

# Université Bordeaux Segalen

Année 2011

Thèse n°1896

## THÈSE

pour le

### DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Option : Microbiologie**

**Présentée et soutenue publiquement**

*Le 15 décembre 2011*

*Par Frédéric Gabriel*

*Né le 02 septembre 1979 à Bordeaux*

**Etude fonctionnelle de la  $\beta$ -oxydation chez la levure pathogène opportuniste *Candida lusitaniae* :  
Caractérisation d'une voie mitochondriale et peroxysomale Fox2p-dépendante et mise en évidence d'une voie peroxysomale alternative Fox2p-indépendante de catabolisme des acides gras.**

#### **Membres du Jury**

Monsieur le Professeur Marc BONNEU, PU.....Président  
Monsieur le Professeur Thierry BERGES, PU .....Rapporteur  
Monsieur le Professeur Frédéric DALLE, PU-PH.....Rapporteur  
Monsieur le Professeur Thierry NOEL, PU .....Examinateur  
Madame le Docteur Isabelle ACCOCEBERRY, MCU-PH.....Directrice de Thèse

## **Remerciements**

*Nous remercions le Pr Marc Bonneau, Professeur de l'Université Bordeaux Segalen, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Nous tenons également à remercier le Pr Thierry Bergès, Professeur de l'Université de Poitiers, et le Pr Frédéric Dalle, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier de l'Université de Bourgogne, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.*

*Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr Isabelle Accoceberry (Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier de l'Université Bordeaux Segalen) au sein de l'équipe « Candida et Pathogénicité » (dirigée par le Pr Thierry Noël, Professeur de l'Université Bordeaux Segalen), qui fait partie du Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité UMR-CNRS 5234 de l'Université Bordeaux Segalen.*

*Thierry, je te remercie de m'avoir chaleureusement accueilli au sein de ton équipe. Tes conseils, ton soutien, ta disponibilité et ton expertise m'ont particulièrement aidé au cours de ces années. Je n'oublie pas non plus ton humour et tes frisements de moustache !*

*Isabelle, je t'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir encadré tout au long de ce travail. Un immense merci pour ton soutien, tes conseils, ton implication et ta disponibilité sans failles durant toutes ces années, mais aussi pour ta bonne humeur indispensable à la réalisation de ces nombreuses manips finissant bien après le coucher du soleil.*

*Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe, Karine Dementhon, Sabine Charron, Sandrine Albac, Sofiane El Kirat-Chatel, Valérie Fitton-Ouabi, Ayman Sabra, et Eva Devo pour leur aide précieuse et indispensable sans laquelle ce travail ne serait pas. Les inénarrables karinades, votre gentillesse, votre constante bonne humeur et les nombreux moments de rigolade font que tout ce travail s'est passé dans une ambiance chaleureuse.*

*Mes remerciements vont aussi à Jean-Jacques Bessoule, Stephen Manon et René Lessire, pour leur participation à mon comité de thèse mais aussi et surtout pour leur expertise, leur disponibilité, leur intérêt et les nombreuses discussions qui ont contribué pour beaucoup à ce travail.*

*J'exprime aussi tous mes remerciements à l'ensemble des membres du laboratoire UMR-CNRS 5234 pour leur accueil, leur aide et leur gentillesse, ainsi qu'à l'ensemble des membres du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Bordeaux qui m'ont si gentiment supporté durant toutes ces années et m'ont toujours permis d'y travailler avec plaisir. Les moments passés dans ces deux autres chez moi, mais aussi à l'extérieur, ont été très agréables.*

*A tous mes amis bordotribiens, expatriés ou non, merci pour tous ces merveilleux moments vécus ensemble depuis bien longtemps et pour tous ceux encore à partager.*

*A ma famille, merci pour votre soutien indéfectible, votre générosité, votre tendresse et votre enthousiasme de tous les instants.*

# Sommaire

Liste des Figures.....	6
Liste des Tableaux.....	8
Liste des publications et des communications .....	9
Liste des Abréviations .....	11
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
Introduction .....	14
1 Catabolisme lipidique.....	16
1.1 Les lipides : définitions et nomenclature	16
1.1.1 Les lipides à base d'acides gras.....	17
1.1.1.1 Les acides gras	17
1.1.1.2 Les dérivés de l'acide arachidonique (eicosanoïdes)	19
1.1.1.3 Les lipides simples	19
☉ Les acylglycérols.....	19
☉ Les cérides et stérides.....	20
1.1.1.4 Les lipides complexes	20
☉ Les glycérophospholipides ou phospholipides.....	20
☉ Les sphingolipides.....	20
1.1.2 Les lipides polyisopréniques .....	20
1.2 La $\beta$ -oxydation des acides gras	21
1.2.1 Etape préliminaire d'activation des acides gras par une acyl-CoA synthétase	23
1.2.2 Première réaction : la déshydrogénation de l'acyl-CoA .....	23
1.2.2.1 Les Acyl-CoA déshydrogénases (ACD)	23
1.2.2.2 Acyl-CoA oxydases (ACO)	24
1.2.3 Deuxième réaction : l'hydratation du trans-2-énoyl-CoA .....	26
1.2.4 Troisième réaction : la déshydrogénation du 3-hydroxyacyl-CoA .....	27
1.2.5 Quatrième réaction : la thiolysse du 3-kétoacyl-CoA.....	27
1.2.6 Enzymes auxiliaires.....	28
1.2.6.1 $\Delta_3, \Delta_2$ -énoyl-CoA isomérase (ECI)	29
1.2.6.2 2,4-diénoyl-CoA reductase (DECR)	30
1.2.6.3 $\Delta_{3,5}, \Delta_{2,4}$ -diénoyl-CoA isomérase (DECI)	31
1.2.6.4 Epimérisation	31
1.2.7 Organisation de la $\beta$ -oxydation chez les procaryotes.....	31
1.2.8 Organisation subcellulaire de la $\beta$ -oxydation chez les eucaryotes.....	32
1.2.8.1 La $\beta$ -oxydation mitochondriale	33
1.2.8.1.1 Import mitochondrial et activation des acides gras .....	33
1.2.8.1.2 Chez les mammifères, deux systèmes de $\beta$ -oxydation mitochondriale .	33
1.2.8.1.3 Chez les plantes .....	35
1.2.8.1.4 Chez les champignons .....	35
1.2.8.2 La $\beta$ -oxydation peroxysomale	36
1.2.8.2.1 Import peroxysomal et activation des acides gras.....	36
1.2.8.2.2 Chez les mammifères, deux protéines multifonctionnelles peroxysomales .....	38

1.2.8.2.3	Chez les végétaux, plusieurs protéines multifonctionnelles peroxysomales .....	40
1.2.8.2.4	Chez les champignons, une seule protéine multifonctionnelle peroxysomale .....	40
1.3	L' $\alpha$ -oxydation des acides gras	42
1.4	L' $\omega$ -oxydation des acides gras (Figure 12)	45
1.5	Cycle du glyoxylate et entrée dans la néoglucogénèse	46
2	Lipides et champignons.....	48
2.1	Lipides et membranes fongiques	48
2.2	Les lipides, molécules signal	49
2.2.1	Le farnésol.....	49
2.2.2	Les oxylipines .....	51
2.2.3	Les sphingolipides.....	53
2.3	Régulation du métabolisme lipidique et rôle dans la virulence	54
3	Le modèle biologique <i>Candida lusitaniae</i> .....	57
3.1	Taxonomie, morphologie et reproduction des <i>Candida</i> spp.	57
3.2	Pouvoir pathogène et épidémiologie des <i>Candida</i> spp.	57
3.3	<i>Candida lusitaniae</i>	59

## **MATERIELS & METHODES ..... 61**

1	Matériel biologique .....	63
1.1	Souches de <i>Candida lusitaniae</i> , conditions de culture	63
1.2	Souches d' <i>Escherichia coli</i> , conditions de culture	63
1.3	Macrophages	63
1.4	Vecteurs plasmidiques	64
1.5	Oligonucléotides	64
2	Techniques de biologie moléculaire.....	68
2.1	Extraction et purification des acides nucléiques	68
2.1.1	ADN génomique de levure.....	68
2.1.2	ARN de levure.....	68
2.1.3	ADN plasmidique d' <i>Escherichia coli</i> .....	68
2.2	Dosage des acides nucléiques	69
2.3	Amplification de séquences d'ADN génomique par PCR	69
2.4	Séquençage nucléotidique	70
2.5	Rétrotranscription	70
2.6	Digestions enzymatiques	70
2.7	Techniques de clonage	71
2.8	Transformation des levures	71
2.9	Southern Blot	71
2.10	Electrophorèse sur gel d'agarose	72
3	Constructions moléculaires pour l'inactivation de gènes.....	72
3.1	Technique « <i>URA3</i> blaster »	72
3.2	Technique « cœur de gène »	74
3.3	Technique « PCR chevauchante »	75
4	Caractérisation phénotypique.....	76
4.1	Etude de l'assimilation <i>in vitro</i> des sources de carbone	76
4.2	Profils lipidiques	76
4.2.1	Analyse des acides gras.....	76

4.2.2	Analyse des lipides neutres .....	76
4.3	Etude de la pseudofilamentation .....	77
4.4	Etude de la reproduction sexuée .....	77
4.5	Infection de macrophages .....	77
4.6	Infection sur modèle murin .....	78
5	Etude de la $\beta$ -oxydation des acides gras .....	78
5.1	Purification de fractions peroxysomales et mitochondriales à l'aide d'un gradient discontinu de saccharose .....	78
5.2	Purification de mitochondries .....	79
5.3	Dosages enzymatiques réalisés sur les fractions peroxysomales et mitochondriales .....	80
5.4	Catabolisme du $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA .....	80
5.5	Respiration mitochondriale .....	81
5.6	Immunodétection des protéines Fox2p et Icl1p par Western-Blot .....	81
6	Analyses bioinformatiques et statistiques .....	81

## **RESULTATS ..... 83**

### **- Partie I - Démonstration de l'existence d'une $\beta$ -oxydation mitochondriale Fox2p-dépendante chez *Candida lusitaniae* ..... 84**

#### Introduction ..... 85

#### 1 Manuscrit de l'article : A Fox2-dependent fatty acid $\beta$ -oxidation pathway coexists in both peroxisomes and mitochondria of the ascomycete opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitaniae* ..... 87

#### 2 Données complémentaires..... 112

##### 2.1 Construction, caractérisation génotypique et phénotypique du mutant *fox2 $\Delta$ \_cl*, et des doubles mutants *fox2 $\Delta$ pxa1 $\Delta$* , *fox2 $\Delta$ \_cl pxa1 $\Delta$* ..... 112

###### 2.1.1 Construction d'un deuxième mutant *fox2 $\Delta$ (fox2 $\Delta$ \_cl)*..... 112

###### 2.1.2 Construction du mutant *fox2 $\Delta$ \_EL*..... 112

###### 2.1.3 Construction du mutant *fox2 $\Delta$ \_cl*..... 114

###### 2.1.4 Construction des doubles mutants *fox2 $\Delta$ pxa1 $\Delta$* et *fox2 $\Delta$ \_cl pxa1 $\Delta$* ..... 114

###### 2.1.5 Caractérisation génotypique des mutants ..... 115

###### 2.1.5.1 Caractérisation génotypique des mutants par PCR ..... 115

###### 2.1.5.2 Caractérisation génotypique des mutants par Southern Blot ..... 116

###### 2.1.6 Etude de l'assimilation *in vitro* des sources de carbone..... 117

###### 2.1.7 Profils lipidiques ..... 118

###### 2.1.7.1 Etude des lipides neutres ..... 118

###### 2.1.7.2 Analyse des acides gras contenus dans les phospholipides et les triacylglycérols ..... 118

###### 2.1.8 Pseudofilamentation ..... 122

###### 2.1.9 Reproduction sexuée ..... 123

##### 2.2 Etude de la $\beta$ -oxydation des acides gras ..... 123

###### 2.2.1 Etude du catabolisme du $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA ..... 123

###### 2.2.2 Etude de la respiration mitochondriale sur mitochondries purifiées ..... 124

##### 2.3 Etude de virulence des mutants *icl1 $\Delta$* et *fox2 $\Delta$* ..... 127

###### 2.3.1 Infection de macrophages..... 127

2.3.2 Infection sur modèle murin .....	128
Conclusion sur les données complémentaires au manuscrit .....	132

## **- Partie II - Etude fonctionnelle des gènes *FOX1* et *FOX3* chez *Candida lusitanae* ..... 134**

Introduction .....	135
1 Identification des gènes <i>FOX1</i> et <i>FOX3</i> .....	136
2 Analyses transcriptomiques par RT-PCR .....	138
3 Invalidation des gènes <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> et <i>FOX3-2</i> .....	144
3.1 Construction du double mutant [ <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> ]Δ et du triple mutant [ <i>fox1a</i> , <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> ]Δ .....	146
3.2 Construction du double mutant [ <i>fox3-1</i> , <i>fox3-2</i> ]Δ .....	147
4 Caractérisation génotypique des souches <i>fox1</i> Δ et <i>fox3</i> Δ par PCR.....	147
5 Etude de l'assimilation des sources de carbone par les souches mutantes.....	149
6 Composition en acides gras.....	150
7 Pseudofilamentation .....	152
8 Reproduction sexuée .....	154
Conclusion.....	155

