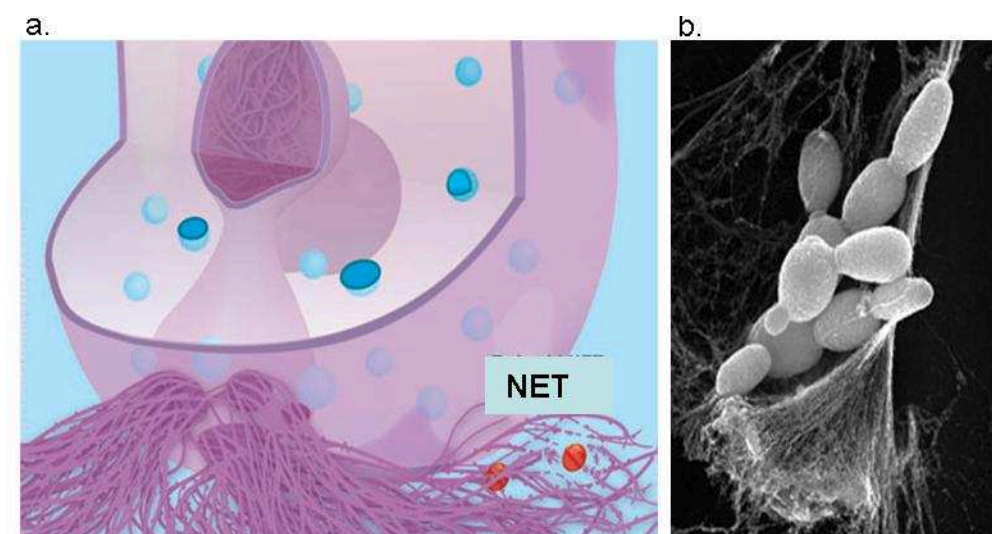


Figure 22 : NETs, Neutrophil Extracellular Traps (Urban *et al.*, 2006). (a.) Représentation schématique de levures (en rouge) capturées par un NET constitué de chromatine et du contenu des granules cytoplasmiques du neutrophile. (b.) Photo de microscopie électronique d'un NET piégeant des levures.

Conclusion

L'identification des mécanismes de virulence des *Candida* ou de défense de l'hôte nécessite d'avoir accès à une analyse qualitative et quantitative des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de l'interaction entre les levures et les phagocytes. Les modèles *in vitro* déjà décrits ont permis de caractériser les récepteurs de l'immunité innée permettant la reconnaissance des *Candida* et la réponse anti-*Candida* qu'ils entraînent. Du point de vue des levures, les travaux menés jusqu'à présent portent principalement sur une analyse globale du transcriptome de *C. albicans* ou sur la caractérisation de mutants de gènes cibles. La première partie des travaux présentés dans cette thèse porte sur la mise au point d'un modèle *in vitro* d'infection des macrophages ou des neutrophiles par les *Candida*. Ce modèle expérimental permet d'obtenir une analyse qualitative et quantitative de l'interaction au cours du temps. L'utilisation de ce modèle a permis de comparer la virulence de *C. albicans*, *C. lusitaniae* et *C. glabrata*, trois espèces de *Candida* aux caractéristiques morphogénétiques différentes. La deuxième partie de cette thèse porte sur la construction de mutants chez le principal modèle biologique du laboratoire, *C. lusitaniae*. Cette partie décrit la mise au point d'outils de biologie moléculaire pour l'inactivation complète de gènes cibles chez *C. lusitaniae* et la construction d'une banque de mutants aléatoires étiquetés chez cette même espèce. L'objectif à terme est de cribler des mutants de gènes spécifiques et de cribler la banque de mutants étiquetés afin d'identifier de nouveaux gènes et de nouvelles voies de signalisation fongiques impliquées dans l'interaction *Candida* - phagocytes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tableau 3 : Souches de *C. lusitaniae* utilisées au cours de ce travail.

Nom	Génotype	Description	Origine / Référence
6936	<i>MATa, URA3, LEU2, OLE1, OLE2</i>	Sauvage	CBS (Centraal Bureau voor Schimmelcultures)
5094	<i>MATa, URA3, LEU2, OLE1, OLE2</i>	Sauvage	CBS (Centraal Bureau voor Schimmelcultures)
<i>ura3Δ360</i>	<i>MATa, ura3Δ360, LEU2, OLE1, OLE2</i>	Auxotrophe pour l'uracile	T. Noël
<i>ura3Δ990</i>	<i>MATa, ura3Δ990, LEU2, OLE1, OLE2</i>	Auxotrophe pour l'uracile	Ce travail
<i>ura3Δ360, leu2Δ::URA3</i>	<i>MATa, ura3Δ360, leu2Δ::URA3, OLE1, OLE2</i>	Auxotrophe pour la leucine	Ce travail
<i>ura3Δ360, leu2Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ360, leu2Δ, OLE1, OLE2</i>	Auxotrophe pour la leucine et l'uracile	Ce travail
<i>ura3Δ990, leu2Δ::URA3</i>	<i>MATa, ura3Δ990, leu2Δ::URA3, OLE1, OLE2</i>	Auxotrophe pour la leucine	Ce travail
<i>ura3Δ990, leu2Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ990, leu2Δ, OLE1, OLE2</i>	Auxotrophe pour la leucine et l'uracile	Ce travail
<i>ole2Δ</i>	<i>MATa, ura3Δ360, LEU2, OLE1, ole2Δ::URA3</i>	Voir Résultats (partie 2)	Ce travail

1. Matériel biologique

1.1. Levures

1.1.1. *Candida lusitaniae*

Deux souches de référence de *C. lusitaniae* ont été utilisées au cours de ce travail (**Tableau 3**): la souche 6936 *MAT α* et la souche 5094 *MAT α* , provenant du CBS (Centraal Bureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, Pays-Bas).

Les souches auxotrophes pour l'uracile 6936 *ura3 Δ 360* et 6936 *ura3 Δ 990* obtenues au cours de ce travail, ont été utilisées pour les expériences de transformation génétique. Quelle que soit la mutation, elle entraîne une inactivation de l'enzyme orotidine-5'-monophosphate décarboxylase codée par le gène *URA3*.

Les mutants obtenus au cours de ce travail sont décrits dans le **Tableau 3**. Ces mutants et la souche sauvage 6936 ont été utilisés pour les caractérisations phénotypiques et l'infection des phagocytes.

1.1.2. *Candida albicans* et *Candida glabrata*

La souche de référence SC5314 de *C. albicans* et la souche ATCC 90030 de *C. glabrata* provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection) ont été utilisées au cours de ce travail pour l'infection des phagocytes.

1.2. Bactéries

La souche XL1-Blue d'*Escherichia coli* [*F'* ::*Tn10 proA+B+ lacIq Δ (lacZ)MI5 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (rk-mk+) glnV44 relA1 lac*] a été utilisée pour les expériences de clonage.

1.3. Cellules mammifères

1.3.1. Macrophages

Les macrophages murins de la lignée tumorale J774.1 (ATCC TIB-67) issus de souris BALB/C ont été utilisés dans le cadre des infections par les levures.

1.3.2. Neutrophiles (Polymorphonucléaires, PMN)

Les neutrophiles d'origine humaine utilisés pour les infections par les levures ont été purifiés à partir de couches leucoplaquetaires de donneurs sains obtenues auprès de l'EFSAL (Établissement Français du Sang Aquitaine Limousin) (Dooley *et al.*, 1982).

Pour la purification des PMN, 15 ml de tampon de dilution (9.6 mM glucose, 3 mM KCl, 100 mM NaCl, 30 mM Citrate trisodique, 2 mM EDTA) et 5 ml de Dextran (6% m/v Dextran T500), en solution dans du tampon PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄, pH 7,4), sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ pour éviter l'activation des neutrophiles, sont ajoutés à 30 ml de résidu leucoplaquetaire. Le tube incliné à 45° est incubé 30 min à température ambiante pour la sédimentation des hématies. Le surnageant blanchâtre est récupéré

délicatement et centrifugé à 300 g, 20 min. Le culot cellulaire est repris dans 2 ml de tampon de lyse (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EGTA) en évitant la formation de bulles qui activent les neutrophiles, puis incubé 5 min dans la glace pour la lyse des hématies restantes. La lyse est stoppée par ajout de 8 ml de PBS et les cellules sont centrifugées à 300 g, 10 min. Le surnageant rosé est éliminé et le culot de leucocytes est repris dans 6 ml de PBS avant d'être déposé sur un gradient de Percoll (1.075/1.095). Le gradient se fait dans des tubes de 15ml, en déposant d'abord 3 ml de Percoll de densité 1.075 (52.8% v/v Percoll pur, PBS) puis en ajoutant délicatement au fond du tube, à l'aide d'une seringue, 3 ml de Percoll de densité 1.095 (69.1% v/v Percoll pur, PBS). Après dépôt de 3 ml de suspension de leucocytes sur le gradient, la séparation des cellules est faite par centrifugation à 3000 g, 20 min, 4°C sans accélération ni frein.

L'anneau correspondant aux PMN situé à l'interface des deux densités de Percoll est récupéré à la pipette et les cellules sont lavées deux fois par 10 ml de PBS et une fois par 10 ml de cRPMI 0.5x puis centrifugées à 300 g, 5 min. Après resuspension dans le milieu complet cRPMI, les cellules sont dénombrées à l'hématimètre de Malassez et un frottis est réalisé pour estimer la pureté par coloration de May-Grünwald Giemsa (3 min dans la solution de May-Grünwald pur, 2 min dans du PBS, 10 min dans la solution de Giemsa diluée au 1/10^{ème} et un rinçage dans du PBS avant séchage).

1.4. Vecteurs plasmidiques

Plasmide commercial pGEM-T (Proméga) (3000 pb) : ce plasmide porte le gène *Bla* (codant pour une β -lactamase), le gène *lacZ* (codant pour la β -galactosidase) au milieu duquel se situe le multi-site de clonage, et une origine de réplication fonctionnelle chez *E. coli*. Ce vecteur permet le clonage des fragments PCR grâce à ses extrémités thymine, compatibles avec les extrémités adénine des produits de PCR. La sélection des clones recombinants est réalisée sur milieu supplémenté en ampicilline et en X-gal (milieu LAX, crible visuel blanc/bleu).

Plasmide pGUNv2 (4436 pb) : plasmide construit sur la base du plasmide pGEM-T dans lequel a été cloné le fragment GUN, composé du gène *URA3* (1436 pb) de *C. lusitaniae*, codant pour l'orotidine-5'-phosphate décarboxylase de la voie de biosynthèse de l'uridine (Francois *et al.*, 2004 ; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

1.5. Oligonucléotides

Différents oligonucléotides ont été employés comme amorces pour des réactions de PCR (**Tableau 4**). Leur séquence comprend le cas échéant un site de restriction reconnu par une endonucléase. Ils ont été synthétisés par MWG Biotech.

Tableau 4 : Amorces nucléotidiques utilisées au cours de ce travail.

Amorce	Séquence (5' vers 3') *	Utilisée pour l'amplification de
Fura	AAAGCATGCCTCTCCCGTGG	Sonde URA3
Rura	GACGACCTCCTGAACTGTCC	
Fleu	GCAACAGCTGATCCATCAACG	Sonde LEU2
Rleu	GTAGAAGACATTTTGGTTTGCAG	
FMtCP	CGCACGAAGCCTTATATGCC	Sonde MtCP
RMtCP	GTCCTCGCAGCATTGGGTCG	
Fole	AATCCCAAACAGCCTTGTTC	Sonde OLE2
Role	GATATATAAGACCGTGCACCC	
5URA	CCCGTTGATGGCAGAGTTG	Marqueur de selection URA3
3URA	ATGACATTCTCCATTCAAATGC	
FUpLEU2	ATTCCATCGAGTGGAGCGG	LEU2 amont
RUpLEU2URA	tatggaaaacatcatccttcaccaactctgcatcaacgggGTAGAAGACATTGTGGTTTGC	
FDownLEU2URA	aataaataattgtgtttgccaagcatttgaatggagaatgcatCCAGGAGGTGGGTCTG GC	LEU2 aval
RDownLEU2	TTTTTCATGTTTCTTCACCATCC	
NFUpLEU2	ACTTTTGTCTACCTTCAACTTCC	PCR nichée
NRDownLEU2	ATTGTATTGCAGATTAAGAGAGC	
FDownUpLEU2	tcaccgtttcgccaaatctgcaaacacaatgtcttctacCCAGGAGGTGGGTCTGGC	LEU2
RUpLEU2	GTAGAAGACATTGTGGTTTGC	
F1	ACCATTGTCCCTCTTTTGG	Fragment URA3
R1	TCTTTACCGCCCATGTCCG	
F2	GACGACTTCTCGTACGAAGG	Fragment URA3
R2	CCAACCAGTCAAACCTTCG	
F3	TAAAGACACACATTGACATC	Fragment URA3
R3	ACCAACACCTGGGGTCATC	
F4	GGTCCTTTCATATGCCTCG	Fragment URA3
R4	GCGTCTCCTTTATCGTCAAG	
F5	GAATTCTTGGCTCTCATAGAC	Fragment URA3
R5	TGTCCGGTACTGTTGTCCC	
F6	CTGTTGATGTTTCAACTACTGC	Fragment URA3
R6	GTCGGTACCTGTCGAGACG	
F7	AGAAACTTACACTCAGAGGGC	Fragment URA3
R7	GCACATCTCTCCGTGTAAGC	
F8	AGCAAATAAAGAACACCCC	Fragment URA3
R8	TCCCGCTTCGATTACTTGG	
FoutLEU2	GATGGTGCAGGAGGGTATCG	Criblage des mutants <i>leu2</i>
RmidURA3	ATGCCTCTGCAAGTGAAGTG	
5OLE1NcoI	<u>CATGCCATGGGGT</u> CGATT TGACCTCGC TC	Coeur de gene OLE1
3OLE1SacII	<u>TCCCCGCGGAACATCCAGCCC</u> ATGTGCG	
5AmOLE2	CCATAAATAAATGTCGCACAGC	OLE2 amont
3AmOLE2URA3	tatggaaaacatcatccttcaccaactctgcatcaacgggCGAACTCGAACACCAGATGC	
5AvOLE2URA3	taatttgtgtttgccaagcatttgaatggagaatgcatGAAGACAGCTGAAGCAGCG	OLE2 aval
3AvOLE2	GCGAGCACGCTGACTAAACC	

* Les séquences en minuscules représentent les 40 nt d'homologie pour la fusion avec le marqueur de sélection par PCR chevauchante. Les séquences soulignées contiennent les sites de restriction pour les enzymes dont le nom est spécifié dans le nom de l'amorce.

1.6. Milieux et conditions de culture

1.6.1. Culture de levures

Les milieux de culture :

- milieu complet YPD : Yeast extract 1% (m/v), bacto-peptone 2% (m/v), D-glucose 2% (m/v).
- milieu minimum YNB : Yeast Nitrogen Base (YNB Difco) w/o amino acids (sans acides aminés) 0,76% (m/v), D-glucose 2% (m/v), sulfate d'ammonium 0,5% (m/v).
- milieu YNB oléate : milieu YNB dans lequel le D-glucose est remplacé par de l'oléate 2% (v/v).
- milieu 5-FOA : milieu YNB auquel a été rajouté après autoclave 1 g/L d'acide 5-fluoro-orotic, utilisé pour la sélection des souches auxotrophes Ura⁻.

Les milieux sont supplémentés en uracile (50 µg/ml) selon nécessité. Les milieux solides sont obtenus par ajout d'agar 2% (m/v). La stérilisation se fait par autoclavage à 110°C, 30 min.

Les conditions de culture :

Pour la culture en milieu solide, une colonie est prélevée sur une boîte de Pétri à l'aide d'une anse stérile puis les cellules sont étalées sur le milieu approprié en stries. La même opération peut être réalisée avec des souches issues de milieux liquides de stockage (-80°C). Les cultures sont incubées à 30°C pendant 3 jours.

La culture en milieu liquide se fait dans des Erlenmeyers stériles en s'assurant que le volume de milieu soit au moins 5 fois inférieur au volume de l'Erlenmeyer afin de maintenir l'aérobiose. Les cultures standard sont réalisées à 30°C et sous agitation constante à 200 rpm.

1.6.2. Culture de bactéries

Les milieux de culture :

- milieu complet LB (Luria Bertani) : Yeast extract 0,5% (m/v), tryptone 1% (m/v), NaCl 0,5% (m/v), pH 7,5.
- milieu SOC : Bacto-Yeast extract 0,5%, Bacto-tryptone 2%, D-glucose 0,36%, NaCl 5M, KCl 0,19 g/L, MgCl₂ 1M, MgSO₄ 4M. Ce milieu de culture est utilisé pour une meilleure efficacité de transformation.
- milieu LAX : milieu LB dans lequel l'antibiotique ampicilline (AMP) à 50 µg/ml final, de l'isopropyl-thio-galactoside (IPTG, 1mM) et du bromo-chloro-indolyl-galactoside (X-gal, 40µg/ml) sont ajoutés après stérilisation.

Les milieux solides sont obtenus par ajout d'agar 2% (m/v). La stérilisation se fait par autoclavage à 120°C, 20 min.

Les conditions de culture d'*E. coli* :

Les bactéries sont cultivées à 37°C sur milieu solide et avec agitation à 200 rpm en milieu liquide.

1.6.3. Culture des macrophages

Les cellules sont entretenues, en conditions stériles, dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Glucose 4,5 g/L, Gibco) supplémenté en sérum de veau fœtal à 10% (SVF décomplémenté, Gibco), en pyruvate de sodium (1 mM) et en antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine à 100 µg/ml).

La culture est réalisée dans des flasques Falcon de 25 ou 75 cm², à bouchon ventilé, placées en atmosphère humide dans un incubateur à la température de 37°C et à une concentration en

CO₂ de 5%. Le milieu est remplacé tous les deux jours afin de renouveler les nutriments consommés et d'éliminer les cellules mortes.

Pour les infections par les levures, les macrophages sont récoltés à l'aide d'un râteau stérile (Cell scraper Corning Incorporated) puis resuspendu à la concentration voulue dans du milieu RPMI 1640 (Sigma) sans rouge phénol, complétement en pyruvate de sodium (1 mM), en antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine à 100 µg/ml) et en NaHCO₃ (2 g/L), pH 7,4 et supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (milieu cRPMI) ou ne contenant pas de sérum (milieu RPMI).

1.7. Détermination du nombre de cellules

La croissance des levures est suivie par la mesure de la densité optique (DO) des cultures à 600 nm. La correspondance entre une unité d'absorbance et la concentration cellulaire a été déterminée pour chaque espèce de levure :

- *C. lusitaniae*, souche 6936 : 1 unité DO ↔ 1.7 x 10⁷ CFU/ml.
- *C. albicans*, souche SC5314 : 1 unité DO ↔ 0.7x 10⁷ CFU /ml.
- *C. glabrata*, souche ATCC 90030 : 1 unité DO ↔ 2.3 x 10⁷ CFU /ml.

Les macrophages ainsi que les neutrophiles sont comptés sur hématimètre de Malassez.

1.8. Stockage et conservation des souches en milieu liquide

Les souches bactériennes et les différentes souches des trois espèces de *Candida* sont stockées à forte densité cellulaire dans du glycérol 10% à -80°C.

Pour la lignée de macrophages J774.1, une flasque de 75 cm² à confluence est entièrement récoltée pour constituer trois tubes de collection de 1 ml. Le milieu utilisé pour la collection est le DMEM, supplémenté en SVF (15% final) et en diméthyl sulfoxyde (DMSO 1%). Les tubes sont congelés à - 80°C pendant 48h puis placés dans l'azote liquide. La remise en culture se fait dans une flasque de 25 cm², après décongélation rapide des tubes à 37°C.

2. Techniques de biologie moléculaire

2.1. Extraction et purification des acides nucléiques

2.1.1. ADN génomique de levure

Miniprep : 1,5 ml de culture stationnaire de levures sont centrifugés 5 min à 2800 g. Le culot obtenu est rincé par 1 ml d'eau stérile avant de recentrifuger les cellules et de reprendre le culot dans 300 µl de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% Triton X-100 et 1% SDS). Environ 250 µl de billes de verre stériles (diamètre 0,5 mm) et 250 µl d'une solution de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) sont ajoutés avant d'agiter vigoureusement au vortex pendant 3 min. L'émulsion obtenue est centrifugée pendant 5 min à 19000 g. La phase aqueuse supérieure est prélevée puis additionnée de deux volumes d'éthanol absolu, 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) avant centrifugation 20 min, 19000 g à 4°C. Le culot d'ADN est lavé par 1 ml d'éthanol 70% avant recentrifugation et séchage du culot. Ce culot d'ADN purifié est repris dans 100 µl d'eau milliQ stérile contenant 50 µg/ml de RNase A.

Maxiprep : 50 ml d'une phase stationnaire d'une culture de levures sont centrifugés 5 min à 2800 g. Le culot obtenu est traité pendant 1h à 37°C par du tampon sphéroplaste (0,1 M phosphate de sodium pH 6,5, 1 M sorbitol et extemporanément 1% de β -mercaptoéthanol et 10 mg/ml de zymolyase). Les sphéroplastes obtenus sont centrifugés 15 min, 4500 g, 4°C puis lysés dans 5 ml de solution ES (25 mM EDTA, 2% SDS) pendant 30 min à 65°C. Un volume de phénol: chloroforme : alcool isoamylique (25 :24 :1) est ajouté au lysat. L'émulsion est centrifugée à 4500 g pendant 5 min et un volume de chloroforme : alcool isoamylique (24 :1) est ajouté avant centrifugation. La phase aqueuse est ensuite mélangée à 1/10 de volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) puis à deux volumes d'éthanol absolu, avant centrifugation 20 min, 19000 g à 4°C. Le culot d'ADN est lavé deux fois par de l'éthanol 70% puis le culot sec est repris dans 500 μ l d'eau milliQ stérile contenant 50 μ g/ml de RNase A.

2.1.2. ADN plasmidique d'*E. coli*

Miniprep : 1,5 ml de culture stationnaire de bactéries cultivés dans du LB-AMP sont centrifugés 5 min à 2800 g. Le culot bactérien est repris dans 300 μ L de tampon de lyse STET (NaCl 0,1 M ; Tris-HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM; Triton X-100 5%) contenant 5 μ L de lysosyme à 50 mg/ml. La suspension cellulaire est lysée à 100°C (2 min) puis centrifugée (16000 g, 5 min). L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est ensuite purifié à l'aide de 200 μ l de matrice (Miniprep Express Matrix[®]). Après centrifugation et rinçage à l'éthanol à 70%, la résine séchée est remise en suspension dans 75 μ l de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). L'ADN plasmidique élué est récupéré dans le surnageant après une dernière centrifugation.

Midiprep : Cette méthode de lyse alcaline permet d'obtenir une plus grande quantité de matériel que la technique de miniprep. Elle a été utilisée pour l'obtention de plasmides recombinants destinés à transformer les levures. L'ADN plasmidique est extrait à partir de 50 mL de culture bactérienne en milieu LB-AMP à l'aide du kit Qiagen[®] Plasmid Midi Kit et selon les recommandations du fabricant.

2.2. Dosage des acides nucléiques

La quantification est réalisée par dosage au spectrophotomètre BioPhotometer plus (Eppendorf) à la longueur d'onde de 260 nm. Les échantillons dilués dans de l'eau distillée sont analysés dans des cuves UVette[®] (Eppendorf). Les quantités d'ADN sont déterminées par le calcul suivant la relation qui lie la densité optique à la concentration en ADN : 1 unité de DO à 260 nm correspond à 50 μ g/ml d'ADN double brin. L'absence de contamination par des protéines est estimée par la lecture de l'absorbance à 280 nm. Le rapport $A_{(260 \text{ nm})}$ sur $A_{(280 \text{ nm})}$ doit être compris entre 1.7 et 2 pour une préparation optimale.

2.3. Amplification de séquences d'ADN génomique par PCR

Des réactions de PCR ont été pratiquées pour sélectionner les transformants d'intérêt mais également permettre les constructions plasmidiques. L'amplification des séquences génomiques contenant les régions codantes ou une partie des gènes *OLE1*, *OLE2*, *LEU2* et *URA3* a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de chaque séquence (**Tableau 4**).

Les amplifications ont été réalisées selon les cas avec une des trois enzymes Taq ADN polymérase suivantes :

- La Hot Star[®] Taq polymérase (Qiagen) pour la vérification des clonages et le criblage de mutants. Cette enzyme possède une activité terminale A transférase qui ajoute une adénine en 3' des produits de PCR.
- La Hot Star[®] Taq HiFidelity polymérase (Qiagen) pour l'amplification haute fidélité des fragments à cloner. Cette enzyme possède également une activité terminale A transférase.
- La Pfu turbo[®] (Stratagene) pour l'amplification haute fidélité produisant des fragments d'ADN bouts francs utilisés pour les PCR chevauchantes.

Toutes les PCR ont été réalisées dans un thermocycler Eppendorf Mastercycler[®] Gradient. Les mélanges réactionnels (50µl) et les programmes d'amplifications utilisés sont décrits dans le

Tableau 5. La quantité d'ADN matrice est de 50 ng pour l'ADN génomique et 5 ng pour l'ADN plasmidique.

Les produits PCR obtenus sont purifiés sur résine d'exclusion Sephacryl[™] S300, et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Tableau 5 : Mélanges réactionnels et paramètres de l'amplification par PCR.

	HotStar	HotStar HiFidelity	Pfu turbo
Mélange réactionnel (50µl)	5µl tampon 10x 800µM dNTP mix 0.5µM amorce 1 0.5µM amorce 2 2.5 u Taq ADN	10µl tampon (dNTP+) 5x 1µM amorce 1 1µM amorce 2 2.5 u Taq ADN	5µl tampon 800µM dNTP mix 0.5µM amorce 1 0.5µM amorce 2 2.5 u Taq ADN
Paramètres	95°C, 15min 95°C, 30 sec Tm-5°C, 30sec 72°C, 1min/kpb 72°C, 10min } 30 cycles	95°C, 5min 94°C, 15 sec Tm-5°C, 1min 72°C, 1min/kpb 72°C, 10min } 30 cycles	95°C, 3min 95°C, 30 sec Tm-5°C, 30sec 72°C, 1min/kpb 72°C, 10min } 30 cycles

2.4. Séquençage nucléotidique

Il est réalisé selon le protocole du kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction[®] v1.1 (Applied Biosystems) à partir d'ADN plasmidique (300 à 600 ng) ou de produits de PCR purifiés (100 ng). L'amplification linéaire de séquençage comprend 30 cycles (10 s à 96°C ; 5 s à 50°C ; 4 min à 60°C). Les sels ainsi que les dNTP et les ddNTP non incorporés sont éliminés par précipitation de l'ADN à l'éthanol absolu, suivie d'un lavage à l'éthanol 70%. Le séquençage est réalisé par le plateau de Génotypage-Séquençage de Bordeaux 2. Les chromatogrammes sont récupérés via un serveur FTP et analysés par bioinformatique.

2.5. Digestions enzymatiques

Les digestions de l'ADN par les endonucléases de restriction ont été effectuées à une température dépendante de l'enzyme pendant 1 heure. Le milieu réactionnel de 10 µl contient le tampon fourni avec l'enzyme, 1 µg de l'ADN à digérer, 0,5 µl d'enzyme (10 u/µl) et 10 µg/ml de BSA (Albumine sérique de bovin) le cas échéant. Les doubles digestions ont préférentiellement été réalisées de façon simultanée (dans les conditions pour lesquelles l'activité des deux enzymes était optimale).

2.6. Techniques de clonage

Purification sur gel d'agarose : avant clonage, certains fragments d'ADN séparés par migration dans un gel d'agarose (1,3% m/v agarose, 1 µg/L de BET) ont été purifiés à l'aide du kit QIAEX[®] (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Ligation : Après purification sur résine S300 ou sur gel d'électrophorèse, les ligations des fragments d'ADN dans le vecteur adéquat ont été réalisées à 16°C pendant 16h dans un volume final de 10 µl contenant 50 ng de vecteur linéaire, les inserts d'ADN, 1 µl de T4 DNA ligase Proméga[®] et 1 µl de tampon de la ligase.

Transformation génétique des bactéries par choc thermique : les bactéries thermocompétentes (50 µl) sont incubées en présence du mélange de ligation (10 µl) 20 minutes dans la glace, 1 min à 42°C, puis 2 min dans la glace. Elles sont remises en suspension dans 900 µl de milieu SOC liquide préchauffé et incubées pour l'expression phénotypique (37°C, 1 heure). La suspension,ensemencée sur milieu gélosé LAX, est incubée 16 h à 37°C.

2.7. Transformation des levures

Une culture de levures est réalisée dans 5 ml de YPD à 35°C sous agitation (230 rpm) jusqu'en phase stationnaire (24 h). Les levures sont centrifugées (2500 g, 10 min, 4°C), remises en suspension dans du tampon LiDTT Sorbitol (100 mM acétate de lithium, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM Dithiothréitol, 1 M Sorbitol) et incubées 1 heure à température ambiante. Après deux lavages au sorbitol 1 M glacé, les levures sont resuspendues dans 400 µl de sorbitol 1M. A 40 µl de levures sont ajoutés 5 µl d'ADN transformant (environ 2 µg). Le mélange est placé dans des cuvettes d'électroporation d'espace interélectrodes égal à 0,2 cm. La transformation est réalisée par électroporation (1,5 kV, 200 Ω, 25 µF). Les échantillons sont dilués dans 1 ml de sorbitol 1 M puis étalés sur milieu YNB supplémenté en sorbitol 1 M (YNBS) et incubés à 30°C pendant 48 à 72 heures.

2.8. Southern Blot

Synthèse des sondes : la technique utilisée est un marquage froid à la Digoxigénine[®] (Roche). Les sondes sont élaborées par des PCR réalisées en présence de dUTP marqué à la Digoxigénine[®] (rapport DIG-dUTP/dTTP de 1/6) grâce au kit PCR DIG Probe Synthesis Kit[®] (Roche) selon les recommandations du fabricant. La réaction de synthèse est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Séparation – Hybridation – Révélation : les ADN sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (0,8%). Après dépurination, dénaturation et neutralisation du gel d'agarose, ils sont transférés sur membrane de nylon (Hybond N+[®], General Electric) par capillarité durant 16h dans du tampon 20x SSC (3 M NaCl, 300 mM citrate de sodium, pH 7). L'ADN est alors

thermofixé à la membrane (80°C pendant 2h). Après une étape de préhybridation (3h à 42°C dans du tampon DIG-Easy Hyb[®], Roche), la sonde dénaturée (5 min à 100°C puis 2 min dans la glace) est ajoutée et l'hybridation s'effectue dans un four à hybridation (16 h à 42°C). Après plusieurs lavages permettant d'éliminer les sondes non fixées en augmentant la stringence et après saturation, la membrane est mise en présence de l'anticorps anti-digoxigénine conjugué à une phosphatase alcaline (Anti-DIG AP[®], Roche). Le substrat (CSPD[®], Roche) est ajouté et l'ensemble est incubé 15 min à température ambiante. La membrane est ensuite exposée à un film (Amersham Hyperfilm ECL[®], General Electric) pendant 2 à 30 min afin de permettre la détection des hybrides par chémiluminescence.

Déshybridation des sondes : pour pouvoir réhybrider une membrane à l'aide d'une seconde sonde, il est nécessaire de décrocher la sonde fixée par deux traitements de 15 min à 37°C dans une solution de stripping (2% SDS, 0,2 M NaOH). La membrane peut ensuite être conservée humide dans du 2x SSC à 4°C pendant plusieurs mois.

2.9. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les électrophorèses ont été réalisées afin de vérifier les produits de PCR et les digestions d'ADN plasmidiques mais également pour contrôler la qualité et les quantités d'ADN purifié. Les fragments d'ADN sont séparés par migration sur gel d'agarose à 1% (m/v) dans le tampon TBE (Tris-HCl 45 mM, 45 mM borate, 1 mM EDTA, pH 8), dans un champ électrique de 110 V/h. L'ajout de bromure d'éthidium (BET) dans le gel (0,1 mg/L) permet de visualiser l'ADN par transillumination UV. Un marqueur de taille moléculaire (Gene Ruler[®] DNA ladder mix) permet également de vérifier la taille des fragments et de quantifier approximativement l'ADN déposé par comparaison de l'intensité des bandes.

2.10. Constructions moléculaires pour l'inactivation de gènes

2.10.1. Technique « cœur de gène »

Cette méthode permet d'inactiver un gène en interrompant la séquence codante par l'insertion du vecteur pGUNv2. Pour cela, le cœur de gène d'environ 500 pb et correspondant à une partie du gène cible X est amplifié avec des amorces permettant de border le produit de PCR par les sites de restriction *NcoI* et *SacII* (New England Biolabs). Ces sites ne sont pas présents dans le reste du produit de PCR. Le cœur de gène et le vecteur pGUNV2 sont ensuite digérés par les enzymes *NcoI* et *SacII* et les produits de digestion sont ligués avant transformation bactérienne. Le vecteur pGUNV2-cœur X, obtenu après criblage des clones bactériens, est linéarisé par une endonucléase ayant un site de restriction unique situé dans le cœur de gène X. Cette linéarisation du vecteur dans le cœur de gène permet d'adresser l'intégration du vecteur au locus X d'intérêt après transformation des levures *Ura⁻*.

2.10.2. Technique « PCR chevauchante »

Cette méthode basée uniquement sur la PCR permet d'obtenir une cassette de délétion d'un locus. Dans la première étape d'amplification, un produit de 1436 pb correspondant au marqueur de sélection *URA3* amplifié à partir de l'ADN génomique de *C. lusitaniae* est amplifié en parallèle de deux fragments d'au moins 500 pb correspondant respectivement aux régions amont et aval du locus X à déléter. Pour les régions amont et aval, l'une des deux amorces utilisées porte à son extrémité 5' 40 nucléotides homologues à l'une des extrémités du marqueur *URA3*. Chaque produit de PCR est purifié puis dilué à 5 ng/μl et à 0,5 ng/μl. Dans la seconde étape, le produit de PCR *URA3* et la région amont sont mixés et utilisés

comme matrice de PCR chevauchante avec les amorces externes. Un mélange réactionnel est fait pour chaque dilution (5 ng/μl et 0,5 ng/μl). Le produit de fusion de la région amont au marqueur *URA3* ainsi obtenu est purifié puis dilué comme précédemment. Ces dilutions sont ensuite mélangées avec celles du produit aval, et la cassette de délétion correspondant au marqueur *URA3* bordé par la région amont et aval du locus X est amplifiée avec les amorces les plus externes.

3. Caractérisation phénotypique

3.1. Etude de l'assimilation *in vitro* des sources de carbone

Le milieu de base est constitué de YNB (0,17% Yeast Nitrogen Base sans acides aminés (Difco), 0,5% (NH₄)₂SO₄) auquel sont ajoutés 2% de la source de carbone à étudier. Les acides gras sont liquéfiés au bain marie à 70°C. Le mélange d'émulsion (49% d'acide gras, 49% d'eau milliQ stérile, 2% de Tween spécifique de chaque acide gras) est ajouté immédiatement à du milieu YNB contenant 0,05% de rouge phénol (permettant un contraste optique avec la couleur blanche des colonies). Le milieu, homogénéisé est aussitôt coulé en boîte de Pétri.

Tests en goutte : à une absorbance de 0,5 à 600 nm, les levures sont centrifugées, lavées à l'eau stérile et 5 dilutions successives au 1/5^{ème} sont effectuées dans une microplaque. 7 μL de chacune des dilutions sont ensemencés sur les différents milieux solides à tester et incubés 5 jours à 30°C et à 37°C.

Croissance en milieu liquide : les différents milieux liquides à tester sont ensemencés au 1/100^{ème} par des précultures réalisées à 37°C en milieu liquide YNB + 2% glucose puis incubés à 37°C sous agitation. Le suivi de croissance est effectué par turbidimétrie à 600 nm.

3.2. Etude de la pseudofilamentation et de la reproduction sexuée

Les tests de pseudofilamentation sont réalisés par le dépôt d'une goutte de 5 μL de préculture sur la surface d'un milieu YCB solide (Yeast Carbon Base (Difco), 1,17% m/v). La pseudofilamentation est observée quotidiennement pendant 7 jours à la périphérie de la colonie ou entre lame et lamelle après prélèvement dans la colonie.

3.3. Mating tests et croisements génétiques

Des suspensions cellulaires de souches sexuellement compatibles sont mélangées à volume égal, et des gouttes de 5 à 10 μl sont ensemencées sur du milieu YCB. Des témoins négatifs sont constitués en déposant des gouttes de suspensions pures de chaque parent.

Un examen direct des mélanges cellulaires, entre lame et lamelle, est effectué à 24 h et à 48 h pour identifier la présence de cellules en conjugaison, d'asques ouverts et d'ascospores.

4. Infection de phagocytes

4.1. Infection de macrophages

La veille de l'infection, les macrophages sont récoltés à l'aide d'un râteau stérile, dénombrés avec un hématimètre de Malassez et mis à adhérer dans une plaque stérile de 96 puits à une concentration finale de $2 \cdot 10^5$ macrophages par puits dans du milieu cRPMI. Chaque puits est représenté en quintuplat afin d'éliminer les variations aberrantes. Les infections de macrophages sont analysées au temps 30 min, 5 h et 24 h. Une plaque de 96 puits est préparée pour chaque temps d'incubation.

Les infections sont faites en cRPMI ou en RPMI. Les levures prélevées au centre d'une colonie d'un milieu YPD sont resuspendues dans de l'eau stérile. La concentration en levures est déterminée par la mesure de la DO et est ajustée à la concentration désirée en fonction du MOI (Multiplicity Of Infection) dans du milieu d'infection contenant 5 µg/ml de CalcoFluor White (CFW).

4.1.1. Analyse de l'infection par cytométrie en flux

Cette analyse permet de déterminer le nombre de macrophages survivants au cours de l'infection ainsi que le pourcentage de macrophages associés aux levures.

Pour chaque plaque de 96 puits, plusieurs puits constituent des témoins en plus des puits contenant des macrophages infectés par des levures :

- cinq puits contiennent des macrophages seuls dans le milieu d'infection + 5 µg/ml de CFW.
- un puits contient chaque souche de levure seule dans du milieu d'infection + 5 µg/ml de CFW.

Après observation au microscope à chaque temps d'infection, les 200 µl de surnageant d'infection contenant des levures sont délicatement éliminés. La couche de cellules macrophagiques est alors lavée par 200 µl de PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, pH 7,4) stérile préchauffé (37°C). Les macrophages sont ensuite détachés par traitement avec 50 µl de trypsine-PBS (Trypsine 0,5 g/L (Sigma), NaHCO₃ 0,58 g/L, NaCl 8 g/L, KCl 0,4 g/L, Glucose 1 g/L, EDTA 0,2 g/L, PBS) pendant 20 min à 37°C et 20 min à 4°C. L'action de la trypsine est stoppée par ajout de 150 µl de milieu utilisé pour l'infection.

Les macrophages en suspension sont ensuite marqués par 0,2 µM de calcéin-AM (AcetoxyMethyl ester, Sigma) (excitation / émission : 485 / 520 nm) et par 0,2 µg d'anticorps anti-CD16-APC (AlloPhycoCyanine, Beckman Coulter) anti-souris (excitation / émission : 600 / 630 nm).

Les puits correspondant aux levures seules ne sont pas traités par la trypsine mais sont marqués de la même façon que les macrophages afin de déterminer le bruit de fond de chaque fluorochrome.

L'analyse du taux de macrophages associés aux levures et de la survie des macrophages est réalisée à l'aide du cytomètre de flux FACS CantoII (Becton Dickinson) équipé des filtres permettant la mesure de la fluorescence du CFW, de la calcéine et de l'APC. Un volume constant de 60 µl est analysé par l'appareil. Chaque population est séparée et identifiée selon sa fluorescence et les données obtenues sont analysées en utilisant le logiciel FACS Diva (Becton Dickinson).

4.1.2. Analyse de l'infection par fluorimétrie classique

Cette analyse permet de suivre l'évolution de la population de levures et de déterminer le taux de levures intramacrophagiques par l'extinction de la fluorescence des levures libres au bleu trypan (Sigma).

Pour chaque plaque de 96 puits, un témoin correspondant à du tampon PBS est ajouté en plus de ceux décrits pour l'analyse par cytométrie en flux. De plus, chaque quintuplat d'infection est dupliqué.

Après observation au microscope à chaque temps d'infection, la plaque est centrifugée 5 min à 2200 g et les puits sont lavés par du PBS. Après lavage de chaque duplicat, l'un des puits recevra 200 µl de PBS pour mesurer la fluorescence totale des levures tandis que le second recevra 200 µl de PBS supplémenté avec 250 µg/ml de bleu trypan afin d'éteindre la fluorescence des levures extracellulaires. Après 1 min d'incubation à température ambiante, la plaque est centrifugée et un lavage au PBS est effectué. Après une dernière centrifugation, les cellules sont reprises dans 200 µl de PBS pour mesure des fluorescences.

L'analyse est réalisée à l'aide d'un fluorimètre Fluostar Optima (BMG Labtech) avec les longueurs d'ondes d'excitation de 350 nm et d'émission de 460 nm à un gain de 1400. Chaque valeur obtenue correspond à la moyenne d'une matrice de 9 valeurs mesurées dans chaque puits. L'estimation du pourcentage de levures intramacrophagiques est obtenue par la comparaison de l'intensité de fluorescence des puits éteints au bleu trypan par rapport aux puits repris uniquement dans le PBS.

4.1.3. Détermination de la survie des levures

Afin de déterminer la survie des levures au cours de l'interaction, les milieux d'infection obtenus après l'analyse de fluorimétrie et contenant essentiellement des macrophages infectés sont traités par du Triton X-100 (0,1%) froid afin de lyser les phagocytes.

Le nombre de levures récoltées est déterminé par comptage à l'hématimètre de Malassez et 100 levures sont étalées sur gélose YPD en duplicat. Après 2 jours à 30°C, le taux de survie est déterminé par comptage direct des colonies.

4.2. Infection de neutrophiles

Après purification des neutrophiles humains, les infections sont réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'infection des macrophages en utilisant un anticorps anti-CD16-APC monoclonal anti-humain. Les infections sont analysées au temps 30 min et 5 h.

4.3. Vidéo-microscopie

Des infections de macrophages et de neutrophiles ont été réalisées pour l'analyse qualitative par microscopie. Pour ces expériences, $2 \cdot 10^5$ phagocytes sont déposés (la veille pour les macrophages) au fond de boîtes de Pétri stériles à fond constitué d'une lamelle de verre de 9 cm² (Iwaki). Au début de l'infection, $4 \cdot 10^5$ levures contenues dans 2 ml de milieu cRPMI + CFW (5 µg/ml) sont ajoutées sur les cellules. Le suivi de l'infection se fait à la plateforme BIC (Bordeaux Imaging Center) de l'Université Bordeaux 2, par transmission et par fluorescence du CFW à l'aide du Vidéo-microscope inversé Leica équipé d'une caméra rapide Quantem. Une prise de vue est faite toutes les deux minutes pendant 6 à 9 h à 37°C et 5 % CO₂ et sur 5 positions de la boîte. Pour chaque temps et chaque longueur d'onde, plusieurs

images sont prises en Z (step de 2 μm sur 14 μm : 8 steps). L'analyse des images obtenues se fait à l'aide du logiciel Metamorph Offline.

5. Analyses bioinformatiques et statistiques

5.1. Analyse des séquences

Les bases de données suivantes ont été utilisées :

- *Candida lusitaniae* database (www.broad.mit.edu/annotation/genome/candida_lusitaniae/Home.html)
- *Saccharomyces cerevisiae* genome database (<http://www.yeastgenome.org/>)
- *Candida albicans* database (<http://www.candidagenome.org/>)
- Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Les logiciels d'analyse de séquence présents sur les plateformes suivantes ont été utilisés:

- Pôle bioinformatique lyonnais (<http://pbil.univ-lyon1.fr>)
- European Bioinformatics Institute (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>)
- New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>)

L'analyse des chromatogrammes des séquençages nucléotidiques a été effectuée avec le logiciel BioEdit.

RÉSULTATS

Partie I

Mise au point d'un modèle expérimental pour la caractérisation cellulaire et moléculaire de l'interaction entre les levures et les phagocytes

Introduction

Lors d'une infection à *Candida*, les cellules de l'immunité innée sont essentielles à la défense de l'hôte. Les monocytes et les neutrophiles dans la circulation sanguine, et les macrophages dans les tissus sont les principales cellules permettant le contrôle de l'infection. La reconnaissance des levures par les phagocytes est un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs récepteurs et aboutit à une réponse concertée de l'hôte. Les phagocytes de l'immunité innée possèdent des PRR (Pattern Recognition Receptors) qui reconnaissent les PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) présents sur les levures (Netea *et al.*, 2008). Cependant, le rôle exact de chaque ligand fongique et de chaque récepteur ainsi que les signaux transduits dans les cellules fongiques et les cellules de l'hôte sont encore mal connus. Leur analyse approfondie permettrait de mieux caractériser la balance entre les mécanismes de défense de l'hôte et les facteurs de virulence de la levure. Du point de vue de la mycologie, les progrès dans la compréhension de l'interaction levures - phagocytes sont difficiles à obtenir car il n'existe pas de réel consensus dans la communauté scientifique sur les méthodes d'évaluation de la virulence des levures.

L'étude de la pathogénicité des *Candida* peut se faire à deux niveaux :

- *in vivo* : les études reposent sur l'infection de modèles murins. Ils permettent d'obtenir des données globales sur le devenir de l'hôte ou des *Candida* au cours d'une infection. Par exemple, ils permettent d'analyser la colonisation d'organes, l'efficacité de traitements antifongiques, la virulence de mutants de *Candida* ou encore l'importance de fonctions immunologiques grâce à la manipulation génétique des modèles murins. Cependant, ces modèles ne permettent pas d'étudier précisément l'interaction cellule à cellule et le déroulement de l'infection au niveau cellulaire (Netea *et al.*, 2008 ; Bourgeois *et al.*, 2009 ; Ivashkiv, 2009 ; Jouault *et al.*, 2009 ; Bourgeois *et al.*, 2010).
- *in vitro* : les études reposent sur l'analyse de l'interaction entre les *Candida* et les cellules de l'hôte. Ils permettent de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués au cours de l'infection. Par exemple, la mise en évidence de la reconnaissance de composés fongiques pariétaux par les TLR de l'immunité innée s'est faite grâce à l'utilisation de modèles d'interaction *in vitro* (Netea *et al.*, 2008 ; Ivashkiv, 2009 ; Jouault *et al.*, 2009 ; Bourgeois *et al.*, 2010). Cependant, les modèles *in vitro* se limitent à l'étude de l'interaction cellule à cellule et ne permettent pas d'analyser l'ensemble de la complexité de la réponse immune et de l'adaptation des cellules fongiques qui s'opèrent *in vivo*. Les données obtenues *in vitro* restent donc expérimentales et doivent par la suite être confirmées par des études *in vivo*.

Les études d'interaction *in vitro* ont principalement porté sur l'espèce *C. albicans* en présence de macrophages ou de neutrophiles. Ces travaux ont mis en évidence un comportement différent de *C. albicans* vis-à-vis des phagocytes. Au cours de l'interaction avec un macrophage, *C. albicans* résiste à la phagolyse et filamente dans les cellules jusqu'à échapper au macrophage. L'analyse transcriptionnelle révèle une augmentation de l'expression des gènes du métabolisme péroxysomal (β -oxydation et cycle glyoxylique) et de la synthèse protéique (Prigneau *et al.*, 2003 ; Lorenz *et al.*, 2004 ; Fradin *et al.*, 2005). En présence des neutrophiles, il a été décrit que la filamentation de *C. albicans* était inhibée et que la levure finissait par être détruite. L'interaction avec les neutrophiles est accompagnée au niveau transcriptionnel par une augmentation de l'expression de gènes de détoxification (catalase, superoxyde dismutase) et de réponse à la carence (Fradin *et al.*, 2005 ; Urban *et al.*, 2006 ; Urban *et al.*, 2009).

Cette interaction différentielle de *C. albicans* avec les phagocytes suggère l'existence de voies de signalisation fongiques spécifiquement activées en présence d'un macrophage ou d'un neutrophile. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués au cours de l'infection fongique, nous avons développé un modèle *in vitro* pour le suivi qualitatif et quantitatif de l'interaction entre les phagocytes et les levures.

Dans cette partie des résultats, nous présenterons d'abord le principe du modèle d'interaction mis au point ainsi que les expériences préliminaires d'infection de macrophages puis nous développerons, dans le manuscrit de l'article n°1, l'utilisation de ce modèle d'interaction pour la comparaison de l'interaction entre trois espèces de *Candida* et les phagocytes.

A. Principe du modèle d'interaction *in vitro*

1. Choix des partenaires de l'infection

1.1. Les espèces de *Candida*

Au cours de ce travail, trois espèces de *Candida* aux caractéristiques morphogénétiques différentes (*C. albicans* et deux espèces non-*albicans*, *C. glabrata* et *C. lusitaniae*) ont été choisies pour la mise au point et la validation du modèle expérimental d'interaction avec les phagocytes. En effet, s'il est connu que *C. albicans* est capable d'échapper à la phagolyse macrophagique, très peu de données rendent compte du devenir des espèces non-*albicans* également pathogènes. Ont-elles également la capacité d'échapper à la phagolyse macrophagique et si oui, par quels mécanismes ? Les différences majeures entre les trois espèces choisies pour ce travail portent sur la morphologie, le biotope, la ploïdie et le mode de reproduction :

- *C. albicans*, la plus fréquemment isolée en pathologie, est commensale de l'appareil digestif de l'homme. *C. albicans* est capable de former de vrais hyphes septés ainsi que des pseudohyphes composés de cellules individuelles juxtaposées (**Figure 23.A**). Cette levure est diploïde et aucun cycle sexuel ou méiose n'a été mis en évidence à ce jour. La souche clinique de référence SC5314 a été utilisée pour ce travail.

- *C. lusitaniae* est une espèce environnementale émergente en pathologie (Warnock, 2007). *C. lusitaniae* est une levure capable de former des chaînettes de blastospores et des pseudohyphes (**Figure 23.B**). Elle est haploïde et elle possède un cycle sexuel complet maîtrisé au laboratoire. *Clavispora lusitaniae* est le nom de la forme téléomorphe (sexuée) de l'anamorphe *C. lusitaniae*. La souche de référence CBS 6936 a été utilisée au cours de ce travail.

- *C. glabrata* est une levure commensale de l'appareil uro-génital de l'homme, fréquemment rencontrée en pathologie. *C. glabrata* n'existe que sous forme levure et se multiplie par bourgeonnement (**Figure 23.C**). Aucun cycle sexuel n'a été identifié chez cette espèce haploïde. La souche clinique de référence ATCC 90030 a été utilisée au cours de ce travail.

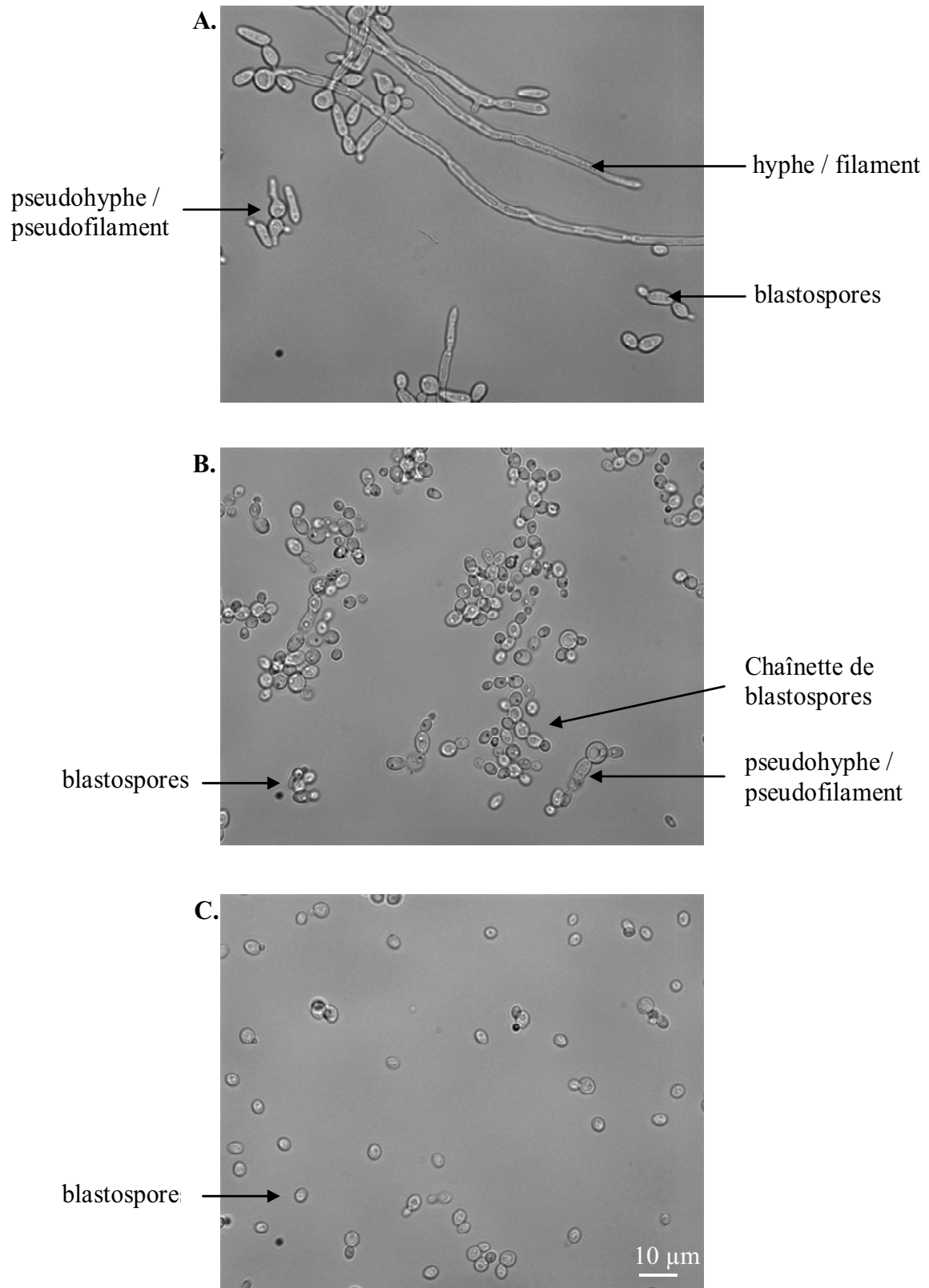


Figure 23 : Morphologie des trois espèces de *Candida* observée au microscope (x630). A. *C. albicans* sous forme blastospore, hyphe et pseudohyphe, B. *C. lusitaniae* sous forme blastospore, chaînette de blastospores et pseudohyphes, C. *C. glabrata* uniquement sous forme blastospore.

1.2. Les cellules phagocytaires

Parmi les cellules de l'immunité innée, les macrophages et les granulocytes neutrophiles sont les principales cellules effectrices de la défense anti-*Candida* (Netea *et al.*, 2008 ; Bourgeois *et al.*, 2010). Notre modèle d'interaction cellulaire a donc été mis au point avec des macrophages et des neutrophiles.

Les macrophages utilisés dans ce travail appartiennent à la lignée murine J774.A1 (**Figure 24**). Cette lignée, largement utilisée dans les études de phagocytose, est facilement entretenue en milieu de culture classique et se multiplie rapidement, ce qui permet d'obtenir en 3-4 jours un tapis cellulaire pour l'infection par les levures. L'utilisation d'une lignée cellulaire plutôt que des macrophages différenciés à partir de monocytes a simplifié la mise au point du modèle d'infection *in vitro*.

Les neutrophiles utilisés pour caractériser l'interaction avec les levures ont été purifiés par gradient de percoll à partir de sang humain fraîchement prélevé. Les neutrophiles sont des cellules différenciées qui ne se divisent pas et à durée de vie courte. Après purification, les neutrophiles ont été dénombrés, le rendement de purification a été estimé par coloration au May-Grünwald Giemsa (**Figure 25**) et les cellules ont été utilisées pendant 5 heures pour les expériences de phagocytose.

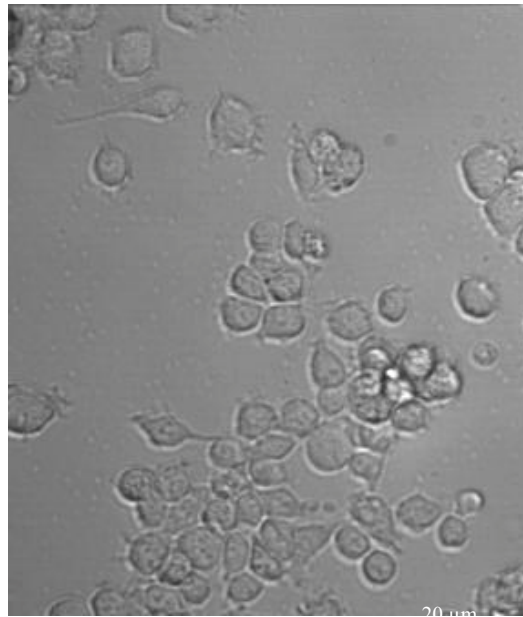


Figure 24 : Macrophages de la lignée murine J774.A1 observés au microscope (x200).

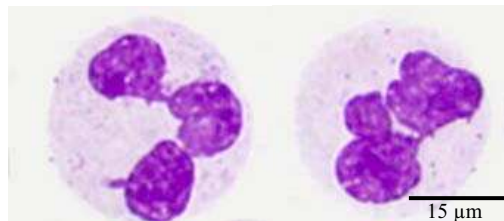


Figure 25 : Neutrophile humain purifié à partir de couche leuco-plaquetaire. Coloration May-Grünwald Giemsa, observation au microscope (x630).

Tableau 6 : Correspondance entre DO_{600nm} et concentration cellulaire de levures (CFU).	
Espèce	Concentration cellulaire pour 1 unité DO
<i>C. lusitaniae</i>	$1,7 \cdot 10^7$ CFU / ml
<i>C. albicans</i>	$0,7 \cdot 10^7$ CFU / ml
<i>C. glabrata</i>	$2,3 \cdot 10^7$ CFU / ml

2. Détermination de la concentration des levures par mesure de turbidimétrie

La comparaison de trois espèces de *Candida* en interaction avec des phagocytes nécessite d'infecter les cellules phagocytaires avec le même nombre de levures. Nous avons donc déterminé, pour chaque espèce, la correspondance entre la DO mesurée à 600 nm, la concentration obtenue après comptage à la cellule de Malassez et le nombre de CFU obtenues sur milieu YPD solide. A partir d'une culture liquide en YPD, des dilutions ont été réalisées afin de dénombrer les levures à la cellule de Malassez, avant d'étaler 100 µl de suspension pour le comptage de CFU, et de mesurer une DO_{600nm} comprise entre 0,5 et 0,8. Chaque expérience a été réalisée en triplicats indépendants. Après avoir tenu compte des facteurs de dilutions, la moyenne entre les concentrations obtenues par comptage à la cellule de Malassez et les concentrations obtenues par le comptage des CFU a été calculée. La correspondance entre la DO_{600nm} et la concentration cellulaire moyenne de chaque espèce est présentée dans le **Tableau 6**. Les différences de correspondance entre la DO et les CFU observées entre les trois espèces de *Candida* peuvent s'expliquer par les spécificités morphologiques de chaque espèce. *C. albicans* qui peut former des filaments en entraînant une augmentation de l'absorbance, sans augmenter pour autant le nombre de CFU, présente le plus faible rapport CFU / DO. *A contrario*, *C. glabrata*, qui n'existe que sous forme levure, présente le rapport CFU / DO le plus élevé.

3. Observation au microscope de l'interaction entre les macrophages et les trois espèces de *Candida*

Une première série d'infection de macrophages par les levures a été réalisée afin de vérifier que les macrophages de la lignée cellulaire J774 étaient capables de phagocyter les levures, mais aussi de faire une première comparaison du comportement des trois espèces de *Candida*. Ces infections préliminaires ont été réalisées dans le milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium supplémenté en Sérum de Veau Fœtal (DMEM+SVF) recommandé pour les macrophages. Environ 1.10^6 macrophages ont été infectés par 1.10^6 levures de chacune des espèces de *Candida* dans des flasques de culture (Multiplicity Of Infection MOI : 1M : 1L). Les flasques ont ensuite été observées à l'aide d'un microscope inversé jusqu'à 24h d'infection. L'interaction a été suivie en évaluant deux paramètres :

1) l'efficacité de la phagocytose des levures par les macrophages, en estimant le nombre de levures libres dans le milieu de culture; (2) le maintien de l'intégrité cellulaire de la population de macrophages au cours du temps.

➤ Temps T = 1 h : dans les temps précoces de l'infection, les levures des trois espèces sont reconnues et phagocytées par les macrophages. La **Figure 26** montre l'interaction entre les macrophages et *C. albicans* (**Figure 26.A**), *C. lusitaniae* (**Figure 26.B**) et *C. glabrata* (**Figure 26.C**) après 1h d'infection. Quelle que soit l'espèce de *Candida*, les macrophages contiennent des levures et aucune différence n'est observable entre les trois espèces. Des levures libres dans le milieu sont présentes dans les trois flasques d'infection. Dès ce temps précoce, les levures *C. albicans* commencent à entamer une transition morphogénétique et à former des filaments. La densité et l'aspect des macrophages sont comparables entre les trois espèces.

➤ Temps T = 5 h : au temps 5h après le début de l'infection, des différences d'interaction sont observables entre les trois flasques (**Figure 27**). Pour l'infection avec *C. albicans* (**Figure 27.A**), toutes les levures forment des filaments, y compris dans les

macrophages, et la majorité des macrophages est associée à des levures. De nombreux macrophages sont déformés et ont un aspect étiré en raison de la présence d'un filament dans les cellules. La population de macrophages est moins dense qu'au temps 1h.

Sur la **Figure 27.B**, l'infection avec *C. lusitaniae* montre la présence de nombreuses levures libres dans le milieu de culture qui s'organisent en chaînettes. La majorité des macrophages contient des levures et leur population apparaît aussi dense qu'au début de l'infection.

Pour *C. glabrata* (**Figure 27.C**), la population de levures semble être totalement phagocytée, les levures libres dans le milieu sont très rares. Les macrophages sont arrondis et ont un aspect turgescent. La densité des phagocytes est comparable à celle du début de l'infection.

➤ Temps T = 24 h : c'est 24h après le début de l'infection que les plus grandes différences d'interaction entre les macrophages et les trois espèces de *Candida* sont observables au microscope (**Figure 28**). La **Figure 28.A** correspond à l'infection en présence de *C. albicans*. Un réseau dense de filaments s'est développé sur l'ensemble de la flasque et les macrophages ont été détruits.

En présence de *C. lusitaniae* (**Figure 28.B**), la population de levures s'est massivement multipliée à l'extérieur des macrophages. Les levures forment un tapis de cellules entourant les macrophages. Ces derniers contiennent toujours des levures et leur densité n'a pas diminué par rapport au début de l'infection.

Dans l'infection avec *C. glabrata* (**Figure 28.C**), les levures libres sont toujours très rares, comme au temps 5h. La majorité des macrophages a le même aspect turgescent qu'à 5h post-infection mais une partie de la population a été lysée. Les rares levures libres se retrouvent autour des macrophages dont la membrane plasmique apparaît rompue.

Ces premières expériences d'infection ont montré que les macrophages interagissaient avec les trois espèces de *Candida* choisies pour notre étude. De plus, des différences d'interaction ont été observées entre les trois espèces. *C. albicans* est phagocytée par les macrophages, forme des filaments dès 5h d'infection et détruit la population de phagocytes en 24h. Les filaments sont retrouvés aussi bien dans le surnageant qu'à l'intérieur des macrophages. Cependant, ces observations au microscope ne permettent pas de préciser si *C. albicans* est capable d'entamer sa transition morphogénétique dans les macrophages ou bien si ce sont plutôt les macrophages qui se déforment pour phagocyter les filaments. L'utilisation de la vidéo-microscopie permettra de suivre un groupe de cellules et de répondre à cette question.

Les infections avec *C. lusitaniae* montrent que les levures forment des chaînettes à l'extérieur des macrophages. La présence de nombreuses levures libres suggère que cette espèce est moins bien reconnue et moins bien phagocytée par les macrophages que *C. albicans* et *C. glabrata*.

Avec *C. glabrata*, toutes les levures sont phagocytées après 5h d'infection, mais des levures libres réapparaissent après 24h. Cette observation suggère que cette espèce est capable de se multiplier à l'intérieur des macrophages jusqu'à la rupture de leur membrane plasmique.

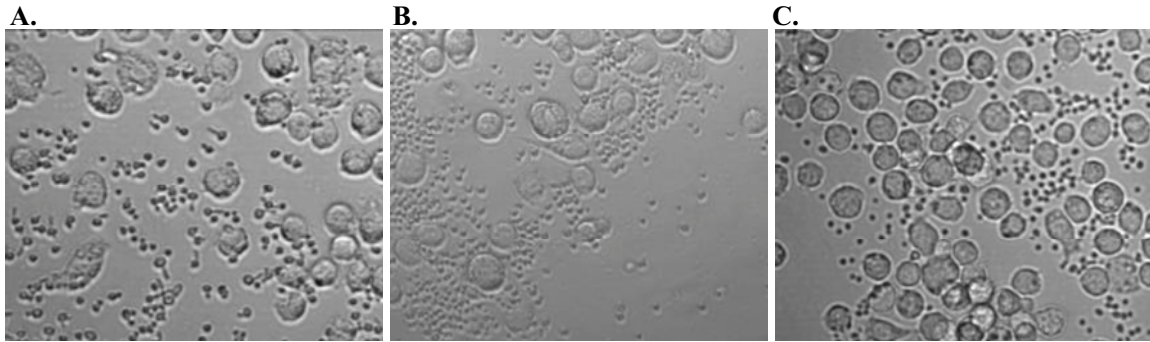


Figure 26 : Observation au microscope (x200) des infections après 1h d'interaction entre les macrophages et A. *C. albicans*, B. *C. lusitaniae* et C. *C. glabrata* (MOI 1M : 1L).

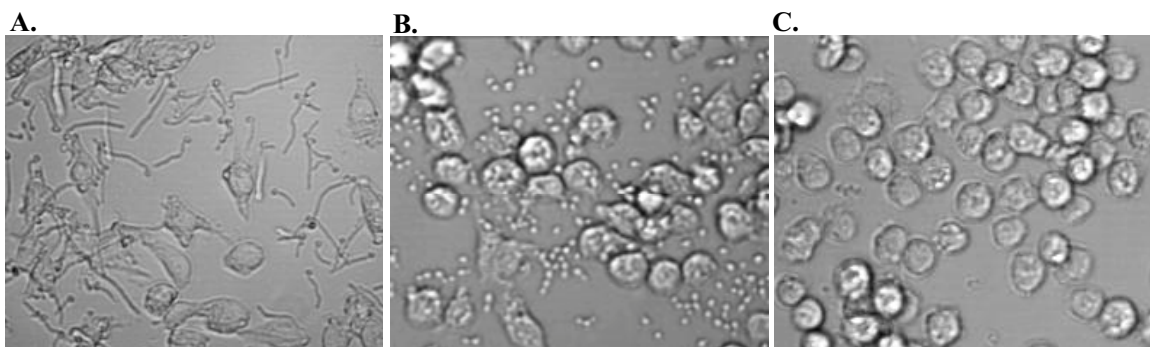


Figure 27 : Observation au microscope (x200) des infections après 5h d'interaction entre les macrophages et A. *C. albicans*, B. *C. lusitaniae* et C. *C. glabrata* (MOI 1M : 1L).

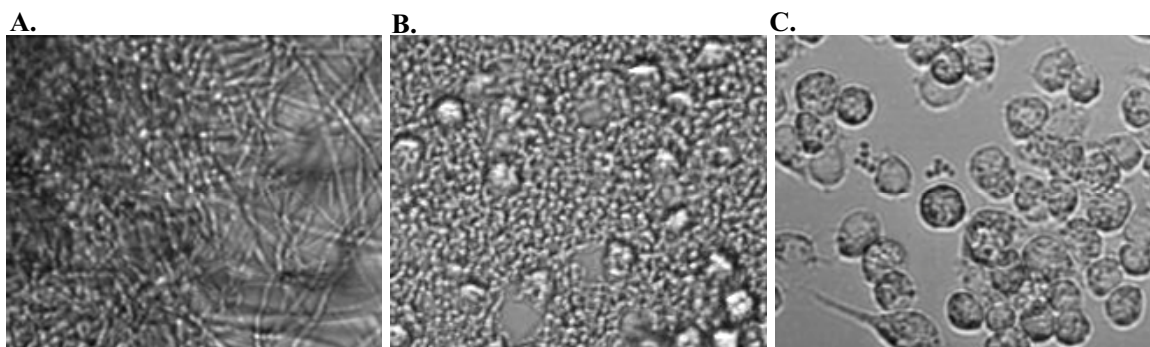


Figure 28 : Observation au microscope (x200) des infections après 24h d'interaction entre les macrophages et A. *C. albicans*, B. *C. lusitaniae* et C. *C. glabrata* (MOI 1M : 1L).

4. Mise au point d'outils pour l'analyse quantitative des infections

4.1. Description des paramètres mesurés pour la comparaison quantitative des infections

L'appréciation et la caractérisation de l'interaction entre les phagocytes et les levures doivent se faire par la mesure de plusieurs paramètres. Du point de vue des levures, nous avons choisi de suivre la multiplication de la biomasse fongique au cours du temps, le pourcentage de levures internalisées par les phagocytes et la survie des levures après phagocytose. Concernant les phagocytes, nous avons suivi la survie des cellules au cours de l'infection par les levures et le pourcentage de phagocytes associés aux levures.

L'analyse quantitative de l'interaction nécessite d'avoir des marqueurs spécifiques de chaque partenaire et de chaque paramètre à mesurer. Par exemple, les levures doivent être marquées différemment des phagocytes, et, au sein de la population de levures, il faut marquer spécifiquement les levures libres et les levures internalisées.

4.2. Marquage des partenaires de l'infection

4.2.1. Marquage spécifique des cellules phagocytaires

4.2.1.a. La calcéine-AM : indicateur d'activité métabolique et d'intégrité membranaire

La calcéine-AM (**Figure 29**) est un ester acétique non fluorescent de la fluorescéine qui traverse passivement les membranes des cellules viables. C'est le groupement acétoxy-méthyl ester (AM) qui facilite l'entrée dans la cellule et qui rend la molécule non fluorescente. Une fois dans la cellule, la calcéine-AM est transformée par les estérases non spécifiques du cytosol en calcéine fluorescente non perméable aux membranes plasmiques et qui donne un signal vert intense à 530 nm après excitation à 490 nm (Mitrofan-Oprea *et al.*, 2007). Ainsi, la calcéine est retenue dans les cellules possédant une membrane intacte et sa disparition indique à la fois une diminution de l'activité estérasique donc une baisse de l'activité métabolique rencontrée dans les cellules sénescents et une perméabilisation de la membrane donc une perte d'intégrité cellulaire (**Figure 30 et Figure 31.B et E**). La calcéine-AM ne pénètre pas dans les cellules fongiques, ce qui permet de l'utiliser comme marqueur spécifique des macrophages et des neutrophiles actifs (**Figure 31.B**).

4.2.1.b. Les anticorps anti-CD16 couplés à l'allophycocyanine

Pour le marquage anticorps des phagocytes, des anticorps monoclonaux anti-CD16 anti-souris ont été utilisés pour les macrophages et des anti-corps monoclonaux anti-humain ont été utilisés pour les neutrophiles. Le CD16 est un récepteur membranaire de faible affinité qui reconnaît la partie Fc des immunoglobulines G : Fc γ RIII. Il existe sous deux formes, le CD16a (Fc γ RIIIa) et le CD16b (Fc γ RIIIb). Les CD16a possèdent plusieurs domaines transmembranaires et sont exprimés à la surface des cellules Natural Killer, des monocytes activés, des macrophages et des neutrophiles. Les CD16b sont liés à la membrane plasmique par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) et possèdent 95% d'homologie avec le domaine extracellulaire du CD16a. Le CD16b est spécifiquement exprimé à la surface des

neutrophiles. Le récepteur CD16 lie les complexes d'IgG et les IgG couplés aux antigènes (Wirthmueller *et al.*, 1992).

Le fluorochrome allophycocyanine (APC) est un pigment bleu de la famille des phycobilliprotéines présent chez les algues rouges (*Rhodophyta*). Ce fluorochrome est excité à 590 nm et émet une fluorescence rouge à 630 nm.

- **Marquage des macrophages : anti-CD16-APC anti-souris**

L'anticorps monoclonal de rat (isotype IgG2b κ) anti-CD16 de souris couplé à l'APC a été utilisé pour le marquage des macrophages J774 au cours des infections. Cet anticorps marque en rouge la membrane plasmique des macrophages (**Figure 31.C et E**). La fixation de l'anticorps est spécifique des macrophages et il n'y a aucune fixation aspécifique sur les levures. Pour l'analyse par cytométrie en flux, l'échantillon est préalablement traité à la trypsine car les macrophages sont des cellules adhérentes. La partie reconnue par l'anticorps anti-CD16-APC se situe dans le large domaine extracellulaire du récepteur CD16. Ce domaine n'est pas sensible à l'action de la trypsine et le marquage anticorps peut donc se faire après détachement des macrophages par cette enzyme (Jersmann *et al.*, 2003).

- **Marquage des neutrophiles : anti-CD16-APC anti-humain**

L'anticorps monoclonal de souris (isotype IgG1 κ) anti-CD16 d'humain couplé à l'APC a été utilisé pour le marquage des neutrophiles purifiés à partir de sang humain. Comme pour l'anticorps utilisé pour les macrophages, l'anticorps anti-CD16 utilisé pour les neutrophiles marque en rouge la membrane plasmique des neutrophiles et n'a aucune fixation aspécifique sur les levures.

122

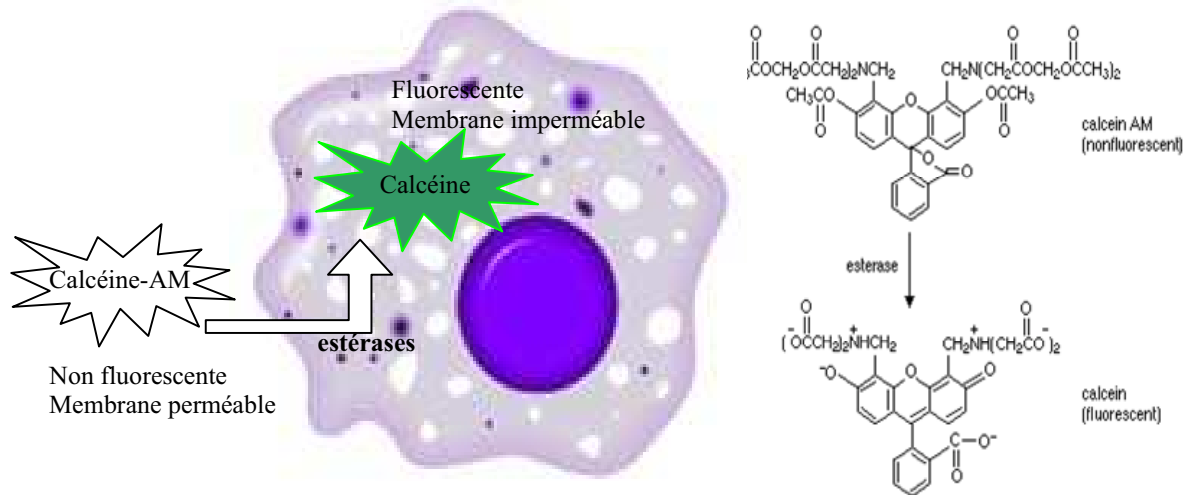


Figure 29 : Principe du marquage des phagocytes métaboliquement actifs par la calcéine-AM.

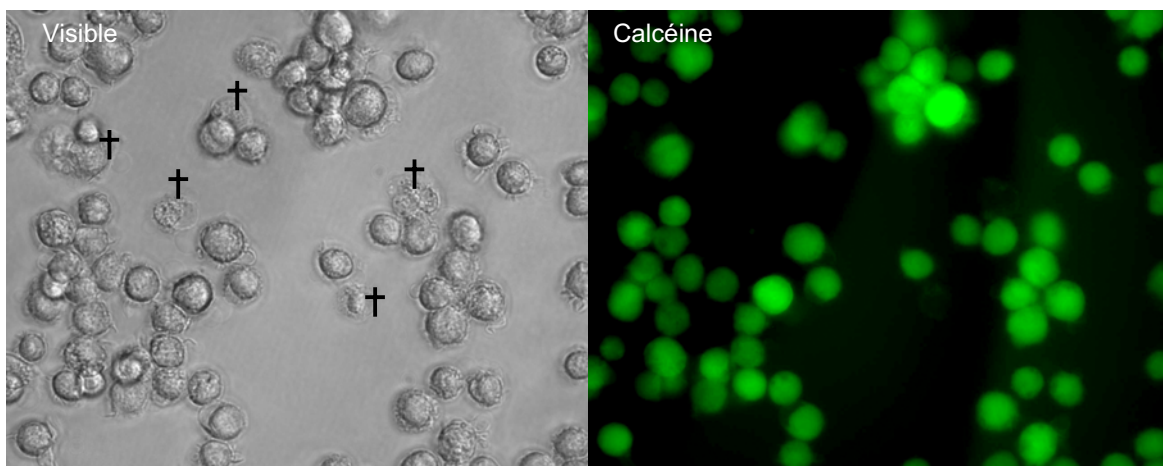


Figure 30 : Observation au microscope (x200) de macrophages marqués par la calcéine. Les cellules mortes ou sénescents (†) sont observables en transmission mais ne sont par marquées par le fluorochrome.

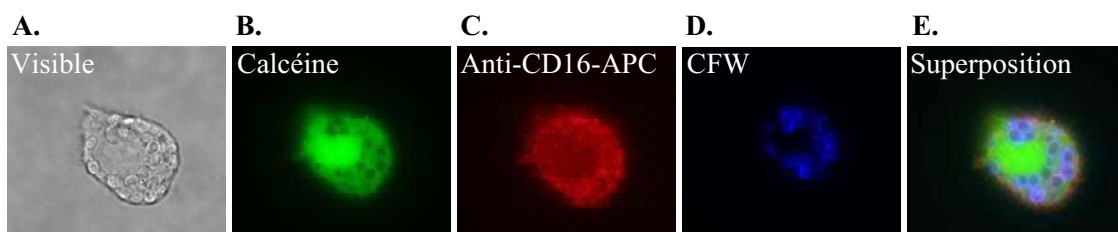


Figure 31: Observation au microscope (x630) d'un macrophage infecté par des levures *C. glabrata* montrant le marquage spécifique de chaque partenaire de l'infection. A. Observation en visible, B. marquage spécifique du macrophage par la calcéine, C. marquage spécifique du macrophage par l'anticorps anti-CD16-APC, D. marquage spécifique des levures par le CFW et E. superposition des trois fluorescences.

Marquage spécifique des levures

4.2.2.a. Le CalcoFluor White

Le CalcoFluor White (CFW) est un fluorochrome qui lie spécifiquement les β 1-3 glucanes, les β 1-4 glucanes et la chitine de la paroi fongique (Harrington BJ. , 2003). La fixation à la paroi fongique se fait par des liaisons hydrogène qui changent la conformation de la molécule et la rendent fluorescente. Les levures émettent alors une fluorescence bleue à 430 nm après excitation à 365 nm (**Figure 31.D et E et Figure 32**). Les observations au microscope montrent que les zones de la paroi dans lesquelles les glucanes et la chitine sont plus accessibles, tels que les apex, les septa et les cicatrices de bourgeonnement fixent plus de CFW et émettent une fluorescence plus importante. Pour chaque espèce de l'étude, des cultures de 24 h à 35°C et en milieu cRPMI + 5 μ g/ml de CFW ont été réalisées et l'évolution de la fluorescence CFW et de la densité optique ont été analysées. L'expression des valeurs de DO_{600nm} en fonction des valeurs de fluorescence CFW est présentée dans la **Figure 33**. Quelle que soit l'espèce, la relation entre les valeurs de DO_{600nm} et les valeurs de fluorescence CFW est linéaire ce qui démontre que l'intensité de fluorescence CFW est proportionnelle à la biomasse fongique. Cependant, pour une même densité optique, une intensité de fluorescence CFW plus élevée est obtenue pour *C. albicans* et la valeur de fluorescence la plus faible est obtenue pour *C. glabrata*. Les coefficients directeurs des courbes de tendance sont également différents : les courbes obtenues pour *C. glabrata* et *C. lusitaniae* présentent des coefficients directeurs très proches (environ 0,0014) tandis que celui de la courbe correspondant à *C. albicans* est plus faible (0,0005). Ces différences de fluorescence CFW peuvent s'expliquer par les différences morphologiques entre les trois espèces. En effet, pour un même nombre de CFU, la biomasse fongique est plus importante pour *C. albicans*. Une proportion différente en glucanes et en chitine dans les parois de ces espèces et une accessibilité différente de ces composés pariétaux au CFW peuvent également expliquer ces différences. La comparaison interspécifique n'est donc pas possible entre deux valeurs de CFW mais nous pouvons comparer l'évolution de cette fluorescence au cours du temps au sein d'une même espèce.

Le CFW est décrit comme pouvant inhiber la croissance des levures. Dans les expériences d'infection, la concentration utilisée est de 5 μ g/ml, ce qui est largement inférieur aux concentrations minimales inhibitrices (80 μ g/ml) décrites dans la littérature (Ram *et al.*, 2006). Afin de vérifier que le CFW à la concentration de 5 μ g/ml n'inhibe pas la multiplication des levures, les courbes de croissance de chaque espèce de levures ont été réalisées, en présence et en absence de CFW (5 μ g/ml) dans du milieu cRPMI et par mesure de la DO_{600nm} pendant 6h (**Figure 34**). La croissance de *C. albicans*, de *C. lusitaniae* ou de *C. glabrata* n'est pas affectée en présence de 5 μ g/ml de CFW. Le CFW permet donc de suivre la multiplication des levures en fonction du temps sans entraîner d'inhibition de croissance.

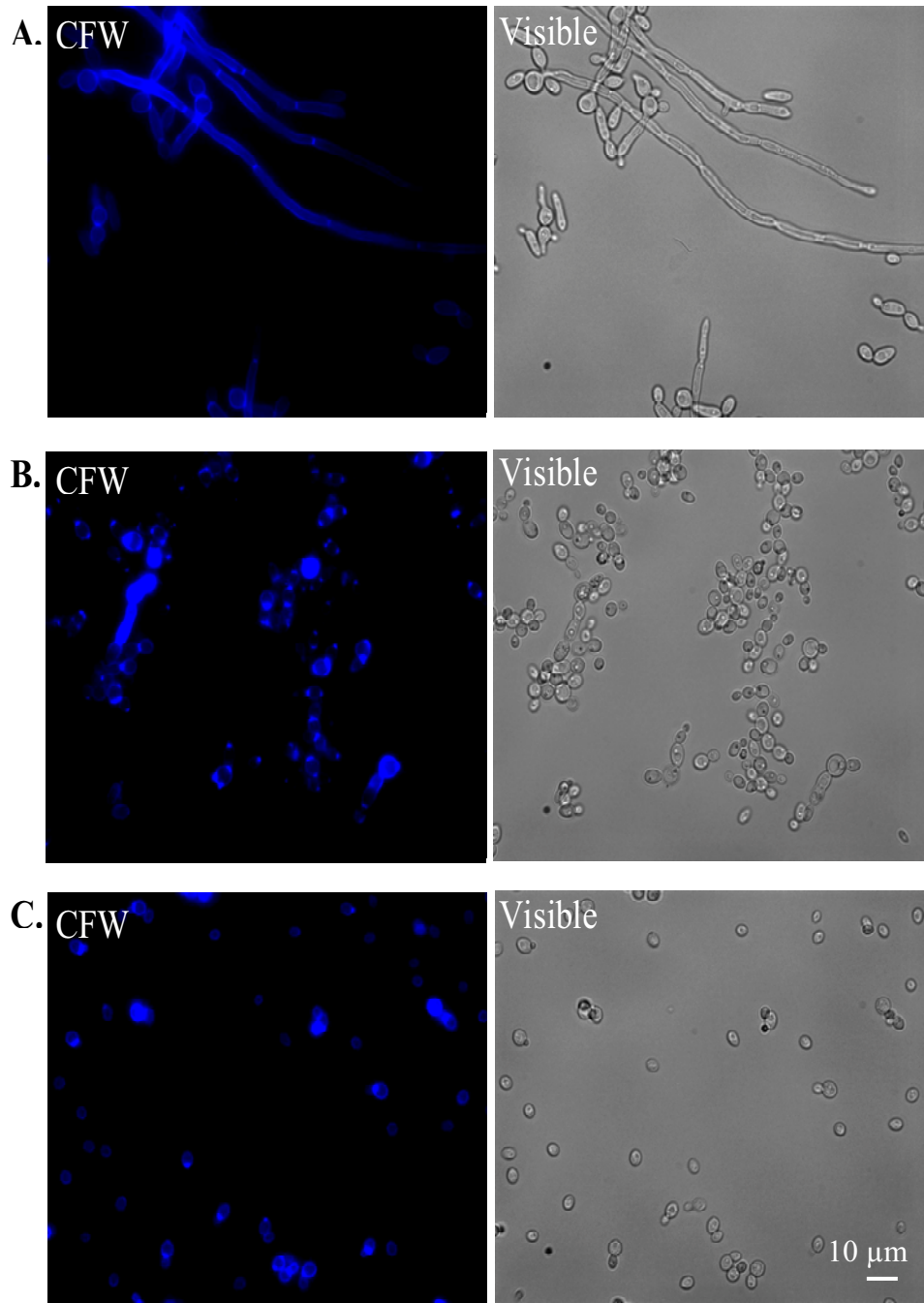


Figure 32 : Observation au microscope (x630) des levures fluorescentes après marquage au CFW. A. *C. albicans*, B. *C. lusitaniae* et C. *C. glabrata*.

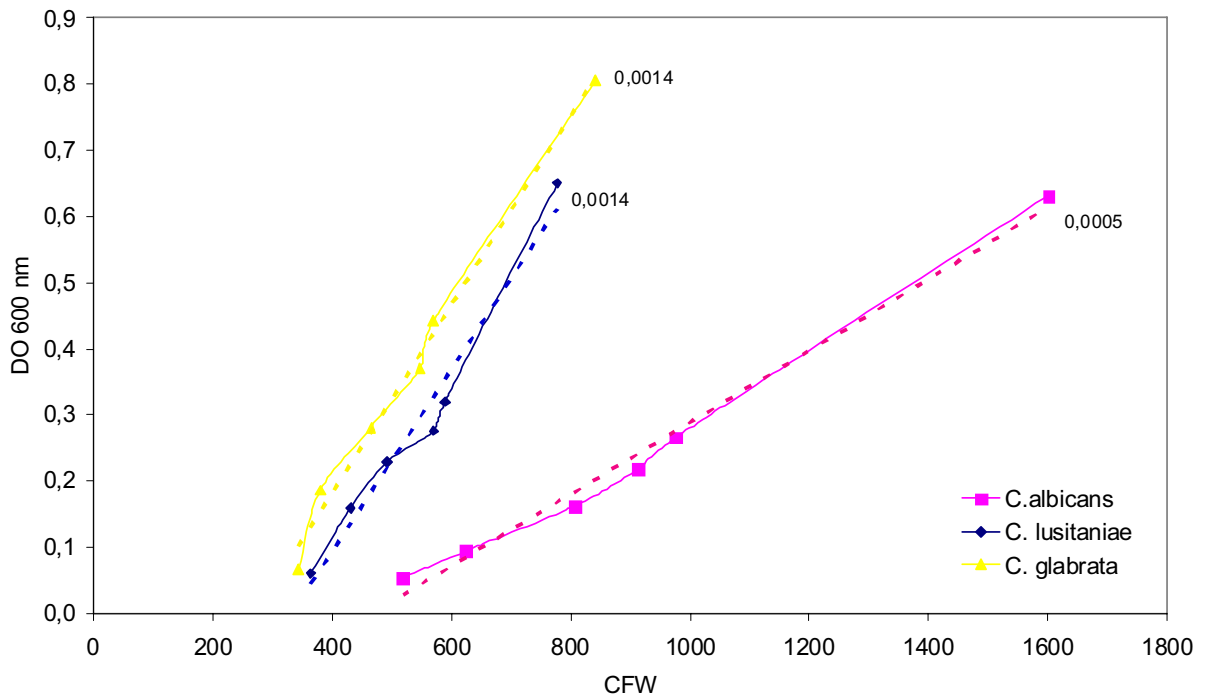


Figure 33 : Suivi de la multiplication des levures par mesure de la DO_{600nm} et de la fluorescence CFW (unités arbitraires). Les courbes de tendance sont représentées en pointillés et leurs coefficients directeurs sont indiqués.

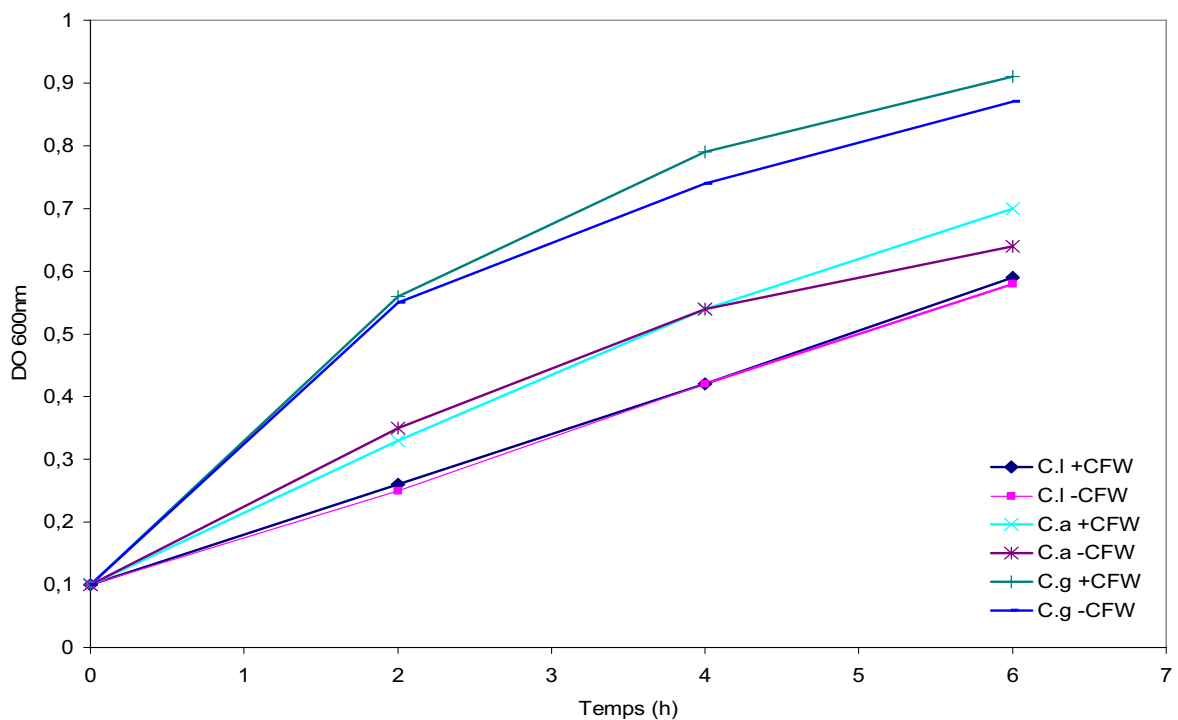


Figure 34 : Comparaison de la multiplication des levures dans du milieu cRPMI en présence ou en absence de CFW (5 µg/ml) par mesure de la DO_{600nm}. C.l, *C. lusitaniae* ; C.a, *C. albicans* ; C.g, *C. glabrata*.

4.2.2.b. Le Bleu Trypan

Pour déterminer le pourcentage de levures intraphagocytaires, il faut pouvoir marquer sélectivement la population de levures libres ou de levures phagocytées et comparer cette valeur à la population totale obtenue par la mesure du CFW. La méthode choisie au cours de notre étude fait appel à l'extinction de fluorescence (ou quenching) des levures libres afin de mesurer uniquement la fluorescence des levures phagocytées. Des travaux portant sur l'interaction entre des phagocytes et des levures marquées par le FITC (Fluoresceine IsoThioCyanate) ont décrit l'utilisation du Bleu Trypan (BT) pour le quenching des levures libres et la quantification des levures phagocytées (Giannis *et al.*, 1994 ; Lyman *et al.*, 1994). Le BT est un colorant vital qui ne s'accumule pas dans les cellules vivantes. Ce colorant a donc accès uniquement aux levures libres, s'accumule dans leur paroi et absorbe la fluorescence émise par le FITC. La fluorescence obtenue après quenching est donc spécifique de la population de levures intraphagocytaire. Le CFW émet une fluorescence bleue à une longueur d'onde de 430 nm qui, comme pour le FITC, est une longueur d'onde comprise dans le spectre d'absorption du Bleu Trypan (400 nm à 650 nm).

Afin de vérifier que le BT pouvait être utilisé pour quencher la fluorescence du CFW, nous avons réalisé un spectre d'absorption du BT, puis un spectre d'émission de 1×10^7 levures marquées par le CFW avec et sans traitement par le BT (**Figure 35.A**). Ces spectres ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre PTI (Photon Technology International). Les spectres d'émission ont été réalisés entre les longueurs d'onde 240 nm et 700 nm, par palier de 10 nm et avec une longueur d'onde d'excitation fixée à 360 nm. Les spectres représentés ici correspondent à ceux obtenus avec l'espèce *C. lusitaniae*. Le spectre correspondant aux levures marquées par le CFW montre un pic d'émission de fluorescence à environ 450 nm. Le quenching par 250 µg/ml de BT permet d'éteindre cette fluorescence pour toutes les longueurs d'ondes testées. En présence de *C. glabrata*, les mêmes concentrations de BT ont été suffisantes pour l'extinction totale de la fluorescence des levures. En revanche, pour *C. albicans* nous avons déterminé que la concentration en BT nécessaire pour le quenching était de 1 mg/ml. Cette concentration plus élevée en BT nécessaire pour le quenching de la fluorescence de *C. albicans* s'explique par la fluorescence plus forte de cette espèce en présence de 5 µg/ml de CFW.

Afin de vérifier les capacités de quenching du BT au niveau de notre modèle d'interaction cellulaire, nous avons testé le quenching des levures libres au cours d'une infection. Pour cela, 1×10^6 macrophages ont été infectés par 1×10^6 levures *C. lusitaniae* marquées par le CFW. Après 4 h d'infection, la fluorescence des levures libres a été quenchée par 250 µg/ml de BT et la différence de marquage entre les levures libres et internalisées a été observée au microscope (**Figure 35.B**). L'extinction spécifique de la fluorescence des levures libres a été observée et les levures contenues dans un macrophage viable (marqué par la calcéine) restent fluorescentes en bleu. Le BT, qui quenche spécifiquement la fluorescence CFW des levures libres, pourrait donc être utilisé pour déterminer le pourcentage de levures intracellulaires en comparant la fluorescence CFW avant et après quenching.

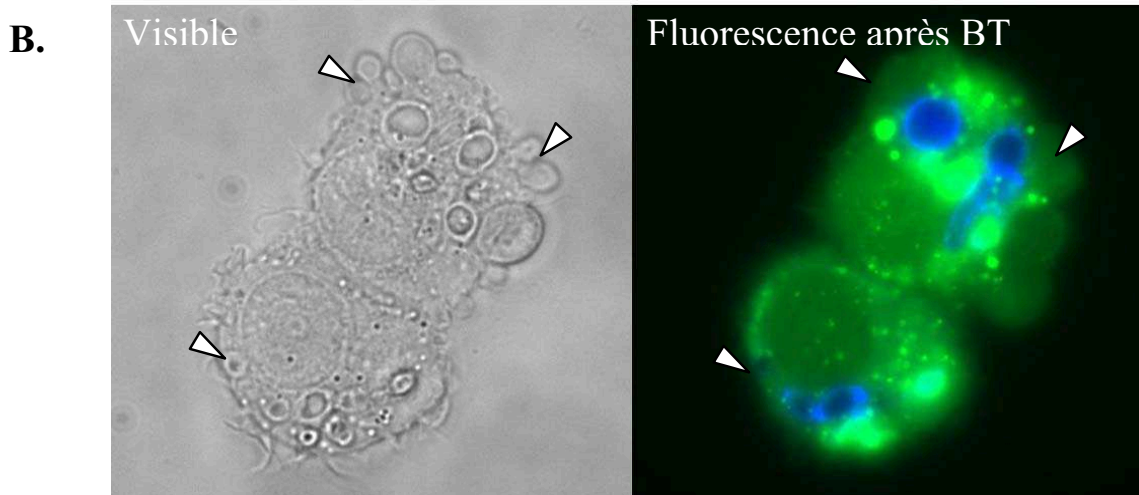
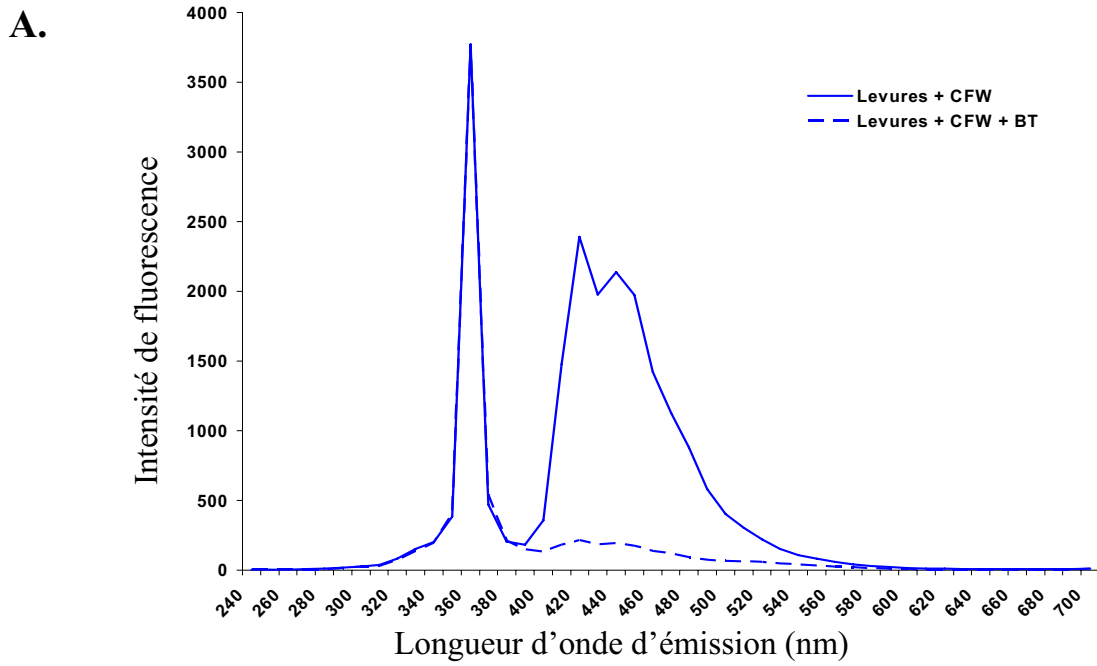


Figure 35 : Quenching de la fluorescence CFW des levures *C. lusitaniae* par le Bleu Trypan (BT). **A.** Spectre d'émission de 1×10^7 levures *C. lusitaniae* marquées par le CFW en présence et en absence de Bleu Trypan après excitation à 360 nm, **B.** Observation au microscope (x630) d'une infection de macrophages par *C. lusitaniae* après quenching par le Bleu Trypan. Les levures libres indiquées par une flèche blanche, n'émettent plus de fluorescence tandis que les levures intramacrophagiques émettent une fluorescence CFW.

4.3. Analyse quantitative des infections

Le marquage spécifique de chaque partenaire de l'infection rend possible le suivi quantitatif de l'interaction au cours du temps. La détection et la mesure de fluorescence nécessite d'utiliser un milieu ne contenant pas de rouge phénol. Celui choisi pour notre étude est le RPMI 1640 complété en Sérum de Veau Fœtal (cRPMI). Ce milieu a une concentration en glucose proche de celle du sang.

A partir des observations faites au microscope au cours de l'interaction entre les macrophages et les trois espèces de *Candida*, nous avons choisi de réaliser les mesures quantitatives au temps 30 min, 5 h et 24 h après le début de l'infection pour les macrophages et seulement 30 min et 5 h pour les neutrophiles, car ces cellules ont une durée de vie inférieure à 8 h après purification.

Afin de mieux caractériser chaque interaction et de différencier plus précisément le comportement de chaque espèce de levure vis-à-vis des phagocytes, nous avons réalisé les infections à plusieurs MOI. Le suivi quantitatif a donc été réalisé à un MOI de 1 phagocyte pour 1 levure (1P : 1L), mais également en présence d'un excès de phagocytes (5P : 1L) et d'un excès de levures (1P : 5L).

4.3.1. Analyse quantitative de la population de phagocytes

L'analyse quantitative de la population de macrophages ou de neutrophiles a été réalisée par cytométrie en flux. Cette méthode permet de séparer différentes populations au cours de l'infection en fonction de leurs fluorescences.

Pour chaque MOI, les infections ont été réalisées en triplicats indépendants et une plaque de 96 puits a été utilisée pour chaque temps d'infection, soit 3 plaques pour les infections de macrophages (30 min, 5 h et 24 h) et 2 plaques pour les infections de neutrophiles (30 min, 5 h). Les infections de phagocytes par chacune des espèces de *Candida* et les témoins contenant uniquement des phagocytes ont été répétés en quintuplats. Pour chaque espèce de *Candida*, un puits contenant uniquement des levures a été utilisé comme témoin.

Les paramètres d'acquisition du cytomètre de flux ont été réglés de telle sorte qu'un même volume de 60 µl soit analysé sur l'ensemble des puits de la plaque.

Le résultat fourni par le cytomètre en flux se présente sous la forme de plusieurs graphiques. Un premier graphique représente l'ensemble des éléments (événements) détectés par l'analyseur en fonction de leur taille (FSC : Forward Scatter) et de leur granulosité (SSC : Side Scatter), qu'ils soient fluorescents ou non (**Figure 36.A**). Ce premier graphique peut servir, en fonction des applications, à sélectionner une population selon des critères morphologiques. Or, au cours d'une infection de phagocytes par des levures, les macrophages et les neutrophiles peuvent significativement changer de forme, en particulier en augmentant de volume. C'est la raison pour laquelle les paramètres FSC et SSC n'ont pas été utilisés dans notre travail.

En plus du graphique représentant les événements en fonction de leurs morphologies, un histogramme est tracé pour chaque fluorochrome utilisé. Les seuils de fluorescence positive pour chacun des fluorochromes utilisés ont été fixés à partir des puits témoins. Pour la fluorescence calcéïne et la fluorescence des anticorps anti-CD16-APC, les bruits de fond de fluorescence sont définis à partir des puits témoins contenant uniquement des levures en présence de chaque fluorochrome et les seuils de fluorescence positifs sont définis à partir des puits témoins ne contenant que des phagocytes. Réciproquement, pour la fluorescence CFW, le bruit de fond est défini à partir des puits contenant uniquement des phagocytes en présence

de CFW et le seuil de fluorescence positive est défini à partir du puits contenant uniquement *C. glabrata*, l'espèce dont l'intensité de fluorescence CFW est la plus faible. Ainsi, lors de l'analyse d'un échantillon contenant uniquement des phagocytes, seuls des événements fluorescents en vert (calcéine) et en rouge (anticorps anti-CD16-APC) apparaissent et aucun événement bleu (CFW) n'est détecté (**Figure 36.B**).

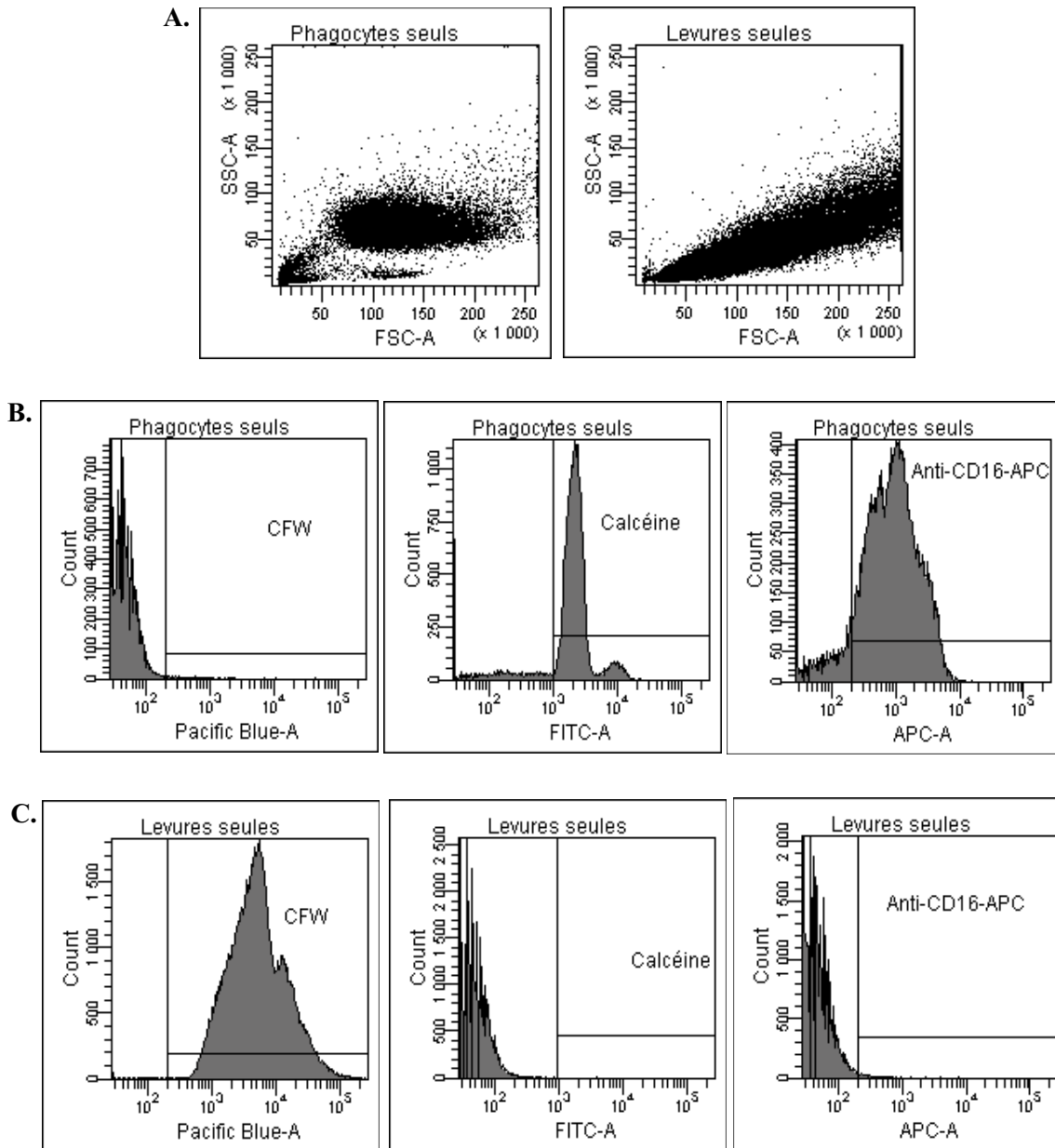
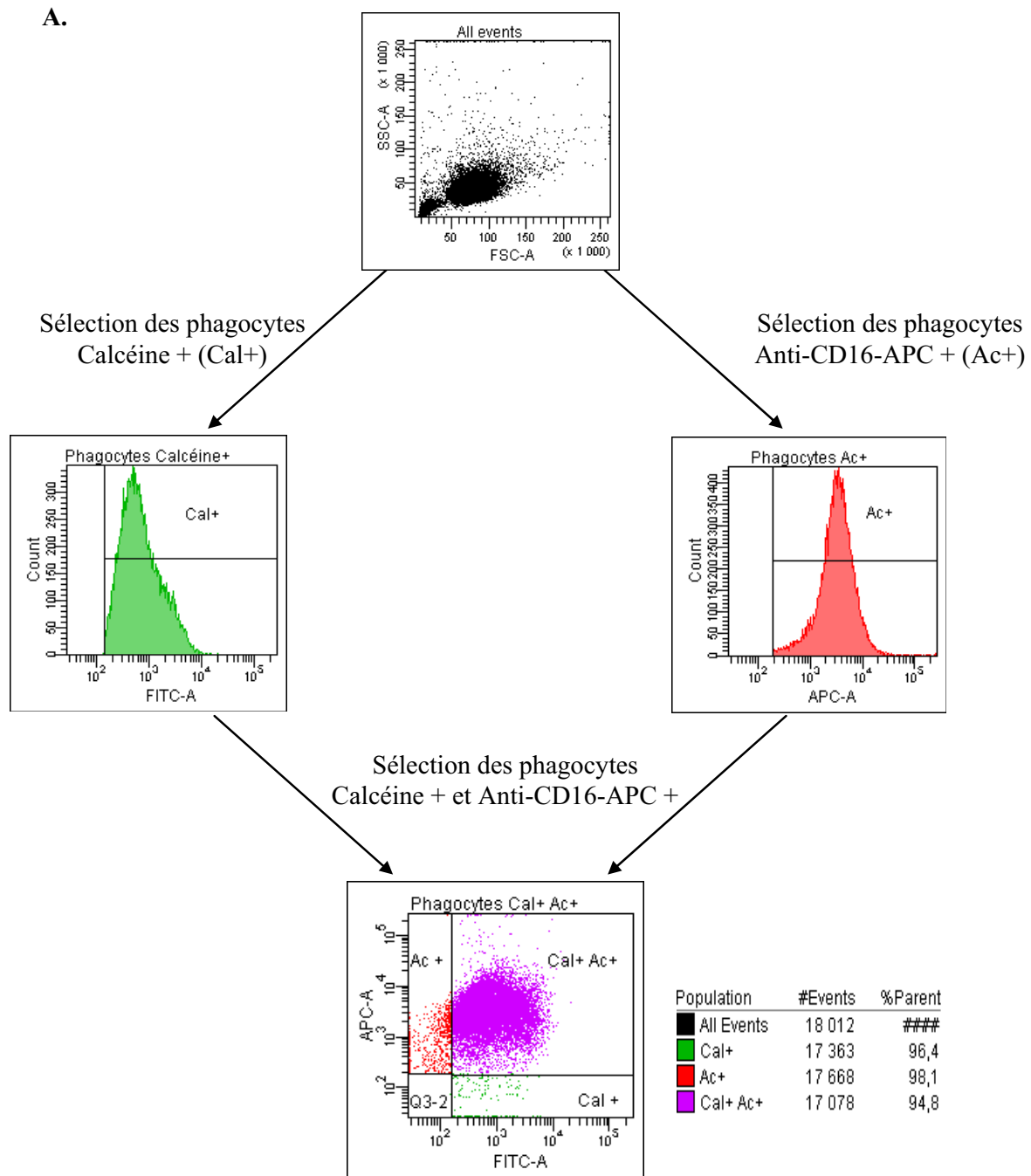


Figure 36 : Analyse des infections par cytométrie en flux. A. Représentation en fonction de la taille (FSC) et de la granulosité (SSC) des événements (structures cellulaires) présents dans un échantillon de phagocytes ou de levures, **B.** Analyse des émissions de fluorescences d'un échantillon contenant uniquement des phagocytes, **C.** Analyse des émissions de fluorescences d'un échantillon contenant uniquement des levures.



B.

$$\% \text{ de survie des phagocytes} = \frac{(\text{Nbre phagocytes Cal+ Ac+ en infection})}{(\text{Nbre phagocytes Cal+ Ac+ du témoin})} \times 100$$

Figure 37 : Détermination de la survie des phagocytes par cytométrie en flux. **A.** Sélection des phagocytes doublement marqués par la calcéine et l'anticorps. **B.** Calcul utilisé pour déterminer la survie des phagocytes en présence des levures par comparaison aux phagocytes en absence de levures.

De la même manière, pour un échantillon contenant uniquement des levures, seuls des événements ayant une fluorescence bleue sont dénombrés, et aucun pour les fluorescences verte et rouge (**Figure 36.C**). Lorsque l'échantillon correspond à une interaction, des événements positifs pour les trois fluorochromes sont détectés.

Pour chaque population définie à partir des fluorescences, le cytomètre en flux fournit un dénombrement des événements (nombre de structures cellulaires détectées) (**Figure 36.B et C**).

4.3.1.a. Détermination de la survie des phagocytes

Une structure cellulaire marquée par la calcéine et l'anticorps anti-CD16-APC est un phagocyte. En exprimant la fluorescence calcéine en fonction de la fluorescence anti-CD16-APC, nous sélectionnons une population (quart supérieur droit du graphique) correspondant aux cellules doublement marquées pour les deux fluorochromes et donc aux phagocytes métaboliquement actifs avec une membrane plasmique intègre (**Figure 37.A**). Sachant que pour chaque échantillon, l'analyse est réalisée sur un volume constant de 60 μ l, il est possible de comparer le nombre de phagocytes obtenu dans chacun des puits. Ainsi, le pourcentage de survie des phagocytes au cours de l'infection a été déterminé par le rapport entre le nombre de cellules doublement marquées obtenues dans les puits d'infection sur le nombre de cellules doublement marquées présentes dans les puits témoins ne contenant que des phagocytes (**Figure 37.B**).

4.3.1.b. Détermination du pourcentage de phagocytes associés aux levures

Les phagocytes associés à des levures correspondent à des événements positifs pour les fluorescences calcéine et anticorps anti-CD16-APC mais aussi pour la fluorescence CFW. Après avoir sélectionné la population de phagocytes doublement marqués par la calcéine et l'anticorps anti-CD16-APC, l'analyse de la fluorescence CFW de ces événements permet de les séparer en deux sous-populations. Une population qui ne présente aucune fluorescence bleue correspondant aux phagocytes seuls et une population positive pour la fluorescence CFW correspondant aux phagocytes contenant des levures (**Figure 38**). Le dénombrement de chaque sous population permet d'estimer le pourcentage de phagocytes vivants associés aux levures. Ainsi, nous avons pu comparer les différences d'association des macrophages et des neutrophiles aux levures des trois espèces de *Candida*.