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 157**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 160**

### **Liste des Figures**

Figure 1. Représentation schématique des différents mécanismes d'oxydation des acides gras..	16
Figure 2. Nomenclature des acides gras : exemple de l'acide palmitoléique, acide <i>cis</i> -9-hexadécénoïque, C16:1(Δ9) ou C16:1(ω-7).....	17
Figure 3. La β-oxydation des acides gras.....	22
Figure 4. Description schématique des enzymes requises préalablement au catabolisme des acides gras saturés et insaturés par la β-oxydation.....	29
Figure 6. La β-oxydation mitochondriale chez les mammifères.....	33
Figure 7. Organisation supramoléculaire de la β-oxydation mitochondriale de mammifères .....	34
Figure 8. Représentation schématique de la β-oxydation peroxysomale chez l'Homme .....	39
Figure 9. La β-oxydation peroxysomale des acides gras saturés chez <i>S. cerevisiae</i> .....	41
Figure 10. Organisation des enzymes impliquées dans l'α-oxydation de l'acide phytanoïque dans les peroxysomes de mammifères. ....	43
Figure 11. Oxygénation de l'acide linoléique catalysée par l'α-dioxygénase .....	44
Figure 12. Formation des acides dicarboxyliques à partir des acides monocarboxyliques par ω-oxydation et leur dégradation secondaire par la β-oxydation dans les cellules de mammifères.....	45
Figure 13. Organisation des voies d'ω-oxydation et de β-oxydation dans les cellules de levures industrielles. ....	46
Figure 14. Réactions enzymatiques des cycles du glyoxylate et des acides tricarboxyliques. ....	47
Figure 15. Transduction du signal farnésol chez <i>Candida albicans</i> . ....	50

Figure 16. Voies de biosynthèse des prostaglandines et leucotriènes chez les mammifères. ....	52
Figure 17. Schéma simplifié de la régulation de la $\beta$ -oxydation, du cycle du glyoxylate, de la néoglucogénèse et de la glycolyse chez <i>Aspergillus nidulans</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ...	55
Figure 18. Répartition par espèce des 409 souches de <i>Candida</i> spp. responsables des 391 épisodes de candidémie diagnostiqués au CHU de Bordeaux de 2005 à 2010.....	59
Figure 19. Invalidation du gène <i>ICL1</i> selon la stratégie « <i>URA3</i> blaster ». ....	73
Figure 20. Invalidation du gène <i>PXA1</i> selon la stratégie « cœur de gène ». ....	75
Figure 21. Purification de fractions peroxysomales et mitochondriales à l'aide d'un gradient discontinu de saccharose. ....	79
Figure 22. Carte du locus <i>FOX2</i> .....	112
Figure 23. Invalidation de la totalité de la séquence codante de <i>FOX2</i> chez le mutant <i>fox2<math>\Delta</math>_cl</i> selon la stratégie de PCR chevauchante. ....	113
Figure 24. Caractérisation génotypique par PCR des loci <i>FOX2</i> et <i>URA3</i> de la souche sauvage et des mutants <i>fox2<math>\Delta</math>::GUN</i> , <i>fox2<math>\Delta</math>_EL</i> et <i>fox2<math>\Delta</math>_cl</i> . ....	116
Figure 25. Caractérisation génotypique par Southern Blot des loci <i>FOX2</i> et <i>URA3</i> . ....	117
Figure 26. Composition en lipides neutres des souches sauvage, <i>fox2<math>\Delta</math></i> et <i>pxa1<math>\Delta</math></i> . ....	119
Figure 27. Composition des phospholipides (A) et des triacylglycérols (B) en acides gras des souches sauvage, <i>fox2<math>\Delta</math></i> et <i>pxa1<math>\Delta</math></i> après culture sur acide palmitique. ....	120
Figure 28. Pseudofilamentation de la souche sauvage 6936, des mutants <i>icl1<math>\Delta</math></i> , <i>fox2<math>\Delta</math></i> et <i>fox2<math>\Delta</math>_cl</i> et des révertant <i>ICL1Re</i> et <i>FOX2Re</i> sur milieu solide YCB. ....	122
Figure 29. Mesure de l'élongation des pseudofilaments de la souche sauvage 6936, des mutants <i>icl1<math>\Delta</math></i> , <i>fox2<math>\Delta</math></i> et <i>fox2<math>\Delta</math>_cl</i> et des révertant <i>ICL1Re</i> et <i>FOX2Re</i> sur milieu solide YCB pendant 72h. ....	123
Figure 30. Activité de catabolisme du $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA dans les fractions peroxysomale et mitochondriale de la souche sauvage 6936. ....	124
Figure 31. Respiration mitochondriale (oxymétrie) observée pour les mitochondries purifiées de la souche sauvage 6936 en présence de NADH comme substrat respiratoire. ....	125
Figure 32. Consommation d'oxygène par les mitochondries purifiées de la souche sauvage 6936 en présence de palmitoyl-CoA comme substrat respiratoire. ....	126
Figure 33. Observation de cocultures de macrophages murins J774.1 avec la souche sauvage 6936 de <i>C. lusitaniae</i> en microscopie optique inversée avec contraste de phase (x400), 5 heures après le début de l'infection. ....	127
Figure 34. Infection <i>in vitro</i> de macrophages murins J774.1 avec les mutants <i>icl1<math>\Delta</math></i> et <i>fox2<math>\Delta</math></i> , les révertants <i>ICL1Re</i> et <i>FOX2Re</i> et la souche sauvage 6936 de <i>C. lusitaniae</i> . ....	129
Figure 35. Etude de la viabilité des mutants <i>icl1<math>\Delta</math></i> et <i>fox2<math>\Delta</math></i> , des révertants <i>ICL1Re</i> et <i>FOX2Re</i> et de la souche sauvage 6936 de <i>C. lusitaniae</i> à différents temps d'infection macrophagique. ....	129
Figure 36. Apposition d'organe prélevé chez une souris infectée par le mutant <i>fox2<math>\Delta</math></i> de <i>C. lusitaniae</i> . ....	130
Figure 37. Représentation de Kaplan-Meier de la probabilité de survie des souris infectées par les différentes souches de <i>C. lusitaniae</i> . ....	130
Figure 38. Locus <i>FOX3-2</i> portant sur le brin plus le cadre ouvert de lecture CLUG_04482 et sur le brin moins le cadre de lecture CLUG_04881. ....	137
Figure 39. Alignement des séquences nucléotidiques des gènes <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> et <i>FOX1c</i> de <i>C. lusitaniae</i> . ....	140
Figure 40. Alignement des séquences nucléotidiques des gènes <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2a</i> et <i>FOX3-2b</i> de <i>C. lusitaniae</i> . ....	141
Figure 41. Séquence nucléotidique du locus <i>FOX3-2</i> de <i>C. lusitaniae</i> . ....	142
Figure 43. Induction des gènes <i>FOX1</i> et <i>FOX3</i> chez les souches sauvage 6936 et mutante <i>fox2<math>\Delta</math></i> de <i>C. lusitaniae</i> après culture sur un milieu contenant un acide gras comme seule source de carbone (acide palmitique C16:0 ou acide oléique C18:1).. ....	144
Figure 44. Invalidation de la totalité de la séquence codante de <i>FOX1a</i> selon la technique de PCR chevauchante. ....	145

Figure 45. Construction de la cassette de délétion pour l'obtention du double mutant [ <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> ] $\Delta$ selon la stratégie de PCR chevauchante..	146
Figure 46. Caractérisation génotypique par PCR des loci <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> et <i>URA3</i> de la souche sauvage 6936 et des mutants <i>fox1b</i> $\Delta$ , [ <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> ] $\Delta$ , <i>ura3</i> $\Delta$ et [ <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> ] $\Delta$ .	148
Figure 47. Composition en acides gras des souches sauvages, mutantes <i>fox1b</i> $\Delta$ , <i>fox2</i> $\Delta$ , <i>pxa1</i> $\Delta$ et <i>fox3</i> $\Delta$ .	151
Figure 48. Pseudofilamentation de la souche sauvage 6936, des mutants <i>fox3</i> $\Delta$ (panneau a) et des mutants <i>fox1</i> $\Delta$ (panneau b) sur milieu solide YCB.	153
Figure 49. Mesure de l'élongation des pseudofilaments de la souche sauvage 6936 et des mutants <i>fox1</i> $\Delta$ et <i>fox3</i> $\Delta$ sur milieu solide YCB pendant 72h.	153
Figure 50. Etude de la reproduction sexuée chez <i>C. lusitaniae</i> .	154

## Liste des Tableaux

Tableau 1. Principaux acides gras saturés et insaturés retrouvés à l'état naturel	18
Tableau 2. Gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras chez <i>Escherichia coli</i>	32
Tableau 3. Principales espèces de <i>Candida</i> rencontrées en pathologie humaine	58
Tableau 4. Souches de <i>C. lusitaniae</i> utilisées au cours de ce travail.	62
Tableau 5. Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.	65
Tableau 6. Mélanges réactionnels et paramètres de l'amplification par PCR selon les enzymes utilisées.	70
Tableau 7. Répartition des différents acides gras entre les phospholipides (PL) et les triacylglycérols (TAG).	121
Tableau 8. Rapport acides gras saturés / acides gras insaturés	121
Tableau 9. Quantification de l'effet détergent du palmitoyl-CoA sur les mitochondries purifiées de la souche sauvage.	126
Tableau 10. Analyse statistique du temps de survie des souris infectées par les souches mutantes <i>icl1</i> $\Delta$ et <i>fox2</i> $\Delta$ , révertantes <i>ICL1Re</i> et <i>FOX2Re</i> et sauvage 6936 de <i>C. lusitaniae</i> .	131
Tableau 11. Pourcentages d'identité et de similarité entre les protéines Fox1p de <i>C. lusitaniae</i> et celles de <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> et <i>Y. lipolytica</i> .	136
Tableau 12. Pourcentages d'identité et de similarité entre les protéines Fox3-1p, Fox3-2ap, Fox3-2bp de <i>C. lusitaniae</i> et Fox3p de <i>C. albicans</i> .	137
Tableau 13. Caractéristiques des fragments amont et aval amplifiés pour l'inactivation des gènes <i>FOX1</i> et <i>FOX3</i> .	145
Tableau 14. Etude de l'assimilation des sources de carbone des souches mutantes, révertantes et sauvage à 30°C et 37°C.	149

## Liste des publications et des communications

### ☛ dans le cadre du Doctorat (effectué au sein de l'UMR CNRS 5234, équipe *Candida* et Pathogénicité) :

▪ **Gabriel F., Accoceberry I., Bessoule J.J., Manon S., Noël T.**, 2011. "Novel Beta-oxidation pathway and hemiascomycetes yeast mutants", *European Patent EP11159920.5* (déposé le 25 mars 2011). Déposants : Université de Bordeaux, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux.

▪ **Gabriel F., Accoceberry I., Bessoule J.J., Manon S., El-Kirat Chatel S., Dementhon K., Noël T.**, « A Fox2p-dependent fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway coexists in both peroxisomes and mitochondria of the ascomycete opportunistic yeast *Candida lusitaniae*. (soumission).

#### ▪ Communications écrites :

- **Gabriel F., Noël T., Accoceberry I.** "Functional characterisation of two genes involved in peroxisomal metabolism in *Candida lusitaniae*." 5e Congress on Trends in Medical Mycology, Valencia, oct 2011.

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

⇒ **Prix poster** de la Journée Scientifique 2007 de l'IFR 66 Pathologie Infectieuse et Cancer.

### ☛ dans le cadre de la recherche appliquée liée aux activités hospitalières :

▪ **Gabriel F., Noël T., Accoceberry I.** Fatal invasive trichosporonosis due to *Trichosporon loubieri* in a patient with a T-lymphoblastic lymphoma. *Med Mycol.* 2011; **49**(3): 306-10.

▪ **Gabriel F., Noël T., Accoceberry I.** *Lindnera (Pichia) fabianii* blood infection after mesenteric ischemia. *Med Mycol* 2012; **50**(3): 310-4

#### ▪ Communications écrites internationales :

- **Noël T., Pujol S., Fitton-Ouhabi V., El-Kirat-Chatel S., Gabriel F., Brèthes D., Dementhon K., Accoceberry I.** "Characterisation of transporters of the Nucleobase Cation Symporter family in *Candida lusitaniae* and of their possible role in fluoropyrimidines and fluconazole antagonism." 5e Congress on Trends in Medical Mycology, Valencia, oct 2011.

- **Lacroix C., Gicquel A., Morio F., Lambert J., Accoceberry I., Bailly E., Desoubreaux G., Collin E., Feghoul L., François N., Gabriel F., Gay-Andrieu F., Guitard J., Hennequin C., Kauffmann-Lacroix C., Lauzin D., Sendid B., Lortholary O., Bougnoux M.E.** "Differences in diversity and susceptibility of *Candida* species isolated from clinical samples in intensive care and haematology units in 8 French university hospitals". 5e Congress on Trends in Medical Mycology, Valencia, oct 2011.