L'analyse quantitative par cytométrie en flux repose sur la sélection des populations en fonction de leurs fluorescences. Afin de vérifier que chaque population quantifiée correspond effectivement aux événements attendus, nous avons réalisé une expérience de tri cellulaire par cytométrie en flux à partir d'une infection de macrophages par *C. lusitaniae* au MOI de 1M : 1L. Le tri cellulaire a été réalisé dans les mêmes conditions que celle décrites pour l'analyse quantitative mais les différentes populations ont été séparées physiquement sur la base de leur fluorescence. Trois populations ont été isolées puis observées au microscope à fluorescence. Cette expérience a confirmé que les événements positifs pour la fluorescence calcéine et anti-CD16-APC correspondaient à des macrophages seuls, que les événements positifs pour la fluorescence CFW uniquement correspondaient à des levures seules, et que les événements positifs pour les trois fluorochromes correspondaient à des macrophages ayant phagocyté des levures (**Figure 39**).

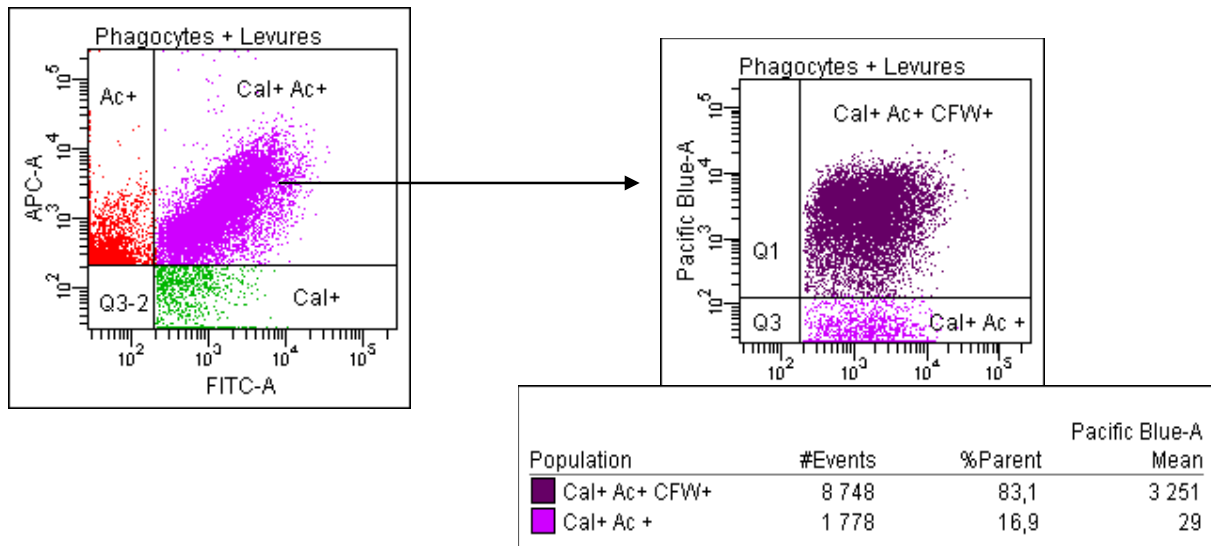


Figure 38 : Détermination du pourcentage de phagocytes associés à des levures par cytométrie en flux en exprimant la fluorescence CFW des événements doublement marqués par la calcéine et l'anticorps.

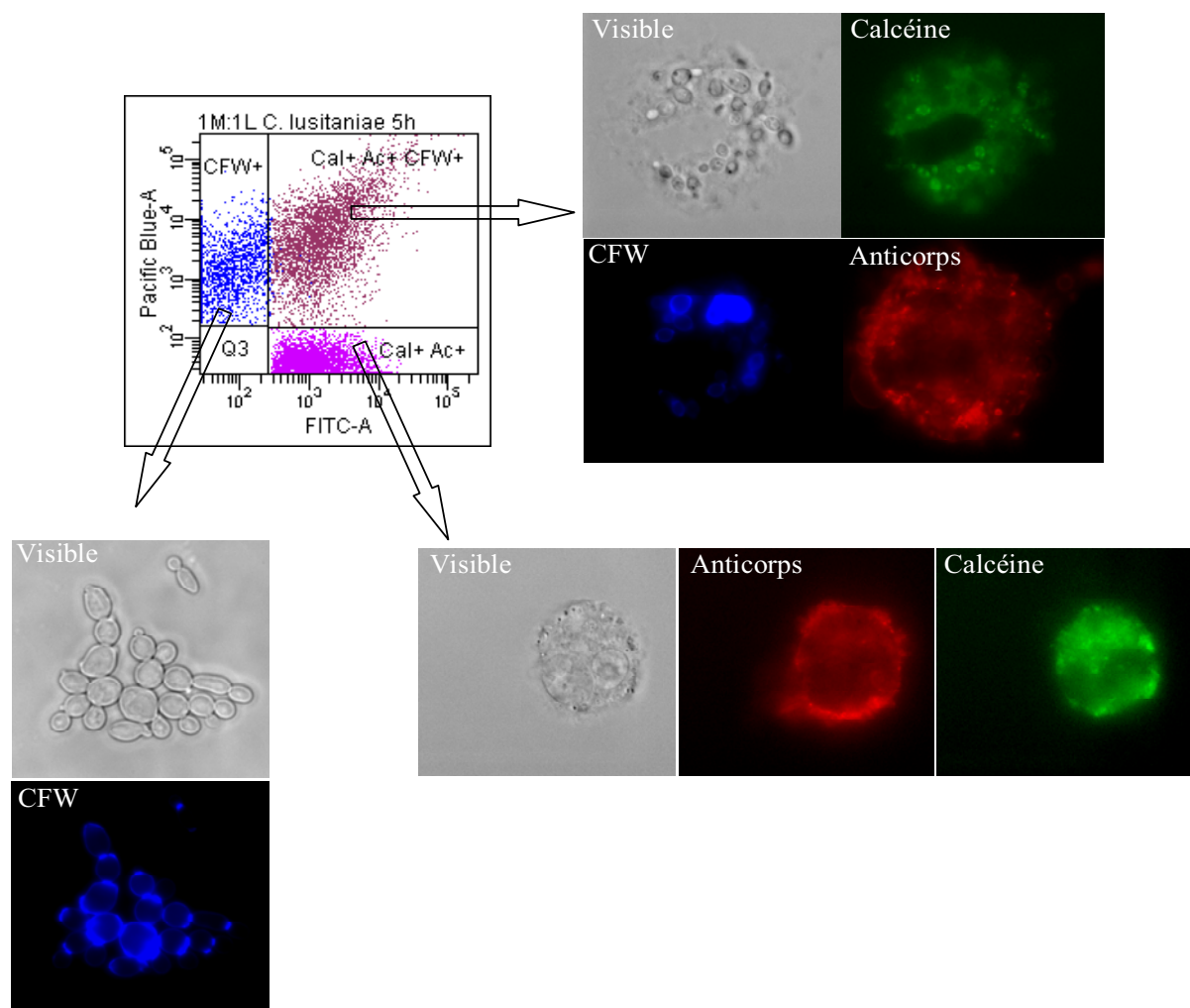


Figure 39 : Tri cellulaire des différentes populations d'une infection de macrophages par *C. lusitaniae* (MOI 1M :1L, 5 h) sur la base de leur fluorescence en cytométrie en flux et analyse de chaque population triée par observation au microscope (x630).

4.3.2. Analyse quantitative des populations de levures au cours des infections

Le suivi quantitatif des populations de levures par mesure de la fluorescence CFW nécessite de quantifier la fluorescence totale de la population au cours du temps. Les infections sont réalisées dans des plaques de culture de 24 ou 96 puits. Or, des expériences de mesure de fluorescence CFW par fluorimétrie, après transfert du surnageant de culture d'un puits à un autre, ont montré que les levures adhéraient au plastique malgré l'agitation avec la pipette. La proportion de levures adhérentes dans le puits d'origine est fonction de l'espèce de *Candida* : *C. albicans* adhère particulièrement au plastique des plaques de culture (90% de fluorescence retenue dans le puits d'origine), tandis que les levures *C. lusitaniae* et *C. glabrata* adhèrent peu (respectivement, 5% et 10% de fluorescence retenue). La cytométrie en flux n'est donc pas un outil approprié pour la mesure de la fluorescence CFW totale car les mesures se font après prélèvement d'un aliquot dans chaque puits. L'analyse de la population de levures a donc été réalisée par fluorimétrie à l'aide du lecteur de plaque FluoStar Optima Fluorimeter (BMG Labtech) (excitation 350 nm, émission 460 nm) afin de mesurer la fluorescence de la population totale de levures présente dans un puits.

Comme pour le suivi des phagocytes, pour chaque MOI, les infections ont été réalisées en triplicats indépendants et une plaque de 96 puits a été utilisée pour chaque temps d'infection (30min, 5h et 24h). Pour chaque infection et pour les témoins correspondant aux macrophages seuls, deux triplicats de puits sontensemencés. Le premier triplicat a été utilisé pour quantifier la multiplication des levures et le deuxième triplicat pour déterminer le pourcentage de levures contenu dans les macrophages (après quenching).

4.3.2.a. Quantification des levures totales et intramacrophagiques au cours du temps

La fluorescence totale en CFW des levures en présence des macrophages a été mesurée au cours de l'infection. Le bruit de fond de fluorescence, correspondant à l'intensité mesurée pour les puits témoins contenant uniquement des macrophages en présence de CFW, a été soustrait. Ainsi, nous avons pu comparer les facteurs de multiplication des trois espèces de *Candida* en présence des macrophages à T = 5 h et T = 24 h par rapport au T = 30 min.

Après quenching au BT, la fluorescence CFW obtenue correspondait à la population de levures contenue dans les macrophages. La comparaison de cette fluorescence à celle obtenue précédemment pour l'ensemble de la population de levures permet d'estimer le pourcentage de levures phagocytées.

A titre d'exemple, le suivi de la multiplication des levures en présence de macrophages et de la proportion de levures phagocytées est présenté dans la **Figure 40** pour *C. lusitaniae*. Les données obtenues pour la comparaison des trois espèces sont présentées dans le manuscrit de l'article n°1.

4.3.2.b. Détermination de la survie des levures

In vivo, la phagocytose des levures par les macrophages et les neutrophiles aboutit à la destruction éventuelle des levures. La viabilité des levures internalisées est donc un paramètre qui a été quantifié. La méthode que nous avons choisie consiste à isoler et à lyser des macrophages après 5 h et 24 h d'interaction avec des levures, puis à récupérer les levures intramacrophagiques, et à les dénombrer à l'hématimètre de Malassez pour en étaler 100 sur du milieu complet YPD. Le pourcentage de survie correspond au nombre de colonies obtenu par rapport aux 100 levures étalées initialement. Les étalements ont été réalisés en duplicats.

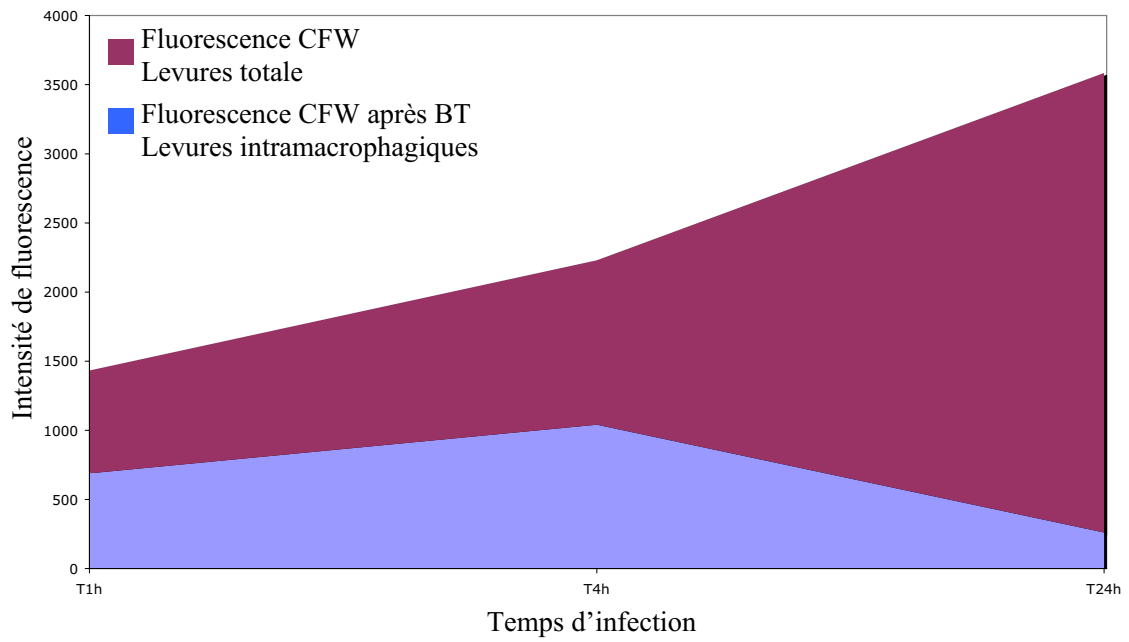


Figure 40 : Suivi de la population de levures totale par mesure de la fluorescence CFW et de la proportion de levures internalisées, par mesure de la fluorescence CFW avant et après quenching par le BT, pendant 24h d'infection de macrophages par *C. lusitaniae*.

Conclusion

Le modèle d'interaction développé au cours de ce travail permet de réaliser une analyse quantitative multiparamétrique et à haut débit de l'infection grâce à la mise au point de marquage spécifique de chaque partenaire. La population de phagocytes est analysée en terme de survie et d'association aux levures et concernant la population de levures, ce modèle permet de suivre leur multiplication, leur survie au cours de l'interaction et le pourcentage de cellules internalisées par les phagocytes.

Ce modèle nous a permis de comparer au niveau quantitatif les infections de macrophages et de neutrophiles par *C. albicans*, *C. lusitaniae* et *C. glabrata*. Après l'observation des interactions au microscope au cours de l'infection de macrophages, les analyses quantitatives ont confirmé qu'ils existaient des différences d'interaction entre les trois espèces de *Candida*. L'ensemble des données obtenues au cours des analyses comparatives des trois espèces de *Candida* sont présentées dans le manuscrit de l'article n°1. Le modèle d'interaction développé au cours de ce travail a aussi été utilisé pour suivre qualitativement les interactions entre les phagocytes et les espèces de *Candida* par vidéo-microscopie. Ces observations ont permis de confirmer les différences d'interaction observées au niveau quantitatif. Les films obtenus par vidéo-microscopie sont disponibles en ligne à l'adresse suivante : « <http://mcmp.aquitaine.cnrs.fr/noel/video.html> ».

B. Manuscrit de l'article n°1 :
***Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida lusitaniae* use different strategies to escape from macrophages and neutrophils phagocytosis.**

***Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida lusitaniae* use different strategies to escape from macrophages phagocytosis**

INTRODUCTION

Fungal infections caused by *Candida* species are increasing particularly in immunocompromised individuals. They can result in very high mortality rate reaching 50% in some cases, usually triggered by bloodstream entry and fungal dissemination to the entire organism. *Candida albicans* is the most frequently responsible of infections (50%). However infections by non-*albicans* species become increasingly frequent. These emerging pathogens include *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. lusitaniae* (Pfaller & Diekema, 2007).

When infecting the host, the fungal cells are confronted to innate immune cells, essentially monocytes and neutrophils in the bloodstream together with macrophages in infected tissues. The innate immunity has been described to be crucial in the host defense against yeast infection. Phagocytic cells possess Pattern-Recognition-Receptors (PRRs) that recognize the Pathogen-Associated-Molecular-Patterns (PAMPs) (Netea *et al.*, 2008) (van de Veerdonk *et al.*, 2008). The fungal cell wall is the first component recognized by the phagocytic cells. The cell wall is essentially composed of mannans and mannoproteins at the external layer, and chitin and glucans at the internal layer. The composition of the fungal cell wall varies between fungal species (de Groot *et al.*, 2008), suggesting diversity in the recognition by the immune cells. This composition also varies between different morphological and physiological states of a same species, notably between exponentially growing cells and stationary phase cells (Klis *et al.*, 2006). Once recognized by the phagocytes, fungal cells are internalized. The interplay between the fungal cell and the phagocyte determine the outcome of the infection.

C. albicans have particular traits which insure that it can cause damages in the host. Morphogenesis and phenotypic switching between yeast and hyphal forms have been for a long time considered as virulence factors as they enable adhesion to the host cells, invasion, tissue damage, and evasion of host immune response. However, *C. albicans* mutants which are morphogenetically locked in either yeast (Lo *et al.*, 1997) or pseudohyphal (Braun & Johnson, 1997) form have been shown to be avirulent. This suggests that the ability to switch between yeast and filament form is critical for pathogenesis, more than the shape itself. Regulators of hyphal production not only control morphogenesis genes but also other virulence genes, therefore the reduced virulence of these regulators mutants cannot solely be attributed to their morphogenetic defects (Gow *et al.*, 2002). Recently Noble *et al.* showed that pathogenesis can be dissociated from morphological switching (Noble *et al.*, 2010). Thus, if morphological switching is an important virulence attribute, it is certainly not the only one. *C. glabrata*, existing only as yeast form, is the second most common cause of disseminated *Candida* infection (Sanglard & Odds, 2002), indicating again that the ability to form true hyphae is not essential for pathogenesis.

It is admitted that *C. albicans* can survive and escape macrophage phagocytosis by its ability to switch from yeast-to-hyphae. However, among the species usually isolated from humans, *C. albicans* is the only *Candida* species with *C. dubliniensis*, to have the capacity to form true hyphae. A study of Kaur *et al.* showed the ability of *C. glabrata* cells to survive and replicate inside macrophages over 24 hours, owing to a gene family (YPS) encoding GPI-linked aspartyl proteases (Kaur *et al.*, 2007). Accordingly, an interesting question addresses the *Candida* non-*albicans* species which are responsible of nearly 50% of the candidiasis and that do not form true hyphae. Do they survive and escape phagocytosis, and if so, do they have alternative strategies? We focused on three *Candida* species harboring different morphological types: *C. glabrata*, only existing under a unicellular yeast form, *C. lusitaniae* found as yeast and pseudohyphae forms, and *C. albicans* which can take the form of yeast, pseudo-hyphae and true hyphae. We report the comparative analysis of the interaction of *C. glabrata*, *C. lusitaniae* and *C. albicans* with the mouse macrophage cell line J774A.1 and human neutrophils. The phagocytic process encompasses two main steps: (1) binding

of target particles by the phagocyte, and (2) internalization of the particle into the phagosome. To precisely quantify the interaction, we combined an assay based on a fluorimetric plate assay (Scott & Woods, 2000) with flow cytometry and viability tests. The fluorimetric assay allowed us to determine the multiplication of yeast population and relative amount of internalized yeasts over time. The flow cytometry assay allowed us to quantify the phagocytes survival and their association to yeast cells (ingested or membrane-bound). All the interactions were also followed qualitatively using microscopy and video microscopy in order to know the outcome of each interaction, and to support the interpretation of the quantitative analysis. We analyzed the association of the phagocytes to the fungal cells (reflecting the recognition of fungal cells by phagocytes), the effect of the phagocytes on fungal cells multiplication, and followed the survival of both cell types during the infection. We pointed out species-specific differences and showed that the three species were not equally associated to the macrophages. The uptake efficiency of fungal cells was also specific to each *Candida* species. Once ingested, the becoming of fungal cells was common to the three species as they all had the ability to escape macrophage phagocytosis at a certain MOI (Multiplicity Of Infection), but the strategy used and the kinetics varied between species. We also pointed out that the different *Candida* species did not affect the phagocytes survival to the same extent. Variation in MOIs influence these parameters, but inter-species phenotypic differences were still noticed. Our results showed that macrophages *in vitro* were relatively unefficient to fight and clear *Candida* yeasts, and that each species used a different strategy to escape phagocytosis. The experiments conducted with human neutrophils showed that despite an equal association to *C. albicans*, *C. lusitaniae* and *C. glabrata*, neutrophils did not survive equally in the presence of the three species.

MATERIALS AND METHODS

Strains, media and growth conditions. *Candida albicans* SC5314, *Candida glabrata* ATCC90030 and *Candida lusitanae* CBS 6936 (ATCC 38533) were used as wild-type strains in all experiments. *Candida* strains were grown in standard medium YPD (1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% dextrose). The murine macrophage line J774A.1 (ATCC TIB-67) was cultured in DMEM (Gibco) plus 10% decompemented fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1 mM sodium pyruvate, or complete RPMI (cRPMI: RPMI-1640 (Sigma) without phenol red plus 10% decompemented FBS, 1 mM sodium pyruvate and 2g/L sodium bicarbonate) for infection experiments, at 37°C in 5% CO₂. Neutrophils were isolated and purified from human blood. For preparation of heat-killed yeast cells, cells were incubated for 30 min at 90°C.

Isolation and purification of human neutrophils. PMN were isolated from human blood (EFS Aquitaine Limousin, Bordeaux) (Dooley *et al.*, 1982). Briefly, dextran allowed the sedimentation of red blood cells. A hypotonic lysis and ammonium chloride were used to remove any remaining red blood cells. The leucocytes were deposited onto a Percoll density gradient (1.075/1.095) (Fluka, SIGMA) and centrifuged at 3000 x g for 20 min at 4°C. The lower ring containing the PMN was collected, the PMN were washed with PBS and resuspended in 0.5X cRPMI. The resulting population contained at least 95% neutrophils.

Infection of phagocytes with yeasts. J774 macrophages were plated in 96-well culture-treated white plates with clear well bottoms (Greiner Bio-one) in 200 µl of cRPMI and incubated overnight at 37°C in 5% CO₂ to adhere. Triplicates of wells were done in each plate and three plates were set up to perform a time course analysis of the infection over 24 hours (at T30min, T5h and T24h). We used 2 x 10⁵ macrophages per well for two multiplicities of infection (MOI 1M:1Y and 1M:5Y) and 3 x 10⁵ macrophages per well for the MOI 5M:1Y. The loss of cells unadhered was lower than 2% of the initial population. Yeast cells were collected from a colony center on a 3-days old YPD solid medium culture, resuspended in 1 ml of cRPMI supplemented with Calcofluor White (CFW) (Sigma) at a final concentration of 5 µg/ml. OD₆₀₀ was measured and the fungal suspension adjusted to the suited concentration in cRPMI supplemented with CFW at a final concentration of 5 µg/ml. Because the size of the cells in a culture can influence the value in the OD₆₀₀ measurements (Uppuluri & Chaffin, 2007), we established the correlation between OD₆₀₀ and CFU for each strain of each species. cRPMI was removed from the wells and J774 macrophages were infected with 200 µl of CFW-labeled yeasts at the suitable concentration depending on the MOI tested. As a control, uninfected phagocytes were stained with CFW at a concentration of 5 µg/µl in cRPMI. PBS was added in 200 µl aliquot to an empty well as a negative fluorescent control. Yeasts in cRPMI without phagocytic cells were included in the plate. The CFW used at a concentration of 5 µg/µl didn't alter the growth or viability of phagocytes and yeast cells. The neutrophils were purified just before being infected with yeasts as described for macrophages, except that interactions were not followed beside 5 hours since these phagocytes have a short life time (about 8 hours).

Fluorimetry and quenching analysis. CFW fluorescence was measured using a FluoStar Optima fluorimeter (BMG Labtech) at an excitation wavelength of 350 nm and emission wavelength of 460 nm. The fluorescence was read from the top with well scanning on a 3x3 matrix of 4 mm diameter. The positioning delay was set up at 0.2 s, and the gain at 1200 or 1400. For OD₆₀₀ measurement, positioning delay was set up at 0.5 s and double orbital shaking was performed before each cycle at 200 rpm for 2 s. Results were recorded in arbitrary fluorescence units (AFU). The vital dye trypan blue (TB) (Sigma) was used to quench fluorescence in the spectral range of CFW. The fluorescence of yeasts free in the medium or attached to macrophages membrane was quenched. As the TB cannot enter viable cells, the unquenched fluorescence reflected yeast cells internalized in viable macrophages. At each time point, the plate was centrifuged 5 min 1500 x g and the wells washed

with PBS to remove unbound CFW. For quenching experiments, each condition was duplicated in the plate: one well received 200 μ l of PBS to read the total fluorescence of CFW-labeled yeasts (intra-macrophagic and extracellular), one well received 200 μ l of trypan blue at the final concentration of 1 mg/ml for *C. albicans* or 250 μ g/ml for *C. lusitaniae* and *C. glabrata* to assess the fluorescence of internalized CFW-labeled yeasts protected from TB exposure. Macrophages alone were treated as the infected ones to assess the residual fluorescence not attributable to yeasts before and after TB quenching. After washing the wells with PBS, 200 μ l of PBS were added and fluorescence was measured. For each well, the value of the fluorescence after quenching was compared to the total fluorescence in PBS to determine the relative amount of yeast population internalized over time. Yeasts alone were included in the plate and treated in the same way to follow the multiplication of the biomass over time. For each time point, the fluorescence of yeasts in presence of macrophages was compared to the fluorescence of yeasts alone to assess the effect of J774 macrophages on yeast biomass multiplication.

Flow cytometry analysis. The quantification of the attachment and/or ingestion of yeast cells by phagocytic cells was done by flow cytometry analysis using a FACSCanto II (Becton Dickinson) equipped for Calcofluor White (λ_{ex} 365 nm, λ_{em} 430 nm, Pacific Blue filter), calcein-AM (λ_{ex} 496 nm, λ_{em} 516 nm, FITC-A filter) and anti-CD16-APC (λ_{ex} 600 nm, λ_{em} 630 nm, APC filter) fluorescence measurements. The data were collected using linear representation for side scatter (SSC) and forward scatter (FSC) and logarithmic representation for fluorescent signals. A constant volume (60 μ l) of each sample was measured at a high flow rate (2 μ l/s). The data were then analyzed by using the FACSDiva software from Becton Dickinson. Phagocytic cells were infected by CFW-labeled yeast cells as described above. After a PBS wash and trypsin treatment, phagocytic cells were labeled with anti-mouse CD16-APC (concentration of 0.2 μ g/ml, Beckman Coulter Cat # 733294) and calcein-AM (concentration of 0.2 μ M, Sigma Cat # 17783). As negative controls, yeast cells alone were labeled with anti-CD16-APC and calcein-AM, and phagocytic cells alone were labeled with CFW and used to determine the background of each fluorescent marker. After different periods of incubation, the plate was kept on ice to stop phagocytosis and samples were analysed by flow cytometry.

Microscopy. Aliquots of phagocytosing macrophages and neutrophils were deposited onto glass slides and observed with a Zeiss Axioplan microscope. The images were recorded with a Micromax camera (Princeton Instruments). The wells of the plate were observed using a Zeiss Axiovert 200 microscope and the images were recorded with a AxioCam ICm1 camera (Zeiss). For video microscopy experiments, 2×10^5 phagocytes were plated in 9 cm² Petri dishes with glass bottoms (Iwaki). 4×10^5 yeast cells in 2 ml of cRPMI medium were added on the phagocytes to start the infection. Movies were recorded at the BIC (Bordeaux Imaging Center) of the University of Bordeaux 2, using an inverted video microscope (Leica) equipped with a Quantem camera. A recording was done every two minutes for 6 to 9 hours at 37°C and 5% CO₂, at 5 different positions on the plate. For each recording, Z steps were done (2 μ m step on a range of 14 μ m). Images were analysed using the Metamorph Offline software (Molecular Devices).

Survival of ingested yeasts. The ability of *Candida* species to resist to phagocytic cells killing was assessed by determining the survival of ingested yeast cells. As *C. albicans* and *C. lusitaniae* cells were never totally intra-macrophagic at any MOI, the viability we assessed included a few macrophage membrane-bound yeasts. Infected macrophages were collected after trypsin treatment and centrifuged for 10 min at 10000 x g. Endocytosed yeast cells were released by lysing the J774 macrophages in 1 ml of 0.1% ice-cold Triton X-100. As a control, yeast cells alone underwent the same treatment to verify that the Triton X-100 treatment didn't alter yeast viability. The yeast cells were counted using Malassez cell and diluted to 1×10^3 cells/ml in YPD. To determine the survival

of yeast cells, 100 μ l of yeast suspensions containing 100 cells were plated on YPD plates in duplicates and incubated at 30°C for 24-48 h. CFU were visually counted, the average was determined and the percentages of survival were determined.

Glucose assay. We used the Glucose (GO) Assay Kit (Sigma), according to the manufacturer's instructions to measure the availability of glucose during the infection experiments. Briefly, the intensity of the pink colored final product (oxidized o-dianisidine) measured at 540 nm is proportional to the glucose concentration. J774 macrophages were infected as described previously by the three species at MOI 1M:1Y. The supernatants were collected after 5 and 24 hours of infection and centrifuged at 2000 x g for 5 min and filter sterilized before the glucose assay was performed.

RESULTS

Fluorometry and flow cytometry analysis allow accurate quantitation of the *in vitro* *Candida* - macrophages interaction

The challenge in developing an *in vitro* cellular model relied on the fact that the two populations interacting changed over time: fungal cells grew and divided, leading to an overall increase in fungal biomass, and phagocytes were killed, imposing the need to specifically follow each population during the interaction. We chose to develop our model using the J774 murin macrophage cell line for technical convenience. We used different fluorescent markers specific to each population: fungal cells were labeled with Calcofluor White (CFW) that binds chitin and glucans in the cell wall of alive or dead yeasts. Phagocytes were double stained with calcein, a marker of an active metabolism and membrane integrity, and anti-CD16 antibodies staining the membrane, the phagocytes fluorescing for both markers were considered alive. We checked that each marker was specific of each population, and didn't alter cell growth or viability at the concentrations used (data not shown). We measured the CFW fluorescence by fluorimetry to monitor the multiplication of the fungal population. In order to distinguish between yeast cells simply attached to macrophages membrane or free in the medium, and internalized yeast cells within the phagocytes, we used the property of Trypan Blue (TB), a vital dye that does not enter viable cells, to quench CFW fluorescence. Yeasts exposed to TB lost their fluorescence, whereas yeasts ingested inside macrophages kept their CFW fluorescence. A measure of total fluorescence was done in PBS before quenching, and a second measure was done after TB quenching to get the residual fluorescence reflecting the part of ingested fungal cells.

First we checked that TB efficiently quenched the fluorescence of CFW-labeled yeasts (**Figure 1**): *C. lusitaniae* cells were labeled with CFW at a final concentration of 5 µg/ml and the fluorescence was measured with a spectrophotometer. CFW emits fluorescence around 430-460 nm when bound to yeast cell wall, and gives negligible background fluorescence when unbound. When TB was added to the CFW-labeled yeasts at a final concentration of 250 µg/ml, the CFW fluorescence was quenched to the baseline observed for CFW alone. We then observed with the microscope the fluorescence of macrophages infected with CFW-labeled *C. lusitaniae* after quenching (**Figure 2**). We confirmed that fluorescence of extracellular yeast cells was quenched whereas yeast cells that have been taken up still showed strong fluorescence. Next, we tested the proportionality between CFW fluorescence and OD₆₀₀ in a range of 10³ to 10⁸ CFU per 100 µl for *C. albicans*, *C. lusitaniae* and *C. glabrata* in 96-well plates (data not shown). The minimal number of CFU that gave a fluorescence signal above the background was 10⁵ CFU per 100 µl, and the CFW fluorescence was linear with the OD₆₀₀ in the range of 10⁵ to 10⁶ CFU per 100 µl for the three *Candida* species. Therefore we chose to use 10⁵ to 10⁶ CFU per 100 µl for infection experiments. The CFW used at 5 µg/ml did not affect the growth of yeast cells in these conditions. We then determined the quantity of CFW fluorescence bound to yeast cells that the TB used at 250 µg/ml could quench. Macrophages (2 x 10⁵) were infected with *C. lusitaniae* ranging from 1 x 10⁵ to 1 x 10⁷ cells per 100 µl. Fluorescence was measured before and after quenching. We observed that CFW fluorescence signal was linear between 1 x 10⁶ and 1 x 10⁷ yeasts per 100 µl, and that TB could efficiently quench the fluorescence of CFW-labeled yeasts up to 1 x 10⁷ cells per 100 µl (**Figure 3**). The quenching of CFW-labeled yeasts was checked with the microscope. We determined that TB at 250 µg/ml was suited to quench the CFW fluorescence of both *C. lusitaniae* and *C. glabrata*, whereas 1 mg/ml was needed for *C. albicans* (data not shown).

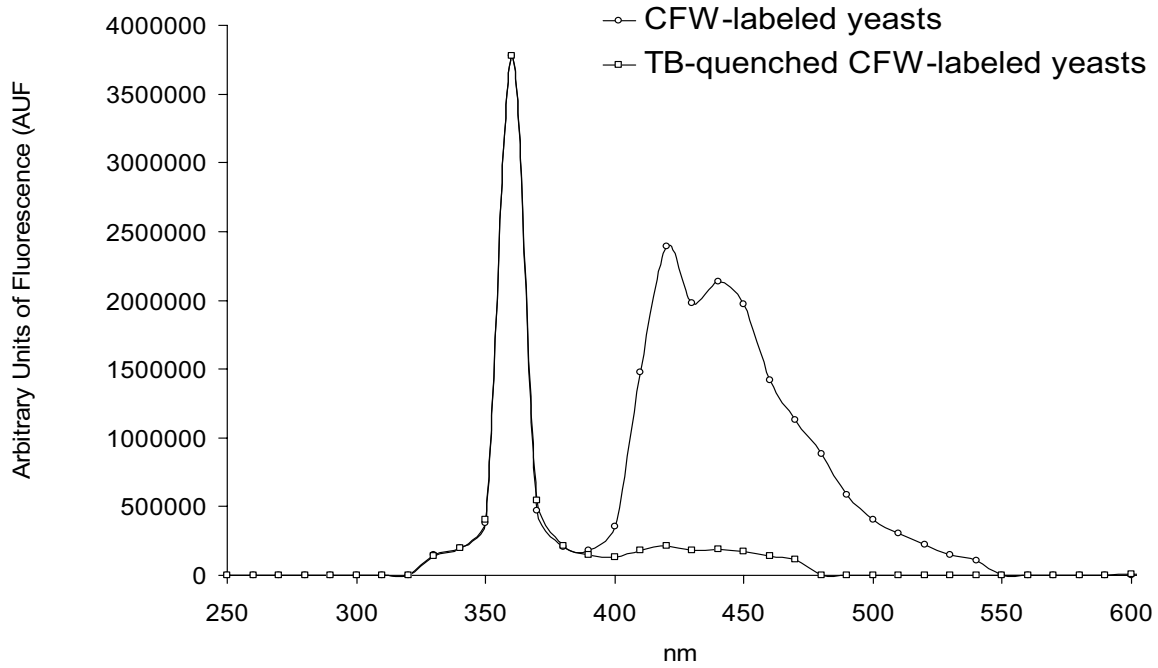


Figure 1: TB efficiently quenched CFW-labeled yeasts fluorescence. Excitation wavelength was set up at 360 nm and emission wavelength was set up to cover the entire emission spectra of CFW.

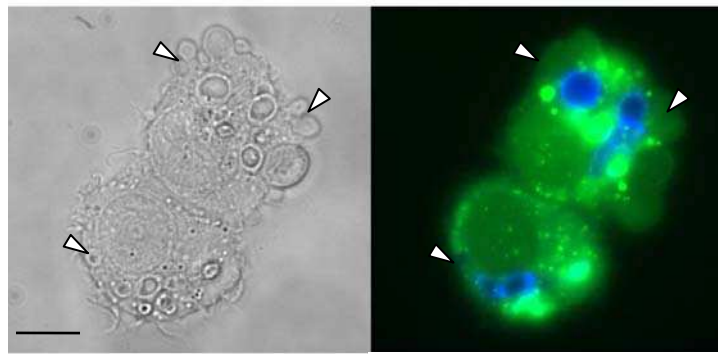


Figure 2: Macrophages after 4 hours of infection with *C. lusitaniae*. Yeast cells were stained with CFW (blue), macrophages were stained with calcein (green). Left panel: phase contrast, right panel: fluorescence. The fungal cells ingested inside the macrophages were protected from TB quenching and fluoresced, whereas membrane-bound yeasts exposed to TB quenching did not (white arrowheads). A pseudohyphae can be seen within the macrophage (white arrow). The bar represents 20 μm .

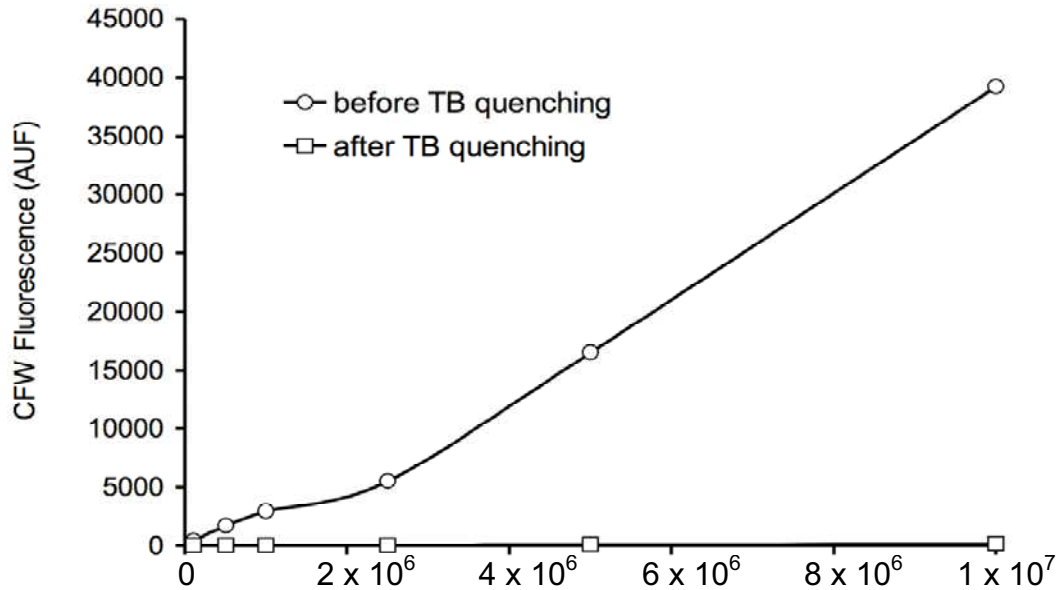


Figure 3: Fluorometric detection of CFW-labeled *C. lusitaniae* cells before and after TB quenching. TB used at 250 µg/ml quenched the CFW fluorescence to background level up to 1×10^7 *C. lusitaniae* cells / 100 µl.

In order to accurately quantify the association of macrophages to the fungal cells and assess the viability of phagocytes, we used flow cytometry. Fungal cells were labeled with CFW and macrophages with calcein and anti-CD16, allowing to distinguish two populations. **Figure 4** shows the results of flow cytometric analysis of CFW-labeled yeasts alone, anti-CD16 and calcein double-stained macrophages alone, or infected with yeasts after 5 hours of incubation. The CFW-labeled yeasts and the anti-CD16 and calcein double-stained macrophages were observed as distinct populations on the flow cytometer (**Figure 4 A et B**). Unstained cells were used as negative controls. The baseline fluorescence of each marker was set up with the analysis of each population alone. In order to determine the association of macrophages to fungal cells, the population of macrophages positive for both calcein and anti-CD16 fluorescence, considered as alive, was selected and analysed for CFW fluorescence (**Figure 4 C**). The macrophages associated with yeasts were positive for CFW fluorescence, whereas macrophages alone were negative. The percentage of macrophages associated to yeasts was calculated as the number of macrophages positive for CFW fluorescence among the total number of double-stained macrophages. The different populations were sorted at T5h and observed with the microscope to verify that the population positive for calcein, anti-CD16 and CFW fluorescences really corresponded to macrophages that had taken up yeast cells (**Figure 4 C**). The percentage of macrophages viability was calculated as the number of macrophages positive for both fluorescences (calcein and anti-CD16) in an infection test versus the macrophages alone. The term “aggressiveness” was attributed to qualify the effect of yeast cells on macrophages viability.

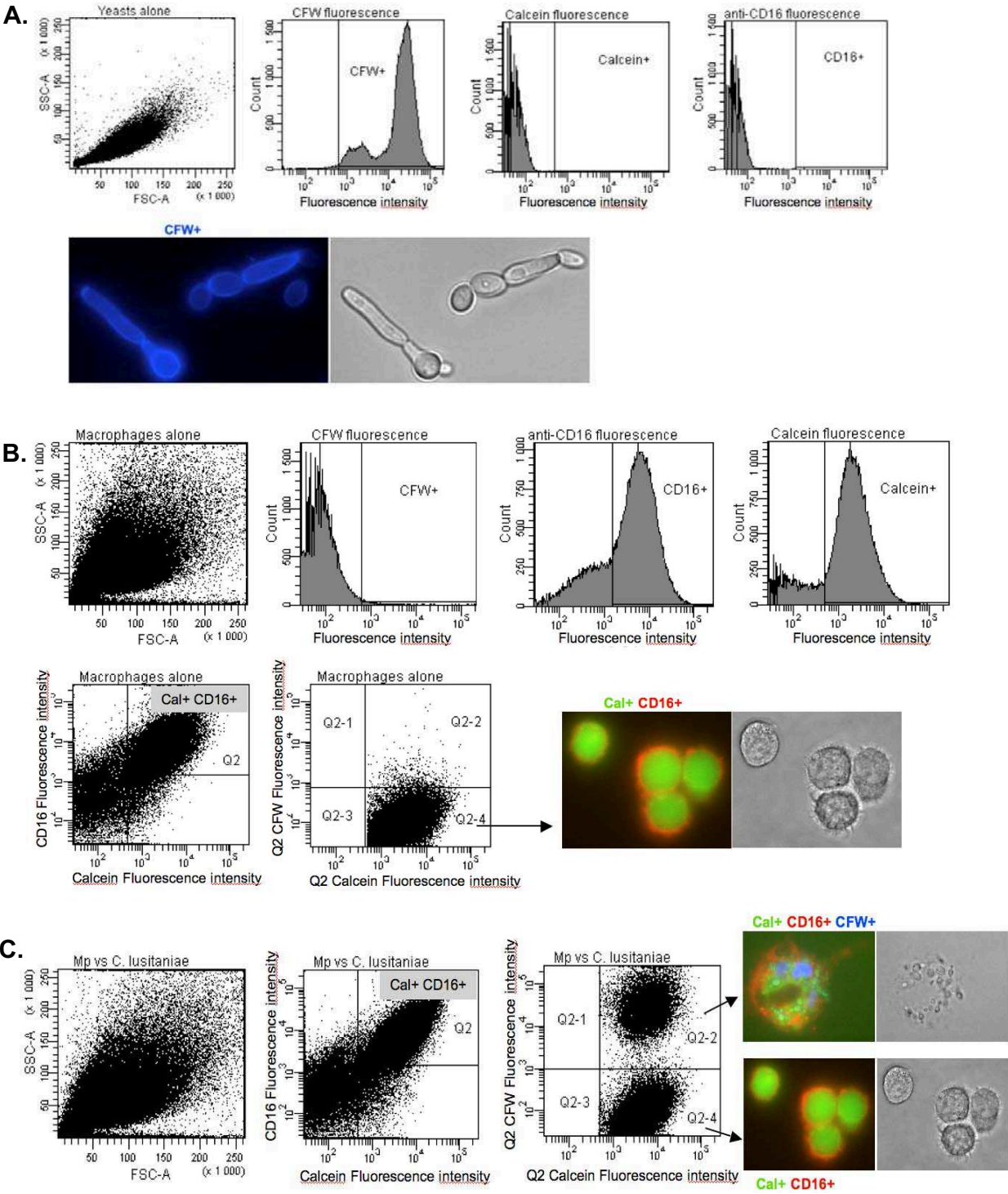


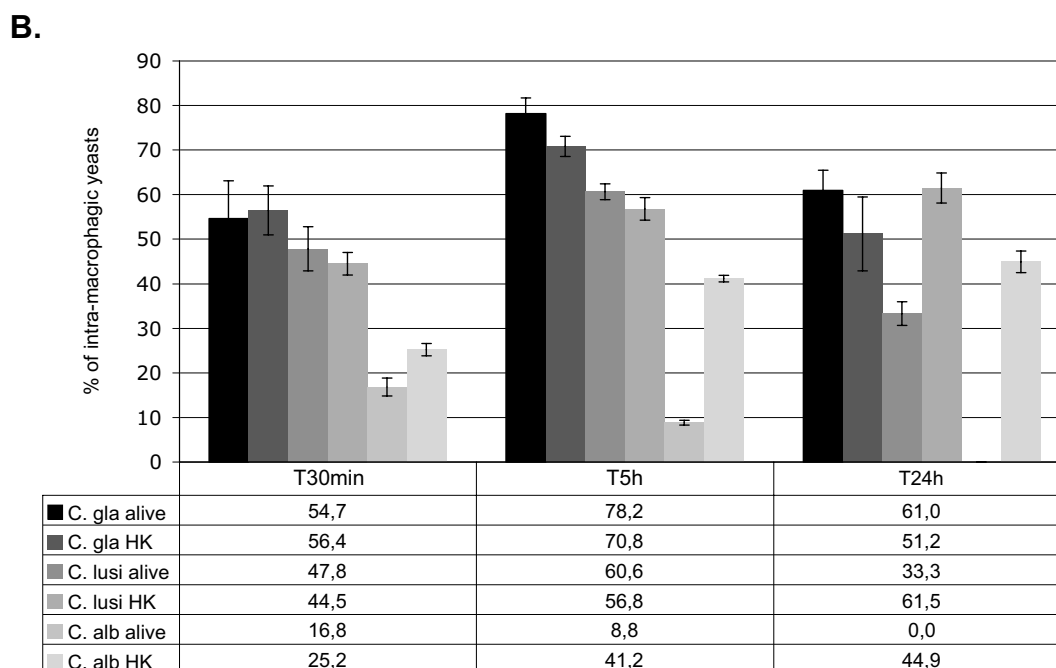
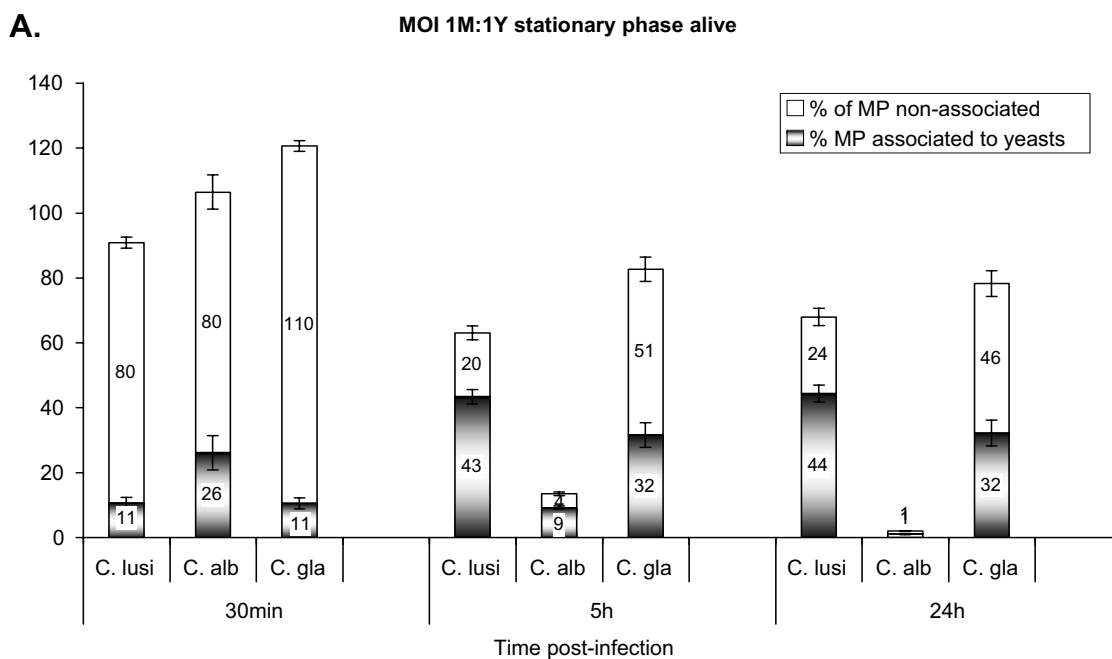
Figure 4: Flow cytometry analysis of the macrophages interacting with yeasts. Fluorescence of *C. lusitaniae* alone (A), macrophages alone (B) and macrophages infected with *C. lusitaniae* (C) after 5 hours of incubation. The vertical line defines the baseline above which the fluorescence is positive. The CFW-labeled yeast cells only showed a positive signal for CFW fluorescence, the calcein and anti-CD16 double-stained macrophages only showed a positive signal for calcein and anti-CD16 fluorescences. The cellular populations sorted after flow cytometry were checked with the microscope.

Effect of fungal developmental stages (exponential and stationary phases), and of heat-killed and live fungal cells on the survival of J774 macrophages

C. albicans mobilizes more, but is less taken up by macrophages, and is more aggressive than *C. lusitaniae* and *C. glabrata* in stationary phase at MOI 1M:1Y. J774 macrophages were infected with blastospores of *C. albicans*, *C. lusitaniae* and *C. glabrata* at the MOI 1M:1Y in a medium containing CFW for the continuous labeling of fungal cells. Because of the morphological changes that could occur for the different yeast species during the infection process, variations in CFW fluorescence were interpreted as variations in fungal biomass rather than variations in the number of cells.

After 30 min of incubation, about 100% of J774 macrophages infected with *C. albicans*, *C. glabrata* or *C. lusitaniae* were alive. *C. albicans* mobilized twice to three times more macrophages (**Figure 5 A**), but was less internalized than the two other species (about 50% of *C. lusitaniae* and *C. glabrata* populations were intra-macrophagic, whereas only 17% of *C. albicans* were taken up) (**figure 5B**), indicating that the macrophages were less efficient in phagocytosing *C. albicans* than *C. glabrata* and *C. lusitaniae* (**Figure 5 C**). After 5 hours of infection, *C. albicans* appeared to be the more aggressive species in terms of macrophage killing, as only 13% of macrophages survived, versus 63% with *C. lusitaniae* and 82% with *C. glabrata* (**Figure 5 A and C**). Among the 13% of surviving J774 macrophages, 67% had internalized less than 10% of the *C. albicans* population (**Figure 5 B and C**) which increased about 2 times in the presence of the macrophages (**Figure 5 C**). Therefore the J774 macrophages were relatively inefficient to engulf and control *C. albicans* cells growth. There was no significant difference between *C. lusitaniae* and *C. glabrata* in the macrophage killing, as $63\% \pm 13$ and $83\% \pm 6$ of macrophages survived, respectively (**Figure 5 A and C**). *C. lusitaniae* and *C. glabrata* biomasses increased to the same extent in presence of macrophages (**Figure 5 C**). 68% of the live macrophages internalized 60% of the *C. lusitaniae* population, whereas only 39% of the live macrophages contained 78% of the *C. glabrata* population (**Figure 5 B and C**). These results indicated that *C. lusitaniae* cells were less efficiently internalized by the J774 macrophages than *C. glabrata*. We confirmed with the microscope that all *C. glabrata* cells were cleared out from the medium by J774 macrophages whereas many *C. lusitaniae* cells were observed unengulfed. At the same time, *C. albicans* hyphae pierced the majority of macrophages (**Figure 6**). The proportion of *C. glabrata* unquenched (about 80%) confirmed that the majority of the cells were engulfed in intact macrophages (**Figure 5 A**). This rate did not reach 100% probably because of a proportion of killed macrophages that allowed the quenching of a part of the engulfed fungal cells. 24 hours post-infection, all the macrophages infected with *C. albicans* were killed (**Figure 5 A**), and no fungal cell was detected in viable macrophages after fluorescence quenching experiment, indicating that the entire *C. albicans* population was unengulfed (**Figure 5 B**). The proportion of macrophages engaged in phagocytosis with *C. glabrata* and *C. lusitaniae*, as well as the proportion of viable macrophages, were similar to the T5h, indicating that *C. lusitaniae* and *C. glabrata* didn't kill macrophages and that the proportion of macrophages engaged in phagocytosis reached a plateau (**Figure 5 C**). *C. glabrata* was entirely taken up in macrophages after 5h of interaction (**Figure 6**), and yeast cells remained intra-macrophagic at 24 hours post-infection, indicating that the macrophages were efficient to contain *C. glabrata* at this MOI. The total fluorescence didn't significantly changed since T5h, consistent with the fact that the entire *C. glabrata* population was contained inside macrophages at T5h (in the case the fungal cells would multiply inside J774, an increase in intra-cellular fluorescence could not be detected as the CFW can not enter viable macrophages) (Berglund & Starkey, 1989). We observed a significant decrease in the fraction of internalized *C. lusitaniae* (33%) (**Figure 5 B**) that is likely the consequence of the 5 times increase of total fungal biomass compared to the initial inoculum (**Figure 5 C**). Indeed, the fluorescence of ingested yeasts (data not shown), as well as the total fluorescence, increased between T5h and T24h, together with a constant macrophage survival, indicating that macrophages kept ingesting *C. lusitaniae*, and that extra-

cellular fungal cells kept multiplying. It is interesting to note that the increase of intra-cellular fluorescence did not correlate with an increase in the association of macrophages to fungal cells; this suggested that macrophages that already ingested fungal cells were more susceptible to engulf other yeast cells than naïve macrophages.



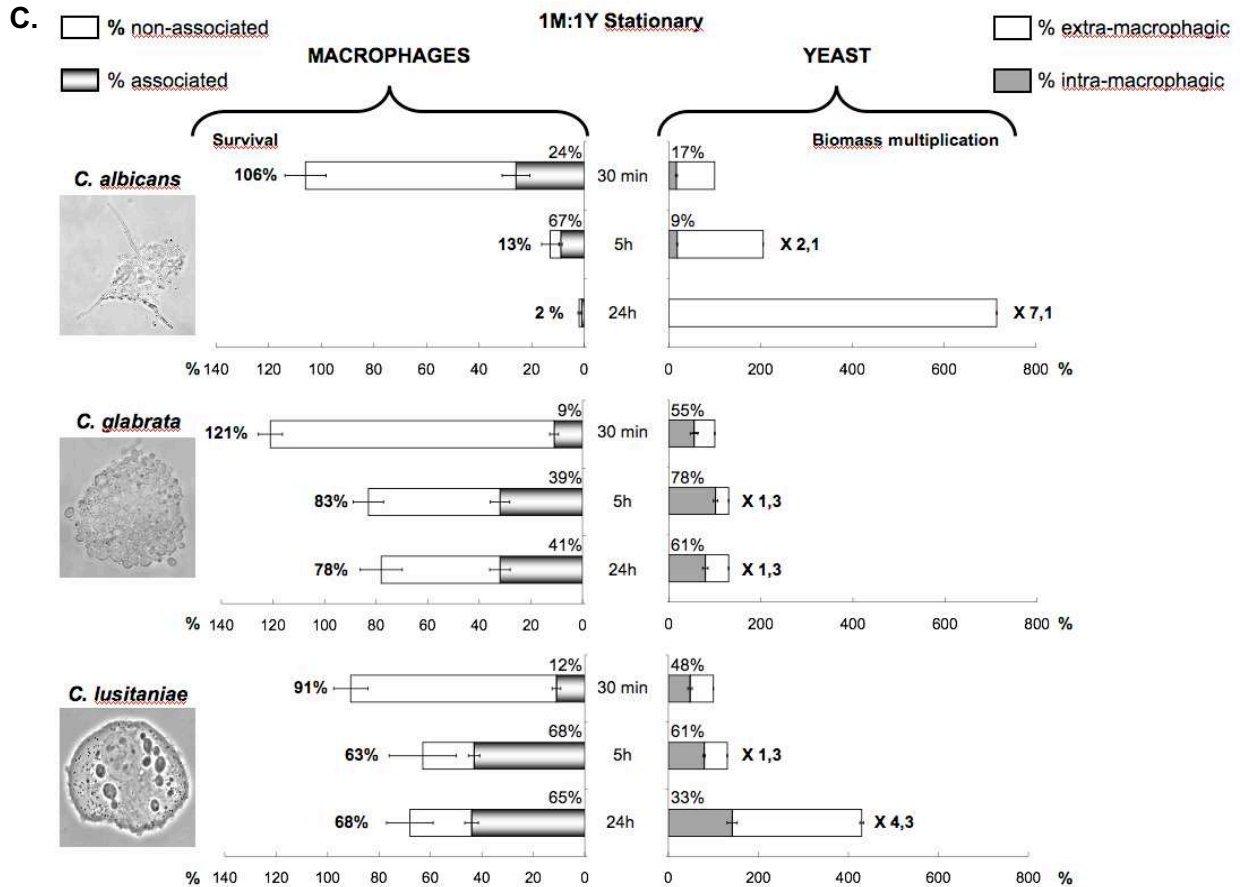


Figure 5: Analysis of the interactions involving J774 macrophages and living yeast cells in stationary phase at MOI 1M:1Y over a 24 hours time course experiment. (A) Effect of yeast cells on macrophage viability and percentage of macrophages associated to the yeast cells. Each bar represents the viability of infected macrophages, and the part associated (shaded tones) or not (white) to yeast cells. Note that *C. albicans* mobilized more macrophages and was more aggressive (T5h and T24h) than *C. glabrata* and *C. lusitaniae*. **(B)** Part of the total fungal population internalized in viable macrophages. Note the lower uptake of *C. albicans* cells. Each condition was performed in quintuplets (A) or in triplicates (B). Each bar is the average of three independent experiments +/- standard error. **(C)** Diagram made of the compilation of (A) and (B) allowing to see in a single panel the behaviour of each partner during 24h of interaction. The left part shows the flow cytometry analysis of the macrophages population: the J774 survival is indicated on the left side of the horizontal bar. The white area of the bar indicates the percentage of J774 non-associated, the shaded tones area indicates the percentage of J774 associated to yeast cells. The right part shows the fluorimeter analysis of the fungal population: the biomass increase is given on the right side of the horizontal bar. The white area of the bar represents the percentage of extra-macrophagic yeast cells, the grey area shows the percentage of fungal biomass internalized within J774 macrophages.

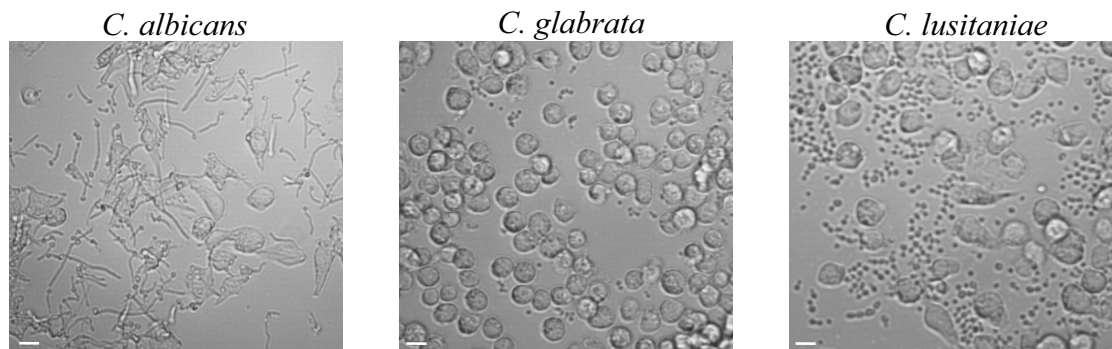


Figure 6: Representative pictures of J774 macrophages after 5 hours of infection with the three *Candida* species in culture flasks (x200). Note that the totality of *C. glabrata* cells were engulfed, whereas *C. albicans* (mostly under filamentous form) and *C. lusitaniae* cells were still observed outside the macrophages. The bars represent 40 μ m.

How does the growth-dependent physiological state of the *Candida* cells influence the interaction with the macrophages? It is known that the yeast cell wall composition and transcript profile vary with the physiological state of development (Klis et al., 2006), notably when considering cells grown in exponential vs. stationary phase. In the aim to determine the effect of the yeast physiological state on the *Candida*-macrophage interaction, macrophages were infected with yeast cells from either exponential or stationary phase, and the phenotypes were compared. In both cases, among the three species, *C. albicans* triggered the higher macrophage mortality and was entirely extra-macrophagic at T24h (**Figure 7**). However, at T5h, macrophages survived better to *C. albicans* when taken in exponential phase ($35\% \pm 12$) than in stationary phase ($13\% \pm 3$). Macrophages infected with either exponential or stationary phase of *C. glabrata* showed similar survival and association to fungal cells (**Figures 5 and 7**). However, *C. glabrata* biomass was never fully engulfed by macrophages when taken in exponential phase, and kept multiplying outside. Macrophages infected with either exponential or stationary phase of *C. lusitaniae* showed a similar association to yeast cells. However at T24h, macrophage survival was lower when *C. lusitaniae* was taken in exponential phase ($42\% \pm 10$) (**Figure 7**) than in stationary phase ($68\% \pm 9$) (**Figure 5**). Furthermore, our data showed that exponential phase cells of *C. lusitaniae* were less internalized ($38\% \pm 8$ vs $61\% \pm 2$ at T5h and $6\% \pm 0.3$ vs $33\% \pm 3$ at T24h), and that unlike stationary phase cells, they escaped from macrophage phagocytosis at T24h. Thus, both *C. lusitaniae* and *C. glabrata* biomasses were less engulfed by macrophages when taken in exponential phase compared to stationary phase. All together, these results suggested that exponential phases of *C. lusitaniae* and *C. glabrata* escaped more easily from macrophage phagocytosis than stationary phase cells. Even if the growth-dependent physiological state of the *Candida* cells influenced the interaction with macrophages at some levels (macrophage survival and association to yeast cells, or efficiency of fungal biomass uptake), the global profile of the interaction within a *Candida* species was similar for exponential and stationary phases. Thus, for technical convenience, we chose to infect phagocytes with stationary cultures for further experiments. This allowed us to use inocula from colonies growing on solid media in order to synchronize the cells under the yeast form at the beginning of the infection process. Our choice to work with cells in stationary phase was reinforced by a study that showed that transcriptional profile of yeast cells *in vivo* was related to laboratory stationary phase (Uppuluri & Chaffin, 2007).

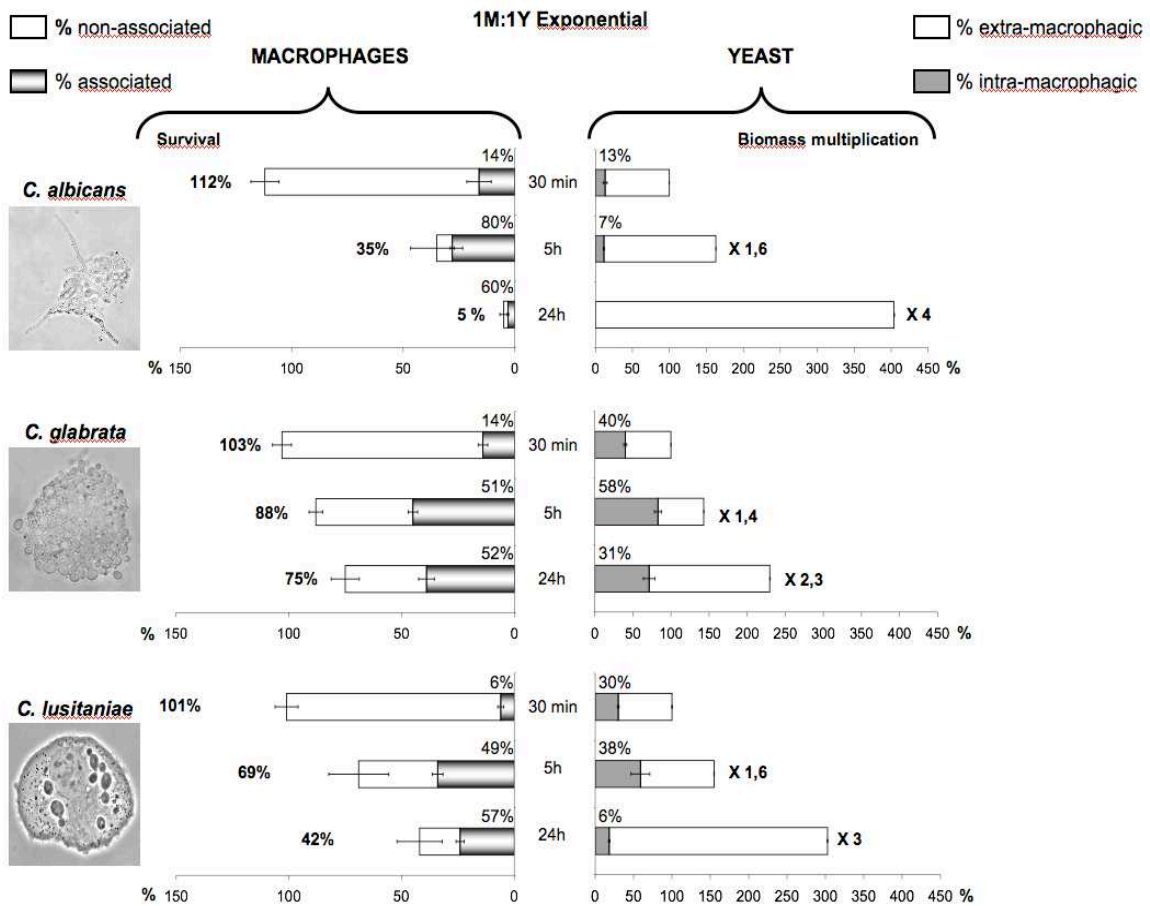


Figure 7: Analysis of the interactions involving J774 macrophages and living yeast cells in exponential phase at MOI 1M:1Y over 24 hours time course experiments. For the legend description, please refer to figure 5. Note that the macrophage killing and the proportion of macrophages associated to yeasts were higher for *C. albicans* than for *C. glabrata* and *C. lusitaniae*. Note the lower uptake of *C. albicans* biomass compared to *C. glabrata* and *C. lusitaniae*. Each condition was performed in quintuplets (flow cytometry experiments) or in triplicates (fluorescence quenching experiments). Each bar is the average of three independent experiments +/- standard error.

Do active fungal metabolic activity contribute to the interaction with macrophages? To determine if the macrophage association to yeast cells, the macrophage killing and the fungal biomass uptake relied on fungal metabolic activity, we compared live vs. heat-killed yeast cells from stationary phase for their interaction with macrophages at MOI 1M:1Y. We chose to inactivate yeast by heat-treatment rather than UV because it was shown that UV-treated *C. albicans* cells still exhibited about 65% of the live cells metabolic activity (Wellington *et al.*, 2009).

When we used heat-killed yeasts, we observed about 20% of macrophages killed at T5 hrs and T24 hrs, independently of the species (Figure 8). Until 24 hours post-infection, live *C. glabrata* and *C. lusitaniae* cells didn't trigger significantly higher macrophage mortality than when heat-killed (compare Figures 5 C and 8), indicating that the macrophage killing did not involve fungal metabolic activity. In contrast, live *C. albicans* cells triggered much higher macrophages mortality (about 85% of macrophage killing after 5 hours, and about 100% after 24h) than when heat-killed (about 20% as for *C. glabrata* and *C. lusitaniae*) indicating that *C. albicans*-induced active mechanisms were involved and/or, alternatively, that heat-killing altered some cell wall components involved in triggering the macrophage cell death. During the whole interaction, the part of macrophages associated to the heat-killed yeast cells was smaller than with live yeast cells,

independently of the species. This suggested that macrophage recognition of yeast cells involved fungal active mechanisms, and/or that the cell wall components recognized by the macrophages were modified by the heat-treatment. When heat-inactivated, yeasts from the three species differed in their interaction with the macrophages. For example at T5h, only 12% of the macrophages were mobilized to ingest 71% of *C. glabrata* population (**Figure 8**); 28% of the macrophages were mobilized to engulf 57% of *C. lusitaniae* population; and 52% of the macrophages were mobilized to ingest 41% of *C. albicans* population; and. Thus, the heat-killing of the yeast cells pointed out some inter-species differences in terms of macrophages recognition. J774 macrophages were the most efficient to take up *C. glabrata*, and the less efficient to take up *C. albicans* dead cells.

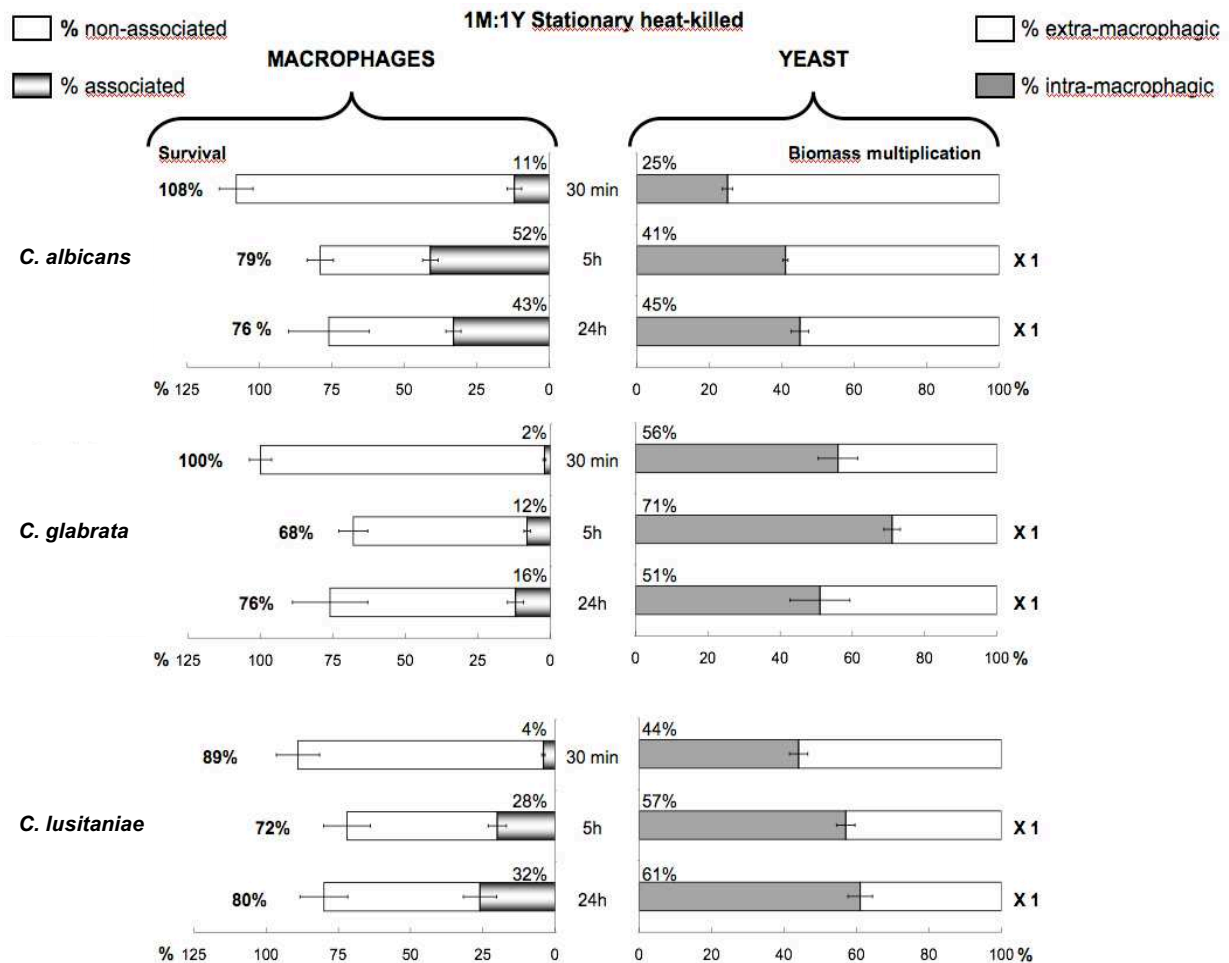


Figure 8: Analysis of the interactions involving J774 macrophages and heat-killed yeast cells in stationary phase at MOI 1M:1Y over 24 hours time course experiments. For the legend description, please refer to figure 5. Note that about 20% of the macrophages were killed with any of the *Candida* species and that *C. glabrata* mobilized the smaller proportion of macrophages, and *C. albicans* the higher.

When *C. lusitaniae* and *C. glabrata* were used in excess over the J774 macrophages, the macrophage killing and escape from phagocytosis were increased. We first challenged the macrophages with an excess of yeasts at MOI 1M:5Y to test how this could affect the macrophage survival. As expected, *C. albicans* was the more aggressive at T5h. Interestingly, macrophages

infected with an excess of *C. glabrata* or *C. lusitaniae* showed an increased mortality compared to MOI 1M:1Y at T24h (78% of macrophages survived to *C. glabrata* at MOI 1M:1Y vs. 52% at MOI 1M:5Y; 68% survived to *C. lusitaniae* at MOI 1M:1Y vs. 26% at MOI 1M:5Y) (**Figures 5 and 9**). Despite macrophages were equally engaged in phagocytosis with *C. glabrata* and *C. lusitaniae* (about 80% for both species at T5h and T24h), macrophages significantly differed in the proportion of internalized biomass (88% of *C. glabrata* taken up at T5h, vs. 42% for *C. lusitaniae* (**Figure 9**)), indicating again that macrophages were less efficient to engulf *C. lusitaniae* than *C. glabrata*. At T24h, only 9% of *C. glabrata* and 7% of *C. lusitaniae* populations were within macrophages. Together with the increase in the macrophage killing, this observation suggested that both *C. glabrata* and *C. lusitaniae* escaped macrophages in 24 hours at MOI 1M:5Y, causing phagocytes death, and multiplied outside. Infecting the macrophages with an excess of yeast cells thus emphasized some phenotypes observed at MOI 1M:1Y: macrophages showed an increased association to yeast cells and an increased mortality, independently of the *Candida* species. Our results suggested that *C. glabrata* and *C. lusitaniae* were able to escape from macrophage phagocytosis at MOI 1M:5Y only, which was confirmed by observation with the microscope.

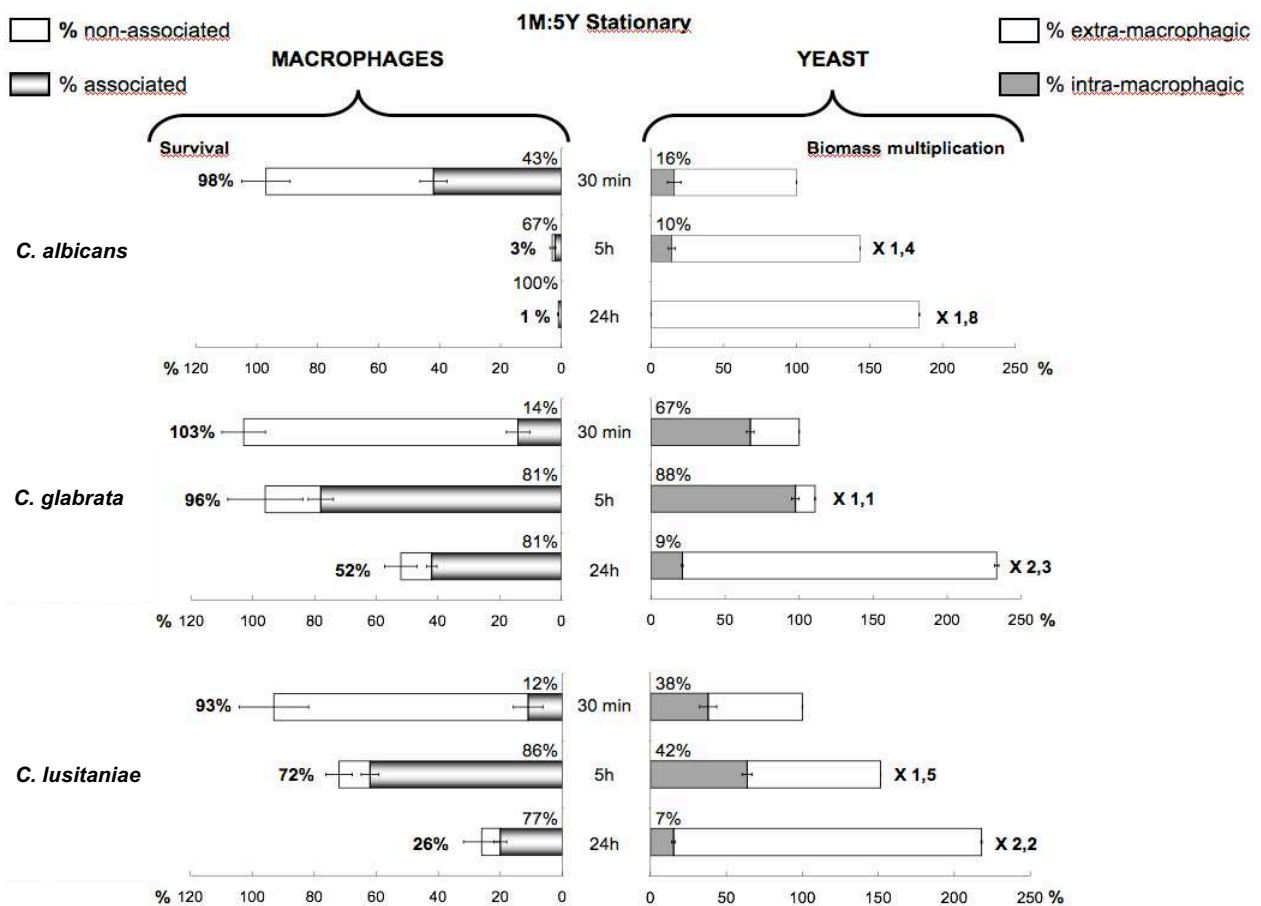


Figure 9. Analysis of the interactions involving J774 macrophages and live yeast cells in stationary phase at MOI 1M:5Y over 24 hours time course experiments. For the legend description, please refer to figure 5. *C. glabrata* and *C. lusitaniae* killed more macrophages than at MOI 1M:1Y at T24h. *C. albicans* again mobilized and killed more macrophages than the two other species. Note the higher uptake of *C. glabrata* cells, and the escape of the three *Candida* species at T24h.

When macrophages were used in excess, killing by *C. albicans* was delayed and *C. glabrata* and *C. lusitaniae* were more efficiently taken up. We used a MOI 5M:1Y to test if macrophages in excess could survive better to the different *Candida* species and engulf more fungal biomass. Macrophages in excess survived better to *C. albicans* infection at T5h than at MOI 1M:1Y (66% of survival at MOI 5M:1Y vs. 13% of survival at MOI 1M:1Y) (Figures 5 and 10), but after 24 hours, all the phagocytes were killed and the entire fungal biomass was extra-macrophagic. Compared to MOI 1M:1Y, when the number of macrophages was increased over yeast cells, we found smaller percentages of macrophages associated to yeast cells, and higher proportions of ingested fungal biomasses, independently of the *Candida* species. Only 1% of the macrophages were mobilized to take up about 80% of *C. glabrata* and *C. lusitaniae* biomasses at T30min. *C. glabrata* was almost fully contained within macrophages at T30min, and stayed so until T24h, while *C. lusitaniae* multiplied outside macrophages. These results showed that when used in excess towards *Candida* species, the macrophages were more efficient to resist to *C. albicans* induced-cell death during the early stages of interaction, and to engulf more fungal biomass whatever the *Candida* species.

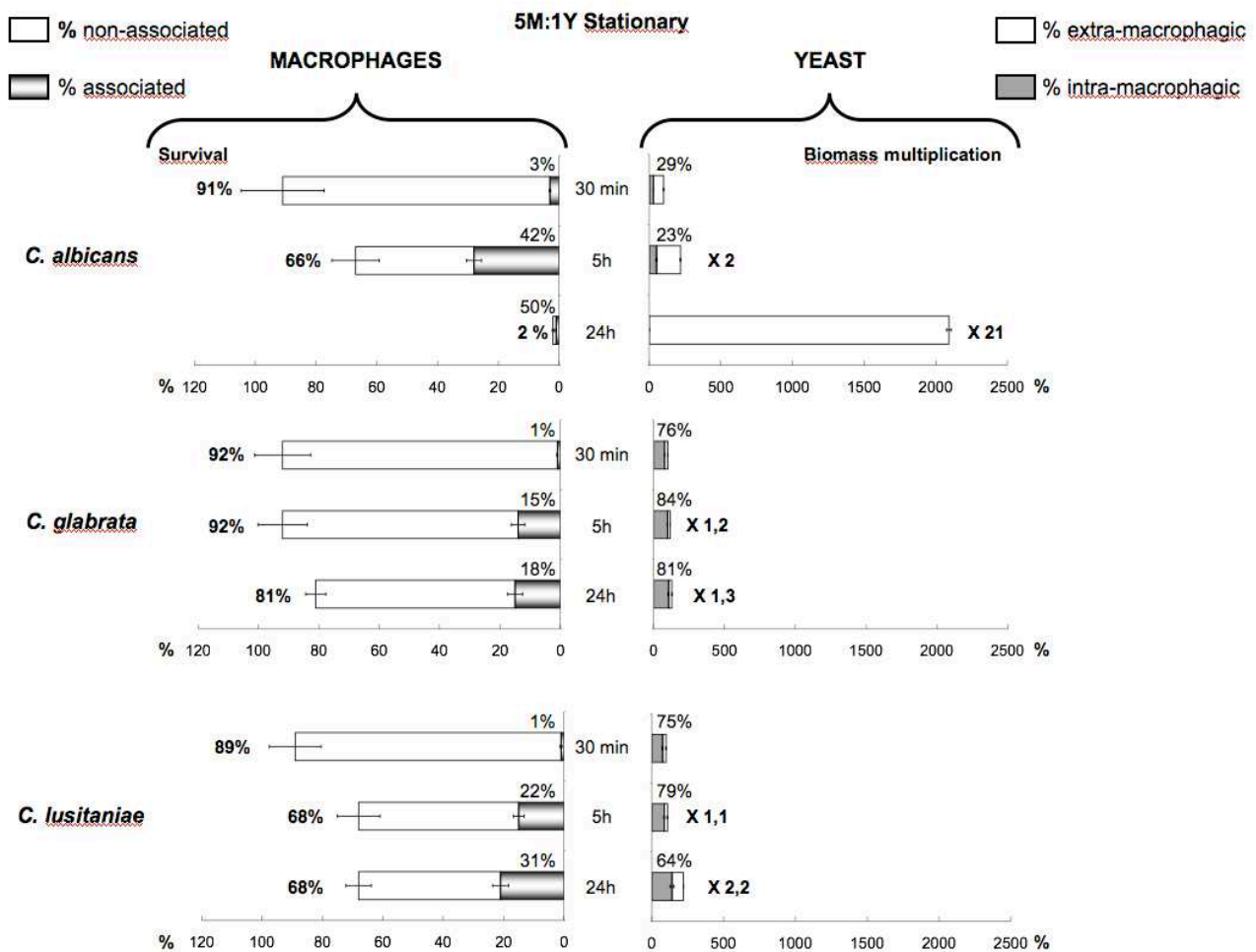


Figure 10. Analysis of the interactions involving J774 macrophages and live yeast cells in stationary phase at MOI 5M:1Y over 24 hours time course experiments. For the legend description, please refer to figure 5. Note that the macrophage killing with *C. albicans* is lower than at MOI 1M:1Y. Note the equally high uptake of *C. glabrata* and *C. lusitaniae* and the lower uptake of *C. albicans* biomass, that was the only one species that finally escaped the macrophages at that MOI.

The macrophages cell death was not due to nutritional depletion of the medium during infection: We wanted to verify that the killing of J774 macrophages we observed during an infection experiment could not be attributed to the depletion of nutrients in the culture media, or to the accumulation of toxic compounds. For that purpose, we measured the quantity of glucose in the supernatants of J774 macrophages infected with the three *Candida* species for 5 and 24 hours at the MOI 1M:1Y. As a control, uninfected macrophages were included in the assay and fresh cRPMI alone was used as the reference (defined as 100% with 2g/L glucose).

Table 1: Measurement of glucose consumption during infection of J774 macrophages with *Candida* species

Supernatants of	% of glucose consumed
J774 alone 5h	20
J774 + <i>C. albicans</i> after 5h	83
J774 + <i>C. glabrata</i> after 5h	23
J774 + <i>C. lusitaniae</i> after 5h	28
J774 alone 24h	36
J774 + <i>C. albicans</i> after 24h	100
J774 + <i>C. glabrata</i> after 24h	94
J774 + <i>C. lusitaniae</i> after 24h	100

Uninfected macrophages depleted about 40% of the glucose present in the media after 24 hours. When macrophages were infected with the fungal cells, more than 90% of the glucose was depleted after 24 hours, independently of the species. After 5 hours, the higher depletion in glucose was observed when J774 were infected with *C. albicans*. Next, we checked if this depletion in glucose could be responsible for the macrophage mortality during infection. Macrophages were incubated during 5 hours with different supernatants collected as described above, before assessing their survival by flow cytometry. None of the supernatants tested, despite the total depletion of the glucose present in the media after 24 hours of infection, triggered macrophages cell death (**data not shown**). Thus, we concluded that the macrophages cell death observed during infection was neither due to any nutritional starvation, nor to a release of a toxic compound in the supernatant by one of the cell type. These results indicated that the J774 macrophage mortality was directly related to phagocytosis of *Candida* cells.

Fungicidal activity of macrophages toward the different *Candida* species. To investigate the capacity of macrophages to kill the different species of *Candida*, the survival of yeast cells was determined following 5 and 24 hours of incubation with phagocytic cells (**Figure 11**). 100% of *C. albicans* cells survived, while 20% and 40% of *C. glabrata* and *C. lusitaniae* were killed respectively within 24 hours of interaction with macrophages.

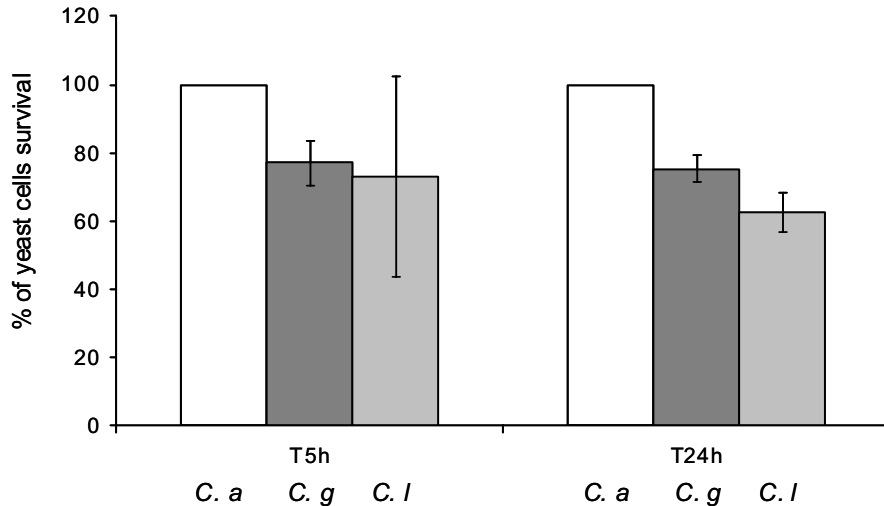


Figure 11: Analysis of yeast cells survival by CFU plating. Infected macrophages were harvested after 5 and 24 hours of interaction, and intra-macrophagic fungal cells were released using Triton X-100 lysis.

Infection of human neutrophils with *Candida* species in stationary phase. Neutrophils have been shown to have the most pronounced and immediate effect on *C. albicans* (Fradin *et al.*, 2005). We studied the interaction of the three *Candida* species with human neutrophils to determine (1) their association to the fungal cells (2) their survival. We could not follow the internalization of the yeast cells with the quenching technique for a technical reason: the neutrophils were loosely adherent to plastic in contrast to macrophages, and were lost during the quenching steps. We did not further try to artificially make the neutrophils adhering on the bottom of the well using gelatin, or collagen to coat the culture plates, to avoid interference of any external molecule with the *Candida*-phagocyte interaction. Furthermore, determining the percentage of internalized yeast cells is a less discriminant parameter with neutrophils, because a part of neutrophils are able to capture and destroy pathogens extracellularly owing to the formation of NETs (Neutrophils Extracellular Traps) (Urban *et al.*, 2006). As we did for macrophages, we analysed the interaction for different MOIs.

***C. albicans* triggered the higher neutrophils cell death.** Human neutrophils were purified from whole blood and infected with *C. albicans*, *C. glabrata* or *C. lusitaniae*. We measured the survival of the neutrophils and their association to live fungal cells by flow cytometry over a 5 hours infection with a MOI 1N:1Y (**Figure 12**). After 30 minutes, 20% of the neutrophils died in the presence of *C. lusitaniae* and *C. glabrata*, whereas 40% died in the presence of *C. albicans*. Longer infection time did not significantly change the death of the neutrophils when infected by *C. lusitaniae* and *C. glabrata*, but dramatically increased the killing by *C. albicans* (more than 90% of neutrophils were killed at T5h). The association of the neutrophils to the three *Candida* species was similar during the infection and reached 50% at T5h.

Varying the MOIs led us to observe some differences in the neutrophils survival and their association in the presence of the *Candida* species. Increasing the number of yeasts over the neutrophils (MOI 1N:5Y) resulted in about a 10% increase of neutrophils cell death for each *Candida* species in early time of the infection (**Figure 12**) as about 30% of neutrophils were killed by *C. glabrata* and *C. lusitaniae*, whereas 50% were killed by *C. albicans*. Nearly all neutrophils were killed with *C. albicans* within 5 hours. Furthermore, the neutrophils were more associated to the fungal cells at MOI 1N:5Y than at MOI 1N:1Y during the infection. In the experiments conducted at MOI 5N:1Y, noteworthy, neutrophils survived to *C. albicans* as well as to the other species at T30min, and 36% were still alive at T5h. Also, neutrophils were less associated to the

yeast cells than at MOIs 1N:1Y and 1N:5Y. In conclusion, while the association of the neutrophils to the three *Candida* species was similar, and varied proportionally with the MOIs, the neutrophils cell death was similar and moderate in the presence of *C. glabrata* and *C. lusitaniae*. *C. albicans* induced the higher neutrophils cell death, which varied proportionally with the MOIs.

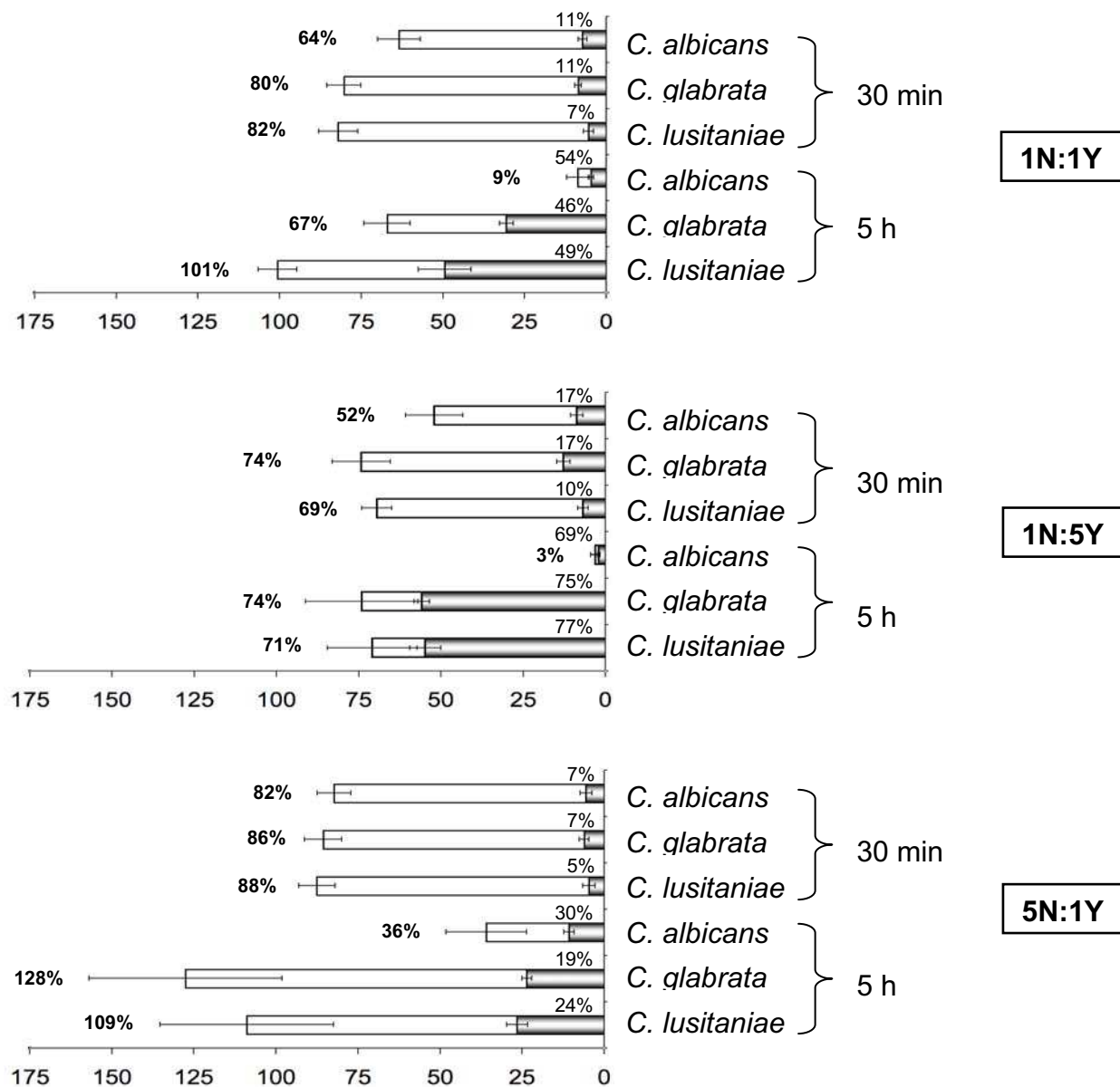


Figure 12: Analysis of the human neutrophils survival and association to live yeast cells in stationary phase at different MOIs over a 6 hours time course experiment. Note that more neutrophils were killed with *C. albicans* than with *C. glabrata* and *C. lusitaniae*.

DISCUSSION

The aim of this study was to develop an *in vitro* cellular model for the measurement of species-specific differences during interaction of the opportunistic pathogen yeast *Candida* with macrophages and neutrophils. We chose three *Candida* species differing in their morphology, ecological niche and prevalence, to infect macrophages and neutrophils. *C. albicans* is responsible for more than 50% of candidemia (Pfaller & Diekema, 2007). *C. albicans* can switch between unicellular yeast form, pseudo-hyphal and true-hyphal forms. *C. glabrata*, phylogenetically and morphogenetically closer to *S. cerevisiae*, only exists as yeast form. *C. albicans* and *C. glabrata* are both commensal of the gastrointestinal tract and genital mucosal tissues. *C. lusitaniae*, an environmental yeast, is an emerging pathogenic yeast which exists as unicellular form and is able to produce pseudo-hyphae. If morphological switch has been often described as an important virulence attribute, recent studies demonstrated that pathogenesis can be dissociated from morphological switching (Noble et al., 2010) (Magee, 2010). In that context, we report here the development of a cellular model that allows a comparative analysis of three morphologically different *Candida* species interacting *in vitro* with macrophages and neutrophils, the main actors of innate anti-*Candida* defense.

Using microscopy, fluorimetry, flow cytometry and viability tests, we were able to finely analyse the interactions over a time course experiment. We determined the effect of the MOI, and of the fungal developmental state (stationary or exponential phase) on the outcome of the interactions, and the contribution of fungal active mechanisms (live versus dead yeast cells) in this process. To monitor the infection of phagocytes with yeast cells over time, many parameters must be taken into account (1) yeast cells can multiply (2) phagocytes and yeast cells may die (3) yeast cells can be bound at the phagocyte membrane or ingested. To measure those parameters, we developed a combination of several techniques based on the specific labeling of each partner. Fungal cells were labeled with CalcoFluor White and phagocytes with calcein and anti-CD16 antibodies. Flow cytometry allowed us to measure the survival of infected phagocytes, and their association to fungal cells. Fluorimetry allowed us to measure the multiplication of fungal biomass along the infection, and the trypan blue quenching made possible to discriminate between membrane-bound and internalized yeast cells. Yeast cells survival was assayed by plating CFU. Fluorescence microscopy and video microscopy were used to qualitatively analyse the outcome of the different interactions in parallel of the quantitative analysis during the development of the cellular model, to verify that the quantitative data obtained were correctly interpreted.

***Candida* yeasts survive and escape macrophages phagocytosis: *C. albicans* produces hyphae, *C. glabrata* multiplies within macrophages, and *C. lusitaniae* avoids phagocytosis.**

For technical convenience, we worked with the J774 murin macrophage cell line. We first challenged the macrophages at a 1M:1Y MOI to compare the *Candida* species. All together, the following of the interactions using the microscope and fluorimetry techniques allowed us to conclude on the strategies used by different *Candida* species to resist and escape from macrophages. *C. albicans* survived and rapidly produced hyphae from within macrophages and escaped phagocytosis, killing the host and multiplying outside. *C. albicans* largely triggered the higher macrophages cell death, macrophages were thus unefficient to fight *C. albicans* infection in these *in vitro* conditions. At 5 hours post-infection, the majority of *C. albicans* cells was under hyphal forms, which may explain why the number of macrophages mobilized was higher than for the unicellular yeast *C. glabrata*. In that way, the ability to form hyphae can constitute a virulence attribute as 1) its size limits *C. albicans* phagocytosis by one macrophage and 2) it allows *C. albicans* to rapidly pierce and kill the macrophages. *C. lusitaniae* was more efficiently taken up than *C. albicans*, and less than *C. glabrata*. Interestingly, beside its ability to form pseudo-hyphae, we found that *C. lusitaniae* quickly formed small chains of cells, more difficult to engulf than single

cells. Once phagocytosed, a part of the yeast cells were able to survive, multiply within macrophages and escape. *C. glabrata* was the most efficiently taken up, as indicated by the lowest number of macrophages recruited and the highest part of fungal population internalized, but *C. glabrata* survived, and largely multiplied within macrophages, which finally burst and released yeast cells. Thus, there may be a correlation between the morphology of the fungal cell and the strategy used to escape from macrophages. Also, a different composition of the cell wall of those *Candida* species may contribute to a differential recognition by phagocytes, and to the induction of different defense pathways in response to fungal cells. *C. glabrata* appeared to be the most efficiently internalized species and its cell wall is richer in mannans, known to have an important role in the recognition by the macrophages (Mannose Receptor), than that of *C. albicans* (de Groot et al., 2008). Unfortunately, to our knowledge, the cell wall composition of *C. lusitaniae* has not been investigated. *C. albicans* itself shows differential expression of cell wall proteins in yeast and hyphae (that varies depending on environmental cues) including in particular glycosyltransferases that modify the glycan components of the cell surface, resulting in a differential recognition by the immune system. Furthermore, filaments do not expose beta-glucans like yeast cells do in bud scars, since mother-daughter cell separation does not occur, and thus, filamentous *C. albicans* do not activate Dectin-1 receptor, involved into phagocytosis and immune response processes (Gantner et al., 2005). Beta-glucans of *C. lusitaniae* may be similarly masked in the small-chains. Thus, the phagocytosis by macrophages of cells from different *Candida* species depends on several parameters, including shape (hyphae or ability to form voluminous structures, such as clusters of unseparated budding cells, can contribute to the strategy to escape macrophages), cell wall components (that can be hidden) and signal molecules that can be perceived by phagocytes. The differences in the aggressiveness of *Candida* species towards macrophages we showed with our cellular model, correlate with already published studies done in mouse models, showing that *C. glabrata* was considerably less virulent than *C. albicans* (Brieland et al., 2001).

The experiments conducted with exponential phases of fungal cells sustain that the development phase is important in the host-pathogen interaction. Exponential phase is expected to divide more frequently than stationary phase, triggering higher exposure of beta-glucans at bud scars. However, both *C. lusitaniae* and *C. glabrata* biomasses were less engulfed by macrophages when taken in log phase and escaped more easily from macrophage phagocytosis than when taken in stationary phase cells. This may suggest that exponential phase produce differential signal molecules that may help avoiding macrophages recognition and phagocytosis, or that some cell wall components are differentially exposed. This is the case for example, of, Sed-1p, a minor cell-wall protein in exponentially growing cells which becomes the most abundant in stationary phase (Klis et al., 2006). Sed-1p is heavily N-glycosylated and therefore may account for increased recognition by host cells (notably Mannose Receptors). Alternatively, log phase of yeast cells dividing more frequently, it may account for the lower proportion of biomass uptaken in macrophages, and for the easier escape from phagocytes. Noteworthy, macrophages survived better to *C. albicans* when taken in log phase ($35\% \pm 12$) than in stationary phase ($13\% \pm 3$) at T5h, and nearly all macrophages died at T24h. The delay in the production of hyphae of *C. albicans* when taken in log phase may account for the delay in the escape and killing of macrophages.

Does fungal metabolic activity contribute to the interaction with macrophages?

Infecting J774 macrophages with heat-killed yeast cells at MOI 1M:1Y allowed us to assess the contribution of the metabolic activity of yeast cells as well as the relative importance of the cell wall composition in the recognition and ingestion by, and killing of macrophages, and to rule out the possible implication of morphological changes associated with growth, notably important for *C. albicans* and *C. lusitaniae* (heat-killed *C. albicans* and *C. lusitaniae* were all under yeast forms in our experiments). About 20% of macrophages were killed in the presence of the heat-killed yeast cells at T24h, independently of the species at MOI 1M:1Y. This suggests that phagocytosis itself of

inert yeast cells triggered some macrophage killing *via* an endogenous mechanism. It has already been reported that the uptake of yeast polysaccharides led to 10% to 20% of macrophages cell death after 6 or 24 hours of incubation (Villena *et al.*, 2008). Living *C. glabrata* and *C. lusitaniae* did not kill significantly more macrophages than when heat-killed at MOI 1M:1Y, suggesting that the fungal metabolic activity did not contribute to the macrophage killing. In contrast, *C. albicans* ability to kill macrophages was greatly reduced after the heat-treatment. This indicates that *C. albicans* metabolic activity, and likely the capacity to produce hyphae, largely contributed to the macrophage killing. It is also possible that *C. albicans* cell wall components recognized by macrophages were inactivated by the heat-treatment. It has been shown that live *C. albicans* cells, unlike heat-killed cells, trigger macrophages apoptosis *via* the phospholipomannans (PLM), glycolipids composed of β -1,2-oligomannosides and phytoceramide which are specific to *C. albicans*. Following a heat-treatment, the PLM content in the cell wall is largely reduced (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003), which could explain the decrease in the macrophage killing, as for the other *Candida* species that do not harbor PLM in their cell wall and triggered reduced cell death compared to *C. albicans*.

The association of the macrophages to the heat-killed yeast cells was lower than with live cells at T30min, for the three *Candida* species. Beyond T30min, it is not relevant to compare the association rates as live cells multiply, and thus macrophages are more solicited to interact with fungal cells. The production of signal molecules by live yeast cells may account for a better recognition by the macrophages. On the other hand, the biomasses of heat-killed *Candida* engulfed by the macrophages at T30 min were similar than with live cells, indicating that macrophages were more efficient to take up dead fungal cells. Together with the observation that the differences pointed out in the recognition and internalization of the three living *Candida* species were maintained with the heat-killed cells, this data suggests that the heat-treatment did not totally disturb the *Candida* cell wall. The macrophages were the most efficient to take up *C. glabrata*, and the less efficient to take up *C. albicans*. Those differences in the recognition of the *Candida* species by macrophages may be attributed to a differential composition of their cell wall. It has been reported that the cell wall of *C. glabrata* harbors 50% more mannose and 3 times less chitin than *C. albicans* (de Groot *et al.*, 2008), and the mannans are exposed on the surface and recognized by several receptors (Mannose Receptor, Dectin-2, Galectine-3) initiating phagocytosis (Netea *et al.*, 2008). It would be interesting to determine the cell wall composition of *C. lusitaniae* in comparison to that of *C. albicans* and *C. glabrata*. Finally, it was shown that a heat-treatment at 100°C for 10 min led to significant increase of β -glucans exposure, which are recognized by Dectin-1 at the membrane of macrophages (Wellington *et al.*, 2009). This increased β -glucans exposure would be overridden by the decrease of outer layer of mannans, or the absence of fungal signal molecule in eliciting the recognition, as the global effect of heat-inactivation is a reduced recognition of dead yeast cells.

Effect of MOI variation on the *Candida*-phagocyte interaction

Changing the MOI led us to assess the effect of an excess of macrophages or yeast cells on the *Candida*-phagocyte interaction. The association of the macrophages to the fungal cells, and the macrophage killing proportionally varied with the number of yeast cells used to infect the phagocytes. When yeast cells were used in excess only, *C. glabrata* and *C. lusitaniae* were able to escape from macrophages. When macrophages were used in excess over fungal cells, the proportion of internalized fungal biomass increased. However, *C. albicans* was the less efficiently internalized species, at any MOI tested, and mobilized and killed the higher number of macrophages. All together, our data showed that the MOI influences the *Candida*-macrophage interaction at different levels: macrophage association and killing, and fungal biomass internalization and escape from macrophages.

***C. albicans* is the more efficient to induce neutrophils cell death**

Generally, neutrophils are described as the most efficient phagocytic cells to fight fungal cells with an important microbicidal arsenal. Neutrophils can kill pathogens intra-cellularly upon phagocytosis and ingestion of target particles for destruction in the phagolysosome by enzymes, proteases and Reactive Oxygen Species (ROS). Alternatively, neutrophils can kill pathogens extracellularly, upon degranulation and release of antimicrobial molecules, or formation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) released from dying neutrophils (Alvarez & Casadevall, 2006). It is proposed that Neutrophils may use NET release to kill large hyphal cells they are not able to phagocyte. On the other hand, neutrophils cell death can be triggered by the pathogens: the phagocytosis of complement or IgG opsonized targets through the Mac-1 (CR3) receptor induces neutrophils apoptosis (PICT for Phagocytosis-Induced Cell Death). Furthermore, the NETs formation is also associated to neutrophils cell death.

We performed a comparative analysis of the three *Candida* species when infecting neutrophils, and analysed neutrophils cell death and their association to the fungal cells. The neutrophils did not significantly differ in their association to the three *Candida* species at each MOI. *C. albicans* triggered the higher neutrophils cell death, whatever the MOI tested. Nearly 40% of neutrophils were killed within 30 min of infection with *C. albicans* at 1N:1Y MOI, whereas 20% were killed by the two other species. A different composition of the cell wall or morphology of the *Candida* species may account for the difference in the cell death rate induced. Increasing the number of yeasts over the neutrophils (1N:5Y) slightly increased the neutrophils cell death at T30min, as well as the association of neutrophils to *Candida* cells during the infection. Decreasing the number of yeast cells over the neutrophils (5N:1Y) decreased the killing by *C. albicans* at T30min and T6h, and the killing by *C. glabrata* at T6h, as well as the association of neutrophils to fungal cells during infection. Thus, variation of the MOI modulated the kinetics of *Candida*-neutrophils interaction, and in our conditions, *C. glabrata* and *C. lusitaniae* were relatively inefficient compared to *C. albicans* to counteract neutrophils attack.

As in our experiments, *Candida* cells are non-opsonized, the neutrophils cell death we observed is not PICT. Instead, the neutrophils cell death could be associated to degranulation in early time of infection, and NETs release later on as it was shown that this process takes 2-3 hours to complete and does not need opsonization of yeast and hyphal forms (Urban *et al.*, 2006). Neutrophils harbor other PRR than CR3, in particular TLR 2, TLR 4 and dectin-1 that recognize the glucans and mannans of fungal cell wall (Netea *et al.*, 2008). It was shown that phagocytosis by human neutrophils can be elicited solely by β -1,6-glucans (Rubin-Bejerano *et al.*, 2007). Pre-incubation of neutrophils with β -1,6-glucans or β -1,3-glucans will give insights in the contribution of these two components in eliciting the neutrophils cell death.

In conclusion, we found that the J774 macrophages were differentially associated to the three *Candida* species. This underlies that differences in the morphology, in the composition of the cell wall, or in the signal molecules produced by *C. albicans*, *C. lusitaniae* and *C. glabrata* account for their differential recognition by macrophages. Our data showed that the three species were able to survive and escape macrophages phagocytosis. It will be interesting to determine the survival of yeast cells in the presence of neutrophils. The fact that *Candida* cells survive in phagocytes asks the question of the source of nutrients utilized by yeast cells for their multiplication or the development of hyphae. Do yeast cells rely on their own metabolism, or do they hijack nutrients from phagocytes? Also it will be of interest to compare the NETs production by neutrophils in presence of the three *Candida* species to get insights in the strategies used to counteract neutrophils attack. The *in vitro* model of phagocytes infection with yeast cells will be useful to study mutants and identify genes of interest to unravel the fungal molecular mechanisms involved in the interaction with macrophages and neutrophils.

References

- Alvarez, M. & A. Casadevall, (2006) Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* **16**: 2161-2165.
- Dooley, D. C., J. F. Simpson & H. T. Meryman, (1982) Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation. *Experimental hematology* **10**: 591-599.
- Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F. C. Odds & B. Hube, (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Molecular microbiology* **56**: 397-415.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons & D. M. Underhill, (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *The EMBO journal* **24**: 1277-1286.
- Gow, N. A., A. J. Brown & F. C. Odds, (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Current opinion in microbiology* **5**: 366-371.
- Klis, F. M., A. Boorsma & P. W. De Groot, (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **23**: 185-202.
- Lo, H. J., J. R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti & G. R. Fink, (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- Magee, P. T., (2010) Fungal pathogenicity and morphological switches. *Nature genetics* **42**: 560-561.
- Netea, M. G., G. D. Brown, B. J. Kullberg & N. A. Gow, (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature reviews* **6**: 67-78.
- Noble, S. M., S. French, L. A. Kohn, V. Chen & A. D. Johnson, (2010) Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nature genetics* **42**: 590-598.
- Pfaller, M. A. & D. J. Diekema, (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews* **20**: 133-163.
- Rubin-Bejerano, I., C. Abeijon, P. Magnelli, P. Grisafi & G. R. Fink, (2007) Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell host & microbe* **2**: 55-67.
- Sanglard, D. & F. C. Odds, (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet infectious diseases* **2**: 73-85.
- Scott, A. J. & J. P. Woods, (2000) Monitoring internalization of *Histoplasma capsulatum* by mammalian cell lines using a fluorometric microplate assay. *Med Mycol* **38**: 15-22.
- Uppuluri, P. & W. L. Chaffin, (2007) Defining *Candida albicans* stationary phase by cellular and DNA replication, gene expression and regulation. *Molecular microbiology* **64**: 1572-1586.
- Urban, C. F., U. Reichard, V. Brinkmann & A. Zychlinsky, (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular microbiology* **8**: 668-676.
- van de Veerdonk, F. L., B. J. Kullberg, J. W. van der Meer, N. A. Gow & M. G. Netea, (2008) Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Current opinion in microbiology* **11**: 305-312.
- Wellington, M., K. Dolan & D. J. Krysan, (2009) Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infection and immunity* **77**: 405-413.

Partie II
Développement d'outils pour la mutagenèse de gènes chez
***C. lusitaniae* ; caractérisation du gène *OLE2* codant pour**
une $\Delta 9$ désaturase

Introduction

La caractérisation des mécanismes impliqués dans la virulence est un challenge pour la compréhension et le contrôle des infections par les levures du genre *Candida*. La caractérisation de gènes impliqués dans la virulence se fait par la construction de mutants et par leur caractérisation phénotypique au cours d'infection sur des modèles *in vitro* et/ou *in vivo*. Deux démarches génétiques sont utilisées pour l'étude fonctionnelle de gènes :

- La génétique directe repose sur la recherche d'un phénotype d'intérêt au sein d'une banque de mutants représentative de l'ensemble du génome de l'espèce étudiée. La stratégie de mutagenèse utilisée doit également permettre d'identifier le gène muté responsable du phénotype d'intérêt.

- La génétique inverse a pour but d'analyser la fonction d'un gène connu. Grâce à différents systèmes de mutagenèse ciblée, le gène d'intérêt est spécifiquement inactivé et le phénotype qui découle de la mutation est ensuite analysé par rapport à une souche sauvage.

Afin de caractériser la fonction de gènes de *Candida* au cours de l'interaction levures – phagocytes, nous avons développé des outils de biologie moléculaire pour la mutagenèse ciblée ou aléatoire chez notre modèle biologique *C. lusitaniae*. La méthode de mutagenèse ciblée décrite dans le manuscrit de l'article n°2 a été utilisée pour invalider le gène *OLE2* codant une désaturase et le phénotype du mutant obtenu a été analysé.

1. Le modèle biologique : *Candida lusitaniae*

Depuis plusieurs années, l'équipe « *Candida* et Pathogénicité » a fait de *C. lusitaniae* son modèle biologique. *C. lusitaniae* est une levure saprophyte environnementale de plus en plus souvent rencontrée en pathologie, même si son incidence reste faible (Warnock, 2007). Les manifestations cliniques des infections à *C. lusitaniae* ne sont pas différentes de celles observées avec les autres espèces de champignons levuriformes.

C'est une espèce cosmopolite ubiquiste dont la niche écologique est mal connue. Dans l'environnement, elle a été isolée à partir de différents substrats végétaux (tiges, feuilles, fleurs, fruits, jus de fruits), d'eaux douces, de laitages et de fientes d'oiseaux (El-Sharoud *et al.*, 2009). Elle est régulièrement isolée du tube digestif de nombreux animaux. La multiplication végétative (asexuée) se fait par le bourgeonnement de blastospores. Dans certaines conditions, en particulier lors d'une carence en ions ammonium (milieu YCB, Yeast Carbon Base, Difco), cette levure forme des pseudofilaments.

C. lusitaniae est l'une des rares espèces pathogènes opportunistes du genre *Candida* à se reproduire par la voie sexuée et à faire la méiose. La forme téléomorphe, *Clavispora lusitaniae*, est hétérothallique. Le type sexuel est contrôlé par un seul locus *MAT* qui peut porter l'un des deux allèles *MATa* ou *MAT α* (Gargeya *et al.*, 1990). La reproduction sexuée débute par la conjugaison de cellules haploïdes provenant de deux souches de types sexuels différents, ce qui donne naissance à des asques. Après méiose, les asques s'ouvrent par déliquescence pour libérer de 1 à 4 ascospores de forme conique. Une étude de microscopie électronique a permis de caractériser les différentes étapes cytologiques conduisant à la formation des ascospores (Francois *et al.*, 2001). La reproduction sexuée est maîtrisée *in vitro* ; elle est rapidement obtenue en 24 à 48 h sur des milieux de culture carencés en ions ammonium, comme le milieu YCB qui a la particularité de favoriser la pseudofilamentation (Goumar A., 2004).

Le génome de *C. lusitaniae* est haploïde et celui de la souche ATCC 42720 a été séquencé par le Broad Institute (MIT, Harvard). Il possède un taux de GC de 44,5%, est constitué de 8 chromosomes représentant 12 Mb, et contient 5941 gènes (données informatiques). Par ailleurs, un système de transformation intégratif par recombinaison homologue a été développé chez *C. lusitaniae*, ce qui la rend accessible à la génétique inverse (Francois *et al.*, 2004).