- **Lacroix C., Gicquel A., Morio J., Accoceberry I., Bailly E., Desoubeaux G., Collin E., Feghoul L., François N., Gabriel F., Gay Andrieu F., Guitard J., Hennequin C., Kauffmann Lacroix C., Lauzin D., Sendid B., Lortholary O., Bournoux M.E.** “Comparative epidemiology of *Candida* spp. isolated from deep and superficial sites in intensive care, haematology and renal transplant patients during a 2-months period in 8 French hospitals”. 21e European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Milano, mai 2011.
- **Guisset O., D'almeida M., Goux X., Gabriel F., Gruson D., Accoceberry I.** « A positive real-time PCR *Pneumocystis jiroveci* assay in Intensive Care Unit (ICU) patients: what can be done? » 23<sup>e</sup> congrès annuel de l'European Society of Intensive Care Medicine, Barcelona, oct 2010

## Liste des Abréviations

<b>5FOA</b>	acide 5-fluoro-orotique
<b>aa</b>	acides aminés
<b>ABC</b>	ATP-binding cassette
<b>ABCD1</b>	adrenoleucodystrophy protein
<b>ABCD2</b>	adrenoleucodystrophy related protein
<b>ACAD-9</b>	acyl-CoA déshydrogénase 9
<b>ACD</b>	acyl-CoA déshydrogénase
<b>ACS</b>	acyl-CoA synthétase
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	acide désoxyribonucléique complémentaire de l'ARN messager
<b>ACO</b>	acyl-CoA oxydase
<b>ADP</b>	adénosine diphosphate
<b>AG</b>	acide gras
<b>AMP</b>	adenine monophosphate
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>BET</b>	bromure d'éthidium
<b>BSA</b>	albumine sérique de bovin
<b>°C</b>	degré Celsius
<b>CCCP</b>	carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone
<b>CBS</b>	Centraalbureau voor schimmelcultures
<b>CFU</b>	Colony forming units
<b>CHU</b>	Centre Hospitalier et Universitaire
<b>CoA</b>	coenzyme A
<b>CoQ</b>	coenzyme Q
<b>CPT1</b>	carnitine palmitoyl-transférase I
<b>CPT2</b>	carnitine palmitoyl-transférase II
<b>Da, kDa</b>	Dalton, kiloDalton
<b>DECI</b>	$\Delta_{3,5}, \Delta_{2,4}$ -diénoyl-CoA isomérase
<b>DECR</b>	2,4-diénoyl-CoA réductase
<b>DEPC</b>	diethylpyrocarbonate
<b>dNTP</b>	désoxyribonucléoside triphosphate où N représente une des 4 bases adénosine, cytidine, guanosine et thymidine
<b>DO<sub>x</sub></b>	densité optique où x représente la longueur d'onde
<b>DPP3</b>	farnesyl-pyrophosphate phosphatase
<b>DRS</b>	domaine riche en stérol
<b>ECH</b>	énoyl-CoA hydratase
<b>ECH-1</b>	énoyl-CoA hydratase de type I
<b>ECH-2</b>	énoyl-CoA hydratase de type II
<b>ECI</b>	$\Delta_{3}, \Delta_{2}$ -énoyl-CoA isomérase
<b>EDTA</b>	acide éthylène diamine tétraacétique
<b>FAD</b>	flavine adénine dinucléotide
<b>FOX1</b>	acyl-CoA oxydase
<b>FOX2</b>	protéine multifonctionnelle de la $\beta$ -oxydation peroxysomale
<b>FOX3</b>	3-kétoacyl-CoA thiolase
<b>g, mg, <math>\mu</math>g</b>	gramme, milligramme, microgramme
<b>g</b>	accélération de la pesanteur
<b>GPI</b>	glycosyl-phosphatidylinositol
<b>h</b>	heure

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxyde d'hydrogène
<b>HAD</b>	3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
<b>IPTG</b>	isopropylthiogalactoside
<b>ICL1</b>	isocitrate lyase
<b>KAS</b>	β-kétoacyl- acyl carrier protein synthase
<b>KAT</b>	3-ketoacyl-CoA thiolase
<b>KCN</b>	cyanure de potassium
<b>L, ml, µl</b>	litre, millilitre, microlitre
<b>LCAD</b>	long chain acyl-CoA dehydrogenase
<b>LT</b>	leucotriènes
<b>M, mM, µM</b>	molaire, millimolaire, micromolaire
<b>MCAD</b>	medium chain acyl-CoA dehydrogenase
<b>MFE-1</b>	protéine multifonctionnelle de la β-oxydation peroxysomale de type I
<b>MFE-2</b>	protéine multifonctionnelle de la β-oxydation peroxysomale de type II
<b>m/v</b>	masse/volume
<b>MGG</b>	May-Grünwald Giemsa
<b>min</b>	minute
<b>MLS</b>	malate synthase
<b>NAD</b>	nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NADP</b>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>nt</b>	nucléotide
<b>pb, kpb, Mb</b>	paire de bases, mille paire de bases, mégabase
<b>PBS</b>	phosphate buffer saline
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PEX</b>	peroxine
<b>PG</b>	prostaglandine
<b>PGE2</b>	prostaglandine E2
<b>pH</b>	potentiel d'hydrogène
<b>PL</b>	phospholipides
<b>POX</b>	acyl-CoA oxydase
<b>PXA1</b>	protéine d'import peroxysomal des acides gras à longue chaîne
<b>PTS</b>	peroxisomal targeting sequence
<b>OLE</b>	stearoyl-CoA desaturase
<b>ORF</b>	open reading frame
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription – polymerase chain reaction
<b>SCAD</b>	short chain acyl-CoA dehydrogenase
<b>SCHAD</b>	short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
<b>SCP2</b>	sterol carrier protein 2
<b>SCPx</b>	SCP2-3-kétoacyl-CoA thiolase
<b>TAG</b>	triacylglycérols
<b>TPP</b>	thiamine pyrophosphate
<b>Tris</b>	tris-hydroxyméthyl-aminoéthane
<b>TX</b>	thromboxane
<b>URA3</b>	orotidine-5'-phosphate décarboxylase
<b>V</b>	Volt
<b>VLCAD</b>	very long chain acyl-CoA dehydrogenase
<b>v/v</b>	volume/volume
<b>X-Gal</b>	5-dibromo 4-chloro 3-indolyl !-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. Même si *Candida albicans* reste l'espèce la plus impliquée, on observe actuellement une augmentation de la proportion des candidémies dues à des espèces de *Candida non-albicans* (Horn *et al.*, 2009; Miceli *et al.*, 2011; Pfaller *et al.*, 2010b). Parmi celles-ci, *Candida lusitaniae* est de plus en plus fréquemment isolée chez les patients immunodéprimés, en particulier en oncologie. A titre d'exemple, elle représente sur la période 2005-2010 la 5<sup>ème</sup> espèce responsable de candidémie au CHU de Bordeaux, et la 2<sup>ème</sup> en oncologie. 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 spp.* est donc nécessaire à la fois pour définir de nouvelles cibles pour les molécules antifongiques et pour permettre une meilleure prise en charge des patients. La plupart des études réalisées concernent la caractérisation des facteurs impliqués dans la pathogénicité de *C. albicans* et sa capacité à survivre et à croître dans un environnement hostile (Brown *et al.*, 2007; Hiller *et al.*, 2011; Hube, 2006; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Kim & Sudbery, 2011; Martin *et al.*, 2011).

Au cours d'une infection à *Candida spp.*, les cellules phagocytaires des lignées monocytaire et neutrophile sont essentielles à la défense de l'organisme contre ces pathogènes opportunistes. La lyse éventuelle des *Candida spp.* par les phagocytes dans les phagolysosomes met en jeu des mécanismes oxydatifs et enzymatiques (Nicola *et al.*, 2008). Cependant, *in vitro*, *C. albicans* (Lorenz *et al.*, 2004) ou *C. glabrata* (Roetzer *et al.*, 2010) sont capables de résister à la phagocytose. Grâce à son dimorphisme cellulaire lui permettant de filamenter après son internalisation, *C. albicans* finit par percer le macrophage (El Kirat-Chatel, 2010; Lorenz *et al.*, 2004), tandis que *C. glabrata* se multiplie à l'intérieur du macrophage, qui finit par éclater en libérant les levures (El Kirat-Chatel, 2010; Roetzer *et al.*, 2010).

L'équipe « *Candida* et pathogénicité » de l'UMR CNRS 5234 s'intéresse aux facteurs qui permettent aux levures de résister à la phagolyse macrophagique, en particulier les facteurs nutritionnels. En effet, la survie et la multiplication des levures à l'intérieur des macrophages nécessite un apport important en énergie et en nutriment. Le phagocyte possédant un réseau membranaire et endo-membranaire très développé, l'hypothèse défendue par notre équipe est que les lipides, et en particulier les acides gras, pourraient constituer une ressource énergétique privilégiée pour la levure afin de résister à la phagocytose. Chez les levures Ascomycètes, le catabolisme des acides gras, qui s'effectue par  $\beta$ -oxydation, est présumé être exclusivement localisé dans les peroxyosomes (Hiltunen *et al.*, 2003; Kunau *et al.*, 1995; Shen & Burger, 2009).

Plusieurs auteurs ont étudié le rôle du métabolisme peroxyosomal dans la virulence de *C. albicans* (Lorenz & Fink, 2001, 2002; Piekarska *et al.*, 2006). Après internalisation dans le macrophage, *C. albicans* reprogramme son métabolisme et son profil transcriptionnel est alors similaire à celui observé dans un contexte de carence nutritionnelle (Lorenz *et al.*, 2004) : la glycolyse est réprimée tandis que le cycle du glyoxylate et la  $\beta$ -oxydation, voies métaboliques permettant l'assimilation de sources de carbone non-fermentables, sont simultanément activées (Lorenz *et al.*, 2004; Prigneau *et al.*, 2003). Il a été clairement démontré que le cycle du glyoxylate était un facteur de virulence impliqué dans la résistance de *C. albicans* à la phagolyse macrophagique (Lorenz & Fink, 2001). Par contre, le rôle joué par la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la pathogénicité reste controversé (Piekarska *et al.*, 2006; Ramírez & Lorenz, 2007). Par ailleurs, le rôle du métabolisme peroxyosomal dans la virulence des *Candida non-albicans* n'a jusqu'à présent pas été exploré.

Notre équipe a pour objectif de caractériser le rôle de la  $\beta$ -oxydation des acides gras de la levure pathogène émergente *C. lusitaniae* au cours de son interaction avec les macrophages.

Pour débiter nos travaux, nous avons choisi d'inactiver trois gènes afin de bloquer le cycle du glyoxylate (*ICLI*), la  $\beta$ -oxydation peroxysomale (*FOX2*) et l'import peroxysomal des acides gras à longue chaîne carbonée (*PXA1*) chez *C. lusitaniae*. La caractérisation du phénotype des mutants obtenus par recombinaison homologue et le développement de plusieurs approches (fractionnement cellulaire, immunolocalisation, mesure de la respiration mitochondriale) nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois chez une levure Ascomycète, une voie mitochondriale de  $\beta$ -oxydation. Nous démontrons également pour la première fois chez un organisme eucaryote, la double localisation peroxysomale et mitochondriale de la protéine multifonctionnelle peroxysomale de la  $\beta$ -oxydation (Fox2p). Nous avons par ailleurs démontré qu'il existe chez *C. lusitaniae* une voie peroxysomale de catabolisme des acides gras indépendante de *FOX2*. Ces travaux originaux, qui ont fait l'objet d'une demande de Brevet Européen et d'un article en soumission, sont présentés dans la partie I des résultats.