Le séquençage de son génome, son état haploïde qui rend plus facile et plus rapide l'inactivation de gène en une seule étape de transformation, et la possibilité de réaliser et d'analyser les descendance de croisements génétiques, font de *C. lusitaniae* un modèle alternatif attractif pour l'étude fonctionnelle de gènes.

2. Construction de souches récipientes pour la sélection de mutants (manuscrit n°2)

L'analyse fonctionnelle de gènes chez *C. lusitaniae* passe par l'inactivation des séquences codantes ou knock-out de gène. En effet, les travaux d'analyse de son génome n'ont pas mis en évidence de machinerie cellulaire telles que les protéines Argonaute, Dicer et ARN polymérase ARN dépendante permettant d'utiliser un système de RNA silencing pour le knock-down (Nakayashiki *et al.*, 2006 ; Drinnenberg *et al.*, 2009). Quelle que soit la méthode, knock-down ou knock-out, l'obtention de mutants nécessite de disposer d'un système de sélection des transformants. Au cours de ce travail, nous avons choisi de sélectionner les transformants en utilisant le marqueur d'auxotrophie *URA3*. Ce gène code pour l'orotidine 5' monophosphate décarboxylase, enzyme de la sixième étape de la voie de biosynthèse des pyrimidines, qui catalyse la décarboxylation de l'orotidine monophosphate (OMP) en uridine monophosphate (UMP). Ce marqueur présente également l'avantage d'être contre-sélectionnable avec l'acide 5 fluoroorotique (5FOA). Le 5FOA est un analogue structural de l'OMP qui est converti par Ura3 en 5-fluorouracile toxique. Le 5-fluorouracile bloque la réplication de l'ADN en inhibant la thymidylate synthase et le 5-fluorouridine monophosphate inhibe la traduction des ARNm en s'incorporant au cours de la polymérisation de l'ARN. Les souches ayant un gène *URA3* codant pour une enzyme Ura3 fonctionnelle sont donc prototrophes pour l'uracile et sensibles au 5FOA. En revanche, les souches ayant un gène *ura3* muté sont auxotrophes pour l'uracile et résistantes au 5FOA.

Afin d'utiliser le gène *URA3* comme marqueur de sélection nous avons construit à partir de la souche sauvage 6936, deux souches portant une délétion pour ce gène. La souche *ura3Δ360* qui porte une délétion de 359 pb dans la région centrale codante du gène et la souche *ura3Δ990* qui porte une délétion de 988 pb recouvrant l'ensemble de la séquence codante du gène. La séquence du gène sauvage (Numéro d'Accession GenBank: AF450297.1) et les séquences des deux loci inactivés sont présentées dans la **Figure 41**. La description de la stratégie de délétion et les cartes génétiques des deux loci obtenus pour les souches *ura3Δ360* et *ura3Δ990* sont présentés dans le manuscrit de l'article n°2.

	Q	T	K	E	H	P	S	P	G	R	Q	N	Q	A	Q	E	D	17	
ag	CAA	ACT	AAA	GAA	CAC	CCC	TCT	CCA	GGA	CGC	CAA	AAC	CAA	GCG	CAG	GAA	GAT	53	
	E	E	I	M	N	M	V	N	L	S	K	K	S	V	E	L	T	G	35
GAA	GAG	ATT	ATG	AAT	ATG	GTT	AAT	TTG	TCA	AAG	AAG	TCT	GTG	GAA	TTG	ACT	GGG	107	
	E	L	G	A	V	R	N	K	S	S	Y	P	F	I	Q	A	L	A	53
GAA	TTA	GGC	GCT	GTT	CGC	AAT	AAA	CTG	TCA	TAT	CCA	TTT	ATT	CAA	GCG	TTG	GCT	161	
	H	Q	C	F	N	P	C	R	K	V	R	A	H	A	I	K	I	L	71
CAT	CAA	TGT	TTC	AAT	CCT	TGC	AGA	AAA	GTG	AGA	GCT	CAT	GCA	ATT	AAA	ATA	TTG	215	
	Q	A	S	L	L	S	S	N	F	S	E	E	Y	S	A	S	G	V	89
CAA	GCT	TCG	TTG	TTA	TCC	AGC	AAT	TTC	AGT	GAA	GAA	TAC	TCA	GCG	TCA	GGT	GTT	269	
	Y	E	Y	G	L	F	P	L	M	A	E	L	V	K	D	D	V	F	107
TAC	GAG	TAC	GGA	TTA	TTC	CCG	TTG	ATG	GCA	GAG	TTG	GTG	AAG	GAT	GAT	GTT	TTC	323	
	H	T	D	L	N	G	F	S	E	T	H	V	Q	I	L	S	L	L	125
CAT	ACA	GAC	TTG	AAT	GGG	TTT	TCA	GAG	ACA	CAT	GTT	CAA	ATC	CTC	AGC	TTG	CTC	377	
	S	K	V	F	L	Q	Y	H	S	S	I	S	D	A	D	K	R	K	143
AGT	AAG	GTG	TTT	TTA	CAA	TAC	CAC	TCG	TCA	ATC	AGT	GAC	GCC	GAC	AAG	CGC	AAA	431	
	V	W	F	G	I	V	D	N	F	V	T	V	N	Q	M	N	A	K	161
GTA	TGG	TTC	GGC	ATT	GTG	GAC	AAT	TTC	GTG	ACC	GTC	AAC	CAG	ATG	AAT	GCA	AAA	485	
	F	Q	K	E	E	V	R	E	P	S	E	E	V	M	K	N	M	I	179
TTC	CAA	AAG	GAA	GAA	GTG	CGC	GAG	CCC	AGC	GAA	GAG	GTG	ATG	AAA	AAC	ATG	ATT	539	

L V L Q N D F L N Q E N S D V W E Q	197
TTG GTT TTG CAG AAC GAC TTT CTC AAC CAA GAG AAT TCA GAC GTG TGG GAG CAG	593
T W R R L E P I Y P G M K E A L A V	215
ACC TGG CGT CGA CTC GAG CCC ATT TAC CCA GGG ATG AAA GAG GCA TTG GCG GTG	647
*	216
TAA gtaggttagtttttgggacgaagaatatcacgtgataacatcgagtagtggaaatcatcgcacttcac	717
	M A E T Y T Q R A E 10
ttgcagaggcatctttccagcatattcacaa ATG GCA GAA ACT TAC ACT CAG AGG GCC GAA	778
K H A S P V A S R L L R L M E A K K	28
AAG CAT GCC TCT CCC GTG GCC CTG CGT CTT TTG CGT TTG ATG GAA GCT AAA AAG	832
S N L C A S V D V S T T A E F L A L	46
TCA AAC TTG TGT GCG TCT GTT GAT GTT TCA ACT ACT GCA GAA TTC TTG GCT CTC	886
I D K L G P F I C L V K T H I D I I	64
ATA GAC AAG TTG GGT CCT TTC ATA TGC CTC GTA AAG ACA CAC ATT GAC ATC ATT	940
D D F S Y E G T I V P L L E L A K K	82
GAC GAC TTC TCG TAC GAA GGA ACC ATT GTC CCT CTT TTG GAG CTC GCC AAA AAG	994
H Q F M I F E D R K F A D I G N T V	100
CAC CAG TTT ATG ATT TTC GAG GAC CGC AAG TTT GCC GAT ATC GGG AAT ACG GTC	1048
Δ961-1320 (359 nt)	
K K Q Y S G G V Y Q I A K W A D I T	118
AAA AAA CAA TAC TCC GGT GGA GTG TAC CAG ATT GCT AAA TGG GCG GAC ATT ACC	1102
N A H G V T G A G I V R G L K E A A	136
AAC GCT CAT GGA GTC ACC GGT GCT GGA ATT GTG CGT GGG TTG AAA GAG GCG GCA	1156
Q E T T S E P R G L L M L A E L S S	154
CAA GAA ACC ACA CTG GAG CCT CGT GGG CTT TTG ATG TTG GCT GAG CTT TCT TCC	1210
Δ730-1717 (988 nt)	
K G S L A Y G E Y T K Q T V E I A K	172
AAA GGA TCT TTG GCC TAT GGC GAA TAC ACC AAG CAA ACT GTG GAG ATC GCC AAG	1264
S D K D F V I G F I A Q R D M G G K	190
TCC GAC AAG GAT TTT GTC ATT GGA TTC ATT GCC CAG CGC GAC ATG GCC GGT AAA	1318
D E G F D W L V M T P G V G L D D K	208
GAC GAA GGG TTT GAC TGG TTG GTG ATG ACC CCA GGT GTT GGT CTT GAC GAT AAA	1372
G D A L G Q Q Y R T V Q E V V S T G	226
GGA GAC GCT TTG GGA CAA CAG TAC CGG ACA GTT CAG GAG GTC GTC TCG ACA GGT	1426
T D I I I V G R G L F G K G R D P T	244
ACC GAC ATC ATA ATT GTG GGC CGT GGA TTG TTT GGA AAA GGC AGA GAC CCA ACA	1480
V E G A R Y R D A G W K A Y T E R C	262
GTA GAG GGG GCA CGT TAC AGA GAC GCT GGG TGG AAA GCT TAC ACG GAG AGA TGT	1534
A N *	265
GCT AAT TAA tagatgacgtagaaggaagaatgtagagggcgaagggggaggaagtgcaggtcacattg	1602
taccatgaaagaaagaatgcaaagtacatattgttccagagttgatccgtgttctatgtgttcgtaaaataa	1674
ataatgtgtgtttgccaagcatttgaatggagaatgtcatctcgagaatgtcatctcgaagcatcaaagt	1746
ctttaatctctctcctcagataaaacttctctatccgtctctgttctcttactcctctgcaagtc	1812

Figure 41 : Séquences nucléotidique et peptidique du locus *URA3* de la souche 6936 de *C. lusitaniae*. La délétion de 360 pb est représentée en gris et la délétion 988 pb est surlignée en jaune.

3. Développement d'une méthode rapide pour la délétion de gènes cibles (manuscrit de l'article n°2)

En génétique inverse, l'inactivation de gènes cibles nécessite d'avoir un système de recombinaison homologue pour le remplacement ou l'inactivation du locus cible par l'intégration du marqueur de sélection. Chez *C. lusitaniae*, il a été décrit un système de recombinaison homologue pour l'intégration par un simple crossing-over d'un vecteur portant le marqueur de sélection. Ces premières données ont permis de développer un système

d'inactivation de gène cible par la méthode dite « cœur de gène ». Une partie du locus cible X, environ 500 pb, est clonée entre les sites *NcoI* et *SacII* du vecteur pGUNv2 portant le marqueur de sélection *URA3* de *C. lusitaniae* (**Figure 42**). Le vecteur pGUNv2-X ainsi obtenu est linéarisé par une enzyme de restriction ayant un site unique dans le cœur de gène X. Le vecteur linéarisé est ensuite utilisé pour transformer une souche récipiente *ura3* et les transformants ayant intégré le vecteur sont sélectionnés pour leur prototrophie à l'uracile. Cette méthode permet d'inactiver le gène cible X après intégration homologue du vecteur pGUNv2-X au locus cible. Cependant, l'ensemble du vecteur reste intégré au locus d'intérêt et cela complique les étapes ultérieures de l'étude fonctionnelle du gène, qui nécessitent de réintégrer un allèle X sauvage au locus (**Figure 42**).

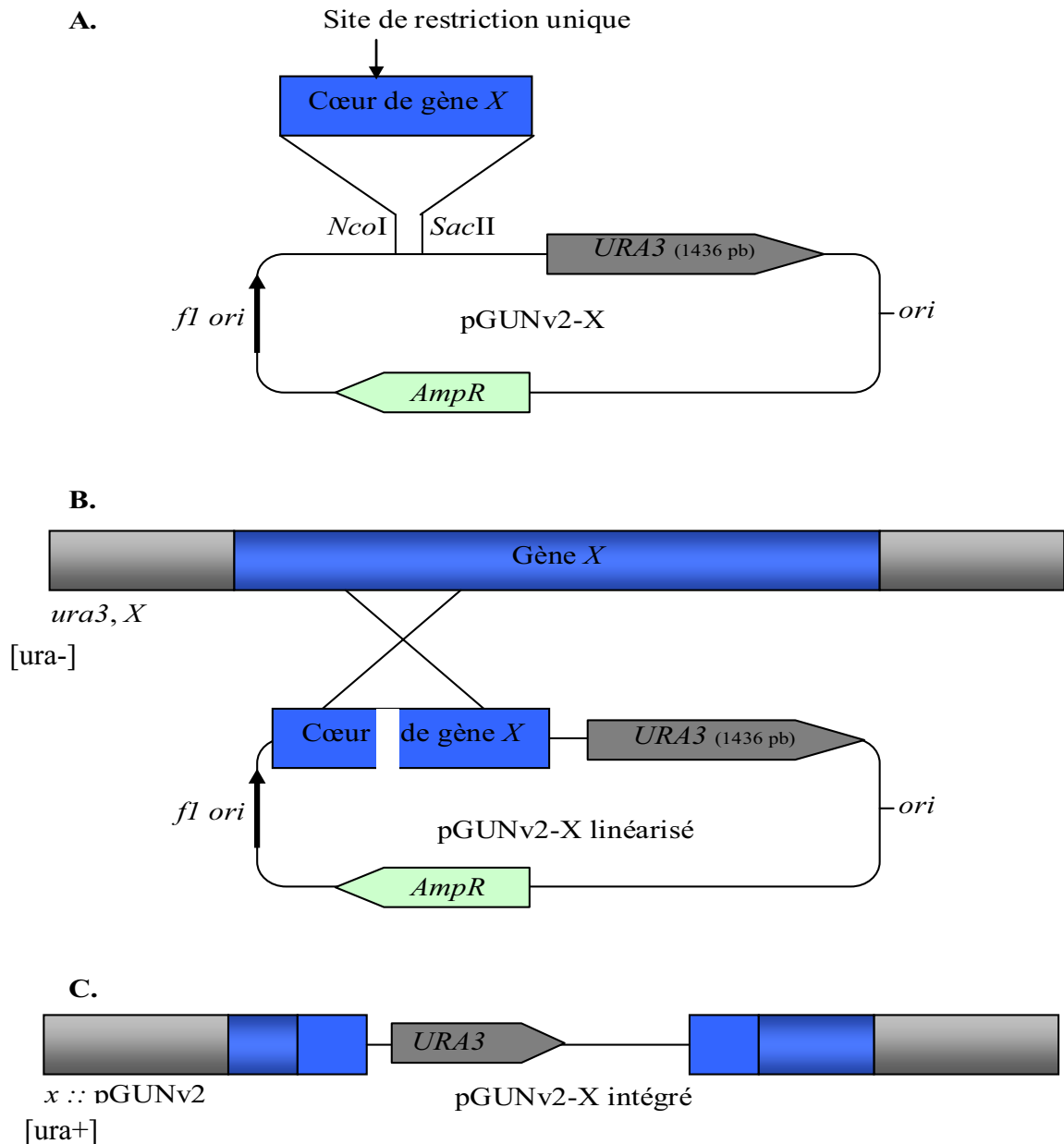


Figure 42 : Principe de l'inactivation de gène par la méthode dite « cœur de gène ». A. Le cœur de gène du locus cible X est amplifié puis inséré dans le vecteur pGUNv2 qui porte le marqueur de sélection *URA3*, B. La linéarisation du vecteur dans le cœur de gène permet d'adresser la recombinaison par crossing-over avec le locus cible X, C. Les transformants ayant intégré le vecteur portent un locus x invalidé et sont prototrophes pour l'uracile.

Une seconde méthode décrite pour *C. albicans* repose sur l'intégration par double crossing-over d'un fragment d'ADN portant le marqueur de sélection bordé par des régions homologues au locus cible. Le système *URA3* blaster utilise cette stratégie (Alani *et al.*, 1987 ; Fonzi *et al.*, 1993). Contrairement à la méthode cœur de gène qui résulte en une interruption de la séquence codante, le système *URA3* blaster aboutit à un remplacement du gène par le marqueur de sélection *URA3*. L'intégration du marqueur *URA3* est réversible et son excision, après recombinaison entre les deux séquences répétées directes *HisG* qui bordent le marqueur de sélection, rend possible l'inactivation du second du gène en utilisant la même cassette, ce qui permet ainsi d'obtenir un mutant portant une délétion du gène sur les deux allèles. Le système *URA3* blaster permet donc d'obtenir des mutants par délétion complète du gène mais une séquence *HisG* reste intégrée dans le locus cible et la construction des cassettes de transformation passe par plusieurs étapes de clonage contraignantes.

Au cours de notre travail, nous avons développé une technique de PCR chevauchante pour obtenir, sans aucune étape de clonage, des cassettes de délétion de gènes chez *C. lusitaniae*. La première étape de mutagenèse repose, comme dans la stratégie *URA3* blaster, sur le remplacement du locus cible par recombinaison homologue de la cassette de délétion constituée par le marqueur de sélection *URA3* bordé par des régions homologues au gène cible. Une seconde étape consiste à transformer la souche mutante obtenue par une cassette de délétion contenant uniquement les régions bordantes du gène cible, sans marqueur de sélection. Une intégration au locus de cette deuxième cassette provoque l'excision du marqueur *URA3* et les transformants sont sélectionnés sur la base de leur résistance au 5FOA. Cette excision de *URA3* permet la réutilisation de ce marqueur pour l'inactivation d'un second gène ou pour la réintroduction du gène *URA3* à son locus. L'obtention d'un révertant pour le mutant du gène d'intérêt peut se faire après la première étape de mutagenèse en remplaçant le marqueur *URA3* par une copie sauvage du gène étudié. Cette stratégie a été validée par l'inactivation du gène *LEU2* codant pour la 3-isopropylmalate déshydrogénase de la voie de biosynthèse de la leucine, dans les deux souches récipientes, 6936 *ura3Δ360* et 6936 *ura3Δ990* de *C. lusitaniae* préalablement construites (manuscrit n°2). La séquence du locus sauvage *LEU2* de la souche 6936 est présentée dans la **Figure 43** (Numéro d'accèsion : BankIt1369894 Candida HM640438) et la carte génétique du locus inactivé est présentée dans le manuscrit de l'article n°2.

```

aattccatcgagtgaggcggacactagcttattttattggtgcatgggagtttgttttgggtgctggtttgtttatagtaattgattgggtggcagaactgaa 100
gtagaataccatcgaacttcaagtcgtagttcacggcatatggaaacataaattttgagtttatcatcttgtgtgtagagcctctgaatgaagcatgatatct 200
tggttcagtgatcaattcatctggtcaaacaagggttttaggcaagaggttaataagggtcaaaatctacaaatccatatatttcgtttatttagctgcagc 300
ttacaatttcattgcaacagctgatccatcaacgaaaaattcatgttactaaataacacttttctaccttcaacttcccttctcatctgacctctttcatc 400
aatcaactaattggctttcgcagcttgtctcacctggccatagtatgcgagaatgcgaacttgactgtgactaatacgtcgcatttttcgaagcgacaacg 500
gcaatggaaaaatgtcctgattggctacgtctagatctctcaataactgctgttcttagtgaatgtaatacaacgttcagcccaacctttctctttcgacat 600
ttttggctctgttccgctccaccatatgtcccagcgggtgactcttccacgtgaccggcccgctaccggcctegttttccacataaaatcacctgttcgc 700
caaattcgaaccaca M S S T T K T I T L L P G D H V G G E I 20
ATG TCT TCT ACC ACT AAA ACT ATC ACA CTT CTT CCG GGC GAC CAC GTG GGT GGC GAA ATC 777
V D Q A V Q I L K V I E E Y T P F Q K I K F E F K 45
GTC GAC CAG GCG GTG CAG ATC CTC AAA GTC ATC GAA GAG TAC ACT CCC TTC CAG AAA ATC AAG TTT GAA TTT AAA 852
N H L I G G A A I D A T G S P L P D E S L E A A K 70
AAC CAC TTG ATT GGC GGC GCT GCC ATT GAC GCC ACG GGC TCG CCT TTG CCC GAC GAG TCG TTG GAG GCT GCT AAA 927
S S D A V L L G A V G G P K W G T G A V R P E Q G 95
AGC TCG GAT GCT GTT TTG CTT GGA GCC GTT GGC GGG CCT AAA TGG GGC ACG GGT GCT GTC AGA CCC GAA CAA GG 1002
L L K I R K E L G L Y A N L R P C N F A S D S L L 120
TTG TTG AAA ATC AGA AAA GAA CTT GGA CTC TAT GCC AAC TTG CGT CCT TGC AAC TTT GCG TCG GAC TCC CTT TTG 1077
E L S P L K A E V V K G T N F T V V R E L V G G I 145
GAG CTT TCT CCA TTG AAG GCA GAA GTG GTC AAG GGC ACC AAC TTC ACT GTT GTG CGT GAG TTG GTG GGC GGA ATC 1152
Y F G E R S E Q E E S A D K D V A W D T E K Y A G 170
TAT TTT GGA GAG AGG CTG GAA CAA GAA GAG TCG GCA GAC AAG GAG GCA TGG GAC ACG GAA AAG TAC AGC GT 1227
A E V T R I T R M A A F M A L Q H N P P L P I W S 195
GCG GAA GTC ACT CGT ATC ACA AGA ATG GCT GCT TTC ATG GCT TTG CAA CAT AAT CCT CCT TTG CCC ATT TGG TCC 1302
L D K A N V L A S S R L W R R T V D K V M S E E F 220
TTG GAT AAA GCC AAC GTT TTG GCC TCT TCC AGA TTG TGG AGA AGA ACA GTC GAC AAG GTC ATG TCG GAA GAG TTC 1377

```

```

P Q L T V N H Q L I D S A A M I L V Q S P T K L N 245
CCT CAA TTG ACC GTT AAC CAC CAG TTG ATT GAC TCT GCG GCC ATG ATC TTG GTC CAG AGC CCA ACC AAG TTG AAC 1452

G I V I T S N M F G D I I S D E A S V I P G S L G 270
GGT ATT GTC ATC ACA TCC AAC ATG TTC GGA GAT ATC ATC AGT GAT GAA GCT TCG GTG ATC CCA GGA TCT TTG GGT 1527

L L P S A S L A S L P D T N S A F G L Y E P C H G 295
CTT TTG CCT TCT GCG TCT TTG GCT TCT TTG CCC GAC ACA AAC TCT GCT TTC GGT TTG TAC GAG CCA TGC CAC GGT 1602

S A P D L P P N K V N P V A T I L S V A M M L R L 320
TCT GCT CCT GAC TTG CCT CCT AAC AAG GTC AAC CCA GTG GCT ACT ATT TTG TCT GTG GCC ATG ATG TTG AGA TTG 1677

S L D C V K E A E A L E K A V G V V L D S G V R T 345
TCT TTG GAC TGC GTC AAA GAA GCA GAA GCT TTG GAA AAA GCT GTT GGT GTT GTG TTG GAT TCT GGT GTC AGA ACA 1752

A D L K G S S S T Q E V G L A I A E A S K K I L Q 370
GCC GAC TTG AAG GGC TCC AGT TCC ACC CAG GAG GTG GGT CTG GCC ATT GCT GAA GCT CTC AAA AAG ATC TTG CAA 1827

E S A * 374
GAG TCT GCT TAA acagagtcgctggtccacatctacttttagctctcaatgtataccttctgtcgggtcaaaagaacaagtagatgtacgagatata 1923

tagagagatatcctcatagtagctgtaaactttaaagtgcacgaagtcttgaggatcaatgaagggaactaccgattatccggataaaaaaagttcaagag 2023

ctctcttaatctgcaataacaatatgaagatatagaaatttaaagataatggatgtcttcacacgacatcaggttacgaatctctatctgtttgaagatt 2123

tggttaagtatagtagtcatatgactgtctctttgtgattgagtaaaatatgctgtaataatccatttggatcttaagacatcatgacagatatatg 2223

ttcttcgttctttgaagtggaatatctgttcagttaagataagttggacatttgcacaaacagtacaaatatgatttttagatggatatcctaccata 2323

actcatccgtagaagtaccatggttgatggtgaagaaacatgaaaaggccacaagactgtgcttcacttgacttttc 2401

```

Figure 43 : Séquence nucléotidique et peptidique du locus *LEU2* de la souche 6936 de *C. lusitaniae*. La délétion de 1048 est représentée en gris.

Manuscrit de l'article n°2:
**A two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes in the
opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitanae*.**
(Accepter pour publication dans "Yeast")

A two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes in the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitaniae*.

Short “Cloning free method for gene deletion in *C. lusitaniae*”

Sofiane El-Kirat-Chatel, Karine Dementhon and Thierry Noël*

Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, Université de Bordeaux, CNRS UMR5234, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

* Correspondence to: Thierry Noël, Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Moléculaire et Pathogénicité, Université de Bordeaux, CNRS UMR5234, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France
e-mail: Thierry.noel@u-bordeaux2.fr

Abstract

We describe a new cloning-free strategy to delete genes in the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitaniae*. We first constructed two *ura3* Δ recipient strains in *C. lusitaniae* for their use in transformation experiments. The first one was deleted for the entire *URA3* ORF. The second one which possessed a partial deletion within the coding region was used to determine the minimum amount of homology required for efficient homologous recombination of a linear DNA fragment restoring *URA3* expression. This allowed us to demonstrate that regions of nearly 200 bp on each side of the DNA fragment were necessary for its efficient homologous integration by double crossing-over. This data served to develop a strategy to construct DNA cassettes by a cloning-free overlapping PCR method. The cassettes were used in two successive transformation steps for the complete removal of a gene of interest. We report here the deletion of the *LEU2* gene as an example. The first cassette was constituted by the *URA3* gene flanked by two large fragments (500 bp) homologous to the 5' and 3' non-coding regions of *LEU2*. After transformation of an *ura3* Δ recipient strain and integration of the cassette at the *LEU2* locus, the *URA3* gene was removed by a second transformation round with a DNA cassette made by the fusion between the 5' and 3' non-coding regions of the *LEU2* gene. The overall procedure took less than two weeks, and allowed to create a clean null mutant that do not retain any foreign DNA sequence integrated in its genome.

Keywords: *Candida lusitaniae*, gene deletion, overlapping PCR

Introduction

The environmental yeast *Candida lusitanae* (teleomorph *Clavispora lusitanae*) belongs to *Candia* species that are opportunistic human pathogens causing serious infections in immunocompromised patients. *C. lusitanae* is a haploid yeast and its genome has been completely sequenced and is available on the Broad Institute Fungal Genome website (<http://www.broadinstitute.org/>). These features make it attractive to study virulence factors and antifungal resistance at the molecular level. Functional gene analysis requires a gene deletion system that allows the complete removal of the target gene. Generally, methods for gene deletion rely on the use of deletion cassette consisting of a selectable marker, either a gene coding for antibiotic resistance, or a wild-type allele complementing an auxotrophic recessive mutation, flanked by sequences homologous to the target gene to be deleted. After transformation, yeast cells are selected upon expression of the selectable marker and those that have correctly integrated the molecular construction at the expected locus are screened using PCR analysis and Southern blot hybridizations. However, integration of foreign information into a locus, and even the displacement of a genetic marker into a genome, may interfere with the phenotype under investigation and can lead to misinterpretation, especially when virulence is considered (Kirsch *et al.*, 1991 ; Staab *et al.*, 2003 ; Brand *et al.*, 2004). This is the reason why the *URA3* blaster strategy has been used for a long time in *C. albicans* (Fonzi *et al.*, 1993). It allows the recovery of the *URA3* selectable marker by counter selection on the toxic 5 fluoroorotic acid, and its reuse, either to restore a wild-type *URA3* locus, or to reconstitute a wild-type target locus. However, removal of the *URA3* marker is mediated by a recombination event between two repeated sequences flanking the *URA3* gene, of which one remains integrated at the locus of interest after excision of *URA3*.

When carried out by classical cloning methods, the deletion cassette may be laborious and time consuming to obtain because of several cloning steps. Alternative methods rely on PCR-based strategies, using long primers (*i.e.* 60 to 100 bp) to flank both sides of the marker gene with homologous regions of the target gene (Wilson *et al.*, 1999 ; Winzeler *et al.*, 1999 ; Gola *et al.*, 2003 ; Walther *et al.*, 2008). However, these rapid non-cloning methods using reduced lengths of homologous region to target integration, lead to a higher frequency of non-homologous integration (Taneja *et al.*, 2004).

In this work, we developed new molecular tools for the rapid and complete deletion of genes in *C. lusitanae*. We first created and used an *ura3* deletant mutant strain to determine the minimal amount of homology that was required for the targeted integration of a DNA cassette in *C. lusitanae*. On the basis of the data obtained, we defined a cloning-free PCR-based strategy for the construction of DNA deletion cassettes harbouring long regions of homology, first for the replacement of a target gene by the *URA3* marker in an *ura3Δ* recipient strain, and then for the complete removal of the *URA3* selection marker and its reintegration at its proper locus. In order to test the feasibility of our disruption strategy, we report here the complete inactivation of the *LEU2* gene, encoding 3-isopropylmalate dehydrogenase of the leucine biosynthetic pathway, in *C. lusitanae*.

Materials and methods

Strains and growth conditions. The *C. lusitanae* wild type strain 6936 (*MATa*), obtained from the Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, The Netherlands), was used for the construction of the two auxotrophic strains 6936 *ura3Δ360* and 6936 *ura3Δ990* which were used in turn for the deletion of the *LEU2* gene. The different strains constructed in this study will be described in the text. They were named by their genotype.

All strains were routinely cultivated at 35°C in liquid YPD medium (1% yeast extract, 2% bactopectone, 2% glucose) under constant agitation at 250 rpm. The minimal medium

YNB (0.67% yeast nitrogen base without amino acids [Difco Laboratories] supplemented with 2% glucose) was used for the screening of auxotrophic clones after having been supplemented with 50 µg/ml uracile, 1 mg/ml 5-Fluoroorotic acid (5-FOA), or with 50 µg/ml leucine when needed.

The *Escherichia coli* XL1 Blue strain was cultivated at 37°C under constant agitation at 250 rpm, in LB medium (Euromedex) supplemented with 100 µg/ml ampicillin (Sigma) for the selection of transformants.

Solid media were obtained by adding 2% agar (Sigma).

DNA extraction. Two ml of a YPD overnight culture of yeast cells were collected by centrifugation (2500 g, 5min) and resuspended in 500 µl of lysis buffer (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 2% and SDS 1%). An equal volume of phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) solution and 250 µl of glass beads 0.5 mm (Sigma) were added before vigorous vortexing (2 min) and phase separation by centrifugation (1600 g, 10 min). Two volumes of absolute ethanol were added to the aqueous phase. The DNA pellet was obtained by centrifugation (16000 g, 20 min, 4°C), washed once by 70% ethanol and then resuspended in 100 µl of RNase solution (50 µg/ml). DNA concentration and purity was estimated by NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (PeqLab, Erlangen, Germany).

PCR amplification. The High fidelity DNA polymerase Pfu Turbo (Stratagene) was used for PCR to generate DNA fragments for cloning steps and for overlapping PCR. For routine PCR, the conditions were those recommended by the supplier. All the primers were synthesized by Eurofins MWG operon and are listed in Table 1.

The DNA quantity used for PCR was 100 ng for direct amplification on genomic DNA. For the overlapping PCR, products were purified to exclude previous primers and 0.5 ng of each fragment used as template was added to the mix. The primers used during this work are listed in Table 1 and were designed on the basis of sequencing data (Accession number: AF450297 for *URA3* and HM640438 for *LEU2*).

Plasmid constructions. To construct the p*GURA3* vector, the PCR product derived from the *URA3* gene and obtained with the primers F8 / R8, was cloned into the plasmid pGEM-T easy (Promega). After heat shock transformation, plasmid DNA was purified from XL1Blue *Escherichia coli* strain (New England Biolabs) by using an anion-exchange column purification system (QIAGEN).

T4 DNA ligase (Promega), exonuclease and endonuclease restriction (New England Biolabs) and DNA repair with Klenow DNA polI (NEB) were performed according to the recommendation of the suppliers.

DNA sequencing and sequence analysis. PCR products were sequenced using the BigDye Terminator v1.1 kit (Applied Biosystems), at the Genotyping - Sequencing Pole of the Functional Genomic Platform of Bordeaux. The similarity searches in databases were performed with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programs available on the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the Broad Institute of MIT and Harvard (<http://www.broadinstitute.org/>) websites.

Tableau 1 : Oligonucleotide primers used in this study.

Primer	Sequence (5' to 3') *	Use for PCR amplification of
Fura	AAAGCATGCCTCTCCCGTGG	URA3 probe
Rura	GACGACCTCCTGAACTGTCC	
Fleu	GCAACAGCTGATCCATCAACG	LEU2 probe
Rleu	GTAGAAGACATTTTGGTTTGCA	
5URA	CCCGTTGATGGCAGAGTTG	Selection marker
3URA	ATGACATTCTCCATTCAAATGC	
FUpLEU2	ATTCCATCGAGTGGAGCGG	Upstream LEU2 fragment (1 st deletion cassette)
RUpLEU2URA	tatggaaaacatcatcctcaccacactctgccatcaacgggGTAGAAGACATTGTG GTTTGC	
FDownLEU2URA	aataaataattgtgttgccaagcattgaaatggagaatgcatCCAGGAGGTGGG TCTGGC	Downstream LEU2 fragment (1 st deletion cassette)
RDownLEU2	TTTTTCATGTTTCTTCCACCATCC	
NFUpLEU2	ACTTTTGTCTACCTTCAACTTCC	Nested deletion cassette
NRDownLEU2	ATTGTATTGCAGATTAAGAGAGC	
FDownUpLEU2	tcaccggttcgccaatctgcaaacacaaatgctcttaccCAGGAGGTGGGTCTG GC	Second cassette deletion
RUpLEU2	GTAGAAGACATTGTGGTTTGC	
F1	ACCATTGTCCCTCTTTTGG	URA3 fragment
R1	TCTTTACCGCCCATGTCCG	
F2	GACGACTTCTCGTACGAAGG	URA3 fragment
R2	CCAACCAGTCAAACCCTTCG	
F3	TAAAGACACACATTGACATC	URA3 fragment
R3	ACCAACACCTGGGGTCAATC	
F4	GGTCCTTTCATATGCCTCG	URA3 fragment
R4	GCGTCTCCTTTATCGTCAAG	
F5	GAATTCTTGGCTCTCATAGAC	URA3 fragment
R5	TGTCCGGTACTGTTGTCCC	
F6	CTGTTGATGTTTCAACTACTGC	URA3 fragment
R6	GTCGGTACCTGTGCGAGACG	
F7	AGAAACTTACACTCAGAGGGC	URA3 fragment
R7	GCACATCTCTCCGTGTAAGC	
F8	AGCAAATAAAGAACACCCC	URA3 fragment and pGURA3 construction
R8	TCCCGCTTCGATTACTTGG	
FoutLEU2	GATGGTGCAGGAGGTATCG	LEU2 replacement by URA3
RmidURA3	ATGCCTCTGCAAGTGAAGT	

*. Sequences in lowercases letters represent the 40nt giving the homology to the second fragment for the overlapping PCR.

Yeast transformation. Yeast transformation was performed by the electroporation procedure previously described by Francois *et al.* (Francois *et al.*, 2004) with slight modifications. Briefly, 5 ml of a YPD overnight culture were collected by centrifugation (1200 g, 10 min). The pellet obtained was treated for competency during 1 hour at room temperature with 40 ml of freshly prepared LiAc-Sorb buffer (lithium acetate 100 mM, Tris-HCL 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, DTT 10 mM and sorbitol 1 M). After centrifugation (1200 g, 10 min), the cell pellet was washed twice with 40 ml of sorbitol 1 M. Finally, cells were resuspended in 400 µl of sorbitol 1M and 40 µl were mixed with 500 ng of transforming DNA. This mix was subjected to the previously described electroporation protocol (Francois *et al.*, 2004).

Southern hybridization. The Southern analysis was done as described previously by Florent *et al.* (Florent *et al.*, 2009). Approximately 10 µg of *C. lusitaniae* was digested with the appropriate restriction enzyme, separated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel, and transferred onto a nylon membrane (Hybon N+; Roche Molecular Biochemicals). The membranes were hybridized with digoxigenin-labeled probes synthesized with a PCR DIG probe synthesis kit (Roche Molecular Biochemicals) as recommended by the supplier.

Results

Construction of two *ura3* deletant strains

In order to use the *URA3* gene encoding the orotidine-5'-phosphate decarboxylase (OMP DCase) as a selectable marker of transformation, we created two recipient strains auxotrophic for uracil, by deleting the wild type locus *URA3* in the *C. lusitaniae* strain CBS 6936 (**Fig. 1.A**). To obtain the first mutant strain, the plasmid p*GURA3* was linearized by *EcoRV* which had a unique restriction site located at 285 nt after the start codon of *URA3*. Then, both ends of the linear vector were progressively shortened by using the exonuclease *Bal31* that degrades both 3' and 5' termini of duplex DNA. Extremities of the shortened products were repaired to blunt ends with the Klenow DNA polymerase I. Plasmids were then recircularized by ligation before transforming bacteria to ampicillin-resistance. The size of plasmids recovered from randomly selected bacterial clones was estimated by agarose gel electrophoresis and compared to the size of the parental plasmid p*GURA3*. One of them was selected and subjected to nucleotide sequencing. The sequence obtained for the new *URA3* insert indicated that 360 bp were deleted in the core of the *URA3* ORF (**Fig. 1.B**). The deleted insert was purified from the plasmid by a double digestion with the *NcoI* and *SpeI* enzymes and used to transform the wild type strain 6936 of *C. lusitaniae*. Uracil auxotrophic clones were selected on YNB supplemented with uracil and 5-fluoro-orotic acid (5FOA), a compound that is converted into toxic 5'-fluorouridine monophosphate by the functional Ura3p enzyme (Boeke *et al.*, 1987 ; Francois *et al.*, 2004). The 5 FOA resistant clones were screened for the *ura3* deletion by PCR (data not shown), Southern blotting (**Fig. 2.B**) and one of them was selected for nucleotide sequencing. The deletion covered a 360 bp central part of the gene (120 amino acids), leaving 213 bp at the 5' end (71 amino acids) and 222 bp at the 3' end (74 amino acids) of the *URA3* ORF. This mutant was named *ura3*Δ360 and gave us the opportunity to use the *URA3* marker for the disruption of target genes. However, the *ura3*Δ360 locus still harboured large regions homologous to the selectable marker *URA3*.

This could lead to recombination of the marker *URA3* at its own deleted locus rather than integration by recombination of the flanking regions at the target gene.

In order to decrease the frequency of unwanted recombination events, we constructed a second *ura3* mutant with a larger deletion, taking care not to alter the *GEA2* (Guanine nucleotide Exchange Factor) gene present 98 bp upstream *URA3*, nor the *MtCP* (Mitochondrial carrier protein) gene present 252 bp downstream (**Fig. 1**). The method relying on the progressive digestion of DNA by *Bal31* was unreliable to create a precise deletion. Thereby, we performed an inverted PCR using the p*GURA3* vector as template DNA and two divergent primers (5invura / 3invura) separated by 990 bp on the *URA3* gene (**Fig. 1.C**). The PCR product was recircularized by ligation and transformed into bacteria to obtain a new plasmid with an insert corresponding to the *URA3* locus deleted for 990 bp. This deleted insert was purified after double digestion of the vector with *NcoI* and *SpeI* enzymes and used to transform the wild type strain 6936 of *C. lusitaniae*. Transformants were selected on YNB plates supplemented with uracil and 5FOA. After PCR screening, Southern blot hybridizations (**Fig. 2.B**), and nucleotide sequencing, a mutant with a deletion of 990 bp, from 19 nt upstream the start codon to 174 nt downstream the stop codon of the *URA3* gene, was selected (**Fig. 1.C**). This mutant strain was named *ura3*Δ990.

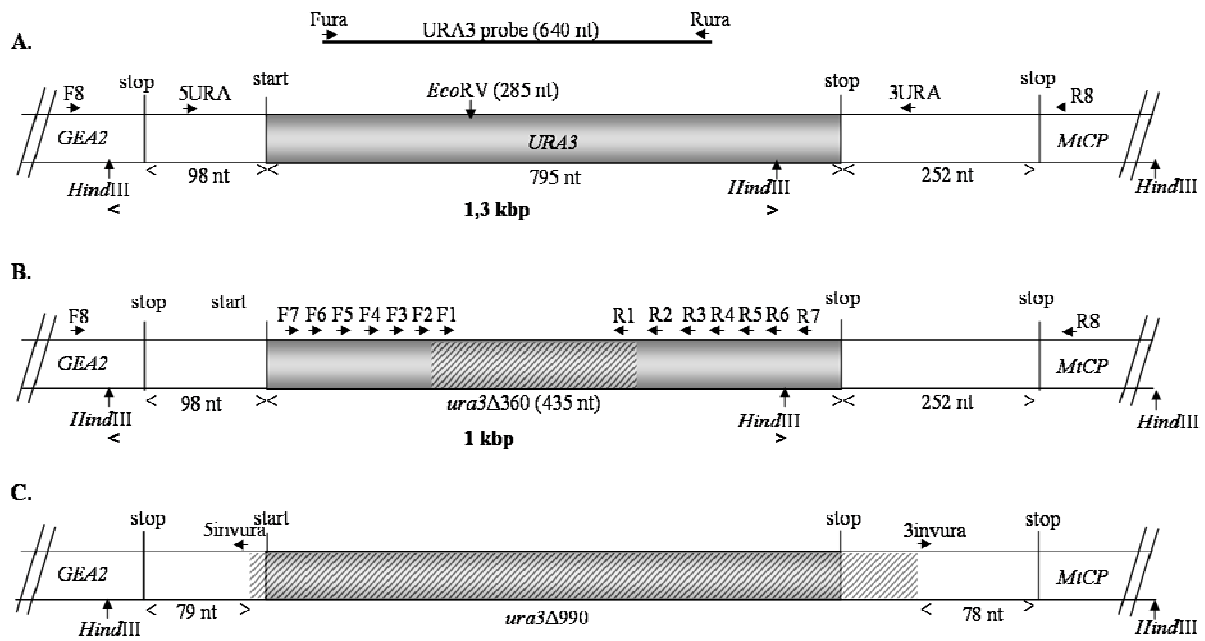


Figure 1 : Molecular organization of the wild-type and deleted alleles of the *URA3* loci.

A. The wild type *URA3* ORF is represented in grey. On each side of the ORF, the intergenic spacer is represented by white squares and the ends of the upstream *GEA2* and the downstream *MtCP* genes are mentioned. **B.** and **C.** Representation of the deleted loci *ura3Δ360* and *ura3Δ990*, respectively. The deleted regions are represented by grey hatched areas.

Primers and restriction sites are named on the figure and are represented by horizontal and vertical black arrows, respectively. The *URA3* probe is represented by a black line on the top and the predicted sizes of the DNA fragments revealed by Southern blotting on genomic DNA digested by *HindIII* are printed in bold under each fragments.

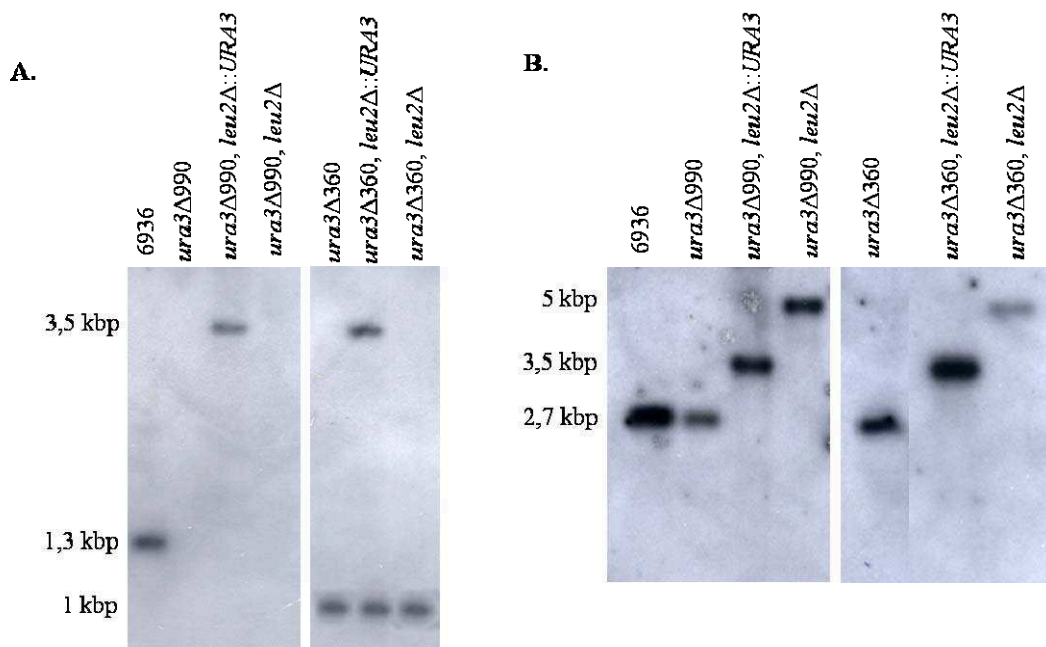


Figure 2 : Southern blot analysis of the *LEU2* and the *URA3* loci in the wild type and the mutant strains of *C. lusitaniae*.

Genomic DNA from the indicated strains was digested with *HindIII*, fractionated on a 1% agarose gel and blotted to nylon membrane. Fragments were revealed with **A.** the probe *LEU2* and **B.** the probe *URA3*. The sizes of the fragments are indicated in base pairs on the left of each panel.

Determination of the minimal size of DNA fragment for homologous recombination

In order to determine the minimal amount of homology necessary for efficient homologous recombination in *C. lusitaniae*, the *ura3Δ360* strain was transformed with different PCR products of the *URA3* gene, each with increasing size of homology on both sides of the $\Delta 360$ deletion (0 bp, 20 bp, 40 bp, 60 bp, 80 bp, 100 bp and 200 bp) (**Fig. 1.B**). As positive control, we used a larger fragment of 2.7 kbp allowing the functional expression of *URA3* whatever the site of integration into the genome. All PCR fragments were obtained with the primers pairs F1 / R1 to F8 / R8 (**Table 1**). Each fragment was used individually in transformation experiments of the *ura3Δ360* recipient strain, and transformants were screened onto YNB plates for uracil prototrophy. Only transformants that were derived from homologous recombination of the PCR fragment at the *ura3Δ360* locus could grow because none of the PCR fragments, except the larger one (2.7 kbp) used as positive control, had itself the sufficient minimal information for *URA3* expression.

The efficiency of transformation ranged from 0 to 10 Ura⁺ transformants per μg DNA with PCR fragments carrying homologies of 100 bp or smaller. When the homologous regions were 200 bp, the number of colonies increased significantly up to 100 transformants per μg of DNA. With the 2.7 kbp fragment corresponding to the wild-type allele *URA3* with its own promoter and terminator regions, the efficiency was about 400 transformants per μg of DNA. As a control, the *ura3Δ990* recipient strain has been transformed by the same PCR fragments. Excepted with the 2.7 kbp, no transformants were obtained since there is no homology between the deleted locus *ura3Δ990* and the different fragments corresponding to a part of the wild type ORF.

These results showed that at least 200 bp of homology to the target sequence on both sides of the genetic transformation marker are necessary to drive efficient site-specific integration of the transforming DNA into the genome. On the basis of these data, we developed a PCR method for the disruption of target genes, using the selectable maker *URA3*.

Construction of recombinant DNA cassettes by ligase-free overlapping PCR for the clean excision of a target gene.

Knowing that successful disruption of target genes by double crossing-over in *C. lusitaniae* should involve at least 200 bp of homology on each side of the genetic marker, we developed an overlapping PCR method which allows flanking the *URA3* marker with long regions homologous to the target DNA (around 500 bp). To test the feasibility of our method, a cassette was constructed for the deletion of a gene with an easily selectable phenotype, the *LEU2* gene, whose inactivation results in leucine auxotrophy.

The first step consisted in the construction of the cassette 5leu-URA-3leu to replace the *LEU2* gene by the *URA3* marker. In that aim, the *URA3* wild-type allele was amplified with the primers 5URA3 / 3URA3 (1.4 kbp) (**Fig. 1.A, 3**). Separately, two fragments corresponding to the non-coding upstream (700 bp) and downstream (600 bp) regions of *LEU2* (**Fig. 3.A**) were amplified with pairs of primers of which one contained at its 5' end a 40 bp region homologous to the extremities of the *URA3* fragment (**Table 1, Fig. 3.A**). A PCR reaction overlapping the *URA3* marker and the *LEU2* upstream fragment was performed. The 5leu-URA resulting product was purified and mixed with the *LEU2* downstream fragment (**Fig. 3.B**). The mix was used as template for a second overlapping PCR, which led to the final 5leu-URA-3leu cassette consisting of the *URA3* marker flanked by the upstream and downstream regions of the target gene *LEU2*. Finally, a nested PCR was carried out to obtain a DNA fragment that was used to transform the *ura3Δ360* and *ura3Δ990* mutant

strains (**Fig. 3.C**). Expected events consist of integration by double crossing-over of the upstream and the downstream regions at the *LEU2* locus (**Fig. 4.A**). Similar results were obtained for the two recipient strains. One hundred colonies prototrophic for uracil were isolated on YNB medium supplemented with leucine. Among the transformants, 25% were auxotrophic for leucine. The molecular organization of these clones was first confirmed by PCR analysis (data not shown) using specific primers: a primer located outside the region of recombination (FoutLEU2), and a primer specific to the *URA3* marker present on the cassette (RmidURA3) (**Fig. 4.A**). The genotype of the selected mutants was then verified by Southern blotting using *LEU2* and *URA3* probes (**Fig. 2**) to exclude clones exhibiting any additional or incorrect integration events. One clone of each recipient strain was selected for the rest of the study; they were named *ura3Δ360, leu2Δ::URA3* and *ura3Δ990, leu2Δ::URA3*, respectively.

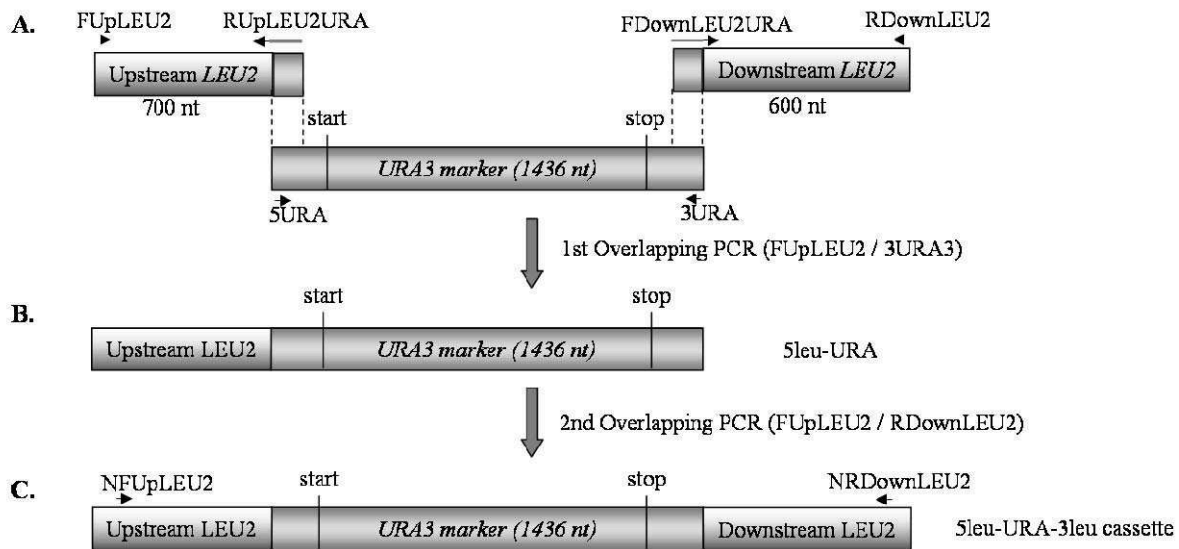


Figure 3: Principle of the overlapping PCR developed to obtain the cassette for the deletion of *LEU2*.

A. The first step consisted in amplifying separately the upstream and downstream regions of the target gene and the *URA3* marker. Primers RUpLEU2URA and FDownLEU2URA contained at their 3' end an extension of 40 nucleotides homologous to *URA3*. **B.** The second step corresponded to the fusion of the upstream *LEU2* fragment to the *URA3* marker by a first overlapping PCR using the primers FUpLEU2 and 3URA3. **C.** The third step led to the fusion of the precedent product to the downstream *LEU2* fragment by a second overlapping PCR using the primers FUpLEU2 and RDownLEU2. This final product has been used as template for a PCR using nested primers NFUpLEU2 and NRDownLEU2 to give the final DNA cassette. Primers are named on the figure and represented by horizontal black arrows.

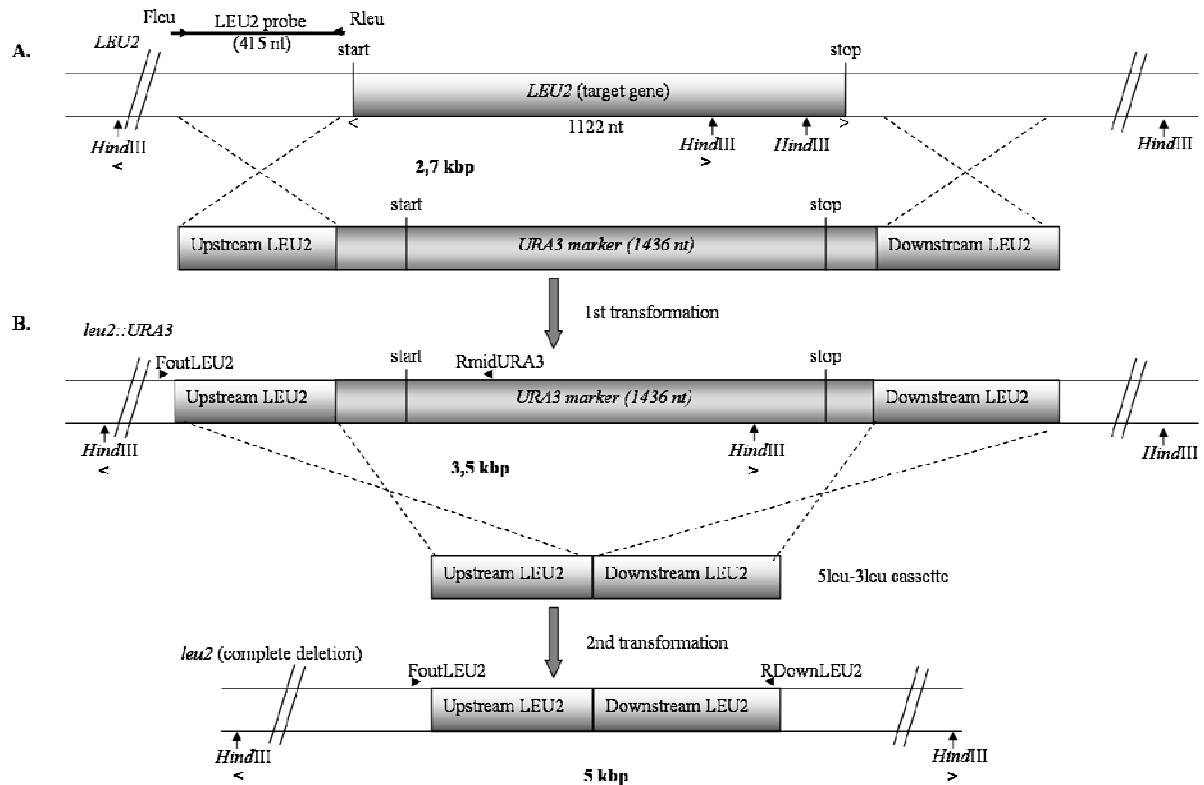


Figure 4 : Principle of the complete deletion of the target gene *LEU2* of *C. lusitaniae*.

A. The first transformation step used the deletion cassette (Fig. 2) harbouring the *URA3* marker to replace *LEU2*. **B.** The second transformation step was performed with a cassette corresponding to the fusion of the upstream and downstream regions of *LEU2*. Integration of the cassette by homologous recombination led to the excision of *URA3* from the target locus.

Primers and restriction sites are named on the figure and represented by horizontal and vertical black arrows, respectively. The *LEU2* probe is represented by a black line on the top and the predicted sizes of DNA fragments revealed by Southern blotting on genomic DNA digested by *Hind*III are printed in bold under each fragment.

The second step of our deletion strategy consisted in removing the *URA3* marker from the inactivated locus *leu2* Δ without leaving any foreign genetic information integrated at the locus (Fig 4.B). For that purpose, the 5leu-3leu cassette made of the 5' non-coding region of *LEU2* fused to the 3' non-coding region of *LEU2* was constructed by overlapping PCR. This PCR fragment was used to transform the *ura3* Δ 360, *leu2* Δ ::*URA3* and the *ura3* Δ 990, *leu2* Δ ::*URA3* mutant strains. Uracil auxotrophic clones were selected by 5FOA resistance. For each recipient strain, 5FOA resistant clones resulting of integration of the 5leu-3leu cassette at the disrupted *leu2* locus were tested by PCR (data not shown) using the primers F_{outLEU2} / R_{DownLEU2} (Fig. 4. B). Among them, 10% of the clones had excised the *URA3* marker from the *leu2* Δ locus. The other clones likely derived from spontaneous mutation in the *URA3* marker. The correct molecular organization of the mutants was verified by Southern blotting (Fig. 2); they were named *ura3* Δ 360, *leu2* Δ and *ura3* Δ 990, *leu2* Δ .

Finally, we verified that it was possible to restore the wild type Leu⁺ phenotype by transforming the two mutants *ura3* Δ 360, *leu2* Δ and *ura3* Δ 990, *leu2* Δ with the entire amplified *LEU2* gene. Fifty percent of the clones selected for Leu⁺ prototrophy on YNB medium harboured the wild type *LEU2* gene reintegrated at its proper locus (hybridization profile with a *LEU2* probe identical to that of the wild type strain, data not shown).

Discussion

Functional analysis of genes is essential to understand important biological mechanisms of fungal cells such as virulence factors or drug resistance. This requires efficient methods for fungal transformation and gene disruption. In the opportunistic pathogen yeast *C. lusitaniae*, an integrative transformation system based on the *URA3* blaster strategy was already described (Francois *et al.*, 2004). This system was successfully used, *e.g.* for the functional analysis of genes involved in flucytosine resistance (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Papon *et al.*, 2007 ; Florent *et al.*, 2009). However, the initial recipient strain used for genetic transformation in these works was an *ura3* auxotrophic strain harbouring a point missense mutation (*ura3*[D95V]) that could revert to give Ura⁺ clones along with true Ura⁺ transformants. Furthermore, the *ura3*[D95V] locus had full length homology with the wild-type *URA3* allele used as genetic marker of transformation, which resulted in a strong competition for the integration of a disruption cassette between the resident *ura3* locus and the locus of the gene to be deleted for functional analysis. Lastly, the *URA3* blaster system requires several cloning steps which are time consuming.

Accordingly, the work presented here addressed several issues: 1/ determining the minimal length of homology required for homologous integration of a transforming DNA fragment into the genome of *C. lusitaniae*. 2/ constructing a new *ura3* mutant strain harbouring a deletion large enough so that a DNA cassette carrying the wild-type *URA3* allele cannot recombine to the *ura3* locus. 3/ Developing a cloning-free recombinant DNA strategy for the rapid construction of DNA cassettes for the clean deletion of genes of interest in *C. lusitaniae*.

We thus report here the construction of two *C. lusitaniae ura3Δ* mutant strains (*ura3Δ360* and *ura3Δ990*). The *ura3Δ990* strain harbours a deletion covering the entire coding region, and also parts of the 5' and 3' non-coding regions. The extent of the deletion makes this strain particularly useful for the disruption of genes using *URA3* as genetic marker of transformation, because the marker could not recombine at its own locus, thus favouring integration of the disruption cassette at the locus of interest. The *ura3Δ360* strain harbours a 360 bp deletion within the *URA3* coding sequence which encompasses an important region encoding a conserved block of amino acids – FEDRKFADIG (88-97) - known to play a key role in the enzymatic function of orotidine-5'-phosphate decarboxylase (Kimsey *et al.*, 1992 ; Francois *et al.*, 2004). We took advantage of this strain to determine the minimum size of the regions of homology required for driving efficient homologous recombination in *C. lusitaniae*. The *ura3Δ360* strain was transformed with DNA fragments corresponding to the 360 bp region needed to repair the deletion, flanked on both sides by regions of increasing sizes. Each of the DNA fragments generated could not encode a functional orotidine-5'-phosphate decarboxylase, as verified by transforming in parallel the *ura3Δ990* strain which could not yield Ura⁺ colonies. Ura⁺ transformants could arise only from the homologous recombination by double crossing-over of the DNA fragment at the *ura3Δ360* locus. The minimal DNA fragment size necessary for efficient homologous recombination by double crossing-over was estimated to 200 bp on each side of the marker in *C. lusitaniae*. In other yeast species, such as *Saccharomyces cerevisiae* (Winzeler *et al.*, 1999) and *C. albicans* (Wilson *et al.*, 1999 ; Walther *et al.*, 2008), it was reported that regions of 60 bp or less were sufficient to drive homologous recombination to the target locus, even though with a low frequency when compared to ectopic recombination. This gave the opportunity to construct DNA cassettes for gene disruption by a single PCR with 80 nt primers possessing at their 3' extremity 20 nt specific to a selection marker and at their 5' extremities 60 nt homologous to the upstream and downstream region of the target gene. The data of our study demonstrate that this strategy could not be used in *C. lusitaniae*, which requires longer regions of homology.

This led us to develop a new strategy for the clean deletion of any gene without cloning step. This strategy relies on transforming *C. lusitaniae* with a DNA fragment obtained by overlapping PCR to disrupt the target gene with the genetic marker and on two transformation steps that results to the clean excision of the marker from the targeted locus. The first step, as already described for *C. albicans* (Noble *et al.*, 2005), consists in obtaining a mutant by transforming the Ura⁻ recipient strain with the 5leu-URA-3leu cassette obtained by overlapping PCR and corresponding to the *URA3* selectable marker flanked by large homologous regions of the target locus. In the second step, the mutant thus obtained is again transformed with a DNA fragment consisting in the fusion of the upstream and the downstream regions of the target locus, in order to excise the *URA3* marker resulting in the clean deletion of the target locus.

To demonstrate the reliability of our deletion method, we deleted the *LEU2* gene of *C. lusitaniae* encoding the 3-isopropylmalate dehydrogenase of the leucine biosynthetic pathway, in the two *ura3Δ* recipient strains obtained during this work. It was expected that the strain *ura3Δ990*, in which the *URA3* selectable marker could not recombine at its own locus, could enhance targeted gene recombination at the *LEU2* locus. Surprisingly, the efficiency of *LEU2* disruption was about 25% in the two strains *ura3Δ360* and *ura3Δ990*. These results indicated a high rate of non-homologous recombination in *C. lusitaniae*, which contrasts strongly with the 100% homologous recombination rate first reported in this species when using the sole *URA3* gene in transformation experiment of the *ura3*[D95V] genetic background (François *et al.*, 2004). The high rate of non-homologous recombination reported here can be explained by the chimeric structure of the transforming DNA which is composed of artificially linked DNA fragments derived from distinct loci in the genome of *C. lusitaniae*. In the second step of transformation, the 5leu-3leu cassette, made of the fusion of the upstream and downstream regions of *LEU2*, allowed excision of the *URA3* marker from the *leu2Δ* locus with an efficiency of about 10% (*i.e.* 10% of the 5-FOA-resistant clones had excised the *URA3* marker). Nevertheless, a large number of clones with a complete and clean deletion of *LEU2* was obtained in the two *ura3Δ* recipient strains. The major advantage of this system is that it overcomes fastidious cloning steps, while maintaining the possibility to flank large DNA fragments on each side of the selectable marker of transformation to optimize integration to the target locus. The technique for removing the *URA3* marker was improved to avoid leaving any foreign DNA sequence integrated at the locus, such as the *hisG* fragment of the *URA3*-blaster used in *C. albicans* (Fonzi *et al.*, 1993). Finally, the technique described here is rapid, and a mutant strain generated by the complete deletion of a gene of interest can be obtained in less than two weeks. It represents a valuable alternative method to classical cloning strategies for the deletion of genes in yeast species that need large regions of homology for targeted homologous integration.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the Genotyping and Sequencing facility of Bordeaux for participating to the sequencing of *LEU2*. Sofiane El-Kirat-Chatel PhD is supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We would like to thank Denis Dacheux-Deschamps and Nicolas Biteau for scientific advices and helpful discussions.

References

- Boeke J. D., Trueheart J., Natsoulis G. and Fink G. R.** (1987). "5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics." *Methods Enzymol* **154**: 164-75.
- Brand A., MacCallum D. M., Brown A. J., Gow N. A. and Odds F. C.** (2004). "Ectopic expression of URA3 can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of URA3 at the RPS10 locus." *Eukaryot Cell* **3**(4): 900-9.
- Chapeland-Leclerc F., Bouchoux J., Goumar A., Chastin C., Villard J., et al.** (2005). "Inactivation of the FCY2 gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(8): 3101-8.
- Florent M., Noel T., Ruprich-Robert G., Da Silva B., Fitton-Ouhabi V., et al.** (2009). "Nonsense and missense mutations in FCY2 and FCY1 genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(7): 2982-90.
- Fonzi W. A. and Irwin M. Y.** (1993). "Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*." *Genetics* **134**(3): 717-28.
- Francois F., Chapeland-Leclerc F., Villard J. and Noel T.** (2004). "Development of an integrative transformation system for the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitanae* using URA3 as a selection marker." *Yeast* **21**(2): 95-106.
- Gola S., Martin R., Walther A., Dunkler A. and Wendland J.** (2003). "New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region." *Yeast* **20**(16): 1339-47.
- Kimsey H. H. and Kaiser D.** (1992). "The orotidine-5'-monophosphate decarboxylase gene of *Myxococcus xanthus*. Comparison to the OMP decarboxylase gene family." *J Biol Chem* **267**(2): 819-24.
- Kirsch D. R. and Whitney R. R.** (1991). "Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections." *Infect Immun* **59**(9): 3297-300.
- Noble S. M. and Johnson A. D.** (2005). "Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* **4**(2): 298-309.
- Papon N., Noel T., Florent M., Gibot-Leclerc S., Jean D., et al.** (2007). "Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(1): 369-71.
- Staab J. F. and Sundstrom P.** (2003). "URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes." *Trends Microbiol* **11**(2): 69-73.
- Taneja V., Paul S. and Ganesan K.** (2004). "Directional ligation of long-flanking homology regions to selection cassettes for efficient targeted gene-disruption in *Candida albicans*." *FEMS Yeast Res* **4**(8): 841-7.
- Walther A. and Wendland J.** (2008). "PCR-based gene targeting in *Candida albicans*." *Nat Protoc* **3**(9): 1414-21.
- 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**(6): 1868-74.
- Winzler E. A., Shoemaker D. D., Astromoff A., Liang H., Anderson K., et al.** (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." *Science* **285**(5429): 901-6.

4. Inactivation des gènes *OLE1* et *OLE2* codant pour des $\Delta 9$ désaturases

Après internalisation par les phagocytes, les levures font face à un environnement hostile comprenant une exposition à l'arsenal antimicrobien des macrophages et des neutrophiles et une carence nutritionnelle. Les études de transcriptome de *C. albicans* en réponse à la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles ont mis en évidence plusieurs mécanismes de défense de la levure (Prigneau *et al.*, 2003 ; Rubin-Bejerano *et al.*, 2003 ; Lorenz *et al.*, 2004 ; Fradin *et al.*, 2005).

Ainsi, des mécanismes de détoxification permettant à la levure de résister à l'arsenal oxydatif des phagocytes, tels que les superoxydes dismutases (SOD) (Martchenko *et al.*, 2004), la catalase et la glutathion peroxydase, sont activés (Chauhan *et al.*, 2006).

De plus, l'analyse transcriptomique a également révélé que la levure phagocytée fait face à une carence métabolique. Dans les neutrophiles, les voies de biosynthèse de la méthionine et de l'arginine sont induites chez *C. albicans*, probablement pour palier à une carence en acides aminés en plus de la carence en carbone et en azote (Rubin-Bejerano *et al.*, 2003 ; Fradin *et al.*, 2005). Dans les macrophages, le profil transcriptionnel de *C. albicans* correspond à une situation de carence nutritionnelle avec une répression de la glycolyse et l'activation du cycle du glyoxylate et de la β -oxydation pour l'assimilation de sources de carbone secondaires tels que les acides gras (Prigneau *et al.*, 2003 ; Lorenz *et al.*, 2004).

L'échappement du système immunitaire de l'hôte par les espèces de *Candida* peut également se faire par la perturbation de la réponse immunitaire. Les levures sont capables de synthétiser des oxylipides, qui sont des métabolites secondaires proches des eicosanoïdes, et qui pourraient intervenir dans la régulation des fonctions immunes de l'hôte (Noverr *et al.*, 2003). Les oxylipides dérivent tous de lipides polyinsaturés ce qui montre encore l'importance du métabolisme lipidique dans la virulence des espèces de *Candida*.

Ces données suggèrent donc que les lipides pourraient avoir de multiples rôles dans la virulence des levures *Candida*. Le rôle des oxylipides en tant que molécules médiatrices serait particulièrement intéressant à préciser dans l'interaction *Candida* - phagocytes. Chez *C. albicans*, les gènes *OLE1* et *OLE2* sont deux paralogues codant pour des $\Delta 9$ désaturases dont la fonction est de désaturer l'acide stéarique (C18:0) en acide oléique (C18:1) (**Figure 44**). L'acide oléique peut jouer un rôle structural pour l'architecture membranaire, un rôle énergétique et constitue également un précurseur pour la synthèse d'oxylipides. Cette Chez *S. cerevisiae*, la protéine Ole1 est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Elle présente quatre domaines transmembranaires putatifs qui ancrent la protéine dans la membrane et exposent le site catalytique de l'enzyme dans le cytoplasme (Stukey *et al.*, 1990). Les désaturases d'acide gras utilisent les électrons transportés par le cytochrome b5 à partir du NADH et l'oxygène moléculaire pour la déshydrogénation de l'acide stéarique et la formation de la double liaison. Les désaturases fongiques contiennent dans leur propre séquence un domaine cytochrome b5 (Mitchell *et al.*, 1995). Le site actif de ces enzymes contient trois séquences riches en histidine qui se replient pour former deux sites de liaison au fer (Stukey *et al.*, 1990).

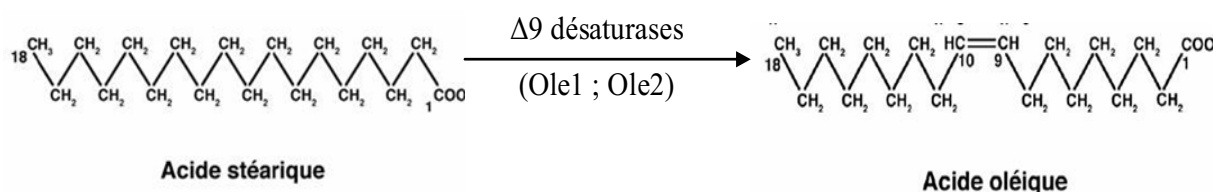


Figure 44 : Réaction de désaturation de l'acide stéarique en acide oléique par les $\Delta 9$ désaturases telles que Ole1 et Ole2.

La comparaison du profil transcriptionnel de *C. albicans* en présence de différentes concentrations en fer a permis de montrer que le gène *OLE1* était surexprimé en présence d'un excès de fer, nutriment essentiel à la croissance et à la virulence de la levure (Lan *et al.*, 2004). Le mutant conditionnel *ole1Δ / PMET3-OLE1*, qui porte une seule copie du gène sauvage sous le contrôle du promoteur inductible *PMET3*, a permis de démontrer le caractère essentiel de ce gène par l'inhibition de croissance du mutant en condition restrictive. La répression partielle de l'expression du gène *OLE1* sous le contrôle du promoteur *PMET3* entraîne une baisse de la concentration en acide oléique dans les cellules ainsi qu'une réduction de la fluidité membranaire. Cela s'accompagne également d'une inhibition de la filamentation et de la formation de chlamydospores en condition aérobie, suggérant un rôle régulateur de l'acide oléique dans la formation d'hyphes (Krishnamurthy *et al.*, 2004). En revanche, un mutant de *C. albicans* muté pour les deux allèles du gène *OLE2*, le paralogue de *OLE1*, est viable et sa filamentation n'est pas affectée (Krishnamurthy *et al.*, 2004). Cependant, une analyse par ELISA a montré une réduction d'environ 25% de production de Prostaglandine E2 (PGE2) par le mutant *ole2/ole2* par rapport à la souche sauvage (Erb-Downward *et al.*, 2007).

Nous avons cherché à savoir si les oxylipides en général, et plus précisément leurs précurseurs, c'est-à-dire les acides gras insaturés pouvaient jouer un rôle au cours de l'interaction entre les levures *Candida* et les phagocytes. Nous avons pour cela identifié deux paralogues codant des $\Delta 9$ désaturases chez *C. lusitaniae*, puis nous avons cherché à les invalider afin de définir leur rôle possible dans les interactions cellulaires et la virulence.

4.1. Identification et analyse *in silico* des gènes *OLE1* et *OLE2* chez *C. lusitaniae*

Les séquences protéiques des gènes *OLE1* et *OLE2* de *C. albicans* ont été récupérées à partir de la banque de données *Candida Genome Database* (CGD) puis utilisées pour rechercher dans le génome de *C. lusitaniae* (*Candida lusitaniae* Database Broad Institute MIT, Harvard) les séquences nucléotidiques des gènes orthologues en utilisant le logiciel *tBLASTn* (Protein query/Nucleotide database). Avec la séquence de la protéine Ole1 de *C. albicans*, l'analyse informatique a permis d'identifier une première séquence de *C. lusitaniae* (CLUG_00176.1) homologue au gène *OLE1* de *C. albicans* et une seconde séquence (CLUG_05828.1) avec un score plus faible qui pourrait correspondre à un gène homologue du gène *OLE2* de *C. albicans*. Réciproquement, une analyse à partir de la séquence protéique Ole2 de *C. albicans* a permis d'identifier les deux mêmes ORF de *C. lusitaniae*.

Après traduction, les séquences protéiques du CLUG_00176.1 et du CLUG_05828.1 de *C. lusitaniae* ont été alignées avec celles des protéines Ole1 et Ole2 de *C. albicans* (**Figure 45**). Les pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences protéiques déduites du CLUG_00176.1 et du CLUG_05828.1 de *C. lusitaniae* et les protéines Ole1 et Ole2 de *C. albicans* sont présentés dans le **Tableau 7**. Sur la base des pourcentages d'identité et de similarité, nous avons considéré dans un premier temps que le CLUG_00176.1 de *C. lusitaniae* était l'orthologue de *OLE1* de *C. albicans* et le CLUG_05828.1 était l'orthologue de *OLE2*.

4.1.1. Structure du locus *OLE1* de *C. lusitaniae*

La séquence du gène *OLE1* (CLUG_00176.1) est localisée sur le supercontig 1 (nucléotides 345711 à 344260). Le gène a une taille de 1452 nt, ne comporte pas d'intron et code potentiellement pour une protéine de 483 aa. Le domaine désaturase se situe entre les nucléotides 300 et 999 (acides aminés 100 à 333) et un domaine Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding est situé entre les nucléotides 1156 et 1383 (acides aminés 385 à 461),

permettant le transfert d'électron pour la formation de la double liaison entre les carbones 9 et 10 de l'acide stéarique.

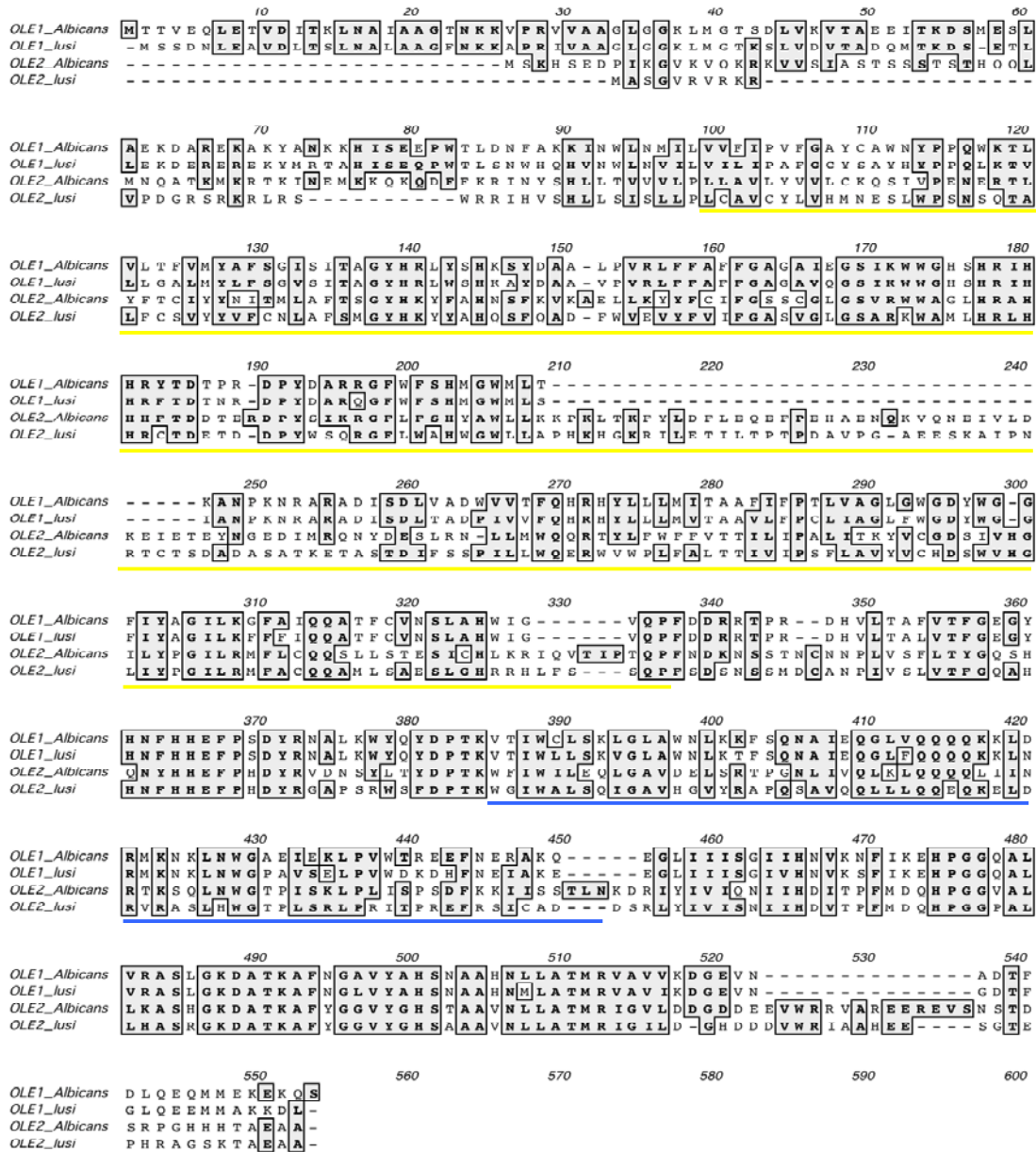


Figure 45 : Alignement des protéines Ole1 et Ole2 de *C. lusitaniae* (*lusi*) et de *C. albicans* (*Albicans*). Le domaine désaturase est souligné en jaune et le domaine cytochrome b5 en bleu (Krishnamurthy *et al.*, 2004).

Tableau 7 : Analyse comparative des séquences protéiques de Ole1 et Ole2 de *C. lusitaniae* et de *C. albicans*. Les pourcentages d'identité sont représentés en bleu et les pourcentages de similarité en vert.

Protéine	Identité (%)			
	Ole1 <i>C.albicans</i>	Ole1 <i>C.lusitaniae</i>	Ole2 <i>C. albicans</i>	Ole2 <i>C.lusitaniae</i>
Ole1 <i>C.albicans</i>	100.0	78.6	26.6	28.0
Ole1 <i>C.lusitaniae</i>	88.1	100.0	26.0	27.2
Ole2 <i>C. albicans</i>	43.6	43.4	100.0	45.2
Ole2 <i>C.lusitaniae</i>	42.6	42.6	62.4	100.0
	Similarité(%)			

4.1.2. Structure du locus *OLE2* de *C. lusitaniae*

La séquence du gène *OLE2* (CLUG_05828.1) est localisée sur le supercontig 8 (nucléotides 512253 à 513689). Le gène a une taille de 1437 nt, ne comporte pas d'intron et code potentiellement pour une protéine de 478 aa. Le domaine désaturase se situe entre les nucléotides 165 et 953 (acides aminés 55 à 317) et comme dans la séquence du gène *OLE1*, un domaine Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding est retrouvé entre les nucléotides 1110 et 1343 (acides aminés 370 à 447).

4.2. Construction moléculaire pour l'inactivation des gènes *OLE1* et *OLE2* de *C. lusitaniae*

L'inactivation du gène *OLE1* a été entreprise par la méthode cœur de gène. Une partie (cœur de gène) de la séquence codante du gène a été insérée entre les sites *NcoI* et *SacII* du vecteur pGUNv2. Le vecteur pGUNv2-cœur *ole1* ainsi obtenu a été linéarisé par l'endonucléase *BbsI* qui reconnaît un site unique de restriction situé au centre du cœur de gène. Le vecteur linéarisé a ensuite été utilisé pour transformer les souches récipientes *ura3Δ360* et *ura3Δ990* auxotrophes pour l'uracile. Sur un total de quatre transformations indépendantes, moins de 15 transformants ont été isolés sur milieu sélectif et l'analyse génotypique par PCR n'a pas permis d'identifier de mutant *ole1* parmi eux. Il est probable que ces transformants proviennent d'une intégration par recombinaison non homologue du vecteur linéarisé avec le génome des souches récipientes, ce qui permet de rétablir la prototrophie à l'uracile, mais n'entraîne pas l'inactivation du gène *OLE1*. Notre incapacité à isoler des transformants *ole1* et les données de bibliographie décrivant le gène *OLE1* comme essentiel chez *C. albicans*, suggèrent que *OLE1* est également essentiel chez *C. lusitaniae*. Nous n'avons pas envisagé la construction d'un mutant *ole1* conditionnel chez *C. lusitaniae* et le reste de nos travaux a porté sur l'inactivation du gène paralogue *OLE2*.

Pour l'inactivation du gène *OLE2*, nous avons utilisé la méthode décrite dans le manuscrit de l'article n°2. Ainsi, une cassette de délétion correspondant au marqueur de sélection *URA3* bordé par les régions amont et aval du gène cible *OLE2* a été obtenue par PCR chevauchante. Le fragment amont de 700 pb comprenant la région amont de l'ORF jusqu'à 23 pb après le codon start a été amplifié avec les amorces 5amOLE2 et 3amOLE2-URA3 (**Figure 46**). L'amorce reverse 3amOLE2-URA3 possède à son extrémité 3', 23 nt qui sont complémentaires de la séquence *OLE2* et à l'extrémité 5', une queue flottante de 41 nt complémentaires de la région 5' du marqueur *URA3*. Le fragment aval de 700 pb correspond majoritairement à la région 3' non codante et comprend les 21 pb de la fin de l'ORF de *OLE2*. Ce fragment a été amplifié avec les amorces 5avOLE2-URA3 et 3avOLE2. L'amorce 5avOLE2-URA3 possède à son extrémité 3', 21 nt complémentaires de la séquence *OLE2* et son extrémité 5' correspond à une queue flottante de 40 nt complémentaires de la région 3' du marqueur de sélection *URA3*. Le marqueur de sélection *URA3* d'environ 1400 pb a été amplifié en parallèle avec les amorces 5-URA et 3-URA (**Figure 46**). Ces produits de PCR ont ensuite servi de matrice pour réaliser des PCR chevauchantes afin de fusionner le marqueur *URA3* avec la région amont et la région aval du gène *OLE2*. Le mix comprenant le marqueur *URA3* et le fragment amont et le mix comprenant le marqueur *URA3* et le fragment aval ont permis d'obtenir des amplifiats de 2300 pb correspondant à la fusion entre le marqueur *URA3* et respectivement, le fragment amont et le fragment aval du gène *OLE2*. Le produit de fusion avec le fragment amont a ensuite été utilisé pour une seconde réaction de PCR chevauchante en présence du fragment aval de *OLE2* afin d'obtenir la cassette de délétion finale (amplifiat de 3 kpb) (**Figure 46**). Cette cassette de délétion du gène

OLE2 a été utilisée pour transformer les souches *ura3Δ360* et *ura3Δ990* de *C. lusitaniae* auxotrophes pour l'uracile. Une dizaine de colonies prototrophes a été obtenue pour chaque souche récipiente. La séquence du locus *OLE2* de la souche 6936 et l'étendue de la délétion réalisée sont présentées dans la **Figure 47**.

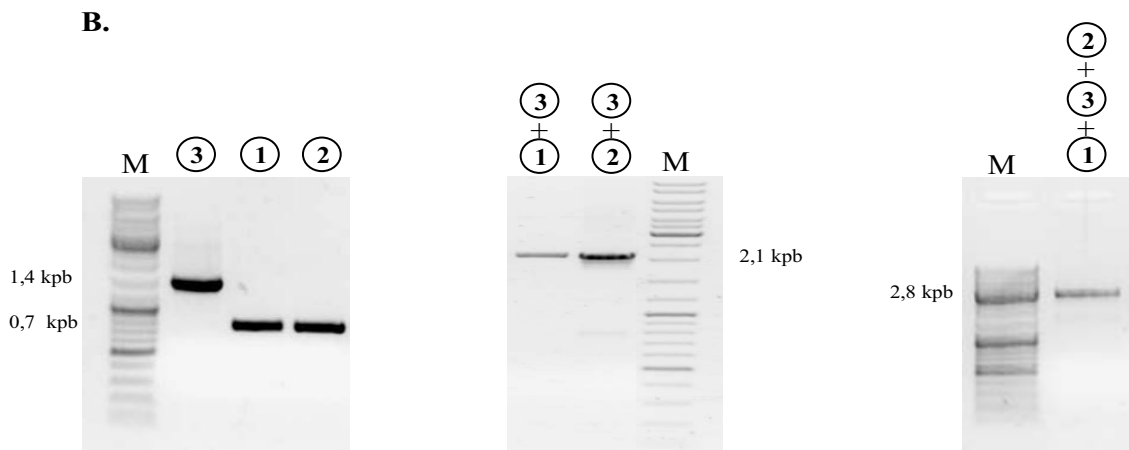
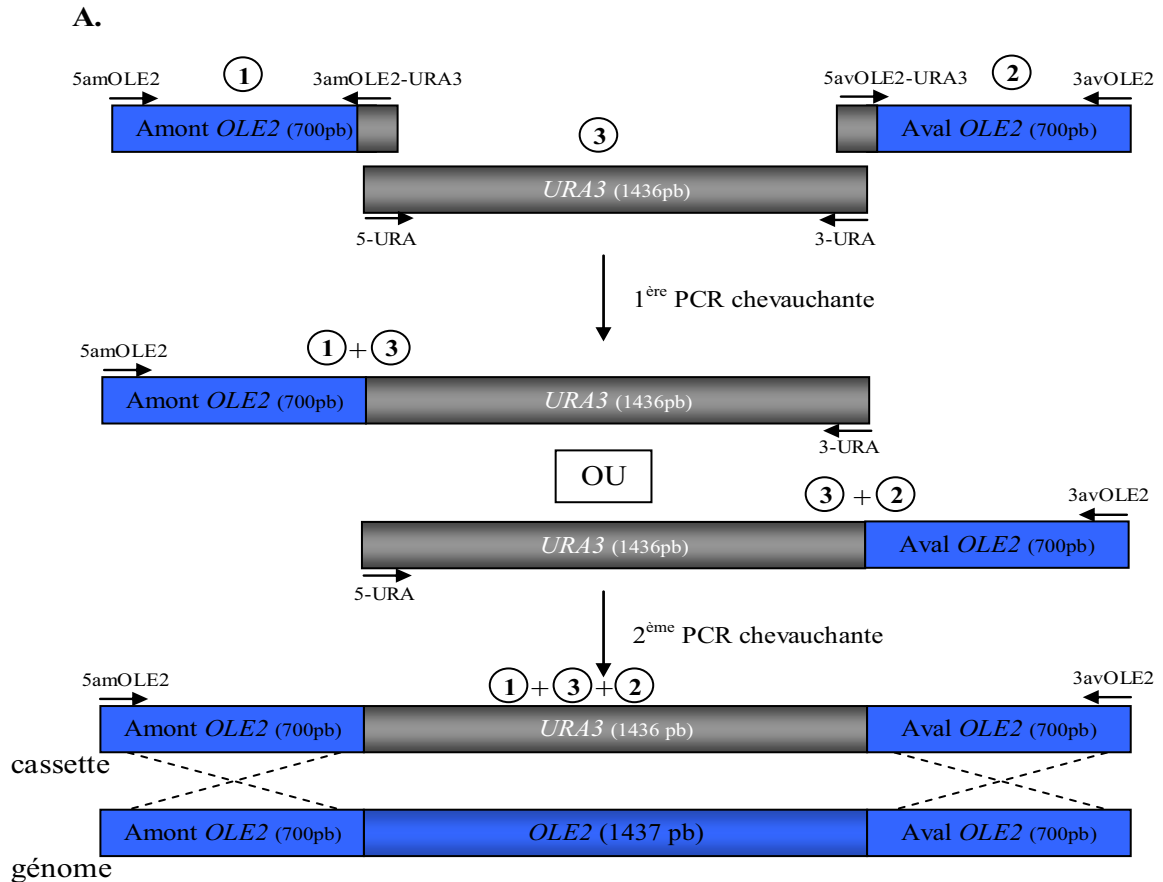


Figure 46 : Constructions moléculaires pour l'obtention de la cassette de délétion utilisée pour le remplacement du gène *OLE2* par le marqueur de sélection *URA3*. A. Les fragments obtenus par PCR et PCR chevauchante ainsi que les amorces utilisées sont représentés schématiquement. B. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse (M : Marqueur de poids moléculaire).

GA CGT ACC GCT AGA ATA AAA GAT TAT TCT ACG TAT GCA CTA GCA CCC AAT CAT	54
ACA TGA GCT TTT CTT TCG TGT CTT CAT CAT CTT GTA ACT AGG AGG CAC CAT ATT	108
TGC AGC CTA TTT ACG AAG GCA TGC ATG ATC GAA ATA ATG CAA TAA ACG CAA TGC	162
ACA CCC CTT CTT GCC GTT TTA GTT GTA TCT TGT GGT TGT AAA GAT CTC AAA CAT	216
AAG CGG GGT AGC TCC AGA ATA CTA TAG AAA GTT GTC CTT TTT CCG CTT TGC CAC	270
GTA AAA TAT CAA AAC GGT CCA TAT GCA TCA ACG CAC ATA ATC AAT TGG ATA ACG	324
AGG CCA GTA ATT GCC GCT CTA TTT ACC AGC AGA AGC AAG TAG CTT TTA TCA CAT	378
AAA TGG GTG ATT TAT CTA TTT CTA TGA ATT TTT TTC TAC TTT GTA TAT CCT GTT	432
TGC AGC AAT ATC GTT TAT GCT CGT TTA TTC TGA CGT GGT AAT CAT CTG CGT GCA	486
AGA ATC ACG TGC ATC ACA TCC CCA CTA ACC ACT CTC ATT AAA AGC TTC TTG ATT	540
GCC TTC ACA TCT ACG CTA CTT CTT CGT TCA GTT TCC ATT CTT CCT TTT TTT TTG	594
M A S G V R V R K R V P D G R S R	17
CAT ATG GCA TCT GGT GTT CGA GTT CGA AAG CGG GTG CCT GAT GGG CGC CTG CGG	648
K R L R S W R R I H V P H L L S I S	35
AAG AGA CTT CGT CTG TGG CGC CGG ATC CAT GTT CCA CAC CTT CTT TCG ATC CTG	702
L L P L C A V C Y L V H M N E S L W	53
CTA CTT CCC CTT TGC GCT GTG TGC TAC TTA GTG CAC ATG AAC GAG AGT TTG TGG	756
P S N S Q T A L F C S V Y Y V F C N	71
CCT TCT AAT TCC CAA ACA GCC TTG TTC TGT TCT GTC TAC TAC GTA TTC TGC AAT	810
L A F S M G Y H K Y Y A H Q S F Q A	89
TTG GCA TTC TCC ATG GGC TAC CAT AAG TAC TAT GCG CAT CAA AGT TTC CAA GCA	864
D F W V E V Y F V I F G A S V G L G	107
GAT TTT TGG GTC GAG GTG TAC TTT GTG ATT TTT GGA GCT AGT GTA GGG CTT GGT	918
S A R K W A M L H R L H H R C T D E	125
TCT GCC CGA AAA TGG GCT ATG TTG CAC CGT TTA CAT CAC AGG TGT ACT GAC GAG	972
T D D P Y W S Q R G F L W A H W G W	143
ACG GAT GAT CCG TAT TGG AGC CAA CGT GGA TTC TTA TGG GCA CAT TGG GGT TGG	1026
L L A P H K H G K R I L E T I L T P	161
CTA TTA GCA CCG CAC AAG CAT GGT AAG AGA ATC TTG GAA ACT ATT TTG ACC CCA	1080
T P D A V P G A E E S K A I L N R T	179
ACA CCC GAC GCT GTG CCT GGA GCT GAA GAA AGC AAA GCA ATA CTT AAT CGC ACT	1134
Δ23-1431 (1408 nt)	
C T S D A D A S A T K E T A S T D I	197
TGC ACC TCG GAT GCT GAT GCA TCT GCC ACT AAA GAG ACT GCT AGT ACT GAT ATC	1188
F S S P I L L W Q E R W V W P L F A	215
TTC TCC TCA CCA ATT CTA CTA TGG CAA GAG CGC TGG GTA TGG CCA CTA TTT GCT	1242
L T T I V I P S F L A V Y V C H D S	233
CTC ACC ACG ATA GTG ATT CCA TCT TTT CTT GCT GTC TAT GTT TGC CAC GAC TCT	1296
W V H G L I Y P G I L R M F A C Q Q	251
TGG GTG CAC GGT CTT ATA TAT CCA GGC ATT CTC CGC ATG TTT GCT TGT CAG CAA	1350
A M L S A E S L G H R R H L F S S Q	269
GCT ATG CTT TCA GCA GAA TCA TTG GGC CAC AGG CGA CAT TTA TTT TCC TCG CAA	1404

P	F	S	D	S	N	S	S	M	D	C	A	N	P	I	V	S	L	287
CCT	TTC	AGT	GAC	TCT	AAC	TCG	CTG	ATG	GAC	TGT	GCT	AAT	CCT	ATA	GTT	TCC	CTA	1458
V	T	F	G	Q	A	H	H	N	F	H	H	E	F	P	H	D	Y	305
GTC	ACT	TTT	GGT	CAG	GCA	CAT	CAC	AAT	TTC	CAT	CAT	GAG	TTC	CCT	CAT	GAT	TAT	1512
R	G	A	P	S	R	W	S	F	D	P	T	K	W	G	I	W	A	323
CGT	GGA	GCA	CCA	TCT	AGA	TGG	TCA	TTT	GAT	CCA	ACC	AAA	TGG	GGG	ATC	TGG	GCC	1566
L	S	Q	I	G	A	V	H	A	V	Y	R	A	P	Q	S	A	V	341
TTG	TCC	CAA	ATT	GGT	GCG	GTA	CAT	GCC	GTA	TAT	CGG	GCC	CCG	CAA	CTG	GCT	GTG	1620
Q	Q	L	L	L	Q	Q	E	Q	K	E	L	D	R	V	R	A	S	359
CAA	CAG	CTA	CTT	CTC	CAA	CAG	GAA	CAA	AAG	GAA	CTA	GAT	CGT	GTC	CGT	GCG	CTG	1674
L	H	W	G	T	P	L	S	R	L	P	R	I	T	P	R	E	F	377
CTA	CAT	TGG	GGT	ACA	CCG	CTT	TCA	CGT	CTA	CCG	CGT	ATC	ACT	CCT	CGG	GAG	TTT	1728
R	S	I	C	A	D	D	S	R	L	Y	I	V	I	S	N	I	I	395
CGC	AGC	ATT	TGT	GCC	GAC	GAT	TCA	CGC	CtT	TAC	ATC	GTA	ATT	CTG	AAC	ATT	ATA	1782
H	D	V	T	P	F	M	D	Q	H	P	G	G	P	A	L	L	H	413
CAC	GAT	GTG	ACG	CCT	TTT	ATG	GAT	CAG	CAT	CCT	GGT	GGG	CCG	GCT	CTA	TTA	CAT	1836
A	L	R	G	K	D	A	T	K	A	F	Y	G	G	V	Y	G	H	431
GCC	CTG	CGT	GGT	AAG	GAT	GCT	ACA	AAA	GCG	TTC	TAT	GGA	GGC	GTG	TAC	GGA	CAT	1890
S	A	A	A	V	N	L	L	A	T	M	R	I	G	I	L	D	G	449
CTG	GCT	GCA	GCA	GTG	AAT	TTG	CTC	GCA	ACA	ATG	CGT	ATT	GGC	ATT	CTT	GAC	GGC	1944
H	D	D	D	V	W	R	I	A	A	H	E	E	S	G	T	E	P	467
CAT	GAT	GAT	GAT	GTA	TGG	AGG	ATC	GCC	GCA	CAC	GAG	GAA	AGT	GGG	ACT	GAG	CCA	1998
H	R	A	G	S	K	T	A	E	A	A	*							478
CAT	CGT	GCT	GGC	CTG	AAG	ACA	GCT	GAA	GCA	GCG	TGA	AGC	ACC	TTC	GGC	ACA	TGA	2052
TGA	CAC	CTA	TCG	AAA	TTA	TTT	CGT	CAA	ATG	ATC	TTG	GCG	TAC	TTG	GTA	TAT	ACA	2106

Figure 47 : Séquences nucléotidique et peptidique du locus *OLE2* de la souche 6936 de *C. lusitaniae*. La délétion de 1408 pb est surlignée en jaune.

4.3. Caractérisation génotypique des transformants *ole2Δ* par PCR-RFLP

Pour chaque souche récipiente (*ura3Δ360* et *ura3Δ990*), l'ADN de huit transformants prototrophes pour l'uracile a été extrait. Cet ADN a ensuite servi de matrice pour l'amplification du locus *OLE2* avec les amorces 5amOLE2 et 3avOLE2. Ce couple d'amorces ne permet pas de différencier le locus muté *ole2Δ* du locus sauvage *OLE2* car le produit de PCR a une taille d'environ 2,7 kpb, que le locus soit sauvage ou remplacé par le marqueur *URA3* (Figure 48). La distinction a donc été faite par digestion des produits de PCR avec l'endonucléase de restriction *EcoRV*. Dans le cas d'un transformant possédant un allèle *OLE2* sauvage, comme chez la souche sauvage non transformée, deux fragments de restriction de tailles différentes ont été obtenus : un fragment de 1500 pb et un fragment de 1250 pb. En revanche, dans le cas d'un mutant *ole2Δ*, le remplacement de l'allèle sauvage *OLE2* par le marqueur de sélection *URA3* change le profil de restriction du produit de PCR qui génère un doublet d'environ 1,4 kpb (Figure 48). Ainsi, dans chaque souche récipiente, un mutant sur huit transformants testés a présenté un profil de restriction correspondant au remplacement de l'allèle sauvage *OLE2* par *URA3* (Figure 48). Ces deux mutants ont été sélectionnés pour la suite des travaux et nommés *ura3Δ360*, *ole2Δ::URA3* et *ura3Δ990*, *ole2Δ::URA3*.

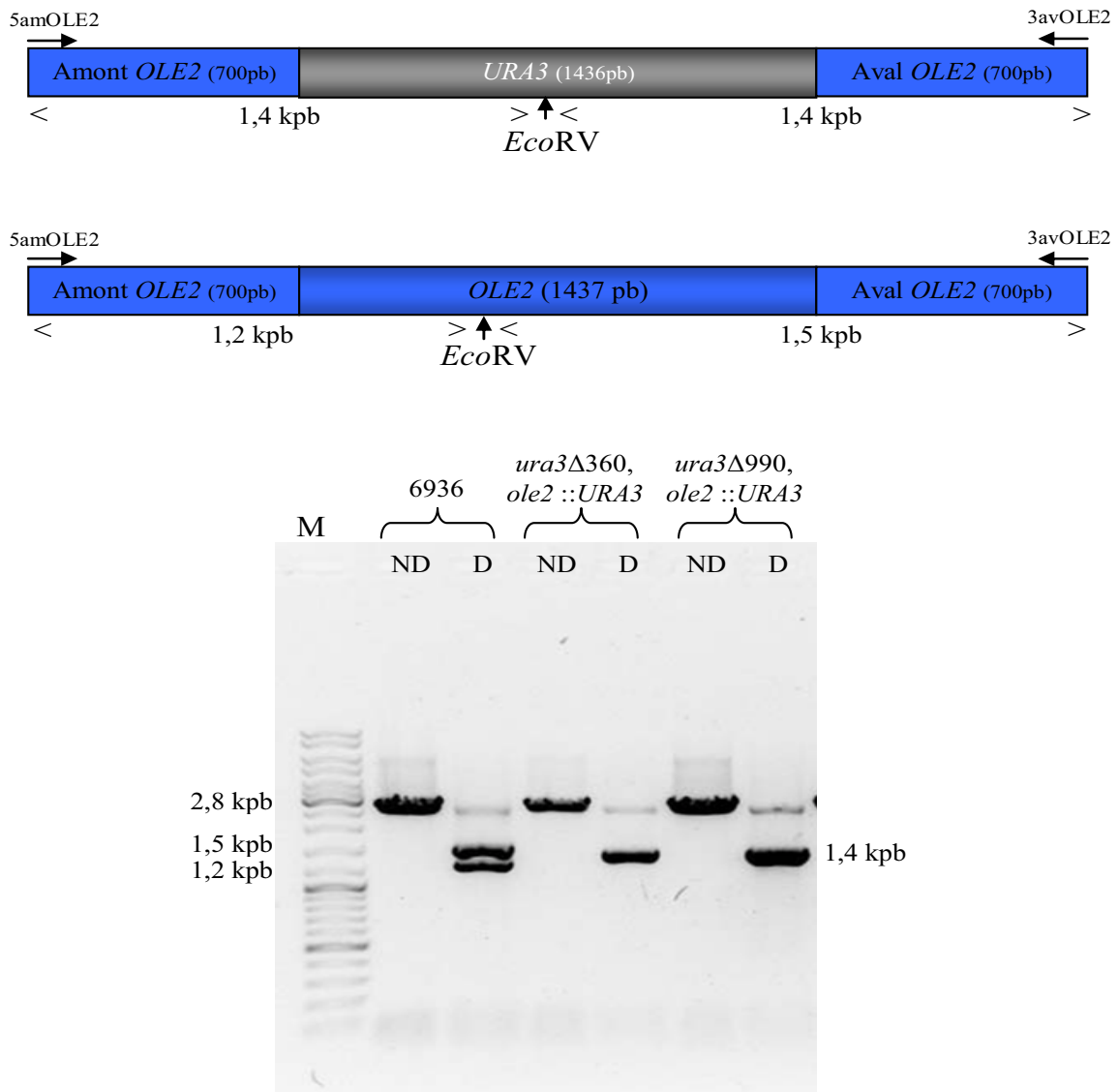


Figure 48 : Carte génétique des loci *OLE2* sauvage et muté et caractérisation génotypique des transformants *ole2* par PCR-RFLP. L'ADN génomique des transformants et de la souche sauvage 6936 a été amplifié avec les amorces 5amOLE2 et 3avOLE2 (ND) et les produits de PCR ont été digérés par l'endonucléase *EcoRV*.

4.4. Caractérisation génotypique des transformants *ole2*Δ par Southern blot

La structure des loci d'intérêt a été confirmée par Southern blot. Les ADN génomiques des deux mutants *ura3*Δ360, *ole2*Δ::*URA3* et *ura3*Δ990, *ole2*Δ::*URA3* caractérisés par PCR ainsi que celui des souches récipientes *ura3*Δ360 et *ura3*Δ990 et de la souche sauvage 6936 ont été extraits, digérés par l'enzyme de restriction *SacI*. Les produits de digestion ont ensuite été séparés par électrophorèse puis transférés sur membrane de nylon et hybridés avec les sondes *OLE2* (Figure 49.A) ou *URA3* (Figure 49.B). Le profil d'hybridation obtenu pour le mutant *ura3*Δ990, *ole2*Δ::*URA3* est identique à celui obtenu pour la souche récipiente *ura3*Δ990 que ce soit avec la sonde *OLE2* ou *URA3* (donnée non montrée). Ce mutant correspondait donc à un faux positif lors de l'analyse génotypique par PCR-RFLP et a été

éliminé pour le reste de l'étude. Pour la souche 6936 et la souche récipiente *ura3Δ360*, la sonde OLE2 révèle un fragment de 24 kpb (**Figure 49.A**). Le remplacement du gène *OLE2* par le marqueur de sélection *URA3* dans le mutant *ura3Δ360, ole2Δ::URA3* entraîne un changement du profil d'hybridation et la sonde OLE2 ne révèle qu'un fragment de 5 kpb. Le génotype du mutant *ura3Δ360, ole2Δ::URA3* a été également confirmé par hybridation avec la sonde URA3 (**Figure 49.B**). Pour la souche 6936, la sonde URA3 révèle un fragment de 1,3 kpb et un fragment de 800 pb. Pour la souche récipiente *ura3Δ360*, cette sonde révèle un fragment de 1 kpb et un fragment de 800 pb. Pour le mutant *ura3Δ360, ole2Δ::URA3*, la sonde URA3 révèle deux fragments identiques au profil de la souche récipiente *ura3Δ360*, correspondant au locus *ura3Δ360* et deux fragments de plus hauts poids moléculaires, 19 kpb et 5 kpb correspondant au locus *ole2Δ::URA3*.

Cette analyse par Southern blot confirme donc le génotype *ura3Δ360, ole2Δ::URA3* et le mutant est renommé *ole2Δ* pour la suite des travaux.

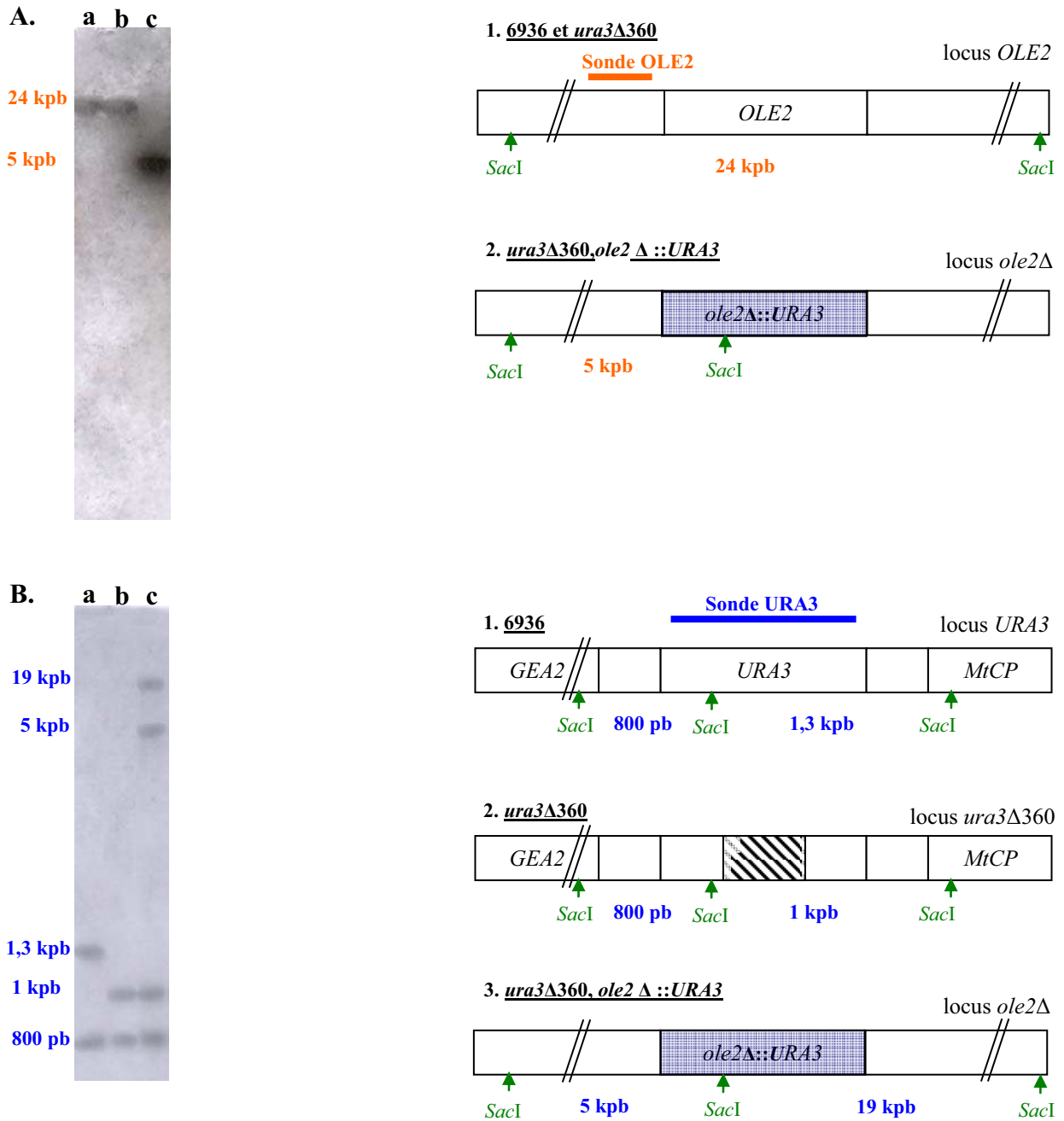


Figure 49 : Caractérisation génotypique par Southern blot des souches 6936 (a), *ura3Δ360* (b) et du mutant *ura3Δ360, ole2Δ::URA3* (*ole2Δ*)(c) à l'aide de la sonde A. OLE2 (en orange) et B. URA3 (en bleu). La taille des fragments révélés par chacune des sondes est indiquée à gauche de chaque film ainsi que sur les cartes génétiques des loci.

5. Analyse phénotypique du mutant *ole2Δ*

5.1. Courbes de croissance et étude nutritionnelle

La première analyse phénotypique a porté sur la croissance du mutant *ole2Δ* par rapport à la souche sauvage 6936. Pour cela, les courbes de croissance de ces deux souches ont été comparées à 35°C en milieu complet liquide YPD ainsi que dans les milieux RPMI et cRPMI utilisés pour l'infection des phagocytes. Quel que soit le milieu, le profil de croissance des deux souches était comparable (**Figure 50**), ce qui permettait de s'assurer que l'inactivation du gène *ole2* était sans effet sur le temps de division des cellules du mutant *ole2Δ* dans les conditions de culture testées.

Des analyses de croissance par test en goutte ont ensuite été réalisées à 35°C sur du milieu minimum solide (YNB) supplémenté en glucose, en acide oléique (C18:1), en acide stéarique (C18:0), en acide palmitique (C16:0), ou en acide myristique (C14:0) comme unique source de carbone. A 48h et 72h et quelle que soit la source de carbone, aucune différence de croissance n'a été observée entre le mutant et la souche sauvage, ce qui montre que la délétion du gène *ole2* dans le mutant *ole2Δ* n'entraîne pas d'auxotrophie pour l'acide oléique (Figure 51).

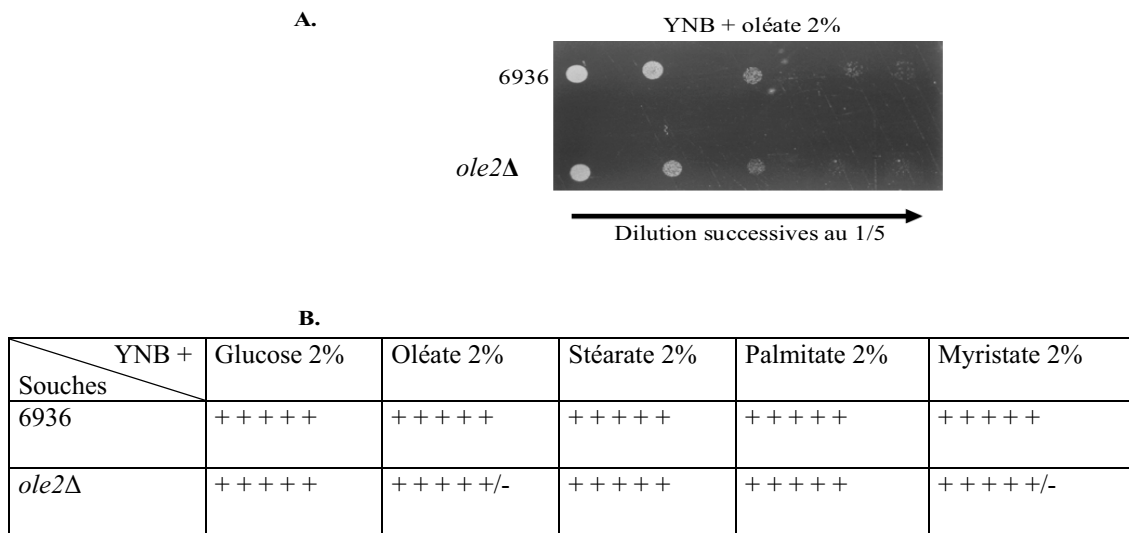


Figure 51 : Test de croissance en goutte pour le mutant *ole2Δ* et la souche sauvage 6936 sur milieu solide YNB + glucose (2%) ou YNB + acide gras (2%). A. Exemple de test en goutte sur YNB + oléate (2%), **B.** Résultats obtenus pour la croissance des deux souches sur les différentes sources de carbone.