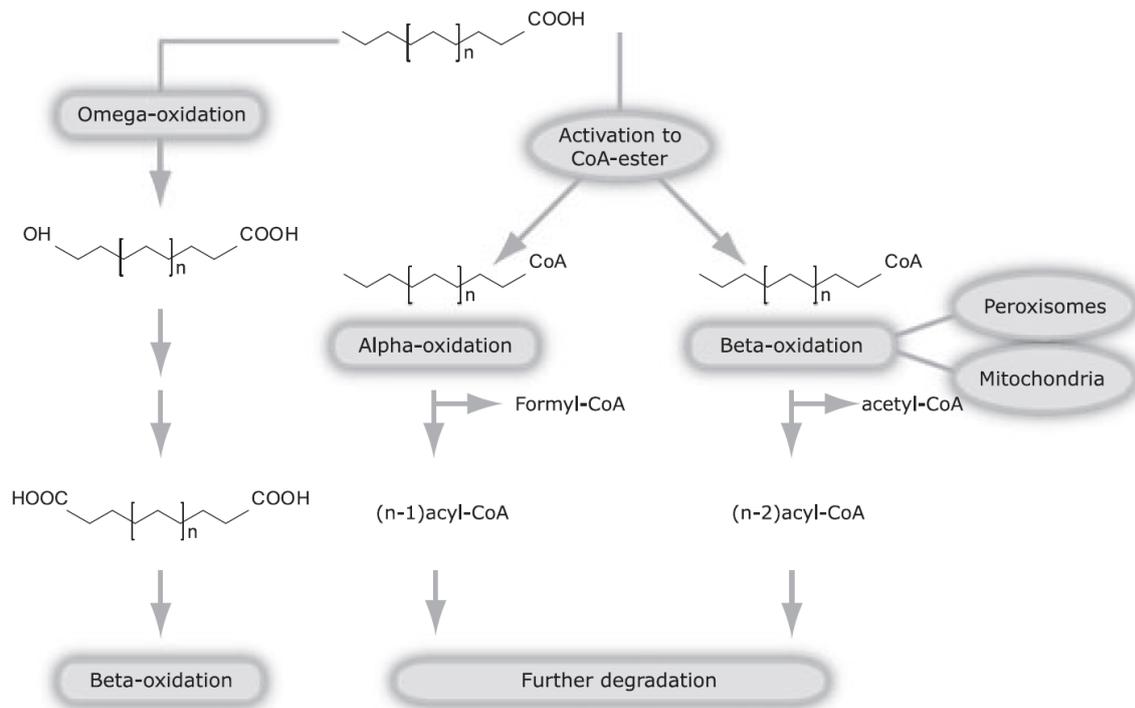
Dans un deuxième temps, nous avons poursuivi la caractérisation de la  $\beta$ -oxydation de *C. lusitaniae*, à travers l'étude fonctionnelle des gènes *FOX1* (codant pour l'acyl-CoA oxydase) et *FOX3* (codant pour la 3-kétoacyl-CoA thiolase). L'identification de 3 paralogues pour chacun des gènes chez *C. lusitaniae* nous a conduits à réaliser une étude de leur expression par RT-PCR semi-quantitative. Leur invalidation, tout comme celle de *FOX2*, n'a pas permis de bloquer l'assimilation des acides gras chez *C. lusitaniae*, ce qui confirme l'existence d'une voie alternative de catabolisme des acides gras. Les profils lipidiques et les capacités de pseudofilamentation et de reproduction sexuée des différentes souches obtenues ont également été déterminés. Ces résultats sont présentés dans la partie II des résultats.

Au préalable, la première partie est consacrée à une revue bibliographique présentant les voies du catabolisme lipidique, principalement chez les organismes eucaryotes et en particulier chez les organismes fongiques, et le rôle joué par les lipides dans la structure, dans la morphogénèse et en tant que molécules signal chez les champignons.

# 1 Catabolisme lipidique

Les lipides sont une importante source d'énergie pour les organismes vivants. A titre d'exemple, la dégradation complète chez le mammifère d'une seule molécule d'acide palmitique produit 130 molécules d'adénosine-triphosphate (ATP).

La principale voie de catabolisme lipidique chez les mammifères, les plantes, les organismes fongiques et les bactéries est la  $\beta$ -oxydation des acides gras. D'autres voies de dégradation, comme l' $\alpha$ - et l' $\omega$ -oxydation, existent mais elles sont minoritaires (**Figure 1**).



**Figure 1. Représentation schématique des différents mécanismes d'oxydation des acides gras (Wanders *et al.* 2011).**

## 1.1 Les lipides : définitions et nomenclature

Les lipides sont caractérisés par leur solubilité, nulle ou faible dans l'eau, élevée dans les solvants organiques apolaires (méthanol, chloroforme, hexane, diéther, acétone...). Ce sont des molécules organiques qui peuvent être complètement apolaires (lipides neutres) ou bien bipolaires (molécules amphiphiles, avec une tête polaire liée à une chaîne fortement apolaire).

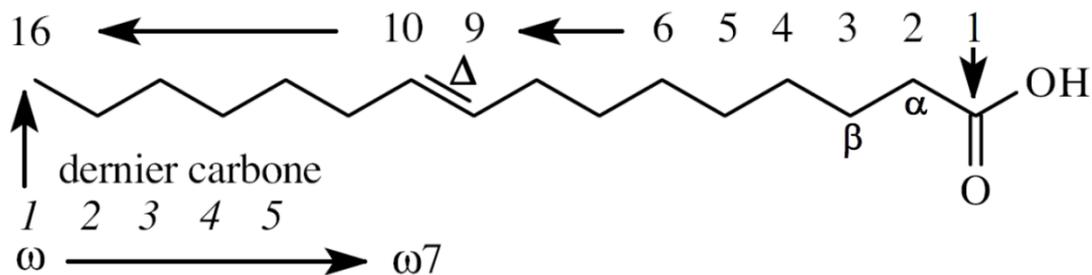
On peut distinguer deux grandes catégories de lipides : ceux à base d'acides gras (parfois appelés « lipides vrais ») et ceux à base d'isoprènes (isoprénides, polyisopréniques), dont font notamment partie les terpènes et les stéroïdes.

## 1.1.1 Les lipides à base d'acides gras

### 1.1.1.1 Les acides gras

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques R-COOH, dont le radical R est une chaîne aliphatique. Les AG sont dits insaturés, lorsqu'ils contiennent une ou des doubles liaisons. Dans le cas contraire, on parle d'AG saturés. Les AG naturels sont très largement monocarboxyliques, linéaires et comportent un nombre pair de carbones. La biosynthèse des AG s'effectue en effet par l'ajout de molécules à deux carbones (acétyl-CoA) au niveau du groupement carboxyle.

L'International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry Commission on Biochemical Nomenclature (1968, 1976) a fixé les règles de la nomenclature des AG (**Figure 2**) : la classification systématique indique le nombre de carbones, le nombre, la position et la configuration (*cis* ou *trans*) des doubles liaisons ( $\Delta$ ).



**Figure 2.** Nomenclature des acides gras : exemple de l'acide palmitoléique, acide *cis*-9-hexadécénoïque, C16:1( $\Delta_9$ ) ou C16:1( $\omega-7$ )

Selon cette nomenclature internationale, le carbone du groupement carboxyle est toujours numéroté 1. Une méthode d'identification alternative consiste à attribuer aux atomes de carbone adjacents au carbone 1 les lettres de l'alphabet grec. Le carbone 2 est ainsi le carbone  $\alpha$ , le carbone 3 le carbone  $\beta$ , ... La lettre  $\omega$  désigne toujours le dernier carbone de la chaîne aliphatique, c'est à dire le carbone du groupement méthyle terminal (-CH<sub>3</sub>). La position d'une double liaison peut ainsi être indiquée à partir du carbone 1 (ex :  $\Delta_9$ ) ou du carbone  $\omega$  (ex :  $\omega-3$ ). La plupart des AG naturels possèdent des noms d'usage (**Tableau 1**).

La figure 2 donne l'exemple de l'acide palmitoléique, AG à 16 carbones, appelé acide *cis*-9-hexadécénoïque ou C16:1( $\Delta_9$ ) en nomenclature internationale, mais également C16:1  $\omega-7$  selon la classification  $\omega$  utilisée en nutrition.

**Tableau 1. Principaux acides gras saturés et insaturés retrouvés à l'état naturel (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry Commission on Biochemical Nomenclature ; Cuvelier *et al.* 2004).**

Symbole (nomenclature normalisée)	Symbole (nomenclature oméga)	Structure chimique	Nom systématique de l'acide	Nom commun de l'acide
C1 : 0		<b>Acides gras saturés</b> CH <sub>3</sub> COOH	Méthanoïque	formique
C2 : 0	C1 : 0	CH <sub>3</sub> COOH	Éthanoïque	acétique
C3 : 0	C2 : 0	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH	Propanoïque	propionique
C4 : 0	C3 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	Butanoïque	butyrique
C5 : 0	C4 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Pentanoïque	valérique
C5 : 0 iso	C5 : 0 iso	CH <sub>3</sub> CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> COOH	Méthyl-3 butanoïque	isovalérique
C6 : 0	C6 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Hexanoïque	caproïque
C7 : 0	C7 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> COOH	Heptanoïque	énanthique
C8 : 0	C8 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	Octanoïque	caprylique
C9 : 0	C9 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	Nonanoïque	pélargonique
C10 : 0	C10 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	Décanoïque	caprique
C12 : 0	C12 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	Dodécanoïque	laurique
C14 : 0	C14 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	Tétradécanoïque	myristique
C16 : 0	C16 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	Hexadécanoïque	palmitique
C18 : 0	C18 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	Octadécanoïque	stéarique
C20 : 0	C20 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH	icosanoïque <sup>1</sup>	arachidique
C22 : 0	C22 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> COOH	Docosanoïque	béhenique
C24 : 0	C24 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> COOH	Tétracosanoïque	lignocérique
C26 : 0	C26 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>24</sub> COOH	Hexacosanoïque	cérotique
C28 : 0	C28 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>26</sub> COOH	Octacosanoïque	montanique
C30 : 0	C30 : 0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>28</sub> COOH	Tricotanoïque	mélissique
C12 : 1 (9)	C12 : 1 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	<b>Acides gras insaturés monoinsaturés</b> <i>cis</i> -9-dodécénoïque	lauroléique
C14 : 1 (9)	C14 : 1 ω-5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	<i>cis</i> -9-tétradécénoïque	myristoléique
C16 : 1 (9)	C16 : 1 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	<i>cis</i> -9-hexadécénoïque	palmitoléique
C18 : 1 (trans 6)	C18 : 1 ω-12	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	<i>trans</i> -6-octadécénoïque	pérossélaïdique
C18 : 1 (9)	C18 : 1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	<i>cis</i> -9-octadécénoïque	oléique
C18 : 1 (trans 9)	C18 : 1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	<i>trans</i> -9-octadécénoïque	élaïdique
C18 : 1 (11)	C18 : 1 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	<i>cis</i> -11-octadécénoïque	vaccénique
C18 : 1 (trans 11)	C18 : 1 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	<i>trans</i> -11-octadécénoïque	<i>trans</i> vaccénique
C20 : 1 (9)	C20 : 1 ω-11	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	<i>cis</i> -9-icosénoïque <sup>(1)</sup>	gadoléique
C22 : 1 (11)	C22 : 1 ω-11	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	<i>cis</i> -11-docosénoïque	cétoleïque
C22 : 1 (13)	C22 : 1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH	<i>cis</i> -13-docosénoïque	éruïque
C24 : 1 (15)	C24 : 1 ω-9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	<i>cis</i> -15-tétracosénoïque	sélaçoléique
C18 : 2 (9,12)	C18 : 2 ω-6	<b>polyinsaturés</b> CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	<i>cis,cis</i> -9,12-octadécadiénoïque	linoléique
C18 : 2 (9,trans 11)	C18 : 2 ω-7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CHCH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	<i>cis,trans</i> -9,11-octadécadiénoïque	linoléique conjugué <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 ou ruménique
C18 : 2 (trans 10,12)	C18 : 2 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	<i>trans,cis</i> -10,12-octadécadiénoïque	linoléique conjugué <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12
C18 : 3 (6,9,12)	C18 : 3 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CHCH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	<i>cis,cis,cis</i> -6,9,12-octadécatriénoïque	γ-linolénique
C18 : 3 (9,12,15)	C18 : 3 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-octadécatriénoïque	α-linolénique
C18 : 3 (9,trans 11,trans 13)	C18 : 3 ω-5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	<i>cis,trans,trans</i> -9,11,13-octadécatriénoïque	α-élostéarique
C20 : 4 (5,8,11,14)	C20 : 4 ω-6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	<i>cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14-icosatétraténoïque <sup>(1)</sup>	arachidonique
C20 : 5 (5,8,11,14,17)	C20 : 5 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14,17-icosapentaénoïque <sup>1</sup>	
C22 : 5 (4,8,12,15,19)	C22 : 5 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> -4,8,12,15,19-docosapentaénoïque	cuplanodonique
C22 : 6 (4,7,10,13,16,19)	C22 : 6 ω-3	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque	

La longueur de la chaîne carbonée permet de distinguer 4 catégories d'AG (Cuvelier *et al.*, 2004):

- les AG volatils de 2 à 4 carbones,
- les AG à courte chaîne de 6 à 10 carbones,
- les AG à chaîne moyenne de 12 à 14 carbones,
- les AG à longue chaîne de 16 carbones et plus.

La longueur de la chaîne détermine l'hydrophobicité de l'AG : les AG saturés jusqu'à 3 carbones sont totalement hydrophiles, le C4:0 est légèrement hydrophobe et les AG saturés de plus de 6 carbones sont totalement hydrophobes. La température de fusion de la molécule d'AG est fonction du nombre de doubles liaisons et du nombre de carbones. Les AG saturés à courte chaîne sont liquides à température ambiante, alors que ceux possédant plus de 10 carbones sont solides. Les AG insaturés ont généralement un point de fusion plus faible que leurs homologues saturés : l'acide oléique (C18:1) est liquide à température ambiante alors que l'acide stéarique (C18:0) ne se liquéfie qu'à 70°C.

Les AG insaturés sont dits monoéniques ou monoinsaturés lorsqu'ils possèdent une seule double liaison, polyéniques ou polyinsaturés quand ils en ont plusieurs. Les AG insaturés naturels les plus souvent retrouvés possèdent de 16 à 20 carbones. En règle générale :

- les doubles liaisons sont en configuration *cis*,
- la première double liaison est établie entre le C9 et le C10,
- les doubles liaisons sont séparées par un groupe -CH<sub>2</sub>- , ce qui les positionne en  $\Delta_9$ ,  $\Delta_{12}$ ,  $\Delta_{15}$  ou  $\omega_3$ ,  $\omega_6$ ,  $\omega_9$  par exemple.

Quelques atypies existent, avec par exemple des AG insaturés en configuration *trans*, comme l'AG *trans*-vaccénique, isomère *trans* de l'acide oléique, présent chez certaines bactéries du tube digestif des ruminants.

### 1.1.1.2 Les dérivés de l'acide arachidonique (eicosanoïdes)

Les eicosanoïdes dérivent de l'acide arachidonique C20:4 ( $\Delta_5$ ,  $\Delta_8$ ,  $\Delta_{11}$ ,  $\Delta_{14}$ ). Ils comprennent les prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes, jouant un rôle de molécule signal.

### 1.1.1.3 Les lipides simples

Les lipides simples (homolipides) ne sont constitués que par du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène. Ce sont des esters d'AG que l'on classe en fonction de l'alcool (glycérol pour les acylglycérols, alcool gras pour les cérides et stérol pour les stérides)

#### ➔ Les acylglycérols

Le glycérol est un triol. Par estérification avec des AG, il peut donc former des monoesters (monoacylglycérols (MAG) ou monoglycérides), des diesters (diacylglycérols (DAG) ou diglycérides), et des triesters (triacylglycérols (TAG) ou triglycérides). On parle de diacylglycérol ou triacylglycérol homogènes lorsque les groupements hydroxyles du glycérol sont estérifiés par le même AG, sinon de diacylglycérol ou triacylglycérol mixtes.

Les acylglycérols naturels, essentiellement des TAG sont des molécules totalement apolaires, et font donc partie des lipides neutres. La plupart des organismes eucaryotes utilisent les TAG comme réserve d'énergie et les stockent dans des inclusions huileuses du cytosol (Beopoulos *et al.*, 2009a). La saponification par des bases fortes en solution alcoolique et à chaud coupe les liaisons esters des acylglycérols en libérant les AG.

## ➤ Les cériques et stérides

Principaux constituants des cires animales, végétales et bactériennes, les cériques sont des mono-esters d'AG et d'alcools aliphatiques à longue chaîne. Constitués de deux longues chaînes carbonées, ils sont donc solides à température ambiante, très peu solubles dans l'eau et inertes chimiquement (ils résistent aux acides et sont difficilement saponifiables). Les animaux supérieurs et l'homme ne métabolisent pas les cires, seuls les insectes en sont capables.

Les stérides résultent de l'estérification d'AG par des stérols, et permettent en particulier le transport sérique du cholestérol par liaison non covalente aux lipoprotéines.

### 1.1.1.4 Les lipides complexes

## ➤ Les glycérophospholipides ou phospholipides

Les glycérophospholipides ou phospholipides (PL) sont des dérivés de l'acide phosphatidique. Les 2 premiers atomes de carbone du glycérol portent, par liaison ester, les chaînes aliphatiques d'AG, tandis que le troisième carbone est estérifié à un groupement phosphoryle relié lui-même par une autre liaison ester à un alcool (glycérol pour les cardiolipines, inositol pour les inositides, éthanolamine ou sérine pour les céphalines, choline pour les lécithines).

Les PL sont donc des molécules amphiphiles comportant une tête polaire et ionisée (le phosphoglycérol) et une partie apolaire (les deux queues constituées par les chaînes des AG). Leur organisation en bicouche lipidique constitue le « squelette » des membranes biologiques.

## ➤ Les sphingolipides

Les sphingolipides sont constitués d'un AG et d'un alcool aminé à chaîne longue carbonée de type sphingoïde (la sphingosine, parfois la choline). La fixation d'un AG s'effectue grâce à une liaison amide entre le groupement aminé de la sphingosine et le groupement carboxyle de l'AG. Les sphingolipides sont des composants majeurs de la membrane plasmique des cellules eucaryotes.

### 1.1.2 Les lipides polyisopréniques

L'unité de base de ces lipides est l'isoprène, ou 2-méthyl-1,3 butadiène. Le farnésol est un sesquiterpène (3 unités isopréniques), le squalène un triterpène (6 unités isopréniques). Le squalène est un précurseur de la voie de biosynthèse des stérols.

Le cholestérol est un constituant important des membranes plasmiques animales, mais également le précurseur des acides biliaires, des hormones stéroïdes et de la vitamine D. Dans les cellules fongiques, le cholestérol est remplacé par l'ergostérol. Il se distingue du cholestérol par une double liaison dans le noyau en 7-8 et par une chaîne aliphatique insaturée à 9 carbones.

## 1.2 La $\beta$ -oxydation des acides gras

En 1949, Kennedy et Lenninger ont découvert que les mitochondries pouvaient cataboliser les AG (Kennedy & Lehninger, 1950). Par la suite, les travaux de Lazarow et de Duve ont démontré l'existence également d'une dégradation peroxysomale des AG chez les eucaryotes (Lazarow & De Duve, 1976).

La  $\beta$ -oxydation est la principale voie de dégradation des AG chez les bactéries, les mammifères, les plantes et les champignons. Les deux principales sources d'AG sont les triacylglycerols stockés dans les vacuoles lipidiques et les AG importés de l'environnement au niveau de la membrane plasmique. Après une étape préliminaire d'activation des AG en acyl-CoA dépendante de l'ATP, la  $\beta$ -oxydation catalyse le raccourcissement des chaînes d'esters d'acyl-CoA entre les carbones 2 et 3, ce qui aboutit après plusieurs cycles à la formation, selon le substrat, d'acétyl-CoA ou de propionyl-CoA (Hiltunen & Qin, 2000; Hiltunen *et al.*, 1996, 2003, 1992).

Chaque tour de  $\beta$ -oxydation comprend les 4 étapes enzymatiques suivantes (**Figure 3**) :

- ❶ La déshydrogénation de l'acyl-CoA est catalysée par des acyl-CoA déshydrogénases ou des acyl-CoA oxydases, et permet la formation de *trans*-2-énoyl-CoA ;
- ❷ L'hydratation du *trans*-2-énoyl-CoA par une énoyl-CoA hydratase produit du 3-hydroxyacyl-CoA ;
- ❸ La déshydrogénation du 3-hydroxyacyl-CoA en 3-kétoacyl-CoA est catalysée par une hydroxyacyl-CoA déshydrogénase ;
- ❹ La thiolase du 3-kétoacyl-CoA grâce à une 3-kétoacyl thiolase coupe la chaîne de carbone entre les carbones  $\alpha$  et  $\beta$ . Il en résulte la libération d'une molécule d'acétyl-CoA et d'un acyl-CoA dont la chaîne est raccourcie de 2 carbones. L'acyl-CoA obtenu pourra le cas échéant subir un nouveau cycle de  $\beta$ -oxydation.

$\beta$ -oxydation peroxysomale et mitochondriale ont été décrites chez les mammifères (Bartlett & Eaton, 2004) et les plantes (Masterson & Wood, 2001). En revanche, si une  $\beta$ -oxydation peroxysomale et mitochondriale ont été retrouvées chez certains champignons filamenteux (Baltazar *et al.*, 1999; Boisnard *et al.*, 2009; Maggio-Hall & Keller, 2004) et chez une levure Basidiomycète (Feron *et al.*, 2005), il semble admis que la  $\beta$ -oxydation des AG chez les levures Ascomycètes est exclusivement localisée dans les peroxysomes (Hiltunen *et al.*, 1992; Kunau *et al.*, 1988; Kurihara *et al.*, 1992; Shen & Burger, 2009; Smith *et al.*, 2000).

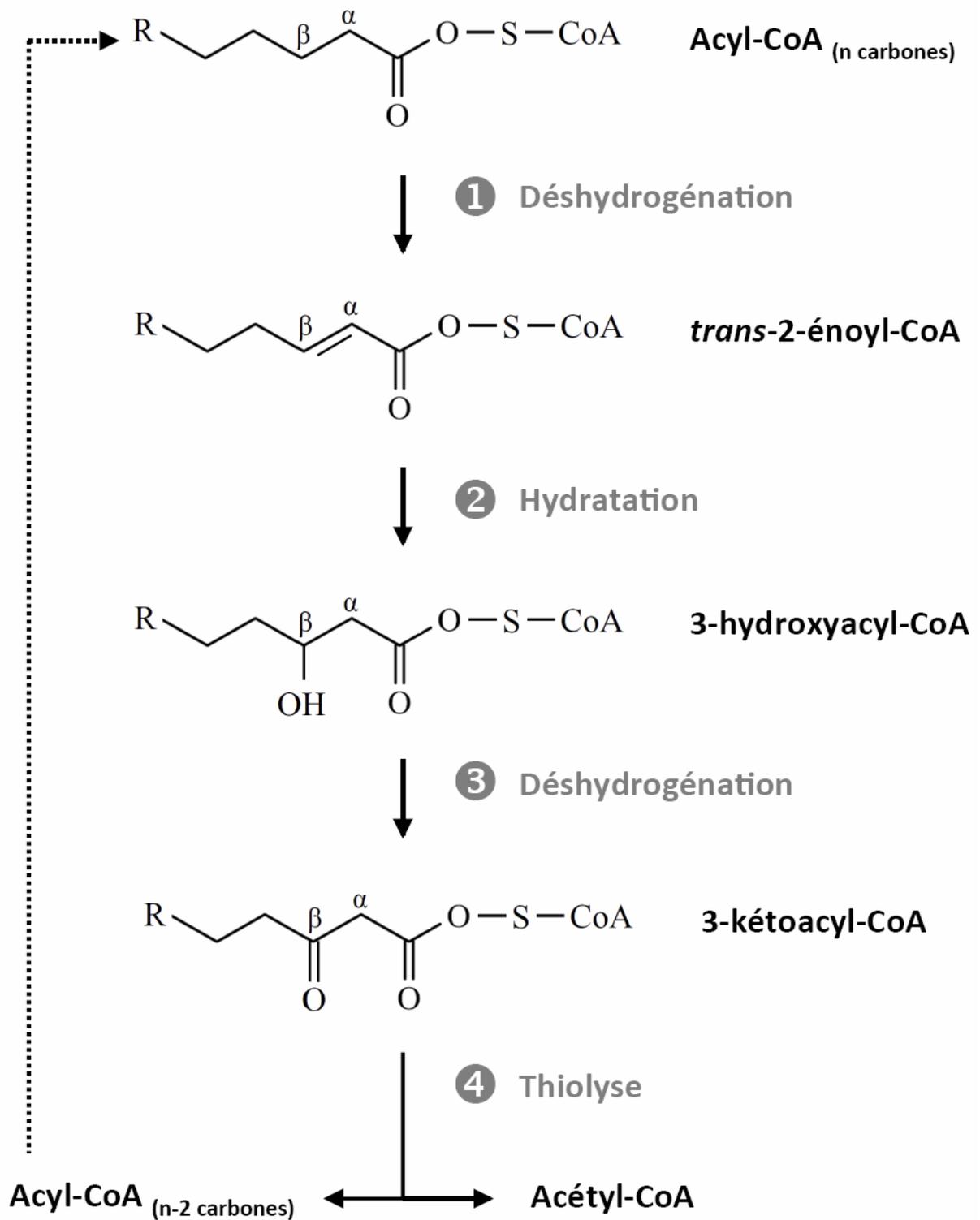


Figure 3. La  $\beta$ -oxydation des acides gras.

## 1.2.1 Etape préliminaire d'activation des acides gras par une acyl-CoA synthétase

L'activation des AG en esters d'acyl-CoA est nécessaire à leur entrée dans la  $\beta$ -oxydation. Cette étape est catalysée par une enzyme de la famille des acyl-CoA synthétases (EC 6.2.1.3), ATP-dépendantes, dont la spécificité de substrat diffère, selon la réaction suivante :



Chez les fongiques, les acyl-CoA synthétases ont été caractérisées chez *S. cerevisiae* et très récemment chez *A. nidulans*. Il en existe six chez *S. cerevisiae* : les protéines Faa1p à Faa4p (Johnson DR *et al.*, 1994), Fat1p et Fat2p (Black & DiRusso, 2007). La localisation a été établie pour deux d'entre elles : Faa2p et Fat2p sont peroxysomales. Les autres seraient cytosoliques. Faa1p et Faa4p catalysent l'activation d'AG dont la chaîne carbonée va de 8 à 20 carbones, mais ces enzymes ont une meilleure activité pour les substrats à longue chaîne carbonée. Faa1p est responsable de plus de 90% de l'activité totale acyl-CoA synthase pour les AG à longue chaîne. La double délétion de *FAA1* et *FAA4* réduit l'activité de synthèse d'oleoyl-CoA de plus de 98% (Faergeman *et al.*, 2001). Faa2p possède une large spécificité de substrat mais son activité est maximale pour les AG de chaîne moyenne. Il n'y a pas de données publiées sur le spectre d'activité de Fat2p (Black & DiRusso, 2007). Faa3p a une préférence pour les AG insaturés à longue chaîne et les AG à très longue chaîne carbonée (Knoll *et al.*, 1995). Fat1p permet l'activation du C24:0 et son absence entraîne l'accumulation des AG à très longue chaîne (Black & DiRusso, 2007).