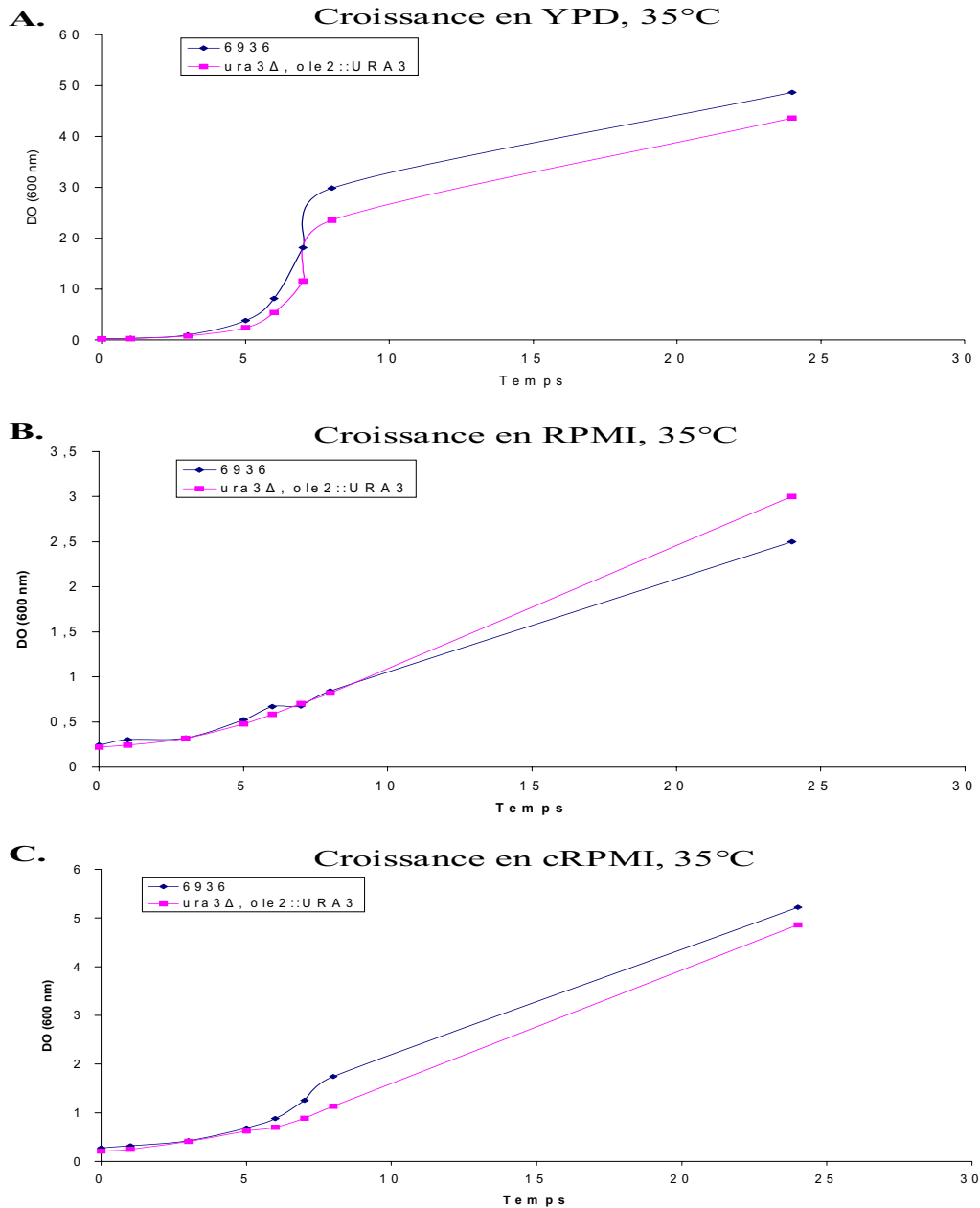


Figure 50 : Courbes de croissance obtenues par mesure de la densité optique (600 nm) en fonction du temps, pour le mutant *ole2Δ* (rose) et la souche sauvage 6936 (bleu) dans le milieu A. YPD, B. RPMI et C. cRPMI à 35°C.

5.2. Étude de la pseudofilamentation et de la reproduction sexuée

5.2.1. Test de pseudofilamentation

La capacité du mutant *ole2Δ* à former des pseudofilaments par a été comparée à celle de la souche récipiente *ura3Δ360* et de la souche sauvage 6936. Des inocula de 5μl prélevés à partir de cultures stationnaires en milieu complet YPD liquide ont été déposés sur du milieu solide YCB + Ura. Le milieu YCB induit la pseudofilamentation en raison d'une carence en source d'azote. L'uracile est ajouté au milieu afin de compléter l'auxotrophie de la souche récipiente *ura3Δ360* ainsi que de la souche *ole2Δ* dans le cas où l'expression

ectopique du gène *URA3* ne permettrait pas de rétablir une prototrophie totale et induirait un phénotype indépendant de l'inactivation du gène *ole2*.

Après incubation 24 h à 30°C, la périphérie des colonies a été observée au microscope (**Figure 52**). Pour le mutant *ole2*Δ, le contour de la colonie était lisse et les pseudofilaments étaient très rares, courts et groupés en amas. Pour la souche 6936 et la souche *ura3*Δ360 l'ensemble du contour de la colonie présentait une forte densité de pseudofilaments longs et ramifiés. Après 48 h et 7 jours, la quantité de pseudofilaments était toujours moindre pour le mutant *ole2*Δ et ils étaient toujours courts et majoritairement groupés en amas. Les pourtours des colonies de la souche 6936 et de la souche *ura3*Δ360 présentaient quant à eux un réseau dense de pseudofilaments beaucoup plus longs et individualisés. Ces observations suggèrent d'une part que l'inactivation du gène *ole2* entraîne un retard dans la formation des pseudofilaments, et d'autre part que les pseudofilaments formés par le mutant ont une morphologie différente de ceux de la souche sauvage et de la souche récipiente.

Afin de mieux caractériser les pseudofilaments formés par le mutant et les deux souches témoins, le pourtour de chaque colonie a été prélevé et observé au microscope, 7 jours après l'inoculation. Ces observations ont montré que les souches témoins produisent de nombreux pseudofilaments et que peu de formes levures sont retrouvées à la périphérie de leur colonie, tandis que pour le mutant *ole2*Δ, une majorité de formes levures ont été retrouvées en périphérie de la colonie en présence de quelques pseudofilaments (**Figure 53**). Ainsi, les amas observés sur le pourtour de la colonie du mutant *ole2*Δ seraient constitués de pseudofilaments rares associés à de nombreuses blastospores formant une gaine autour du pseudofilament.

L'inactivation du gène *ole2* chez *C. lusitaniae* entraîne donc une diminution quantitative de la pseudofilamentation et un retard dans la formation des pseudofilaments sur le milieu d'induction YCB.

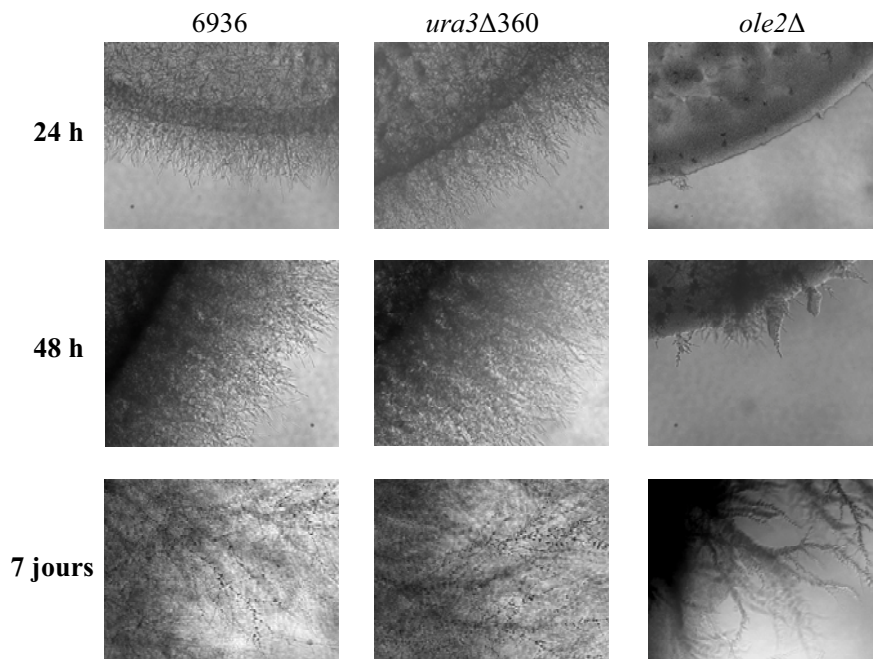


Figure 52 : Analyse au microscope (x100) de la pseudofilamentation sur le pourtour des colonies de la souche sauvage 6936, de la souche *ura3*Δ360 et de la souche *ole2*Δ en milieu solide YCB + ura et au temps 24h, 48h et 7 jours.

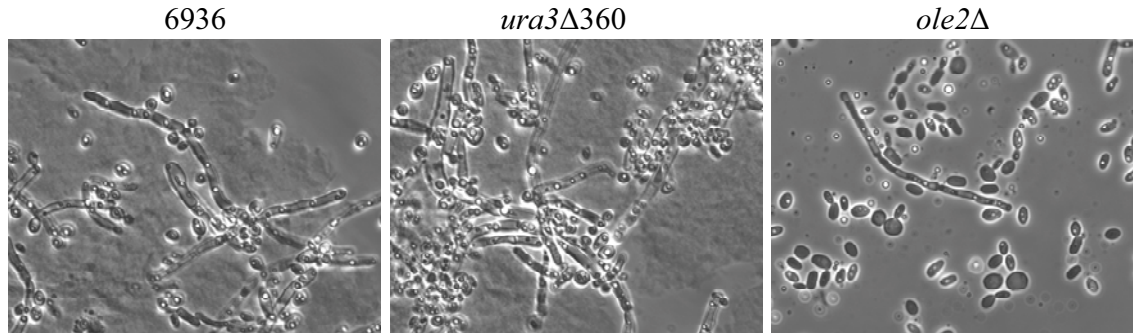


Figure 53 : Observation au microscope (x630) des cellules prélevées sur le pourtour des colonies de la souche 6936, de la souche *ura3Δ360* et de la souche *ole2Δ* en milieu YCB + *ura*.

5.2.2. Test de reproduction sexuée

Le mutant *ole2Δ* présentant un phénotype particulier de pseudofilamentation, nous avons recherché si l'inactivation du gène *OLE2* pouvait également avoir une incidence sur la reproduction sexuée. Toutes les souches étudiées au cours de ce travail dérivent de la souche de référence 6936 de type sexuel *MATa*. La souche de référence CBS 5094 de type sexuel *MATα* a été choisie comme partenaire pour l'étude de la reproduction sexuée.

La reproduction sexuée entre deux souches de types sexuels compatibles est déclenchée par une carence en ions ammonium sur un milieu solide YCB. Après mélange en suspension de deux souches sexuellement compatibles, 5 μ l de chaque suspension de cellules ont été déposés sur milieu solide YCB + Ura. La souche de référence 5094 *MATα* a été croisée indépendamment avec la souche 6936, la souche *ura3Δ360* et le mutant *ole2Δ*, toutes trois de génotype *MATa*. Des témoins négatifs ont été réalisés en croisant des souches de même type sexuel et en spotant sur YCB + Ura des cultures pures de chaque souche. Après 24 h et 48 h d'incubation à 30°C, la formation de structures typiques de la reproduction sexuée (tubes de conjugaison, asques, ascospores) a été recherchée par l'observation du mélange cellulaire au microscope (x630) entre lame et lamelle. Les croisements 5094 x 6936 et 5094 x *ura3Δ360* génèrent en 24 h de nombreuses formes conjuguées et en 48 h des asques et des ascospores. Le croisement 5094 x *ole2Δ* n'a donné que de très rares formes conjuguées à 24 h et de très rares asques et ascospores à 48 h (**Figure 54**). Les témoins négatifs n'ont donné aucune structure cellulaire typique d'une reproduction sexuée. L'inactivation du gène *OLE2* chez *C. lusitaniae* a donc une incidence quantitative sur la reproduction sexuée. Elle entraîne un retard dans la formation des tubes de conjugaison et une production d'asques moins importante.

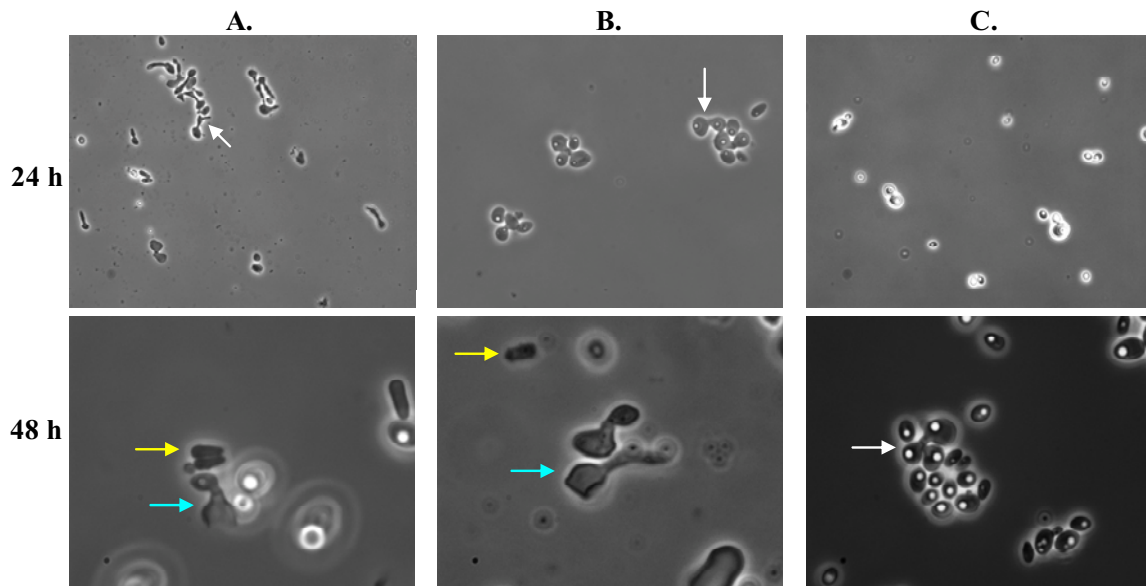


Figure 54 : Analyse par observation au microscope de la reproduction sexuée à partir d'inocula prélevés sur YCB + ura à 24h (x400) et 48h (x630). La souche de référence 5094 *MATa* a été croisée avec : **A.** la souche 6936 *MATa*, **B.** la souche *ura3Δ360*, *MATa* et **C.** la souche *ole2Δ*, *MATa*. Les tubes de conjugaison sont indiqués par une flèche blanche, les asques déliquescents par une flèche bleue et les ascospores par une flèche jaune.

5.3. Etude de la virulence *in vitro*

5.3.1. Infection de macrophages

Le phénotype d'interaction avec les macrophages du mutant *ole2Δ* a été comparé à celui de la souche sauvage 6936. Lors de la mise au point du modèle d'interaction cellulaire levures - macrophages, la population de levures a été quantifiée par fluorimétrie car les trois espèces de *Candida* présentaient de trop grandes différences d'adhérence aux plaques de culture, ce qui pouvait gêner le prélèvement de l'échantillon pour l'analyse en cytométrie de flux et donc fausser l'étude comparative. Pour la comparaison du mutant *ole2Δ* et de 6936 de *C. lusitanae*, l'analyse quantitative de la population de macrophages et le suivi quantitatif de la population de levures ont tous deux été réalisés par cytométrie en flux. En effet, cet outil est utilisable pour comparer des populations de levures au sein d'une même espèce, en particulier pour les espèces présentant une faible adhérence aux supports inertes.

Les analyses ont été réalisées sur le même volume pour l'ensemble des échantillons. Le nombre d'évènements positifs pour la fluorescence CFW aux différents temps de l'infection représente donc l'évolution de la population de levures. La multiplication de la population totale de chaque souche a donc été obtenue en multipliant le nombre d'évènements positifs pour le CFW par la fluorescence moyenne de la population (mean). De plus, en exprimant la fluorescence CFW en fonction de la fluorescence calcéine pour la population marquée par le CFW, il est possible de distinguer deux sous-populations, une population marquée uniquement pour le CFW, correspondant aux levures libres, et une seconde population positive pour le CFW et pour la calcéine, correspondant à des levures intramacrophagiques. Les deux sous-populations de levures sont quantifiées par la fluorescence totale en CFW obtenue en multipliant le nombre d'évènements de chaque sous-population par sa fluorescence moyenne (**Figure 55**).

Les infections de macrophages J774 ont été réalisées en parallèle avec le mutant *ole2Δ* et la souche sauvage 6936, dans le milieu cRPMI (supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal)

ou RPMI (sans sérum) contenant 20 µg/ml d'uracile et aux MOI de 1M :1L, 5M : 1L et 1M : 5L. Les analyses ont été réalisées aux temps 30 min, 5 h et 24 h après le début de l'infection. Les différences les plus importantes ayant été obtenues en milieu RPMI, seules ces données seront présentées.

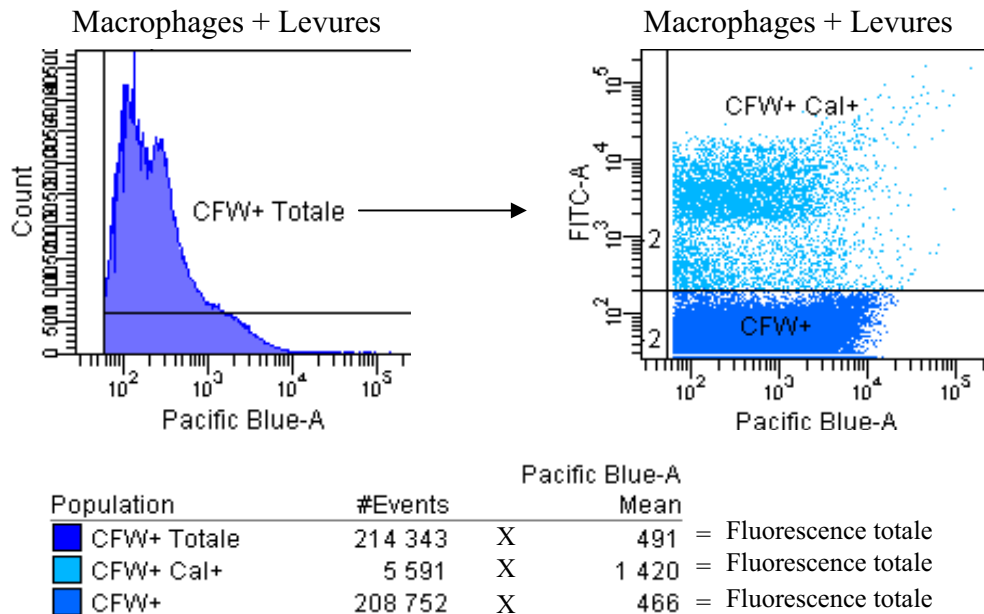


Figure 55 : Analyse quantitative de la population de levures par cytométrie en flux.

Au MOI 1M :1L, environ 1/3 de la population de macrophages a été détruite en 24 h par les levures de la souche sauvage 6936, alors que leur survie est totale en présence du mutant *ole2Δ*. Aux temps 30 min et 6 h, le pourcentage de levures internalisées est équivalent entre les deux souches et à 24 h le pourcentage de levures intramacrophagiques est légèrement supérieur pour le mutant *ole2Δ*. En ce qui concerne le pourcentage de macrophages impliqués dans la phagocytose des levures, le mutant *ole2Δ* mobilise moins de macrophages, quel que soit le temps d'infection (**Figure 56.A**).

Au MOI 1M : 5L, les pourcentages de survie des macrophages sont équivalents à ceux observés au MOI 1M :1L, au T = 24h. Les pourcentages de levures internalisées sont différents dès le début de l'infection et le mutant *ole2Δ* est 1,5 à 3 fois plus phagocyté que la souche sauvage 6936, alors que les pourcentages de macrophages engagés dans la phagocytose sont équivalents entre les deux souches. L'analyse qualitative par microscopie à 24 h d'infection révèle des macrophages contenant de nombreuses levures avec le mutant *ole2Δ* alors qu'en présence de la souche sauvage, la membrane plasmique des phagocytes est rompue et les levures sont libres (**Figure 56.B**).

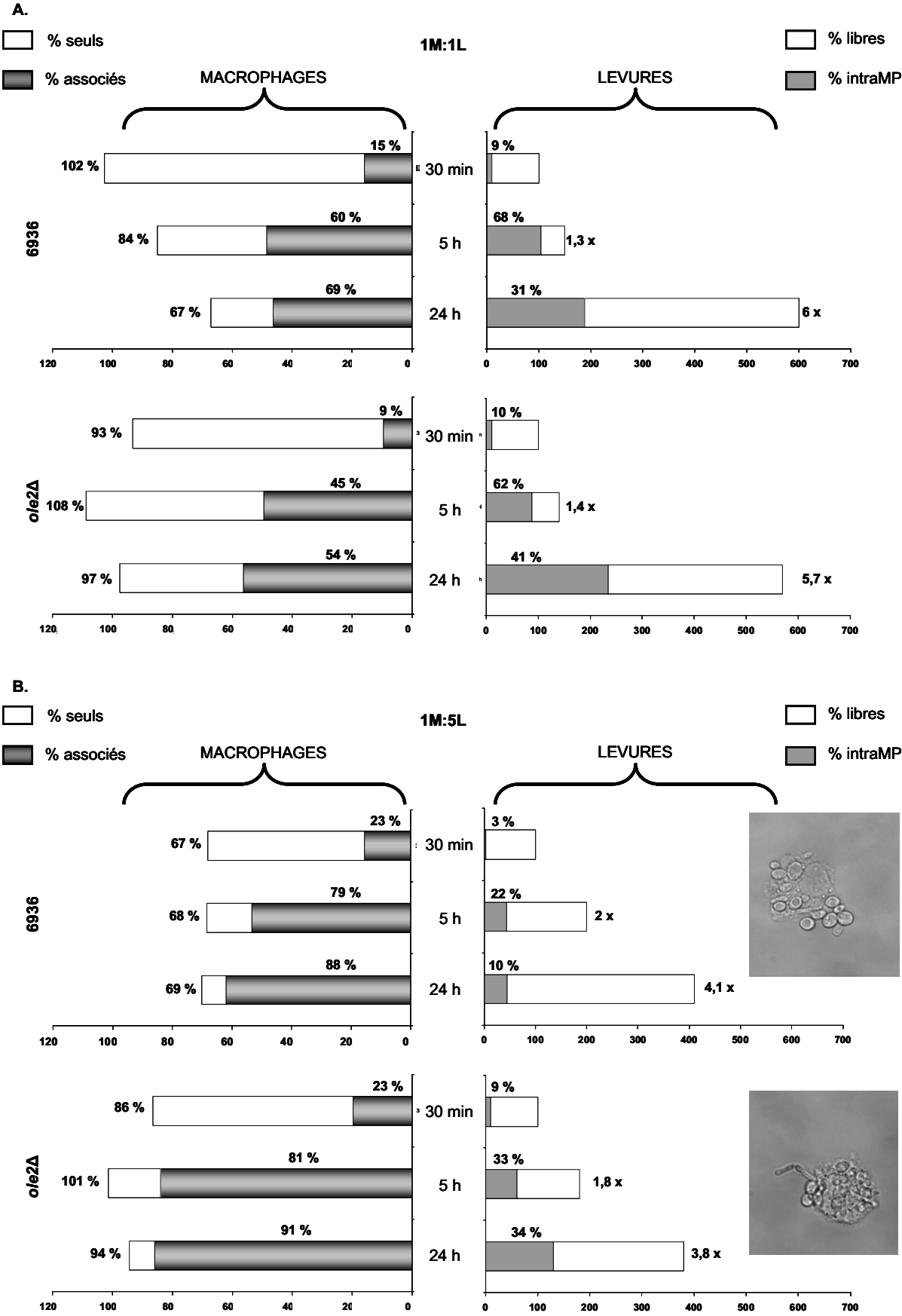


Figure 56 : Comparaison de l'infection de macrophages J774 en milieu RPMI par la souche sauvage 6936 et le mutant *ole2Δ* A. MOI 1M : 1L, B. MOI 1M : 5L.

Au MOI 5M : 1L, comme pour les deux MOI précédents, la survie des macrophages en présence de 6936 est plus faible qu'en présence du mutant *ole2Δ*. La proportion de levures internalisées est équivalente entre les deux souches tout au long de l'infection mais le pourcentage de macrophages mobilisés pour la phagocytose de 6936 est 2 à 4 fois supérieur à celui observé pour le mutant *ole2Δ* (Figure 57).

Ces expériences d'infections mettent en évidence une différence d'interaction du mutant *ole2Δ* par rapport à la souche sauvage 6936 vis-à-vis des macrophages :

- 1) la proportion de phagocytes mobilisés pour phagocyter un même nombre de levures est moindre pour le mutant,
- 2) les macrophages sont capables de phagocyter plus de levures du mutant au MOI 5L : 1M,
- 3) la survie des macrophages est toujours supérieure en présence du mutant que de la souche sauvage 6936.

L'inactivation du gène *OLE2* semble entraîner une meilleure reconnaissance de la levure par les macrophages qui résistent beaucoup mieux en terme de survie, aux levures du mutant *ole2Δ* qu'aux levures de la souche sauvage.

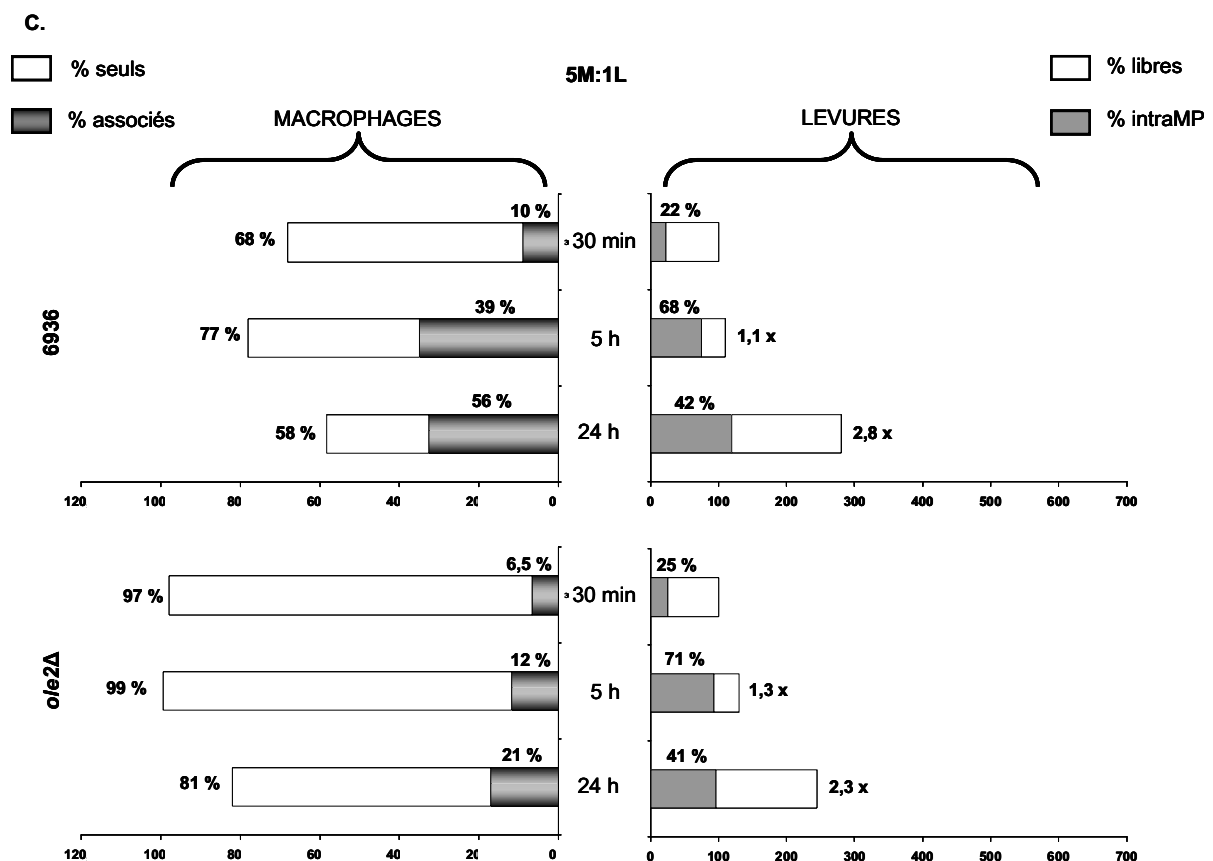


Figure 57 : Comparaison de l'infection de macrophages J774 en milieu RPMI par la souche sauvage 6936 et le mutant *ole2Δ* au MOI 5M : 1L.

6. Mutagenèse aléatoire et construction d'une banque de mutants chez *C. lusitaniae*

La vitesse d'analyse des interactions *Candida* – phagocytes par cytométrie en flux nous permet d'envisager le criblage de banques de mutants. Une dernière partie de notre travail a donc consisté à construire une banque de mutants chez notre modèle biologique *C. lusitaniae*.

Pour cela, nous avons utilisé une stratégie de mutagenèse insertionnelle aléatoire reposant sur l'utilisation du marqueur *URA3* pour la transformation d'une souche *ura3Δ*. La souche *ura3Δ990* qui porte la plus large délétion dans le locus *URA3*, recouvrant l'ensemble de l'ORF, a été utilisée comme souche récipiente afin de réduire la taille des régions d'homologie entre le locus génomique délété et le marqueur de sélection porté par le vecteur de transformation pGUNv2 (**Figure 58**).

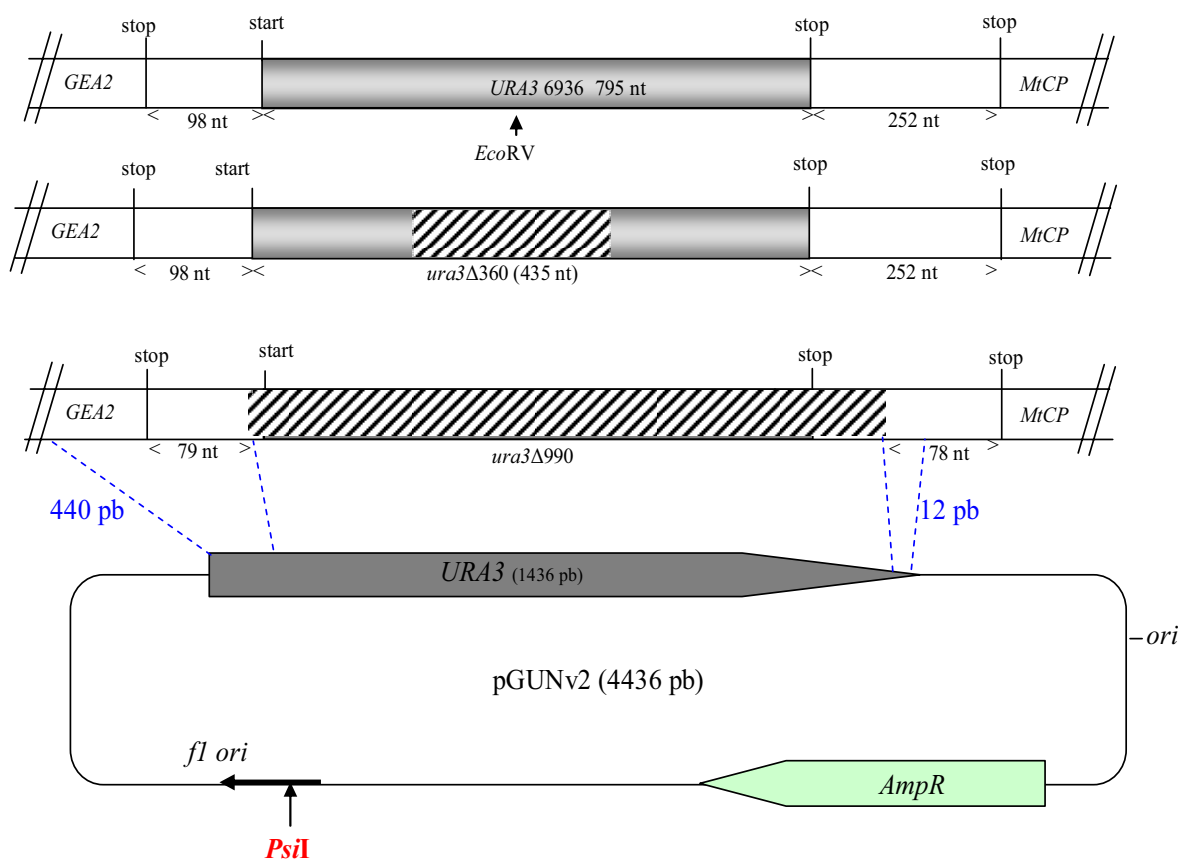


Figure 58 : Représentation du locus *URA3* de la souche 6936, des loci *ura3* des souches *ura3Δ360* et *ura3Δ990* et du vecteur pGUNv2 utilisé pour la mutagenèse aléatoire du génome de *C. lusitaniae* dans la souche *ura3Δ990*. Le site de restriction *PsiI* utilisé pour l'insertion du vecteur par recombinaison aléatoire est représenté sur le vecteur et les régions d'homologies entre le marqueur *URA3* du vecteur et le locus *ura3Δ990* sont représentées en bleu.

La stratégie utilisée pour l'insertion aléatoire dans le génome de *C. lusitaniae* du vecteur pGUNv2 a reposé sur sa linéarisation dans une région qui ne présentait aucune homologie avec le génome de la levure. La linéarisation et la faible probabilité pour le marqueur *URA3* de réintégrer son propre locus force l'intégration ectopique du vecteur pGUNv2.

L'enzyme de restriction *PsiI* a été utilisée pour linéariser le vecteur pGUNv2. Le site de coupure unique est localisé dans l'origine de réplication du phage f1 du vecteur pGEM-T utilisé pour la construction de pGUNv2, et les 1000 pb qui encadrent ce site de restriction ne présentent aucune homologie avec le génome de *C. lusitaniae*. Une dizaine de transformation de la souche récipiente *ura3Δ990* par le vecteur pGUNv2 linéarisé par *PsiI* ont permis d'obtenir 10 000 transformants prototrophes après sélection des transformants sur milieu minimum YNB supplémenté par 1M Sorbitol.

Dans le but de vérifier l'intégration aléatoire du vecteur de mutagenèse pGUNv2 dans le génome de *C. lusitaniae*, quatorze transformants de la banque ont été analysés par Southern blot et comparés aux profils obtenus pour la souche 6936 et la souche récipiente *ura3Δ990*. Les ADN génomiques des différents clones ont été digérés par l'enzyme de restriction *EcoRV*, séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane de nylon. Les fragments de restriction ont été hybridés à l'aide de la sonde *URA3*, spécifique du marqueur de sélection *URA3* porté par le vecteur (**Figure 59.A**). Pour la souche sauvage 6936, la séquence reconnue par la sonde porte un site de restriction pour l'enzyme *EcoRV*. La sonde révèle donc deux fragments, l'un à 4 kpb et l'autre à 1,2 kbp. Pour la souche *ura3Δ990*, la sonde *URA3* n'hybride aucun fragment car la délétion du gène *URA3* recouvre la totalité de l'ORF. Pour les transformants analysés, l'hybridation par la sonde *URA3* révèle un profil spécifique pour chaque transformant et différent des profils obtenus pour les souches témoins. Afin de vérifier que le profil d'hybridation de chaque transformant ne résultait pas d'une variation des zones de recombinaison du vecteur pGUNv2 avec le locus *ura3Δ990*, les fragments de restriction ont été hybridés à l'aide de la sonde MtCP, spécifique de la séquence du gène *MtCP* localisé en aval du locus *ura3Δ990* (**Figure 59.B**). Pour les souches 6936 et *ura3Δ990*, la sonde MtCP a révélé respectivement des fragments de 1,2 kpb et de 4,2 kpb. Pour les quatorze transformants analysés, l'hybridation avec la sonde MtCP a révélé un fragment à 4,2 kbp ce qui correspond au profil obtenu pour la souche récipiente *ura3Δ990*. Ce résultat démontre que le locus délété *ura3Δ990* n'a subi aucun évènement de recombinaison avec le vecteur pGUNv2, et que les profils d'hybridation spécifiques de chaque transformant obtenus avec la sonde *URA3* sont donc la conséquence d'une intégration aléatoire du vecteur dans le génome de *C. lusitaniae*.

Ainsi, les transformants prototrophes pour l'uracile dérivent de l'intégration aléatoire du vecteur pGUNv2 dans leur génome. En considérant que les insertions du vecteur sont indépendantes les unes des autres, la probabilité d'isoler un mutant de chaque gène à partir de cette banque de 10 000 transformants peut être estimée de la manière suivante :

$pN = 1 - ((N - 1) / N)^n$, dans laquelle N représente le nombre de gènes présents dans le génome, n le nombre de transformants et pN la probabilité recherchée.

Sachant que le génome de *C. lusitaniae* contient environ 5900 gènes, la probabilité d'isoler un mutant de chaque gène avec 10 000 transformants est de 81,5 %. Dans ce calcul, chaque gène est considéré comme une unité dans laquelle une insertion du vecteur conduit à l'invalidation et cette formule tient compte uniquement du nombre de gènes et pas de la taille du génome. Cependant, le nombre d'introns est très faible dans le génome de *C. lusitaniae*. Par ailleurs, le génome de *C. lusitaniae* est assez compact, 65% du génome est codant et la taille moyenne des régions intergéniques est de 800 pb (données informatiques du MIT). De plus, le calcul de la probabilité d'isoler un mutant a été fait sur l'ensemble des 5900 gènes du génome. Or, la méthode de mutagenèse et le milieu de sélection des mutants utilisés rendent impossible l'obtention de mutants de gènes essentiels et d'auxotrophes.

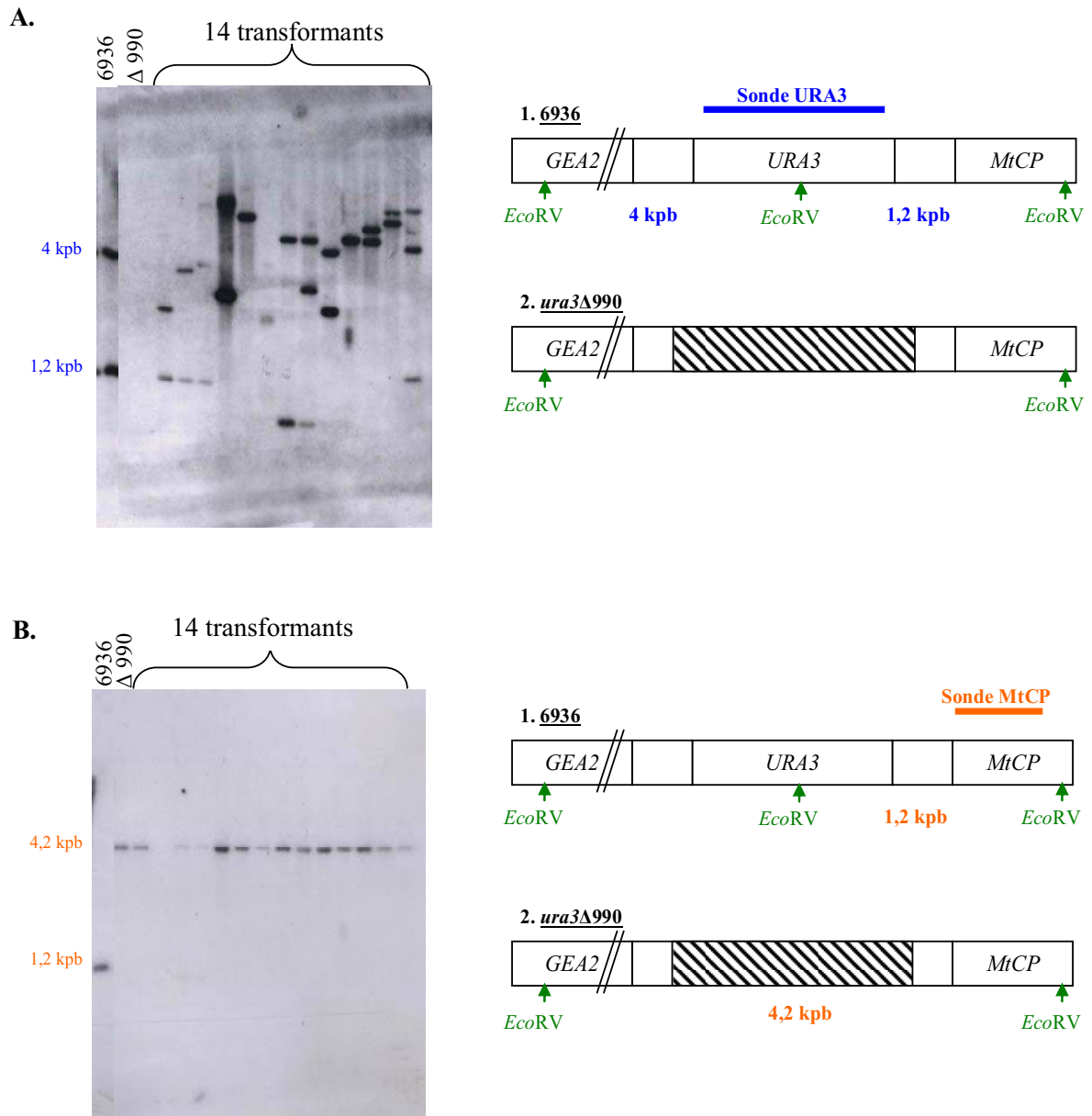


Figure 59 : Caractérisation génotypique par Southern blot des souches 6936, *ura3Δ990* et de quatorze transformants aléatoires à l'aide de la sonde A. URA3 (en bleu) et B. MtCP (en orange). La taille des fragments révélés par chacune des sondes pour les souches 6936 et *ura3Δ990* est indiquée à gauche de chaque film ainsi que sur les cartes génétiques des loci.

Dans le cas de notre étude, la banque de mutants sera criblée en utilisant le modèle d'infection *in vitro* précédemment décrit, qui permet de mesurer plusieurs paramètres de l'interaction entre les phagocytes et les levures. Lorsqu'un mutant sera sélectionné, la méthode de mutagenèse utilisée ici permettra d'identifier le gène inactivé. En effet, la région du génome dans laquelle s'est intégré le plasmide peut être identifiée par PCR inverse à partir d'amorces complémentaires du vecteur. Pour cela, l'ADN génomique des mutants d'intérêt sera digéré par l'enzyme de restriction *EcoRV*. Les fragments de restriction seront circularisés par ligation et les molécules d'ADN circulaires obtenues serviront de matrice à la PCR réalisée avec des amorces divergentes complémentaires de la séquence du vecteur. Ainsi, la région bordant le site d'intégration du vecteur et correspondant au gène inactivé sera amplifiée et pourra être séquencée afin d'identifier le gène associé au phénotype.

Conclusion et discussion

De nouveaux outils moléculaires ont été mis au point au cours de ce travail pour l'étude fonctionnelle de gènes chez *C. lusitaniae*. Nous avons en particulier développé une stratégie pour la délétion de gènes qui repose sur deux étapes de transformation successives réalisées avec des cassettes d'ADN obtenues par PCR chevauchantes, sans étape de clonage intermédiaire. La discussion de ces résultats est contenue dans le manuscrit de l'article n°2, et ne sera pas reprise ici.

Cette méthode a ensuite été utilisée pour l'inactivation d'un gène codant une $\Delta 9$ désaturase chez *C. lusitaniae*. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse des acides gras insaturés, qui eux mêmes sont des précurseurs d'oxylipides. Ces dernières années, plusieurs travaux ont suggéré que les oxylipides pouvaient jouer un rôle dans la signalisation cellulaire des champignons, non seulement entre cellules fongiques, mais aussi avec les cellules de l'hôte, notamment celles de l'immunité (Demeure *et al.*, 1997 ; Noverr *et al.*, 2001 ; Ells *et al.*, 2010).

Nous avons procédé à une analyse du génome de *C. lusitaniae* pour mettre en évidence deux gènes paralogues codant une activité $\Delta 9$ désaturase, que nous avons appelé *OLE1* et *OLE2* par analogie avec la nomenclature de *C. albicans*. L'inactivation du gène *OLE2* a été réalisée sans difficulté par la méthode des PCR chevauchantes. En revanche, l'inactivation du gène paralogue *OLE1* n'a pas pu être obtenue, probablement à cause du caractère essentiel de ce gène, comme cela a déjà été décrit pour *C. albicans* (Krishnamurthy *et al.*, 2004).

Après obtention et vérification de l'organisation moléculaire du mutant *ole2* Δ , l'effet de cette mutation a été analysé au cours de différents tests phénotypiques. Le mutant *ole2* Δ ne présentait aucun défaut de multiplication dans le milieu complet YPD ni dans les milieux RPMI et cRPMI, milieux utilisés pour étudier l'interaction levures - phagocytes. De la même manière, le mutant ne présentait pas de défaut de croissance sur des milieux contenant uniquement de l'acide oléique (C18:1), de l'acide stéarique (C18:0), de l'acide palmitique (C16:0), ou de l'acide myristique (C14:0) comme unique source de carbone. En revanche, l'inactivation du gène *OLE2* entraînait un retard dans la formation de pseudofilaments sur milieu YCB, et les pseudofilaments formés par le mutant *ole2* Δ étaient plus rares et gainés sur toute leur longueur par de nombreuses blastospores. La capacité de reproduction sexuée était également quantitativement affectée chez le mutant *ole2* Δ . La formation d'asques était retardée et leur nombre était beaucoup plus faible dans les croisements réalisés avec le mutant par rapport à ceux réalisés avec la souche sauvage.

L'effet de l'inactivation du gène *OLE2* a également été analysé au cours de l'interaction avec des macrophages. Le modèle d'interaction *Candida* – phagocytes mis au point au cours de ce travail et validé lors de la comparaison de *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. lusitaniae*, a été utilisé pour comparer la souche sauvage 6936 et le mutant *ole2* Δ en interaction avec des macrophages. Les levures portant une mutation *ole2* étaient environ deux fois plus phagocytées par les macrophages mais mobilisaient moins de phagocytes. De plus, la survie des macrophages était supérieure de 30% en présence du mutant *ole2* Δ par rapport aux infections réalisées avec la souche sauvage 6936. Le mutant *ole2* Δ semblait donc moins virulent que la souche sauvage 6936 et les macrophages étaient plus efficaces pour contrôler l'infection par ce mutant. La mise en évidence de ces différences d'interaction entre le mutant et la souche sauvage et les macrophages montre que le modèle d'interaction mis au point au cours de ces travaux est suffisamment sensible pour procéder à des comparaisons de souches au niveau intraspécifique, et qu'il sera donc utilisable dans le cadre du criblage de la banque de mutants de *C. lusitaniae*.

Le mutant *ole2* Δ n'est pas affecté pour l'assimilation des acides gras à longues chaînes carbonées (\geq C16) alors que la fonction décrite pour la protéine codée par le gène *OLE2* est la

désaturation de l'acide stéarique (C18:0) en acide oléique (C18:1). Il est possible que la protéine Ole1 soit redondante d'un point de vue fonctionnel et que le gène *OLE1*, paralogue du gène *OLE2*, complémente la mutation *ole2*. En revanche, le caractère essentiel de *OLE1* démontre que le gène *OLE2* n'est pas capable de complémente une mutation *ole1*. Si ces deux enzymes ont strictement la même fonction de désaturation en C9, nos résultats suggèrent qu'elles pourraient avoir des fonctions supplémentaires spécifiques. En effet, chez *C. albicans*, il a été décrit que l'inactivation du gène *OLE2* entraînait une baisse dans la biosynthèse de prostaglandine E2 (PGE2), mise en évidence par LC-MS/MS et par dosage ELISA, alors que le mutant conditionnel *ole1* n'était pas affecté pour la production de PGE2 et qu'il présentait un défaut de filamentation (Erb-Downward *et al.*, 2007). La PGE2 synthétisée par *C. albicans* est identique à celle produite par les cellules de mammifères (Noverr *et al.*, 2001 ; Erb-Downward *et al.*, 2007). Cette synthèse de PGE2 par les levures est partiellement inhibée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens, tels que l'aspirine, ce qui suggère l'implication d'enzymes proches des cyclooxygénases mammifères pour la biosynthèse des prostaglandines chez les levures (Deva *et al.*, 2001 ; Ells *et al.*, 2010). Chez *C. albicans* et *C. dubliniensis*, la synthèse de PGE2 peut se faire *de novo* mais aussi à partir d'acide arachidonique exogène, principal précurseur de la synthèse d'oxylipides (Brash, 2001 ; Noverr *et al.*, 2001). Au cours d'une infection fongique, la PGE2 peut être synthétisée à partir de l'acide arachidonique relargué par les membranes plasmiques de l'hôte (Brash, 2001 ; Deva *et al.*, 2001 ; Ells *et al.*, 2010). Sur les cellules fongiques, l'effet de la PGE2 serait d'induire la transition morphogénétique. En effet, la présence d'antiprostaglandine ou d'inhibiteur de cyclooxygénases empêche la formation de filaments (Deva *et al.*, 2001 ; Noverr *et al.*, 2001 ; Noverr *et al.*, 2004). Le retard dans la pseudofilamentation et la diminution quantitative de pseudofilaments chez le mutant *ole2Δ* pourrait donc être expliqués par une baisse de biosynthèse de PGE2. La PGE2 aurait donc, comme d'autres oxylipides fongiques tels que le farnésol (Shea *et al.*, 2006), un rôle de molécule signal entre les cellules fongiques, et régulerait chez *C. lusitaniae*, la transition morphogénétique et la reproduction sexuée.

Chez les mammifères, les oxylipides régulent les fonctions du système immunitaire (Funk, 2001). La PGE2 inhibe la réponse pro-inflammatoire Th1 et induit plutôt une réponse anti-inflammatoire Th2. Ainsi, la production de PGE2 par les levures pourrait faciliter leur dissémination au cours de l'infection en augmentant la perméabilité vasculaire et en régulant les fonctions immunes de l'hôte afin de permettre à la levure d'échapper au système immunitaire (Betz *et al.*, 1991 ; Snijdwint *et al.*, 1993 ; Strassmann *et al.*, 1994 ; Demeure *et al.*, 1997 ; Murphy *et al.*, 1997 ; Sergeeva *et al.*, 1997). Ce rôle de la PGE2 dans la virulence fongique a également été suggéré par la diminution de la virulence des levures traitées avec de l'aspirine (Deva *et al.*, 2001). De la même manière, la meilleure efficacité des macrophages face au mutant *ole2Δ* pourrait être expliquée par une baisse de production de PGE2 fongique, ce qui diminuerait l'inhibition des phagocytes par les levures. La PGE2 pourrait donc intervenir en tant que molécule signal entre les cellules fongiques et les cellules de l'hôte au cours de l'infection.

Au cours de nos expériences, nous avons pu constater que les différences phénotypiques entre le mutant *ole2* et la souche sauvage étaient plus importantes en milieu RPMI sans sérum, et qu'elles étaient nivelées dans du milieu RPMI supplémenté en sérum. Or le sérum est riche en albumine et il a été montré que l'albumine était capable de piéger les acides gras et les oxylipides du milieu (Brash, 2001 ; Erb-Downward *et al.*, 2007). Indirectement, les résultats que nous avons obtenus renforcent l'hypothèse que le mutant *ole2* serait affecté dans son système de signalisation extracellulaire lipidique.

L'effet de la mutation *ole2Δ* sur la communication des cellules fongiques à la fois entre elles et avec les cellules de l'hôte pourrait donc s'expliquer par une baisse de production de PGE2, sans que l'on puisse pour autant écarter l'hypothèse que d'autres lipides insaturés puissent jouer un rôle. Par exemple, chez *A. fumigatus* l'inactivation de la dioxygénase PpoC,

qui intervient dans la synthèse de l'oxylipide 10*R*-hydroxy-8*E*,12*Z*-hydroperoxyoctadecadiénoic acide, un dérivé de l'acide linoléique, entraîne un défaut de germination des conidies ainsi qu'une phagocytose plus importante des conidies avec une augmentation de la sensibilité au stress oxydatif (Dagenais *et al.*, 2008).

Afin de confirmer ces hypothèses, il sera nécessaire de doser par LC-MS/MS et à l'aide de test ELISA la production de PGE2 chez la souche sauvage et le mutant *ole2Δ* de *C. lusitaniae*. Si un défaut de production de PGE2 était confirmé, son implication dans les phénotypes observés pourra être vérifiée en complétant les différents milieux utilisés avec de la PGE2 exogène, ce qui devrait permettre de rétablir un phénotype proche de la souche sauvage 6936. De la même manière, la réintroduction d'un allèle *OLE2* sauvage chez le mutant *ole2Δ* doit être réalisée afin de démontrer que tous les phénotypes observés chez *ole2Δ* sont liés à la seule invalidation de *OLE2*. Enfin, l'effet d'anti-inflammatoires non stéroïdiens sur l'infection de macrophages par la souche sauvage 6936 pourra être analysé afin de confirmer l'implication d'eicosanoïdes dans la virulence de *C. lusitaniae*.

Les perspectives de ce travail ne se limitent pas à l'étude du rôle des oxylipides au cours de l'interaction. En effet, la sensibilité de notre outil de mesure des interactions cellulaires entre les levures *Candida* et les phagocytes, et le fait qu'il repose sur des outils comme la fluorimétrie et la cytométrie en flux qui sont compatibles avec le criblage à haut débit de plusieurs centaines de souches, nous a amené à envisager la construction d'une banque de mutants étiquetés chez *C. lusitaniae* pour le criblage de gènes impliqués dans l'interaction avec les phagocytes.

La dernière partie de notre travail a donc consisté à mettre au point une méthode de mutagenèse aléatoire étiquetée chez *C. lusitaniae*. Nous avons ainsi construit une banque de 10 000 « intégrants » obtenus par l'insertion aléatoire du vecteur de transformation pGUNv2 dans le génome de *C. lusitaniae*. L'insertion aléatoire a été démontrée pour un échantillon de transformants par des hybridations en Southern Blot. La méthode d'étiquetage que nous utilisons est indirecte car elle nécessite des manipulations ultérieures pour identifier le site d'intégration du vecteur dans le génome chez un mutant d'intérêt. L'identification du site d'insertion du vecteur de transformation nécessite la digestion enzymatique de l'ADN du mutant, la recircularisation des fragments de restriction, l'amplification des séquences adjacentes au site d'intégration par PCR grâce à des amorces divergentes spécifiques du vecteur, et le séquençage nucléotidique des amplifiats obtenus.

Tous les outils sont prêts pour le criblage de cette banque de mutants dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'interaction *Candida* - phagocytes.

Résumé des Travaux

Conclusion Générale

Les levures du genre *Candida* sont des pathogènes opportunistes responsables d'infections graves chez les patients immunodéprimés. L'installation d'une infection par les levures dépend d'une balance entre les défenses du système immunitaire de l'hôte et l'expression de facteurs de virulence de la levure. En effet, le passage de l'état saprophyte à l'état infectieux est principalement fonction du résultat de l'interaction avec les phagocytes de l'immunité innée. L'équipe « *Candida* et Pathogénicité » a initié depuis quelques années des travaux de recherche sur les interactions entre les levures *Candida* et les phagocytes. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé un modèle d'interaction *in vitro* entre les levures et les phagocytes afin de mieux comprendre les mécanismes fongiques impliqués dans les premières étapes de l'infection. De plus, des outils de biologie moléculaire ont été mis au point pour la mutagenèse de gènes chez *C. lusitaniae*, modèle biologique principal de notre équipe. Les outils cellulaires et moléculaires ont ensuite été utilisés pour réaliser l'étude fonctionnelle du gène *OLE2* codant une enzyme impliquée dans la désaturation d'acides gras précurseurs de lipides oxygénés - notamment de la prostaglandine PGE2 - qui pourraient intervenir dans la signalisation au cours de l'interaction levures-phagocytes.

Les outils cellulaires

Le modèle d'interaction *Candida* – phagocytes que nous avons développé au cours de notre travail permet d'analyser d'un point de vue qualitatif et quantitatif le déroulement d'une infection de phagocytes par des levures en suivant l'évolution des deux populations au cours du temps. Grâce au marquage fluorescent spécifique de chaque partenaire de l'interaction, ce modèle donne accès à une analyse multiparamétrique des infections *in vitro*. Les phagocytes, macrophages et neutrophiles, ont été marqués spécifiquement par la calcéine-AM et par des anticorps anti-CD16 couplés à l'allophycocyanine (APC). La calcéine marque les phagocytes métaboliquement actifs en vert et les anticorps anti-CD16-APC marquent les membranes plasmiques des phagocytes intègres en rouge. La population de levure est marquée par le CalcoFluor White (CFW) qui lie spécifiquement les glucanes et la chitine de la paroi fongique et émet une fluorescence en bleu. Dans le but de pouvoir distinguer les levures libres des levures phagocytées, nous avons mis au point une méthode d'extinction de fluorescence (quenching) par le colorant vital bleu trypan qui a la particularité d'éteindre la fluorescence des levures libres, tandis que la fluorescence des levures intra-phagocytes n'est pas affectée.

Plusieurs outils ont été utilisés pour l'analyse quantitative des différents paramètres. La cytométrie en flux a été utilisée pour le suivi de la population de phagocytes. L'analyse des échantillons à volume constant a permis d'estimer la survie des phagocytes en comparant le nombre de cellules viables doublement marquées par la calcéine et l'anticorps anti-CD16 dans un puits d'infection par rapport à un puits témoin contenant des phagocytes seuls. De plus, en analysant la fluorescence CFW de l'ensemble de la population de phagocytes sélectionnée, nous avons pu distinguer deux populations au sein des phagocytes : une population positive uniquement pour la fluorescence calcéine et anticorps anti-CD16, et une population positive également pour la fluorescence CFW correspondant à des phagocytes associés à des levures. La quantification de la population de levures a été réalisée par fluorimétrie classique. La multiplication des levures a été estimée par mesure de la fluorescence totale CFW car nous avons démontré que cette dernière était directement proportionnelle à la biomasse fongique dans nos conditions expérimentales. La proportion de levures phagocytées a été déterminée par la mesure de la fluorescence CFW après extinction au bleu trypan. Enfin, la survie des levures a été estimée par le dénombrement de CFU après lyse des phagocytes et étalement des levures phagocytées et/ou associées sur du milieu complet YPD.