Six gènes potentiels codant pour une acyl-CoA synthétase ont également été identifiés chez *A. nidulans* (Reiser *et al.*, 2010) : FatA à FatD, FaaA et FaaB. L'inactivation de *FaaB* entraîne une diminution de la croissance sur une large gamme d'AG utilisé comme seule source de carbone (des AG à courte chaîne aux AG à longue chaîne). FaaB est peroxysomale. En revanche, la délétion des 5 autres gènes n'entraîne pas de phénotype de croissance particulier, ce qui témoigne d'une redondance fonctionnelle. Une analyse *in silico* effectuée par l'équipe de Hynes aurait identifié d'autres acyl-CoA synthétases, dont une, spécifique des courtes chaînes carbonées, serait peut-être mitochondriale (Reiser *et al.*, 2010).

## 1.2.2 Première réaction : la déshydrogénation de l'acyl-CoA

La première réaction enzymatique de la  $\beta$ -oxydation (déhydrogénation de l'acyl-CoA), permettant la transformation de l'acyl-CoA en *trans*-2-énoyl-CoA, peut être catalysée par les acyl-CoA déshydrogénases et les acyl-CoA oxydases.

### 1.2.2.1 Les Acyl-CoA déshydrogénases (ACD)

L'accepteur final d'électron pour les acyl-CoA déshydrogénases est l'électron transferring flavoprotéine, couplée à la chaîne respiratoire mitochondriale.

***Chez les mammifères***, il existe neuf enzymes dans la famille des acyl-CoA déshydrogénases (EC 1.3.99.3), dont seulement cinq peuvent catalyser la 1<sup>e</sup> étape de la  $\beta$ -oxydation (Ensenauer *et al.*, 2005; Matsubara *et al.*, 1989):

- la Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (SCAD) avec une activité spécifique maximale pour les chaînes de 4 carbones,

- la Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) avec une activité spécifique maximale pour les chaînes de 8 carbones,
- la Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD) avec une activité spécifique maximale pour les chaînes de 14 carbones,
- la Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD) avec une activité spécifique maximale pour les chaînes de 16 carbones,
- l'Acyl-CoA Dehydrogenase 9 (ACAD-9) plus récemment décrite (Ensenauer *et al.*, 2005) avec une activité spécifique maximale pour les substrats insaturés à longue chaîne. Elle est homologue de la VLCAD.

A l'exception de la VLCAD et de l'ACAD-9, toutes ces ACD sont des homotétramères, solubles dans la matrice mitochondriale (Ensenauer *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 1985; Matsubara *et al.*, 1989), et dont chaque sous-unité contient une molécule de FAD.

L'ACAD-9 et la VLCAD, homodimériques, sont liées à la membrane interne mitochondriale (Ensenauer *et al.*, 2005; Ghisla & Thorpe, 2004; Liang & Nishino, 2010). Elles catalysent la déshydrogénation des acyl-CoA longue chaîne venant d'être importés dans la matrice mitochondriale par la Carnitine-Palmitoyl Transférase II (**Figure 7**, page 35) (Liang & Nishino, 2010).

***Chez les plantes***, deux ACD ont été identifiées, l'une spécifique des longues chaînes carbonées et l'autre des chaînes moyennes (Bode *et al.*, 1999). Une activité acyl-CoA déshydrogénase a été mise en évidence dans des fractions mitochondriales de graines de tournesol lors de leur germination et dans celles de racines de maïs (Bode *et al.*, 1999). L'activité acyl-CoA déshydrogénase spécifique des longues chaînes de carbone s'est avérée être la plus importante durant la germination et le début de la croissance de graines de pois (Masterson C *et al.*, 2000).

***Chez les organismes fongiques***, des ACD mitochondriales ont été décrites chez *Aspergillus niger* (Baltazar *et al.*, 1999) et *Aspergillus nidulans* (Maggio-Hall & Keller, 2004; Maggio-Hall *et al.*, 2008). En étudiant le profil d'assimilation des AG de mutants défectifs pour les deux ACD identifiées chez *A. nidulans*, l'équipe de Hynes a mis en évidence une redondance fonctionnelle des deux enzymes. Une analyse *in silico* leur a permis d'établir une liste de nombreuses autres ACD potentielles. Fait intéressant, plusieurs d'entre elles possèdent un signal d'adressage peroxysomal (Reiser *et al.*, 2009). Une activité acyl-CoA déshydrogénase a également été mise en évidence dans des "glyoxysome-like microbodies", organites dépourvus d'activité catalase, chez un autre champignon filamenteux, *Neurospora crassa* (Kunau *et al.*, 1988). Wang *et al.* ont également identifié chez un filamenteux phytopathogène, *Magnaporthe grisea*, cinq gènes codant pour une ACD, dont deux sont probablement peroxysomales, alors qu'ils n'ont pas retrouvé d'acyl-CoA oxydase (Wang *et al.*, 2007). Après induction de la  $\beta$ -oxydation par l'oléate ou le myristate, Dommes *et al.* (Dommes *et al.*, 1983) ont observé une activité acyl-CoA déshydrogénase chez *C. tropicalis*. L'analyse *in silico* récente de Shen et Burger a permis d'identifier plusieurs ACD chez des levures Ascomycètes (*C. tropicalis*, *C. albicans*, *Y. lipolytica*, *Lachancea kluyveri*, *Debaryomyces hansenii* et *Lodderomyces elongisporus*) (Shen & Burger, 2009).

### 1.2.2.2 Acyl-CoA oxydases (ACO)

Les acyl-CoA oxydases (EC 1.3.3.6) sont des protéines appartenant à la même superfamille que les acyl-CoA déshydrogénases, en général homodimériques et comprenant une molécule de FAD par sous-unités. Chaque sous-unité d'ACO est constituée de 4 domaines (Kim & Miura, 2004). Les ACO diffèrent des ACD par le dernier domaine (l'hélice  $\alpha$  C-terminale 2), qui n'est

par présent chez ces dernières et qui empêche l'accès de l'électron transferring flavoprotein au FAD.

La poche catalytique des ACO, plus large et plus profonde que celle des ACD, devient accessible aux substrats possédant de très longues chaînes de carbone, mais aussi à la molécule d'O<sub>2</sub>. Ainsi, la ré-oxydation du FADH<sub>2</sub> est assurée par l'oxygène, accepteur final d'électron. Cette réaction aboutit à la formation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dégradé ensuite par la catalase.

**Chez les mammifères**, le nombre d'ACO diffère d'une espèce à l'autre. Trois ACO ont été mises en évidence dans le foie de rat (Poirier *et al.*, 2006) :

- l'ACOX1 qui catalyse l'oxydation des substrats à moyenne et longue chaîne de carbone et présente une très faible activité pour des substrats courte chaîne,
- l'ACOX2 ou pristanoyl-CoA oxydase qui est impliquée dans l' $\alpha$ -oxydation des acides gras à chaîne ramifiée,
- l'ACOX3 ou cholestanoyl-CoA oxydase qui a pour substrats des intermédiaires des acides biliaires.

Chez l'Homme, le déficit en ACO se traduit par un tableau clinique neurologique associant hypotonie, surdité, déficit du système visuel (nystagmus, strabisme,...). Tous les patients sont atteints d'un retard psychomoteur important. Un syndrome dysmorphique et une hépatomégalie sont présents dans la moitié des cas. Le décès survient avant l'âge de 10 ans, en moyenne à 5 ans (Wanders *et al.*, 2010).

**Les plantes** possèdent en général plusieurs ACO avec des spécificités de substrats partiellement redondantes (Adham *et al.*, 2005; Arent *et al.*, 2008; Hooks *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2007; Schillmiller *et al.*, 2007). Six gènes codant pour des ACO ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana*, mais seulement cinq sont transcrits (Adham *et al.*, 2005). Ces ACO catabolisent les acyl-CoA très longue chaîne [AtACX2 (Hooks *et al.*, 1999)], longue chaîne [AtACX1 (Hooks *et al.*, 1996), AtACX5 (Schillmiller *et al.*, 2007)], moyenne chaîne [AtACX1 (Hooks *et al.*, 1996), AtACX3 (Hooks *et al.*, 1999)]. Il est intéressant de noter qu'à la différence des ACO de mammifères il existe une ACO pour les substrats à courte chaîne (AtACX4) chez *A. thaliana* (Hayashi *et al.*, 1999; Rylott *et al.*, 2003). Sa structure est d'ailleurs différente de celle des autres ACO, puisqu'elle est homo-tétramérique et que ses sous-unités sont plus légères (47 kDa vs 75 kDa) (Arent *et al.*, 2008). Elle est en effet structurellement plus proche des ACD mitochondriales (Poirier *et al.*, 2006).

**Dans le règne fongique**, *S. cerevisiae* se distingue puisqu'elle ne possède qu'une seule ACO, codée par le gène *FOX1* (ou *POX1*) (Dmochowska *et al.*, 1990). Il s'agit d'une protéine de 748 acides aminés (84 kDa), nécessaire à la croissance de la levure sur acide oléique utilisé comme seule source de carbone. Si l'expression de *FOX1* est fortement induite en présence d'acide oléique (x25), elle est réprimée en présence de glucose.

Plusieurs isoformes de Fox1p ont été retrouvées chez des levures du genre *Candida*. La première a été purifiée et cristallisée chez *C. tropicalis*. C'est une protéine octomérique (600 kDa), catabolisant des substrats de 4 à 20 carbones (Shimizu *et al.*, 1979). Trois gènes codant pour des iso-enzymes d'ACO (*POX2*, *POX4* et *POX5*) ont été mis en évidence chez *C. tropicalis* (Jiang & Thorpe, 1983; Okazaki *et al.*, 1986, 1987). Un double mutant *pox4* $\Delta$  *pox5* $\Delta$  est incapable de croître en présence d'AG ou d'alcane utilisés comme seule source de carbone. Comme le mutant *pox4* $\Delta$  *pox5* $\Delta$  ne possède plus d'activité acyl-CoA oxydase, Picataggio *et al.* en concluent que *POX2* correspond à la duplication d'un gène non fonctionnel ou bien code pour une protéine sans activité enzymatique (Picataggio *et al.*, 1991).

Cinq isoformes d'ACO (Aox1 à 5) ont été mis en évidence chez *Y. lipolytica*, codées par les gènes *POX1* à *POX5* (Beopoulos *et al.*, 2009b). Aox2 oxyde les acyl-CoA longue chaîne, Aox3 les acyl-CoA courte chaîne, alors que Aox5 peut cataboliser les substrats quelle que soit la

longueur de la chaîne carbonée. Des mutations dans *Aox4* et *Aox5* se traduisant paradoxalement par une augmentation de l'activité acyl-CoA oxydase, Waché *et al.* en concluent que ces deux ACO auraient plutôt un rôle dans la régulation de l'activité acyl-CoA oxydase chez *Y. lipolytica* (Waché *et al.*, 2003). Un quadruple mutant *pox2Δ, pox3Δ, pox4Δ, pox5Δ* est incapable de pousser sur AG utilisé comme seule source de carbone, alors que la croissance d'un double mutant *pox2Δ, pox3Δ* est normale sauf sur acide oléique (Wang *et al.*, 1999). Shen et Burger retrouvent même une sixième ACO chez *Y. lipolytica* dans leur analyse *in silico* (Shen & Burger, 2009).

Chez *A. nidulans*, deux gènes codant pour une ACO ont été identifiés : *AoxA* et *AoxB* (Reiser *et al.*, 2009). Leur expression est induite par les AG. La délétion d'*AoxA* s'accompagne d'un retard de croissance lorsque des AG longue chaîne sont utilisés comme seule source de carbone. Le double mutant *aoxaΔ aoxbΔ* présentant le même phénotype de croissance, il doit exister une redondance fonctionnelle pour *AoxB*. Shen et Burger décrivent la présence d'ACO également chez d'autres champignons filamenteux : 1 chez *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*, 2 chez *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus oryzae*, 3 chez *Aspergillus clavatus* et *Aspergillus flavus*, et même 5 chez *Aspergillus terreus* (Shen & Burger, 2009). Le criblage du génome d'un champignon zygomycète, *Rhizopus oryzae*, suppose l'existence de 8 ACO.

### 1.2.3 Deuxième réaction : l'hydratation du *trans*-2-énoyl-CoA

La deuxième étape de la  $\beta$ -oxydation permet la transformation du *trans*-2-énoyl-CoA en 3-hydroxyacyl-CoA. Cette réaction peut être catalysée par les **énoyl-CoA hydratases (ECH)** ou faire intervenir une protéine multifonctionnelle. Deux types d'activité énoyl-CoA hydratase ont été décrits, qui diffèrent par la stéréospécificité de l'hydratation de la double liaison du *trans*-2-énoyl-CoA.

Les ECH de type 1 (ECH-1) ont surtout été étudiées chez les mammifères et permettent l'oxydation du *trans*-2-énoyl-CoA en (*L*)-3-hydroxyacyl-CoA. Trois isomères ont été mis en évidence, différant par leur spécificité de substrat :

- La crotonase (EC 4.2.1.17), protéine homohexamérique, plus active sur les courtes chaînes de carbone. Le  $K_m$  pour l'hexadécénoyl-CoA (chaîne de 16 carbones) est 25 fois plus élevé que pour le crotonoyl-CoA (chaîne de 4 carbones) (Steinman & Hill, 1975).
- Une ECH-1, dite à longue chaîne, mais dont le maximum d'activité est observé pour des esters de CoA comportant 8 carbones (Fong & Schulz, 1977, 1981).
- Une ECH-1 décrite chez l'Homme, active sur les esters de CoA à moyenne et longue chaîne (Jackson *et al.*, 1995).

Il n'y a pas d'ECH-1 décrite chez les organismes fongiques (Kunau *et al.*, 1995).

Les ECH de type 2 (ECH-2) permettent l'oxydation du *trans*-2-énoyl-CoA en (*D*)-3-hydroxyacyl-CoA. Leur existence a initialement été suggérée chez *S. cerevisiae* en raison de la persistance d'une activité ECH chez un mutant déficient pour la protéine multifonctionnelle peroxysomale (Filppula *et al.*, 1995). Plus récemment, Shen et Burger prédisent l'existence d'une ECH-2 chez *C. albicans*, *C. tropicalis* et *Y. lipolytica* (Shen & Burger, 2009), mais pas chez *S. cerevisiae* ou *C. lusitaniae*. A la différence de la crotonase, ECH-2 est homodimérique et possède une structure unique en « hot-dog » dans sa partie C-terminale (Engel *et al.*, 1996) lui permettant d'utiliser les substrats à longue chaîne de carbone (Koski *et al.*, 2004). Une ECH-2 a également été décrite chez *A. nidulans* (Maggio-Hall & Keller, 2004). Un mutant déficient pour cette enzyme est incapable de croître sur AG à courte chaîne utilisé comme seule source de carbone, et sa croissance sur acide oléique est altérée.

### 1.2.4 Troisième réaction : la déshydrogénation du 3-hydroxyacyl-CoA

La troisième étape de la  $\beta$ -oxydation permet la transformation du 3-hydroxyacyl-CoA en 3-kétoacyl-CoA. Elle est catalysée par :

- une **3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD)** :
  - (*L*)-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (EC 1.1.1.35),
  - ou 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase courte chaîne (SCHAD)
- ou une protéine multifonctionnelle :
  - l'HAD longue chaîne associée à la membrane mitochondriale faisant partie de la protéine trifonctionnelle mitochondriale de mammifère,
  - ou une HAD faisant partie d'une protéine multifonctionnelle peroxysomale, MFE-1 ou MFE-2 (Yang *et al.*, 2005b).

La déshydrogénation du 3-hydroxyacyl-CoA s'effectue en présence de  $\text{NAD}^+$  comme accepteur d'hydrogène. Dans la mitochondrie, la réoxydation de NADH,  $\text{H}^+$  a lieu directement au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire.

Les enzymes de la famille des HAD possèdent une séquence consensus H-X-F-X-P-X<sub>3</sub>-M-X-L-X-E (Yang *et al.*, 2005b), retrouvée des organismes procaryotes aux mammifères. Au sein du site actif (figuré dans la revue de Yang *et al.* (Yang *et al.*, 2005b)), deux résidus His-Glu sont essentiels à la fonction catalytique. La HAD, extraite et purifiée pour la première fois à partir du coeur de porc, est une protéine homodimérique, dont chaque sous-unité a une masse moléculaire de 33 kDa (Barycki *et al.*, 1999; Noyes & Bradshaw, 1973). La SCHAD, purifiée à partir du foie de rat (Luo *et al.*, 1995) et clonée à partir du cerveau humain (He *et al.*, 1998), possède également une activité 10-17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (Yang *et al.*, 2005a).

Chez l'Homme, un déficit en SCHAD (aussi nommée 2-méthyl-3-hydroxybutyrate déshydrogénase) s'accompagne d'une accumulation d'isoleucine et de 3-hydroxy-2-méthylbutyrate (AG à chaîne ramifiée), qui affecte le développement cérébral, et entraîne un retard mental ou une neurodégénération progressive (Yang *et al.*, 2005b, 2009). La SCHAD interviendrait dans la pathogénèse des plaques  $\beta$ -amyloïdes de la maladie d'Alzheimer en raison de sa surexpression dans les astrocytes atteints, et de sa liaison au peptide  $\beta$ -amyloïde. Dans la maladie de Parkinson, on observe une diminution de son expression (Yang *et al.*, 2005b).

### 1.2.5 Quatrième réaction : la thiolase du 3-kétoacyl-CoA

Lors de la dernière réaction du cycle de  $\beta$ -oxydation, une **3-kétoacyl thiolase (KAT)** coupe la chaîne de carbone du 3-kétoacyl-CoA entre les carbones 2 et 3. Il en résulte la libération d'une molécule d'acétyl-CoA et d'un acyl-CoA dont la chaîne est raccourcie de 2 carbones. L'acyl-CoA obtenu peut éventuellement subir un nouveau cycle de  $\beta$ -oxydation.

Les KAT (EC 2.3.1.16) peuvent également catalyser l'élongation des AG selon des mécanismes réactionnels identiques à ceux permettant la synthèse des AG par les  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthases (KAS) : addition d'unités de deux carbones à la chaîne aliphatique, en deux temps et sans cofacteur, grâce à l'acétylation d'un résidu cystéine de l'enzyme. KAT et KAS font en fait partie de la même superfamille enzymatique des Thiolases (revue par Haapalainen *et al.* (Haapalainen *et al.*, 2006)). Les KAS sont un des domaines enzymatiques des protéines multifonctionnelles impliquées dans la synthèse des AG de type I ou de type II (Smith *et al.*, 2003).

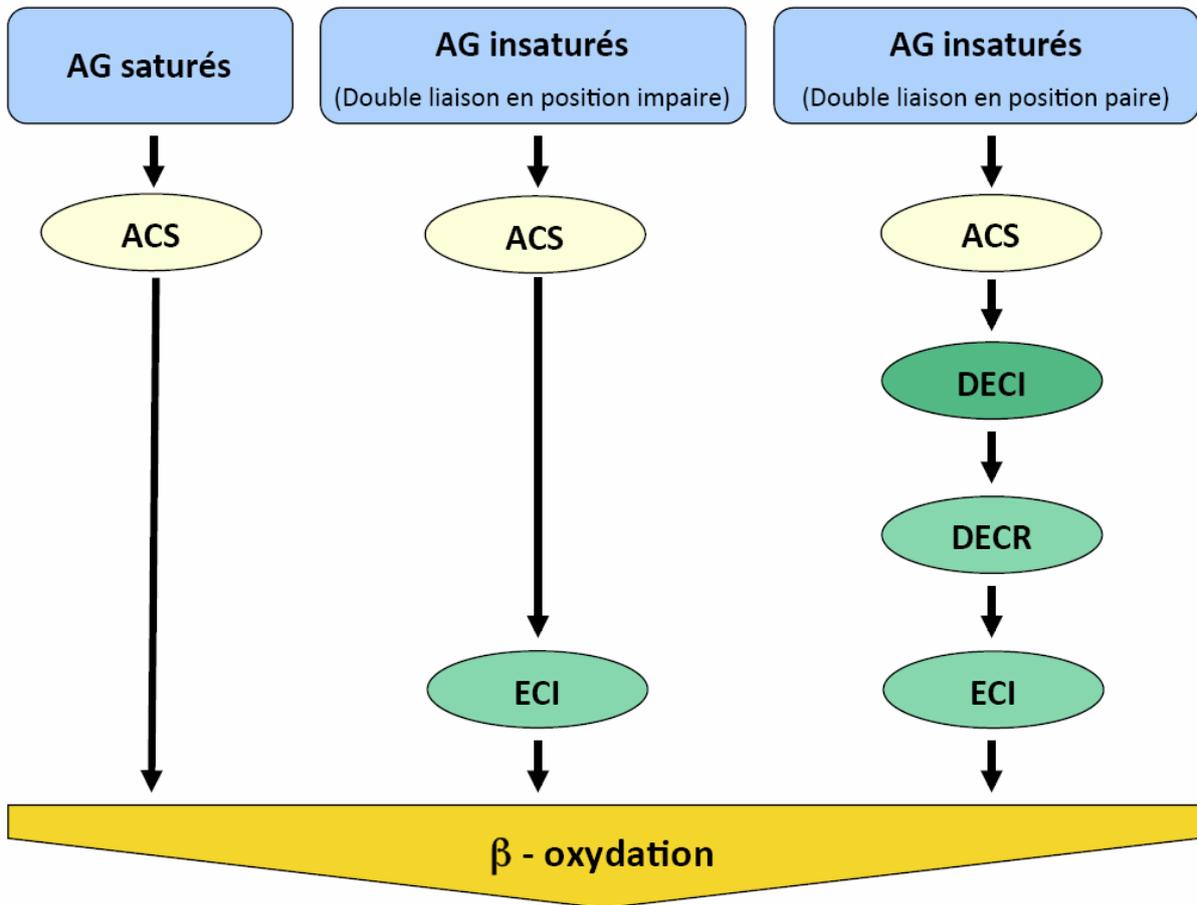
**Chez les mammifères**, l'activité thiolase de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale est associée à la protéine trifonctionnelle (Uchida *et al.*, 1992). Les peroxysomes de rat possèdent trois KAT (Poirier *et al.*, 2006). La thiolase A, exprimée de façon constitutive, et la thiolase B, inductible, sont actives sur les substrats non ramifiés, sans spécificité de longueur de chaîne (Antonenkov *et al.*, 1999). La troisième KAT (SCP2-3-kétoacyl-CoA thiolase ou SCPx) comporte dans sa partie C-terminale un domaine Sterol Carrier Protein (SCP2) qui est clivé après l'import peroxysomal. La SCPx est capable d'agir sur des substrats très variés, dont les chaînes de carbone méthylées sur le carbone 2 (Antonenkov *et al.*, 2000). Chez l'Homme, deux thiolases peroxysomales ont été décrites, une orthologue de la thiolase A, et l'autre orthologue de la SCPx. Le déficit en SCPx se traduit par un tableau de leuco-encéphalopathie associant dystonie et neuropathie motrice. En effet, ce déficit entraîne l'accumulation d'un AG ramifié, l'acide pristanique, à l'instar de ce qui est observé lors d'un blocage de l' $\alpha$ -oxydation (Ferdinandusse *et al.*, 2006).

**Chez les plantes**, quatre KAT ont été décrites chez *A. thaliana*, trois peroxysomales, une cytosolique (Pye *et al.*, 2010). Les 4 enzymes sont codées par 3 gènes et l'isoforme cytoplasmique correspond en fait à l'une des 3 enzymes peroxysomales à laquelle il manque les 43 acides aminés N-terminaux (Carrie *et al.*, 2007). Parmi les KAT peroxysomales, *AtKAT2* (ou PED1) est la mieux caractérisée (Germain *et al.*, 2001) et semble avoir une large spécificité de substrat. *AtKAD2* est dimérique, mais à la différence de Fox3p chez *S. cerevisiae*, un pont disulfure au niveau du site d'attaque nucléophile empêche le substrat d'accéder au site actif dans un environnement oxydatif. Pye *et al.* ont ainsi montré que l'activité de l'enzyme *AtKAT2*, et par extension la  $\beta$ -oxydation peroxysomale chez *A. thaliana*, étaient régulées par l'environnement redox peroxysomal (Pye *et al.*, 2010).

**Chez les organismes fongiques**, la première KAT à avoir été cristallisée est la KAT peroxysomale de *S. cerevisiae* (Pot1p ou Fox3p) (Mathieu *et al.*, 1997, 1994). Il s'agit d'une protéine dimérique de 45 kDa, alors que les KAT mitochondriales de mammifères sont tétramériques (Haapalainen *et al.*, 2006; Poirier *et al.*, 2006). Fox3p possède trois domaines, entourant le site actif : les deux domaines centraux ont une configuration similaire (5 feuillets  $\beta$  bornés de chaque côté par une hélice  $\alpha$ ) et le troisième est en forme de boucle (Haapalainen *et al.*, 2006). Chez *A. nidulans*, une mutation de la KAT mitochondriale se traduit par un déficit de croissance du champignon sur AG courte chaîne mais pas sur AG longue chaîne lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone (Hynes *et al.*, 2008).

### 1.2.6 Enzymes auxiliaires

La voie de  $\beta$ -oxydation classique permet de cataboliser les AG saturés, les AG ayant des doubles liaisons *trans* en position paire et les AG méthylés sur le carbone 2. La dégradation des AG avec une double liaison *cis* ou *trans* en position impaire, ou une double liaison *cis* en position paire nécessite l'intervention d'enzymes auxiliaires : la  $\Delta_3, \Delta_2$ -énoyl-CoA isomérase, la  $\Delta_{3,5}, \Delta_{2,4}$ -diénoyl-CoA isomérase et la 2,4-diénoyl-CoA réductase (**Figure 4**).