La mise au point de ces outils nous a donc permis d'analyser d'une part la survie des phagocytes et le pourcentage de phagocytes associés aux levures, et d'autre part la multiplication des levures, la proportion de levures phagocytées et la survie des levures au cours des interactions *Candida* - phagocytes. Dans un premier temps, ce modèle a été validé par la comparaison de l'interaction entre des phagocytes et trois espèces de *Candida* ayant des

niches écologiques et des caractéristiques morphogénétiques différentes. *C. albicans*, levure commensale du tractus digestif de l'homme et de certaines espèces animales, est le premier agent responsable de candidoses disséminées et profondes chez les patients immunodéprimés. Il est capable de se développer sous trois formes d'appareil végétatif : levure, pseudofilament et hyphes septées. Nous avons également sélectionné deux autres espèces pathogènes opportunistes pour cette étude : *C. glabrata*, levure commensale du tube digestif et de l'appareil uro-génital chez l'homme, qui ne se multiplie que sous la forme levure, et *C. lusitaniae*, levure environnementale, qui peut se multiplier sous la forme levure et pseudofilament. La comparaison de ces trois espèces a été réalisée à travers des infections de macrophages (macrophages de la lignée murine J774) ou de neutrophiles purifiés à partir de sang humain. Les infections de phagocytes (P) par les levures (L) ont été réalisées en triplicats et au MOI (Multiplicity of infection) de 1P:1L ou en présence d'un excès de levures (MOI 1P:5L) ou d'un excès de phagocytes (MOI 5P:1L). Les infections de macrophages ont été analysées aux temps 30 min, 6 h et 24 h et les infections de neutrophiles aux temps 30 min et 6 h. Des différences d'interaction interspécifiques ont ainsi pu être mises en évidence.

Nos résultats ont démontré que *C. albicans* était peu phagocytée par les macrophages, qu'elle résistait et échappait à la phagolyse en formant des hyphes et en détruisant au moins 90% des macrophages selon les MOI dès 6h d'infection. *C. lusitaniae* était phagocytée par les macrophages dans les périodes précoces de l'interaction, mais les nombreuses levures non phagocytées se multipliaient rapidement dans le milieu extérieur et formaient rapidement des chaînettes de cellules qui n'étaient plus reconnues par les macrophages. *C. glabrata* était totalement phagocytée par les macrophages, résistait à la phagolyse et se multipliait par bourgeonnement dans les phagocytes, jusqu'à leur lyse mécanique, observable au terme de 24 h d'incubation pour les MOI favorables aux levures.

En présence de neutrophiles, *C. albicans* était la seule espèce de notre étude capable d'entraîner la mort des phagocytes quel que soit le MOI. En présence de *C. lusitaniae* et de *C. glabrata*, la survie des neutrophiles était au moins de 70%. L'association des neutrophiles aux levures était comparable pour *C. albicans* et *C. glabrata* tandis que l'espèce *C. lusitaniae* mobilisait jusqu'à deux fois moins de phagocytes.

Parmi les espèces de cette analyse *in vitro*, *C. albicans* était donc la plus virulente, et ni les macrophages ni les neutrophiles, lorsqu'ils sont confrontés isolément aux levures de cette espèce dans des expériences *in vitro*, ne semblent efficaces pour contenir l'infection. *C. lusitaniae* pourrait occuper la seconde place en terme de virulence, car elle n'est jamais totalement phagocytée par les phagocytes. Elle peut donc se multiplier abondamment dans le milieu extérieur et finit par devenir numériquement très supérieure aux phagocytes. Enfin, *C. glabrata* pourrait sembler l'espèce la moins virulente car elle se laisse phagocyter en totalité très rapidement. Néanmoins les levures intramacrophagiques survivent à la phagolyse, et continuent de se multiplier à l'intérieur des phagocytes. Il est important de noter que, quelle que soit l'espèce considérée dans nos conditions expérimentales, la majorité des levures internalisées par les macrophages survivent à la phagolyse macrophagique, avec toutefois des proportions différentes, *C. lusitaniae* étant la moins résistante des trois espèces. Ces conclusions obtenues à partir des analyses quantitatives ont été confirmées par les observations qualitatives en microscopie à fluorescence et en vidéomicroscopie. Notre modèle d'interaction cellulaire a permis de montrer que ces trois espèces de *Candida* développaient deux stratégies principales pour échapper aux défenses de l'immunité innée (manuscrit de l'article n°1) :

- en résistant à la phagolyse et en se multipliant à l'intérieur des phagosomes, soit sous la forme d'hyphes, soit sous la forme de clusters cellulaires, jusqu'à l'éclatement des phagocytes,
- en évitant la phagocytose et en se multipliant à l'extérieur des phagocytes.

La mise en évidence de ces phénotypes d'interaction pose deux questions fondamentales qui vont servir de fil conducteur aux recherches menées par l'équipe pour les prochaines années : comment les levures *Candida* résistent-elles à la phagolyse macrophagique et en particulier quelles sont les réserves nutritionnelles et les voies métaboliques recrutées pour assurer leur multiplication ou leur transition morphogénétique dans un macrophage ? Et sur quelles molécules reposent les différences de signalisation des différentes espèces de *Candida* qui font qu'elles sont plus ou moins bien reconnues par les phagocytes ?

Cette étude a donc permis de valider notre modèle d'analyse multiparamétrique de l'interaction *Candida*-phagocytes *in vitro*, en démontrant qu'il était capable de quantifier les différences d'interaction de trois espèces de *Candida* avec les cellules de l'immunité innée. Dans la suite de notre travail de thèse, nous apporterons la démonstration qu'il est également suffisamment sensible pour mettre en évidence des différences d'interactions entre des souches sauvages et mutantes au sein d'une même espèce.

Les outils moléculaires

Le principal modèle biologique de notre laboratoire est *C. lusitaniae*. Son génome haploïde a été séquencé en 2005 par le Broad Institute. Par ailleurs, un système de transformation génétique par la recombinaison homologue avait déjà été développé par notre équipe (Francois *et al.*, 2004). Ce système reposait sur l'intégration du marqueur *URA3* codant l'orotidine 5'-phosphate décarboxylase de la voie de biosynthèse des pyrimidines, dans le génome d'une souche auxotrophe récipiente portant une mutation ponctuelle *ura3*_[D95V]. Afin d'optimiser l'adressage des constructions moléculaires dans le génome pour invalider l'expression d'un gène spécifique, ou au contraire pour favoriser leur insertion aléatoire selon les objectifs recherchés, nous avons dans un premier temps construit deux nouvelles souches mutantes auxotrophes *ura3*, l'une portant une délétion partielle de la séquence codante (*ura3*Δ360), l'autre une délétion totale de l'ORF (*ura3*Δ990). La souche portant la délétion partielle a été utilisée pour déterminer la taille minimum d'homologie requise pour l'intégration d'un fragment linéaire d'ADN par recombinaison homologue afin qu'il restaure l'expression du gène *URA3*. Un adressage efficace a été obtenu avec des fragments portant au moins 200 pb d'homologie à leurs extrémités. Cette donnée était essentielle pour orienter le choix d'une stratégie de construction des cassettes de délétion de gènes. Les régions d'homologie nécessaires étant relativement importantes, nous avons décidé de mettre au point une méthode de construction de cassettes par PCR chevauchantes, pour s'affranchir des étapes de clonage chez *Escherichia coli*, parfois longues et fastidieuses.

Deux étapes de transformation successives avec deux cassettes de délétion sont suffisantes pour invalider un gène cible par délétion complète de la séquence codante, sans qu'aucune séquence étrangère ne reste intégrée au locus, à la différence du système « *URA3* blaster » développé chez *C. albicans* (Fonzi *et al.*, 1993). La première transformation permet de remplacer le gène cible par le marqueur de sélection *URA3*. Pour cela, la souche récipiente auxotrophe pour l'uracile est transformée par une cassette de délétion composée du marqueur *URA3* bordé par les séquences amont et aval du locus cible. La deuxième étape de transformation consiste à éliminer le marqueur *URA3* du locus cible par transformation du clone mutant prototrophe avec une cassette correspondant à la fusion des séquences amont et aval du locus cible. Cette méthode de mutagenèse a été validée par la construction d'un mutant du gène *LEU2* qui présente l'intérêt d'avoir un phénotype d'auxotrophie pour la leucine facilement identifiable (manuscrit de l'article n°2, accepté pour publication dans la revue « *Yeast* »), et qui permet aujourd'hui de bénéficier d'un second marqueur génétique de transformation pour *C. lusitaniae*.

Caractérisation fonctionnelle du gène *OLE2*

À cette étape de notre travail, nous possédions tous les outils cellulaires et moléculaires pour la caractérisation fonctionnelle de gènes potentiellement impliqués dans l'interaction *Candida*-phagocytes pour notre modèle biologique *C. lusitaniae*. Nous nous sommes alors intéressés aux gènes du métabolisme lipidique et plus particulièrement aux métabolites secondaires que sont les oxylipides. Les oxylipides sont des molécules signal produites par les cellules de l'hôte comme par les cellules fongiques à partir d'acides gras insaturés. Les levures sont donc capables de synthétiser des oxylipides proches, voire identiques à ceux produits par l'hôte, ce qui est le cas en particulier de la prostaglandine E2 (PGE2) (Noverr *et al.*, 2003). Notre hypothèse de travail consiste à considérer que ces oxylipides de la levure pourraient jouer un rôle au cours de l'interaction entre les levures et les phagocytes, notamment en modulant les fonctions immunitaires de l'hôte afin de favoriser l'implantation et la progression de l'infection fongique.

Dans ce contexte, nous avons invalidé le gène *OLE2* de *C. lusitaniae* codant une $\Delta 9$ désaturase qui convertit l'acide stéarique (C18 : 0) en acide oléique (C18 : 1), première étape de biosynthèse des oxylipides. Le mutant *ole2* Δ obtenu a été caractérisé sur les plans génotypique et phénotypique. Le mutant *ole2* Δ n'était pas affecté dans ses capacités d'assimilation de différents substrats carbonés, que ce soit des sucres ou des lipides. Par contre, il présentait un défaut de filamentation et il était affecté dans ses capacités de reproduction sexuée. Il est tout à fait possible que les oxylipides, ou tout au moins que les acides gras insaturés précurseurs, puissent jouer un rôle dans la régulation de la filamentation, comme cela a déjà été décrit pour le farnésol (Shea *et al.*, 2006). La possibilité qu'ils soient également impliqués dans la signalisation cellulaire de cellules en reproduction est une donnée plus originale. Toutefois, on ne peut exclure que le défaut de reproduction sexuée ne soit que la conséquence d'un défaut de filamentation, la première étape de la reproduction nécessitant la formation d'un tube de conjugaison entre deux cellules sexuellement compatibles.

Nous avons ensuite caractérisé le phénotype d'interaction du mutant *ole2* Δ avec les macrophages J774. Les macrophages étaient plus efficaces pour phagocyter le mutant *ole2* que la souche sauvage 6936 dont il provient : leur survie était supérieure et la biomasse fongique internalisée était plus importante pour le mutant que pour la souche sauvage. Nous devons confirmer ces interactions et procéder à une analyse avec les neutrophiles. Tous les phénotypes observés pour le mutant *ole2* Δ doivent être confirmés par la construction d'une souche portant un allèle sauvage *OLE2* reconstitué au locus. S'ils étaient confirmés, ces phénotypes pourraient s'expliquer par un défaut de production de la prostaglandine PGE2. En effet, l'inactivation du gène *OLE2* chez *C. albicans* entraîne une diminution de la production de PGE2 associée à un défaut de filamentation. Afin de savoir si la mutation *ole2* Δ de *C. lusitaniae* affecte la production de PGE2, nous nous proposons de doser la quantité de PGE2 produite par le mutant *ole2* par LC – MS/MS et par une méthode immunologique de type ELISA. Selon les résultats obtenus, nous pourrions envisager des tests de complémentation de la mutation *ole2* par de la PGE2 exogène dans différentes situations physiologiques. Nous avons également débuté une analyse globale par GC-MS qui a pour but d'établir la carte d'identité lipidique du mutant *ole2*.

Parallèlement à la mutagenèse de gènes cibles, la dernière partie de notre travail a consisté à mettre en place une stratégie de mutagenèse aléatoire chez *C. lusitaniae*. Elle est basée sur l'insertion ectopique d'un vecteur de transformation dans le génome de *C. lusitaniae*. Elle nous a permis de construire une banque de 10 000 mutants. L'insertion aléatoire du vecteur a été vérifiée par Southern blot pour quelques transformants sélectionnés au hasard. Compte tenu du nombre de gènes contenus dans le génome et de sa compacité, cette banque devrait nous donner plus de 80% de chances d'avoir un mutant dans un gène donné, hors gènes essentiels et gènes de ménage biosynthétiques dont l'inactivation se traduit

Conclusion générale

par une auxotrophie. Les mutants de cette banque sont étiquetés de façon indirecte ; l'identification du site d'insertion du vecteur de transformation nécessite la digestion enzymatique de l'ADN du mutant, la recircularisation des fragments de restriction pour former des minicercles d'ADN, l'amplification des séquences adjacentes au site d'intégration par PCR sur les minicercles grâce à des amorces divergentes spécifiques du vecteur, et le séquençage nucléotidique des amplifiats obtenus.

La suite de nos travaux consistera à cribler cette banque de mutants pour leurs interactions avec les macrophages, puis de façon plus ciblée avec les neutrophiles, grâce au modèle d'interaction cellulaire que nous avons développé, et dont les outils (fluorimétrie et cytométrie en flux) sont compatibles avec du criblage à haut débit. L'objectif à court terme est d'identifier des gènes de *Candida* impliqués dans l'interaction avec les phagocytes de façon à mieux comprendre cette étape cruciale de la relation hôte-pathogène.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abi-Said D., Anaissie E., Uzun O., Raad I., Pinzcowski H., et al.** (1997). "The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species." Clin Infect Dis **24**(6): 1122-8.
- Accoceberry I. and Noel T.** (2006). "Antifungals cellular targets and mechanisms of resistance." Therapie **61**(3): 195-9.
- 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**(Pt 8): 999-1008.
- Alani E., Cao L. and Kleckner N.** (1987). "A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains." Genetics **116**(4): 541-5.
- Alem M. A., Oteef M. D., Flowers T. H. and Douglas L. J.** (2006). "Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development." Eukaryot Cell **5**(10): 1770-9.
- Almirante B., Rodriguez D., Cuenca-Estrella M., Almela M., Sanchez F., et al.** (2006). "Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003." J Clin Microbiol **44**(5): 1681-5.
- Andes D., Nett J., Oschel P., Albrecht R., Marchillo K., et al.** (2004). "Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model." Infect Immun **72**(10): 6023-31.
- Aratani Y., Koyama H., Nyui S., Suzuki K., Kura F., et al.** (1999). "Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase." Infect Immun **67**(4): 1828-36.
- Baillie G. S. and Douglas L. J.** (2000). "Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents." J Antimicrob Chemother **46**(3): 397-403.
- Baine W. B., Koenig M. G. and Goodman J. S.** (1974). "Clearance of *Candida albicans* from the bloodstream of rabbits." Infect Immun **10**(6): 1420-5.
- Barnett J. A., Payne, R.W. and Yarrow, D.** (2000). "Yeasts : Characteristics and Identification." Cambridge University Press 3rd edition.
- Barrett N. A., Maekawa A., Rahman O. M., Austen K. F. and Kanaoka Y.** (2009). "Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells." J Immunol **182**(2): 1119-28.
- Bassetti M., Righi E., Costa A., Fasce R., Molinari M. P., et al.** (2006). "Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care." BMC Infect Dis **6**: 21.
- Bassetti M., Righi E., Tumbarello M., Di Biagio A., Rosso R., et al.** (2006). "Candida infections in the intensive care unit: epidemiology, risk factors and therapeutic strategies." Expert Rev Anti Infect Ther **4**(5): 875-85.
- Becker K. P. and Hannun Y. A.** (2005). "Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling." Cell Mol Life Sci **62**(13): 1448-61.
- Bellocchio S., Montagnoli C., Bozza S., Gaziano R., Rossi G., et al.** (2004). "The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo." J Immunol **172**(5): 3059-69.
- Betz M. and Fox B. S.** (1991). "Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines." J Immunol **146**(1): 108-13.

- Blankenship J. R. and Mitchell A. P.** (2006). "How to build a biofilm: a fungal perspective." Curr Opin Microbiol **9**(6): 588-94.
- Bourgeois C., Majer O., Frohner I. and Kuchler K.** (2009). "In vitro systems for studying the interaction of fungal pathogens with primary cells from the mammalian innate immune system." Methods Mol Biol **470**: 125-39.
- Bourgeois C., Majer O., Frohner I. E., Tierney L. and Kuchler K.** (2010). "Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting." Curr Opin Microbiol.
- Brash A. R.** (2001). "Arachidonic acid as a bioactive molecule." J Clin Invest **107**(11): 1339-45.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., et al.** (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-5.
- Brown A. J. and Gow N. A.** (1999). "Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis." Trends Microbiol **7**(8): 333-8.
- Buscemi L., Arechavala A. and Negroni R.** (2004). "[Study of acute vulvovaginitis in sexually active adult women, with special reference to candidosis, in patients of the Francisco J. Muniz Infectious Diseases Hospital]." Rev Iberoam Micol **21**(4): 177-81.
- Calderone R., Diamond R., Senet J. M., Warmington J., Filler S., et al.** (1994). "Host cell-fungal cell interactions." J Med Vet Mycol **32 Suppl 1**: 151-68.
- Calderone R. A. and Fonzi W. A.** (2001). "Virulence factors of *Candida albicans*." Trends Microbiol **9**(7): 327-35.
- Cambi A., Beeren I., Joosten B., Fransen J. A. and Figdor C. G.** (2009). "The C-type lectin DC-SIGN internalizes soluble antigens and HIV-1 virions via a clathrin-dependent mechanism." Eur J Immunol **39**(7): 1923-8.
- Cambi A., Gijzen K., de Vries J. M., Torensma R., Joosten B., et al.** (2003). "The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells." Eur J Immunol **33**(2): 532-8.
- Cao F., Lane S., Raniga P. P., Lu Y., Zhou Z., et al.** (2006). "The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*." Mol Biol Cell **17**(1): 295-307.
- Casadevall A.** (1995). "Antibody immunity and invasive fungal infections." Infect Immun **63**(11): 4211-8.
- Castaldo P., Stratta R. J., Wood R. P., Markin R. S., Patil K. D., et al.** (1991). "Fungal infections in liver allograft recipients." Transplant Proc **23**(3): 1967.
- Chapeland-Leclerc F., Bouchoux J., Goumar A., Chastin C., Villard J., et al.** (2005). "Inactivation of the FCY2 gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3101-8.
- Chauhan N., Latge J. P. and Calderone R.** (2006). "Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*." Nat Rev Microbiol **4**(6): 435-44.
- Chawla A., Repa J. J., Evans R. M. and Mangelsdorf D. J.** (2001). "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files." Science **294**(5548): 1866-70.
- Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J. and Fink G. R.** (2004). "Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 5048-52.
- Coste A. T., Crittin J., Bauser C., Rohde B. and Sanglard D.** (2009). "Functional analysis of cis- and trans-acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system." Eukaryot Cell **8**(8): 1250-67.
- Csank C. and Haynes K.** (2000). "*Candida glabrata* displays pseudohyphal growth." FEMS Microbiol Lett **189**(1): 115-20.

- Dagenais T. R., Chung D., Giles S. S., Hull C. M., Andes D., et al.** (2008). "Defects in conidiophore development and conidium-macrophage interactions in a dioxygenase mutant of *Aspergillus fumigatus*." *Infect Immun* **76**(7): 3214-20.
- Datry A. and Bart-Delabesse E.** (2006). "[Caspofungin: mode of action and therapeutic applications]." *Rev Med Interne* **27**(1): 32-9.
- Davis D., Edwards J. E., Jr., Mitchell A. P. and Ibrahim A. S.** (2000). "Candida albicans RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions." *Infect Immun* **68**(10): 5953-9.
- De Luca A., Montagnoli C., Zelante T., Bonifazi P., Bozza S., et al.** (2007). "Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, andIDO-dependent inhibition of Rorc." *J Immunol* **179**(9): 5999-6008.
- Demeure C. E., Yang L. P., Desjardins C., Raynauld P. and Delespesse G.** (1997). "Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines." *Eur J Immunol* **27**(12): 3526-31.
- Denning D. W.** (2003). "Echinocandin antifungal drugs." *Lancet* **362**(9390): 1142-51.
- Deva R., Ciccoli R., Kock L. and Nigam S.** (2001). "Involvement of aspirin-sensitive oxylipins in vulvovaginal candidiasis." *FEMS Microbiol Lett* **198**(1): 37-43.
- Develoux B.** (2005). "Candidose et levures diverses." *EMC-Maladies infectieuses* **2**(3): 119-139.
- Diamond M. S., Garcia-Aguilar J., Bickford J. K., Corbi A. L. and Springer T. A.** (1993). "The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands." *J Cell Biol* **120**(4): 1031-43.
- Dooley D. C., Simpson J. F. and Meryman H. T.** (1982). "Isolation of large numbers of fully viable human neutrophils: a preparative technique using percoll density gradient centrifugation." *Exp Hematol* **10**(7): 591-9.
- Douglas L. J.** (2003). "Candida biofilms and their role in infection." *Trends Microbiol* **11**(1): 30-6.
- Drinnenberg I. A., Weinberg D. E., Xie K. T., Mower J. P., Wolfe K. H., et al.** (2009). "RNAi in budding yeast." *Science* **326**(5952): 544-50.
- Eggimann P., Garbino J. and Pittet D.** (2003). "Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients." *Lancet Infect Dis* **3**(11): 685-702.
- Eggimann P., Sax H. and Pittet D.** (2004). "Catheter-related infections." *Microbes Infect* **6**(11): 1033-42.
- Eggimann P. a. P., D.** (2002). "Candidoses en réanimation." *Réanimation* **11**: 209-221.
- El Barkani A., Kurzai O., Fonzi W. A., Ramon A., Porta A., et al.** (2000). "Dominant active alleles of RIM101 (PRR2) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*." *Mol Cell Biol* **20**(13): 4635-47.
- El-Sharoud W. M., Belloch C., Peris D. and Querol A.** (2009). "Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products." *J Food Sci* **74**(7): M341-6.
- Ells R., Kock J. L., Albertyn J., Kemp G. and Pohl C. H.** (2010). "Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on prostaglandin E(2) production by *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms." *Med Microbiol Immunol*.
- Erb-Downward J. R. and Noverr M. C.** (2007). "Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*." *Infect Immun* **75**(7): 3498-505.
- Ermer D., Urban C. F., Laube B., Goosmann C., Zychlinsky A., et al.** (2009). "Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections." *J Innate Immun* **1**(3): 181-93.
- Ezekowitz R. A., Sastry K., Bailly P. and Warner A.** (1990). "Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells." *J Exp Med* **172**(6): 1785-94.

- Fanello S., Bouchara J. P., Jousset N., Delbos V. and LeFlohic A. M.** (2001). "Nosocomial *Candida albicans* acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to-person transmission." *J Hosp Infect* **47**(1): 46-52.
- Favel A., Michel-Nguyen A., Peyron F., Martin C., Thomachot L., et al.** (2003). "Colony morphology switching of *Candida lusitanae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: case report and review of the literature." *Diagn Microbiol Infect Dis* **47**(1): 331-9.
- Favier A.** (2006). "[Oxidative stress in human diseases]." *Ann Pharm Fr* **64**(6): 390-6.
- Figdor C. G. and Van Sriel A. B.** (2009). "Fungal pattern-recognition receptors and tetraspanins: partners on antigen-presenting cells." *Trends Immunol* **31**(3): 91-6.
- 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. and Irwin M. Y.** (1993). "Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*." *Genetics* **134**(3): 717-28.
- Fowler S. L., Rhoton B., Springer S. C., Messer S. A., Hollis R. J., et al.** (1998). "Evidence for person-to-person transmission of *Candida lusitanae* in a neonatal intensive-care unit." *Infect Control Hosp Epidemiol* **19**(5): 343-5.
- Fradin C., De Groot P., MacCallum D., Schaller M., Klis F., et al.** (2005). "Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood." *Mol Microbiol* **56**(2): 397-415.
- Fradin C., Poulain D. and Jouault T.** (2000). "beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3." *Infect Immun* **68**(8): 4391-8.
- Francois F., Chapeland-Leclerc F., Villard J. and Noel T.** (2004). "Development of an integrative transformation system for the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitanae* using URA3 as a selection marker." *Yeast* **21**(2): 95-106.
- Francois F., Noel T., Pepin R., Brulfert A., Chastin C., et al.** (2001). "Alternative identification test relying upon sexual reproductive abilities of *Candida lusitanae* strains isolated from hospitalized patients." *J Clin Microbiol* **39**(11): 3906-14.
- Fu Y., Rieg G., Fonzi W. A., Belanger P. H., Edwards J. E., Jr., et al.** (1998). "Expression of the *Candida albicans* gene ALS1 in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells." *Infect Immun* **66**(4): 1783-6.
- Funk C. D.** (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." *Science* **294**(5548): 1871-5.
- Gale C., Finkel D., Tao N., Meinke M., McClellan M., et al.** (1996). "Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 357-61.
- Gale C. A., Bendel C. M., McClellan M., Hauser M., Becker J. M., et al.** (1998). "Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1." *Science* **279**(5355): 1355-8.
- Gales A., Conduche A., Bernad J., Lefevre L., Olganier D., et al.** (2010). "PPARgamma controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*." *PLoS Pathog* **6**(1): e1000714.
- Garcia-Sanchez S., Aubert S., Iraqui I., Janbon G., Ghigo J. M., et al.** (2004). "*Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns." *Eukaryot Cell* **3**(2): 536-45.
- Gargeya I. B., Pruitt W. R., Simmons R. B., Meyer S. A. and Ahearn D. G.** (1990). "Occurrence of *Clavispora lusitanae*, the teleomorph of *Candida lusitanae*, among clinical isolates." *J Clin Microbiol* **28**(10): 2224-7.

- 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**(12): 5289-94.
- Giaimis J., Lombard Y., Poindron P. and Muller C. D.** (1994). "Flow cytometry distinction between adherent and phagocytized yeast particles." *Cytometry* **17**(2): 173-8.
- Goumar A. A. B., C. Martin, J. Villard J, and T. Noël** (2004). "Selection and genetic analysis of pseudohyphae defective mutants with attenuated virulence in *Candida lusitanae*. " *J. Mycol. Med.* **14**: 3-11.
- Gow N. A.** (2002). "*Candida albicans* switches mates." *Mol Cell* **10**(2): 217-8.
- Graham L. M. and Brown G. D.** (2009). "The Dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis." *Cytokine* **48**(1-2): 148-55.
- Guinet R., Chanas J., Goullier A., Bonnefoy G. and Ambroise-Thomas P.** (1983). "Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae*." *J Clin Microbiol* **18**(2): 443-4.
- Hadfield T. L., Smith M. B., Winn R. E., Rinaldi M. G. and Guerra C.** (1987). "Mycoses caused by *Candida lusitanae*." *Rev Infect Dis* **9**(5): 1006-12.
- Hannun Y. A. and Obeid L. M.** (2002). "The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind." *J Biol Chem* **277**(29): 25847-50.
- Hara H., Ishihara C., Takeuchi A., Imanishi T., Xue L., et al.** (2007). "The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors." *Nat Immunol* **8**(6): 619-29.
- Harrington B. J. H. G.** (2003). "Calcofluor White: A Review of its Uses and Applications in Clinical Mycology and Parasitology." *laboratorymedicine* **34**.
- Hazen K. C.** (1995). "New and emerging yeast pathogens." *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 462-78.
- Heinsbroek S. E., Taylor P. R., Martinez F. O., Martinez-Pomares L., Brown G. D., et al.** (2008). "Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis." *PLoS Pathog* **4**(11): e1000218.
- Herre J., Marshall A. S., Caron E., Edwards A. D., Williams D. L., et al.** (2004). "Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages." *Blood* **104**(13): 4038-45.
- Hirsch J. G.** (1958). "Bactericidal action of histone." *J Exp Med* **108**(6): 925-44.
- Hornby J. M., Jensen E. C., Lisec A. D., Tasto J. J., Jahnke B., et al.** (2001). "Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol." *Appl Environ Microbiol* **67**(7): 2982-92.
- Hornby J. M. and Nickerson K. W.** (2004). "Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2305-7.
- Hoyer L. L.** (2001). "The ALS gene family of *Candida albicans*." *Trends Microbiol* **9**(4): 176-80.
- Hoyer L. L., Fundyga R., Hecht J. E., Kapteyn J. C., Klis F. M., et al.** (2001). "Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family." *Genetics* **157**(4): 1555-67.
- Hoyer L. L. and Hecht J. E.** (2001). "The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain." *Yeast* **18**(1): 49-60.
- Hoyer L. L., Payne T. L., Bell M., Myers A. M. and Scherer S.** (1998). "*Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family." *Curr Genet* **33**(6): 451-9.
- Hoyer L. L., Scherer S., Shatzman A. R. and Livi G. P.** (1995). "*Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif." *Mol Microbiol* **15**(1): 39-54.

- Hube B., Stehr F., Bossenz M., Mazur A., Kretschmar M., et al.** (2000). "Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members." Arch Microbiol **174**(5): 362-74.
- Ibata-Ombetta S., Idziorek T., Trinel P. A., Poulain D. and Jouault T.** (2003). "Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation." Ann N Y Acad Sci **1010**: 573-6.
- Ivashkiv L. B.** (2009). "Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors." Nat Immunol **10**(4): 340-7.
- Jersmann H. P., Ross K. A., Vivers S., Brown S. B., Haslett C., et al.** (2003). "Phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages: analysis by multiparameter flow cytometry." Cytometry A **51**(1): 7-15.
- Johnson L. B. and Kauffman C. A.** (2003). "Voriconazole: a new triazole antifungal agent." Clin Infect Dis **36**(5): 630-7.
- Jouault T., Sarazin A., Martinez-Esparza M., Fradin C., Sendid B., et al.** (2009). "Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*." Cell Microbiol **11**(7): 1007-15.
- Katz S., Merkel G. J., Folkening W. J., Rosenthal R. S. and Grosfeld J. L.** (1993). "Blood clearance and organ localization of *Candida albicans* and *E coli* following dual infection in rats." J Pediatr Surg **28**(3): 329-32; discussion 332-3.
- Kaur R., Ma B. and Cormack B. P.** (2007). "A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(18): 7628-33.
- Kelly S. L., Lamb D. C., Kelly D. E., Loeffler J. and Einsele H.** (1996). "Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients." Lancet **348**(9040): 1523-4.
- Kliwer S. A., Lenhard J. M., Willson T. M., Patel I., Morris D. C., et al.** (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation." Cell **83**(5): 813-9.
- Kremery V. and Barnes A. J.** (2002). "Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance." J Hosp Infect **50**(4): 243-60.
- Krishnamurthy S., Plaine A., Albert J., Prasad T., Prasad R., et al.** (2004). "Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*." Microbiology **150**(Pt 6): 1991-2003.
- 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**(2): 878-88.
- Kumamoto C. A.** (2005). "A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(15): 5576-81.
- LaFleur M. D., Kumamoto C. A. and Lewis K.** (2006). "*Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells." Antimicrob Agents Chemother **50**(11): 3839-46.
- Lan C. Y., Rodarte G., Murillo L. A., Jones T., Davis R. W., et al.** (2004). "Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*." Mol Microbiol **53**(5): 1451-69.
- Lane S., Zhou S., Pan T., Dai Q. and Liu H.** (2001). "The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1." Mol Cell Biol **21**(19): 6418-28.
- Le Cabec V., Emorine L. J., Toesca I., Cougoule C. and Maridonneau-Parini I.** (2005). "The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor." J Leukoc Biol **77**(6): 934-43.

- Leidich S. D., Ibrahim A. S., Fu Y., Koul A., Jessup C., et al.** (1998). "Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*." *J Biol Chem* **273**(40): 26078-86.
- Leigh J. E., Barousse M., Swoboda R. K., Myers T., Hager S., et al.** (2001). "Candida-specific systemic cell-mediated immune reactivities in human immunodeficiency virus-positive persons with mucosal candidiasis." *J Infect Dis* **183**(2): 277-285.
- Li X., Yan Z. and Xu J.** (2003). "Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*." *Microbiology* **149**(Pt 2): 353-62.
- Linehan S. A., Martinez-Pomares L. and Gordon S.** (2000). "Macrophage lectins in host defence." *Microbes Infect* **2**(3): 279-88.
- Lipke P. N., Wojciechowicz D. and Kurjan J.** (1989). "AG alpha 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating." *Mol Cell Biol* **9**(8): 3155-65.
- Liu H.** (2001). "Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*." *Curr Opin Microbiol* **4**(6): 728-35.
- Liu H., Kohler J. and Fink G. R.** (1994). "Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog." *Science* **266**(5191): 1723-6.
- Lo H. J., Kohler J. R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., et al.** (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." *Cell* **90**(5): 939-49.
- Lorenz M. C., Bender J. A. and Fink G. R.** (2004). "Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages." *Eukaryot Cell* **3**(5): 1076-87.
- Lorenz M. C. and Fink G. R.** (2001). "The glyoxylate cycle is required for fungal virulence." *Nature* **412**(6842): 83-6.
- Luo S., Poltermann S., Kunert A., Rupp S. and Zipfel P. F.** (2009). "Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pral is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein." *Mol Immunol* **47**(2-3): 541-50.
- Lyman C. A. and Walsh T. J.** (1994). "Phagocytosis of medically important yeasts by polymorphonuclear leukocytes." *Infect Immun* **62**(4): 1489-93.
- MacMicking J., Xie Q. W. and Nathan C.** (1997). "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol* **15**: 323-50.
- Mancuso P., McNish R. W., Peters-Golden M. and Brock T. G.** (2001). "Evaluation of phagocytosis and arachidonate metabolism by alveolar macrophages and recruited neutrophils from F344xBN rats of different ages." *Mech Ageing Dev* **122**(15): 1899-913.
- Mansour M. K. and Levitz S. M.** (2002). "Interactions of fungi with phagocytes." *Curr Opin Microbiol* **5**(4): 359-65.
- Marks F.** (1999). "Arachidonic acid and companions: an abundant source of biological signals." *Mark, F., Furstenberger G. ed Weinheim, Germany*: 1-46.
- Marr K. A., Balajee S. A., Hawn T. R., Ozinsky A., Pham U., et al.** (2003). "Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens." *Infect Immun* **71**(9): 5280-6.
- Martchenko M., Alarco A. M., Harcus D. and Whiteway M.** (2004). "Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene." *Mol Biol Cell* **15**(2): 456-67.
- Martel C. M., Parker J. E., Bader O., Weig M., Gross U., et al.** "A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14alpha-demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(9): 3578-83.

- Maruyama J., Juvvadi P. R., Ishi K. and Kitamoto K.** (2005). "Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*." Biochem Biophys Res Commun **331**(4): 1081-8.
- Mateus C., Crow S. A., Jr. and Ahearn D. G.** (2004). "Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole." Antimicrob Agents Chemother **48**(9): 3358-66.
- Matsuoka T., Hirata M., Tanaka H., Takahashi Y., Murata T., et al.** (2000). "Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma." Science **287**(5460): 2013-7.
- Mavor A. L., Thewes S. and Hube B.** (2005). "Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes." Curr Drug Targets **6**(8): 863-74.
- Means T. K., Mylonakis E., Tampakakis E., Colvin R. A., Seung E., et al.** (2009). "Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36." J Exp Med **206**(3): 637-53.
- Meri T., Blom A. M., Hartmann A., Lenk D., Meri S., et al.** (2004). "The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein." Infect Immun **72**(11): 6633-41.
- Meri T., Hartmann A., Lenk D., Eck R., Wurzner R., et al.** (2002). "The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1." Infect Immun **70**(9): 5185-92.
- Mitchell A. G. and Martin C. E.** (1995). "A novel cytochrome b5-like domain is linked to the carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* delta-9 fatty acid desaturase." J Biol Chem **270**(50): 29766-72.
- Mitrofan-Oprea L., Palii C., Tissier J. P., Heron A., Verpoort T., et al.** (2007). "[Novel criteria for assessing red blood cell viability in blood banks]." Transfus Clin Biol **14**(4): 393-401.
- Monod M., Togni G., Hube B. and Sanglard D.** (1994). "Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species." Mol Microbiol **13**(2): 357-68.
- Morrow J. D., Awad J. A., Wu A., Zackert W. E., Daniel V. C., et al.** (1996). "Nonenzymatic free radical-catalyzed generation of thromboxane-like compounds (isothromboxanes) in vivo." J Biol Chem **271**(38): 23185-90.
- Mosel D. D., Dumitru R., Hornby J. M., Atkin A. L. and Nickerson K. W.** (2005). "Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum." Appl Environ Microbiol **71**(8): 4938-40.
- Mukherjee P. K. and Chandra J.** (2004). "*Candida* biofilm resistance." Drug Resist Updat **7**(4-5): 301-9.
- Murad A. M., Leng P., Straffon M., Wishart J., Macaskill S., et al.** (2001). "NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*." Embo J **20**(17): 4742-52.
- Murphy J. W., Zhou A. and Wong S. C.** (1997). "Direct interactions of human natural killer cells with *Cryptococcus neoformans* inhibit granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha production." Infect Immun **65**(11): 4564-71.
- Naglik J., Albrecht A., Bader O. and Hube B.** (2004). "*Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions." Cell Microbiol **6**(10): 915-26.
- Naglik J. R., Challacombe S. J. and Hube B.** (2003). "*Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis." Microbiol Mol Biol Rev **67**(3): 400-28, table of contents.

- Nakayashiki H., Kadotani N. and Mayama S.** (2006). "Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi." *J Mol Evol* **63**(1): 127-35.
- Navarro-Garcia F., Sanchez M., Nombela C. and Pla J.** (2001). "Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*." *FEMS Microbiol Rev* **25**(2): 245-68.
- 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**(1): 67-78.
- Netea M. G., Gow N. A., Munro C. A., Bates S., Collins C., et al.** (2006). "Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors." *J Clin Invest* **116**(6): 1642-50.
- Nett J., Lincoln L., Marchillo K., Massey R., Holoyda K., et al.** (2007). "Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2): 510-20.
- Nobile C. J., Andes D. R., Nett J. E., Smith F. J., Yue F., et al.** (2006). "Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo." *PLoS Pathog* **2**(7): e63.
- Nobile C. J. and Mitchell A. P.** (2005). "Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p." *Curr Biol* **15**(12): 1150-5.
- Nobile C. J., Nett J. E., Andes D. R. and Mitchell A. P.** (2006). "Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation." *Eukaryot Cell* **5**(10): 1604-10.
- Nolte F. S., Parkinson T., Falconer D. J., Dix S., Williams J., et al.** (1997). "Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia." *Antimicrob Agents Chemother* **41**(1): 196-9.
- Noverr M. C., Erb-Downward J. R. and Huffnagle G. B.** (2003). "Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes." *Clin Microbiol Rev* **16**(3): 517-33.
- Noverr M. C. and Huffnagle G. B.** (2004). "Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites." *Infect Immun* **72**(11): 6206-10.
- Noverr M. C., Phare S. M., Toews G. B., Coffey M. J. and Huffnagle G. B.** (2001). "Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins." *Infect Immun* **69**(5): 2957-63.
- Nucci M. and Anaissie E.** (2001). "Revisiting the source of candidemia: skin or gut?" *Clin Infect Dis* **33**(12): 1959-67.
- Odds F. C., Rinaldi M. G., Cooper C. R., Jr., Fothergill A., Pasarell L., et al.** (1997). "Candida and Torulopsis: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts." *J Clin Microbiol* **35**(1): 313-6.
- Ortega M., Rovira M., Almela M., Marco F., de la Bellacasa J. P., et al.** (2005). "Bacterial and fungal bloodstream isolates from 796 hematopoietic stem cell transplant recipients between 1991 and 2000." *Ann Hematol* **84**(1): 40-6.
- Papon N., Noel T., Florent M., Gibot-Leclerc S., Jean D., et al.** (2007). "Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(1): 369-71.
- Pappagianis D., Collins M. S., Hector R. and Remington J.** (1979). "Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human." *Antimicrob Agents Chemother* **16**(2): 123-6.
- Parahitiyawa N. B., Samaranayake Y. H., Samaranayake L. P., Ye J., Tsang P. W., et al.** (2006). "Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device." *Apmis* **114**(4): 298-306.

- Pendrak M. L. and Roberts D. D.** (2007). "Hemoglobin is an effective inducer of hyphal differentiation in *Candida albicans*." Med Mycol **45**(1): 61-71.
- Peyron F., Favel A., Michel-Nguyen A., Gilly M., Regli P., et al.** (2001). "Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest." J Clin Microbiol **39**(1): 339-42.
- Phan Q. T., Myers C. L., Fu Y., Sheppard D. C., Yeaman M. R., et al.** (2007). "Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells." PLoS Biol **5**(3): e64.
- Porcaro I., Vidal M., Jouvert S., Stahl P. D. and Giaimis J.** (2003). "Mannose receptor contribution to *Candida albicans* phagocytosis by murine E-clone J774 macrophages." J Leukoc Biol **74**(2): 206-15.
- Prigneau O., Porta A., Poudrier J. A., Colonna-Romano S., Noel T., et al.** (2003). "Genes involved in beta-oxidation, energy metabolism and glyoxylate cycle are induced by *Candida albicans* during macrophage infection." Yeast **20**(8): 723-30.
- Ram A. F. and Klis F. M.** (2006). "Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red." Nat Protoc **1**(5): 2253-6.
- Ramage G., Saville S. P., Thomas D. P. and Lopez-Ribot J. L.** (2005). "Candida biofilms: an update." Eukaryot Cell **4**(4): 633-8.
- Ramage G., VandeWalle K., Bachmann S. P., Wickes B. L. and Lopez-Ribot J. L.** (2002). "In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies." Antimicrob Agents Chemother **46**(11): 3634-6.
- Ramage G., Vandewalle K., Wickes B. L. and Lopez-Ribot J. L.** (2001). "Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*." Rev Iberoam Micol **18**(4): 163-70.
- Ramanan N. and Wang Y.** (2000). "A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence." Science **288**(5468): 1062-4.
- Rauceo J. M., De Armond R., Otoo H., Kahn P. C., Klotz S. A., et al.** (2006). "Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p." Eukaryot Cell **5**(10): 1664-73.
- Reeves E. P., Lu H., Jacobs H. L., Messina C. G., Bolsover S., et al.** (2002). "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux." Nature **416**(6878): 291-7.
- Reid D. M., Gow N. A. and Brown G. D.** (2009). "Pattern recognition: recent insights from Dectin-1." Curr Opin Immunol **21**(1): 30-7.
- Richard M. L., Nobile C. J., Bruno V. M. and Mitchell A. P.** (2005). "Candida albicans biofilm-defective mutants." Eukaryot Cell **4**(8): 1493-502.
- Romani L.** (2004). "Immunity to fungal infections." Nat Rev Immunol **4**(1): 1-23.
- Rowley A. F., Kuhn, H., Schewe, T.** (1998). "Enzymes and factors involved in the biosynthesis of eicosanoids." Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Rubin-Bejerano I., Fraser I., Grisafi P. and Fink G. R.** (2003). "Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 11007-12.
- Saijo S., Ikeda S., Yamabe K., Kakuta S., Ishigame H., et al.** "Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*." Immunity **32**(5): 681-91.
- Sanchez V., Vazquez J. A., Barth-Jones D., Dembry L., Sobel J. D., et al.** (1992). "Epidemiology of nosocomial acquisition of *Candida lusitanae*." J Clin Microbiol **30**(11): 3005-8.

- Sanglard D.** (2002). "Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **20**(9): 462-9; quiz 470, 479.
- Sanglard D., Hube B., Monod M., Odds F. C. and Gow N. A.** (1997). "A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence." *Infect Immun* **65**(9): 3539-46.
- Sanglard D., Ischer F., Monod M. and Bille J.** (1997). "Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene." *Microbiology* **143** (Pt 2): 405-16.
- Sanglard D., Kuchler K., Ischer F., Pagani J. L., Monod M., et al.** (1995). "Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(11): 2378-86.
- Sawyer R. T., Moon R. J. and Beneke E. S.** (1976). "Hepatic clearance of *Candida albicans* in rats." *Infect Immun* **14**(6): 1348-55.
- Schuetzer-Muehlbauer M., Willinger B., Krapf G., Enzinger S., Presterl E., et al.** (2003). "The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin." *Mol Microbiol* **48**(1): 225-35.
- Schweizer A., Rupp S., Taylor B. N., Rollinghoff M. and Schroppel K.** (2000). "The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*." *Mol Microbiol* **38**(3): 435-45.
- Scott L. J. and Simpson D.** (2007). "Voriconazole : a review of its use in the management of invasive fungal infections." *Drugs* **67**(2): 269-98.
- Segal A. W.** (2005). "How neutrophils kill microbes." *Annu Rev Immunol* **23**: 197-223.
- Selmecki A., Forche A. and Berman J.** (2006). "Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*." *Science* **313**(5785): 367-70.
- Semighini C. P., Hornby J. M., Dumitru R., Nickerson K. W. and Harris S. D.** (2006). "Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi." *Mol Microbiol* **59**(3): 753-64.
- Sergeeva M. G., Gonchar M. V., Mevkh A. T. and Varfolomeyev S. D.** (1997). "Prostaglandin E2 biphasic control of lymphocyte proliferation: inhibition by picomolar concentrations." *FEBS Lett* **418**(3): 235-8.
- Sharkey L. L., McNemar M. D., Saporito-Irwin S. M., Sypherd P. S. and Fonzi W. A.** (1999). "HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1." *J Bacteriol* **181**(17): 5273-9.
- Shea J. M. and Del Poeta M.** (2006). "Lipid signaling in pathogenic fungi." *Curr Opin Microbiol* **9**(4): 352-8.
- Sheppard D. C., Yeaman M. R., Welch W. H., Phan Q. T., Fu Y., et al.** (2004). "Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*." *J Biol Chem* **279**(29): 30480-9.
- Siau H. and Kerridge D.** (1998). "The effect of antifungal drugs in combination on the growth of *Candida glabrata* in solid and liquid media." *J Antimicrob Chemother* **41**(3): 357-66.
- Snijdwint F. G., Kalinski P., Wierenga E. A., Bos J. D. and Kapsenberg M. L.** (1993). "Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes." *J Immunol* **150**(12): 5321-9.
- Sobel J. D., Bradshaw S. K., Lipka C. J. and Kartsonis N. A.** (2007). "Caspofungin in the treatment of symptomatic candiduria." *Clin Infect Dis* **44**(5): e46-9.

- Song J. L., Harry J. B., Eastman R. T., Oliver B. G. and White T. C.** (2004). "The *Candida albicans* lanosterol 14- α -demethylase (ERG11) gene promoter is maximally induced after prolonged growth with antifungal drugs." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(4): 1136-44.
- 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**(5407): 1535-8.
- Staub P., Kretschmar M., Nichterlein T., Hof H. and Morschhauser J.** (2000). "Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6102-7.
- Stephan F., Bah M. S., Desterke C., Rezaiguia-Delclaux S., Foulet F., et al.** (2002). "Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers." *Clin Infect Dis* **35**(12): 1477-83.
- Strassmann G., Patil-Koota V., Finkelman F., Fong M. and Kambayashi T.** (1994). "Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2." *J Exp Med* **180**(6): 2365-70.
- Stukey J. E., McDonough V. M. and Martin C. E.** (1990). "The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene." *J Biol Chem* **265**(33): 20144-9.
- Sugiyama Y., Nakashima S., Mirbod F., Kanoh H., Kitajima Y., et al.** (1999). "Molecular cloning of a second phospholipase B gene, caPLB2 from *Candida albicans*." *Med Mycol* **37**(1): 61-7.
- Taguchi H., Tanaka R., Miyaji M., Nishimura K., Kanno H., et al.** (1992). "[Studies on the effect of combination of amphotericin B and flucytosine on *Candida albicans* by flow cytometry]." *Kansenshogaku Zasshi* **66**(4): 516-21.
- Taylor P. R., Gordon S. and Martinez-Pomares L.** (2005). "The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition." *Trends Immunol* **26**(2): 104-10.
- Taylor P. R., Tsoni S. V., Willment J. A., Dennehy K. M., Rosas M., et al.** (2007). "Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection." *Nat Immunol* **8**(1): 31-8.
- Thornton B. P., Vetvicka V., Pitman M., Goldman R. C. and Ross G. D.** (1996). "Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18)." *J Immunol* **156**(3): 1235-46.
- Timpel C., Strahl-Bolsinger S., Ziegelbauer K. and Ernst J. F.** (1998). "Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*." *J Biol Chem* **273**(33): 20837-46.
- Tortorano A. M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C. C., et al.** (2004). "Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**(4): 317-22.
- Triebel T., Grillhosl B., Kacani L., Lell C. P., Fuchs A., et al.** (2003). "Importance of the terminal complement components for immune defence against *Candida*." *Int J Med Microbiol* **292**(7-8): 527-36.
- Tsitsigiannis D. I. and Keller N. P.** (2007). "Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals." *Trends Microbiol* **15**(3): 109-18.

- Tsuchimori N., Sharkey L. L., Fonzi W. A., French S. W., Edwards J. E., Jr., et al.** (2000). "Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells." *Infect Immun* **68**(4): 1997-2002.
- Urban C. F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., et al.** (2009). "Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*." *PLoS Pathog* **5**(10): e1000639.
- Urban C. F., Lourido S. and Zychlinsky A.** (2006). "How do microbes evade neutrophil killing?" *Cell Microbiol* **8**(11): 1687-96.
- Urban C. F., Reichard U., Brinkmann V. and Zychlinsky A.** (2006). "Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms." *Cell Microbiol* **8**(4): 668-76.
- Van Spruiel A. B. and Figdor C. G.** (2009). "The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases." *Microbes Infect* **12**(2): 106-12.
- Vane J. R. and Botting R. M.** (1998). "Mechanism of action of antiinflammatory drugs." *Int J Tissue React* **20**(1): 3-15.
- Vermes A., Guchelaar H. J. and Dankert J.** (2000). "Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions." *J Antimicrob Chemother* **46**(2): 171-9.
- Vinces M. D., Haas C. and Kumamoto C. A.** (2006). "Expression of the *Candida albicans* morphogenesis regulator gene *CZF1* and its regulation by *Efg1p* and *Czf1p*." *Eukaryot Cell* **5**(5): 825-35.
- Viudes A., Peman J., Canton E., Salavert M., Ubeda P., et al.** (2002). "Two cases of fungemia due to *Candida lusitanae* and a literature review." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**(4): 294-9.
- Wang H., Xu Z., Gao L. and Hao B.** (2009). "A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method." *BMC Evol Biol* **9**: 195.
- Warnock D. W.** (2007). "Trends in the epidemiology of invasive fungal infections." *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **48**(1): 1-12.
- Weems J. J., Jr.** (1992). "*Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility." *Clin Infect Dis* **14**(3): 756-66.
- Weinberger M., Leibovici L., Perez S., Samra Z., Ostfeld I., et al.** (2005). "Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non-*albicans* *Candida* species and predictors of mortality." *J Hosp Infect* **61**(2): 146-54.
- Wells C. A., Salvage-Jones J. A., Li X., Hitchens K., Butcher S., et al.** (2008). "The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*." *J Immunol* **180**(11): 7404-13.
- Westwater C., Balish E. and Schofield D. A.** (2005). "*Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance." *Eukaryot Cell* **4**(10): 1654-61.
- Wirthmueller U., Kurosaki T., Murakami M. S. and Ravetch J. V.** (1992). "Signal transduction by Fc gamma RIII (CD16) is mediated through the gamma chain." *J Exp Med* **175**(5): 1381-90.
- Wright S. D. and Silverstein S. C.** (1983). "Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes." *J Exp Med* **158**(6): 2016-23.
- Zaugg C., Borg-Von Zepelin M., Reichard U., Sanglard D. and Monod M.** (2001). "Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*." *Infect Immun* **69**(1): 405-12.

- Zhang Y. Q., Gamarra S., Garcia-Effron G., Park S., Perlin D. S., *et al.*** (2010). "Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs." PLoS Pathog **6**(6): e1000939.
- Zhao X., Daniels K. J., Oh S. H., Green C. B., Yeater K. M., *et al.*** (2006). "Candida albicans Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces." Microbiology **152**(Pt 8): 2287-99.
- 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**(Pt 5): 1619-30.
- Znaidi S., Weber S., Al-Abdin O. Z., Bomme P., Saidane S., *et al.*** (2008). "Genomewide location analysis of Candida albicans Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance." Eukaryot Cell **7**(5): 836-47.

Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions *Candida* - phagocytes ; Application à la caractérisation du gène *OLE2* codant une désaturase chez *C. lusitaniae*.

Les levures *Candida* sont des pathogènes opportunistes responsables d'infections graves chez les patients immunodéprimés. Au cours de ce travail, nous avons développé un modèle cellulaire *in vitro* pour la caractérisation multiparamétrique des phénotypes d'interaction entre les levures *Candida* et les macrophages et les neutrophiles, principaux effecteurs de la défense anti-*Candida*. Il repose sur l'utilisation de marqueurs fluorescents pour le suivi quantitatif de l'interaction en cytométrie en flux et en fluorimétrie. Ce modèle a été validé par la comparaison de l'interaction de trois espèces de levures, *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. lusitaniae*, avec des macrophages murins et des neutrophiles humains. Deux stratégies principales de survie des levures à la phagocytose ont été mises en évidence : par la résistance à la phagolyse et la multiplication des levures à l'intérieur des phagocytes jusqu'à leur éclatement, ou par l'évitement de la phagocytose et la multiplication des levures à l'extérieur des phagocytes. L'interprétation des données quantitatives a été confirmée par microscopie à fluorescence et vidéo-microscopie.

Afin de mieux comprendre les interactions *Candida*-phagocytes, nous avons mis au point des outils pour l'analyse fonctionnelle de gènes chez *C. lusitaniae*. Une stratégie de PCR chevauchante a été développée pour l'obtention de mutants nuls de *C. lusitaniae*, sans étape de clonage. C'est ainsi que le gène *OLE2*, codant une $\Delta 9$ désaturase d'acides gras potentiellement impliquée dans la biosynthèse de la prostaglandine PGE₂, a été invalidé. Le mutant *ole2* Δ présentait de très nets défauts de filamentation et de reproduction sexuée. Par rapport à une souche sauvage, le mutant *ole2* Δ était massivement phagocyté par les macrophages, et la survie des phagocytes était plus importante, ce qui suggère un rôle important des lipides insaturés et des oxylipides dans la signalisation cellulaire au cours de l'interaction *Candida*-phagocytes. Dans la dernière partie de notre travail, nous avons construit une banque de 10 000 mutants de *C. lusitaniae* par l'intégration aléatoire d'un marqueur dans le génome. Le criblage de cette banque à travers notre modèle cellulaire d'interaction permettra d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'interaction avec les phagocytes afin de mieux comprendre la physiopathologie des candidoses et de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques.

Mots clés : *Candida*, macrophage, neutrophile, interaction hôte-pathogène, fluorimétrie, cytométrie en flux, oxylipides, délétion de gène, banque de mutants.

Development of cellular and molecular tools for the analysis of *Candida* - phagocytes interactions; Application to the functional analysis of a desaturase encoded by *OLE2* in *C. lusitaniae*.

Candida species are opportunistic pathogens causing severe infectious diseases in immunocompromised patients. In this work, we developed a tool for a multi-parameter characterization of the cell interactions between the yeasts *Candida* and both macrophages and neutrophils, which constitute the main defense against candidiasis. It relies on the labelling of each population with specific fluorescent markers, and on the use of fluorimetry and flow cytometry to assess interactions. The tool has been validated by comparing the interactions of three yeast species *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. lusitaniae*, with murine macrophages and human neutrophils. We found that yeasts use two main ways for escaping phagocytosis, which has been confirmed using video-microscopy: either (1) by surviving to phagolysis and dividing into the phagosome until phagocytes burst, or (2) by avoiding phagocytosis and dividing outside phagocytes.

In order to better understand the cellular and molecular mechanisms involved in *Candida*-phagocytes interactions, we developed new molecular tools for the functional analysis of genes in *C. lusitaniae*, notably a two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes. This method was successfully used for the deletion of *OLE2*, a gene encoding a $\Delta 9$ -desaturase of fatty acids, possibly implicated in prostaglandin PGE₂ biosynthesis. The *ole2* Δ mutant exhibited strong defects in both pseudofilamentation and sexual mating. During macrophages infection, *ole2* Δ yeast cells were massively internalized and triggered less phagocytes cell death than the wild type strain, suggesting that unsaturated fatty acids and/or oxylipids could play a role during interaction with phagocytes. Lastly, a bank of 10,000 mutants was constructed in *C. lusitaniae* by the random integration of a genetic marker in the genome. The screening of this bank through our tool to analyse cellular interactions will be undertaken to gain insights into understanding of the early stages of the infectious process.

Key words : *Candida*, macrophage, neutrophil, host-pathogen interaction, fluorimetry, flow cytometry, oxylipids, gene knock-out, bank of mutants.