**Figure 4. Description schématique des enzymes requises préalablement au catabolisme des acides gras saturés et insaturés par la  $\beta$ -oxydation.** ACS : Acyl-CoA synthétase, DECI :  $\Delta_{3,5,\Delta_{2,4}}$ -diénoyl-CoA isomérase, DECR : 2,4-diénoyl-CoA réductase, ECI :  $\Delta_{3,\Delta_{2}}$ -énoyl-CoA isomérase

### 1.2.6.1 $\Delta_{3,\Delta_{2}}$ -énoyl-CoA isomérase (ECI)

Les  $\Delta_{3,\Delta_{2}}$ -énoyl-CoA isomérases (EC 5.3.3.8) permettent la dégradation dans les peroxysomes et les mitochondries des AG insaturés portant une double liaison en position impaire. Ainsi, une ECI transforme un *cis*- ou *trans*-3-énoyl-CoA (double liaison en position *cis* ou *trans* entre les carbones 3 et 4) en *trans*-2-énoyl-CoA.

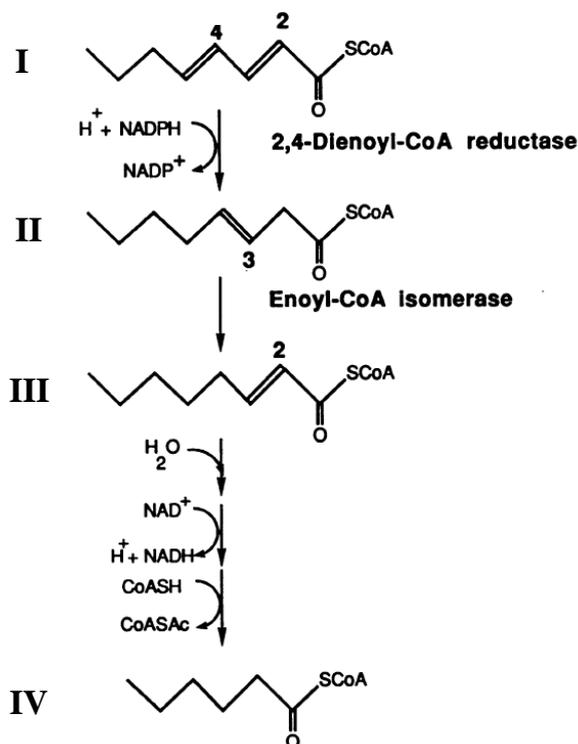
Chez les mammifères, trois ECI ont été décrites, une mitochondriale, une peroxysomale et une portée par la protéine peroxysomale multifonctionnelle MFE-1. Le site catalytique est identique à celui de ECH1 (Kiema *et al.*, 2002; Palosaari & Hiltunen, 1990). Les sous-unités des ECI mitochondriale de rat (Palosaari & Hiltunen, 1990) ou humaine (Partanen *et al.*, 2004) ainsi que celles de l'ECI peroxysomale de *S. cerevisiae* (Mursula *et al.*, 2004) forment des disques homotétramériques. Toutes les ECI appartiennent à la superfamille des hydratases/isomérases mais leur homologie est très faible. La comparaison des séquences des ECI peroxysomale et mitochondriale humaines montre seulement 13% d'identité, alors qu'elles présentent environ 20% d'identité avec une ECH-1, la crotonase (Partanen *et al.*, 2004). L'ECI peroxysomale des mammifères possède un domaine en N-terminal qui n'est pas présent dans l'ECI mitochondriale ni dans l'ECI de *S. cerevisiae* (Mursula *et al.*, 2004). L'étude fonctionnelle de l'ECI mitochondriale de rat réalisée par Zhang *et al.* a montré que cette enzyme pouvait convertir les *trans*-3- et *cis*-3- esters de CoA insaturés. Les substrats de 6 à 16 carbones peuvent être catalysés, mais son affinité pour les AG longue chaîne est plus grande (Zhang *et al.*, 2002).

Chez *S. cerevisiae*, l'ECI (Eci1p) possède un signal d'adressage peroxysomal PTS1 (Mursula *et al.*, 2004) et est nécessaire à la croissance de la levure sur acide oléique (Gurvitz *et al.*, 1998). L'étude cristallographique de cette enzyme a montré qu'un résidu glutamate permet de guider les protons afin de modifier la configuration des doubles liaisons (Mursula *et al.*, 2004).

### 1.2.6.2 2,4-diénoyl-CoA reductase (DECR)

Il s'agit d'enzymes NADPH dépendantes, qui permettent la conversion du 2,4-diénoyl-CoA (*trans*-2, *cis*- ou *trans*-4) en *trans*-3-énoyl-CoA. Elles font partie de la superfamille des Short-chain alcohol Dehydrogenase / Reductase. Une DECR (EC 1.3.1.34) a été identifiée dans les mitochondries et les peroxysomes de mammifères, et dans les peroxysomes de plante (*A. thaliana*) et de levures (*S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, *C. tropicalis*) (Gurvitz *et al.*, 1997; Kunau & Dommes, 1978; Kunau *et al.*, 1995; Poirier *et al.*, 2006). Chez l'Homme, plusieurs cas de déficit en DECR ont été publiés, pouvant conduire au décès du patient (Kimura *et al.*, 2004).

*Saccharomyces cerevisiae* possède une DECR peroxysomale, codée par le gène *SPS19* (Gurvitz *et al.*, 1997). Un mutant *sds19Δ* s'est révélé incapable de croître sur acide petroselinique (*cis*-C18:1(6)) utilisé comme seule source de carbone. La DECR est donc nécessaire à la dégradation des AG possédant une double liaison de configuration *cis* en position paire (Gurvitz *et al.*, 1997; Poirier *et al.*, 2006). Le mutant *sds19Δ* était toujours capable de pousser sur acide oléique (*cis*-C18:1(9)) et de dégrader l'acide *trans*-10-heptadecénoïque, avec cependant une activité réduite de moitié par rapport à la souche sauvage. Si la voie classique de  $\beta$ -oxydation permet de cataboliser les substrats insaturés avec une double liaison de configuration *trans* en position paire, la DECR de *S. cerevisiae* reste nécessaire à une croissance optimale sur ces substrats utilisés comme seule source de carbone. L'équipe de Schulz et Kunau (Smeland *et al.*, 1992) ont ainsi proposé un mécanisme alternatif pour la  $\beta$ -oxydation des AG portant une double liaison en position paire (**Figure 5**).



**Figure 5.** Mécanisme alternatif de  $\beta$ -oxydation des acides gras possédant une double liaison en position paire proposé par Smeland *et al.* (1992). I: *trans*-2-*trans*-4-octadiénoyl-CoA, II : *trans*-3-octénoyl-CoA, III : *trans*-2-octénoyl-CoA, IV : hexanoyl-CoA.

### 1.2.6.3 $\Delta_{3,5},\Delta_{2,4}$ -diénoyl-CoA isomérase (DECI)

Les DECI appartiennent à la superfamille des isomérases / hydratases.

Un seul gène codant pour une DECI pouvant être adressée au péroxysome ou à la mitochondrie a été identifié chez les mammifères (Filppula *et al.*, 1998). La cristallisation de la DECI de rat a permis de mettre en évidence un résidu glutamate comme accepteur de proton et un résidu aspartate comme donneur de proton (Modis *et al.*, 1998).

Dans le génome de *S. cerevisiae*, un seul gène code pour une DECI peroxysomale (Dci1p) qui présente 50% d'identité avec la ECI (Eci1p). Dci1p et Eci1p sont donc des protéines homologues, qui peuvent entrer dans les peroxysomes sous forme complexée (Yang *et al.*, 2001). En plus de l'activité DECI, Dci1p possède une faible activité ECI : un mutant *dci1* $\Delta$  est capable de pousser comme la souche sauvage sur acide oléique utilisé comme seule source de carbone (Gurvitz *et al.*, 1999). L'implication de la DECI dans le catabolisme de l'acide oléique, mais également dans celui de l'acide *cis*-10-*cis*-13-nonadécadiénoïque (acide gras bi-insaturé à 19 carbones, possédant une double liaison en position paire et une autre en position impaire), de l'acide *cis*-9-*trans*-11-octadécadiénoïque et de l'acide *trans*-10-*cis*-12-octadécadiénoïque semble très mineure (Poirier *et al.*, 2006). Ainsi la conversion des intermédiaires réactionnels *cis*-3-*trans*-5-diénoyl-CoA en *trans*-2-*trans*-5-diénoyl-CoA est principalement catalysée par l'ECI chez *S. cerevisiae*, même si elle semble thermodynamiquement moins favorable que la conversion en *trans*-2-*trans*-4-diénoyl-CoA par la DECI (Poirier *et al.*, 2006).

Chez *A. thaliana*, la DECI identifiée ne possède que 18% d'identité avec celle de *S. cerevisiae*, et 38% avec celle de rat (Goepfert *et al.*, 2005).

### 1.2.6.4 Epimérisation

Une activité 3-hydroxyacyl-CoA épimérase décrite dans les peroxysomes de foie de rat assure la conversion d'un (*L*)-3-hydroxyacyl-CoA en son isomère (*D*), et inversement. L'épimérisation est le résultat d'une déshydratation et d'une hydratation, catalysées successivement par deux ECH de stéréospécificités opposées. L'ordre d'intervention des ECH-1 et ECH-2 varie selon les substrats (Hiltunen *et al.*, 1989).

Chez les organismes fongiques, l'épimérisation a été initialement décrite pour les protéines multifonctionnelles (chez *C. tropicalis* (Moreno de la Garza *et al.*, 1985) et *N. crassa* (Thieringer & Kunau, 1991)). Cette activité en fait reposait sur l'observation d'une consommation de (*D*)-3-hydroxyacyl-CoA chez ces champignons, qui est produit par les ECH-2 et qui est l'intermédiaire réactionnel de la protéine multifonctionnelle peroxysomale (Hiltunen *et al.*, 1992). Il semblerait donc que l'épimérisation des esters d'acyl-CoA ne fait pas intervenir d'activité enzymatique particulière chez les champignons ou les mammifères.

## 1.2.7 Organisation de la $\beta$ -oxydation chez les procaryotes

*Escherichia coli* est la bactérie dont le catabolisme lipidique a été le plus étudié. La première réaction de la  $\beta$ -oxydation est assurée par une ou des ACD indépendantes. Les électrons sont transférés du FAD de l'enzyme à une electron transferring flavoprotein comme dans la mitochondrie des eucaryotes. Les trois étapes suivantes de la  $\beta$ -oxydation sont catalysées par un complexe multi-enzymatique, hautement organisé (Binstock *et al.*, 1977).

Chez *E. coli*, les 8 gènes codant pour les enzymes de la  $\beta$ -oxydation (*fad* pour fatty acid degradation) forment un opéron soumis à une régulation transcriptionnelle par le gène *fadR* (Tableau 2). Ce gène est induit par la présence dans le milieu d'AG possédant au moins 10 carbones. Les gènes *fadA* et *fadB* codent pour les deux sous-unités du complexe multi-

enzymatique portant les activités 2-énoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, 3-kétoacyl-CoA thiolase, 3-hydroxyacyl-CoA épimérase et  $\Delta_3, \Delta_2$ -énoyl-CoA isomérase (Binstock *et al.*, 1977). Ce complexe, organisé en tétramère  $\alpha_2\beta_2$  fait de l'ordre de 260 kDa (Pawar & Schulz, 1981).

Chez *Pseudomonas fragi*, les gènes codant pour les deux sous-unités du complexe multi-enzymatique ont également été identifiés (Sato *et al.*, 1992). Les activités énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase sont portées par le dimère  $\alpha_2$  (formé par 2 sous-unités  $\alpha$ ), alors que le dimère  $\beta_2$  seul ne possède pas d'activité 3-kétoacyl-CoA thiolase. La tétramérisation  $\alpha_2\beta_2$  est essentielle pour l'activité thiolase (Ishikawa *et al.*, 1997). L'induction de la  $\beta$ -oxydation se produit en présence d'AG de 6 carbones ou plus (Sato *et al.*, 1992).

Les bactéries anaérobies strictes ne semblent pas capables de dégrader les AG. Néanmoins, les études réalisées chez *Caulobacter crescentus* ont montré que cette bactérie pouvait utiliser l'acide oléique comme seule source de carbone et possédait les enzymes nécessaires à la  $\beta$ -oxydation. Mais ces enzymes permettent la synthèse des AG, et non leur dégradation (O'Connell *et al.*, 1986).

**Tableau 2. Gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras chez *Escherichia coli* (Kunau *et al.*, 1995)**

Gene	Gene product
<i>fadL</i>	Fatty acid transporter (outer membrane)
<i>fadD</i>	Acyl-CoA synthetase
<i>fadE</i>	Electron transferring flavoprotein
<i>fadF</i>	Acyl-CoA dehydrogenase (long-chain)
<i>fadG</i>	Acyl-CoA dehydrogenase (short-chain)
<i>fadB</i>	Multifunctional $\beta$ -oxidation protein, large subunit (enoyl-CoA hydratase, 3-L-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, 3-hydroxyacyl-CoA epimerase)
<i>fadA</i>	Multifunctional $\beta$ -oxidation protein, small subunit (3-oxoacyl-CoA thiolase)
<i>fadH</i>	2,4-dienoyl-CoA reductase
<i>fadR</i>	Transcriptional regulator of <i>fad</i> genes

### 1.2.8 Organisation subcellulaire de la $\beta$ -oxydation chez les eucaryotes

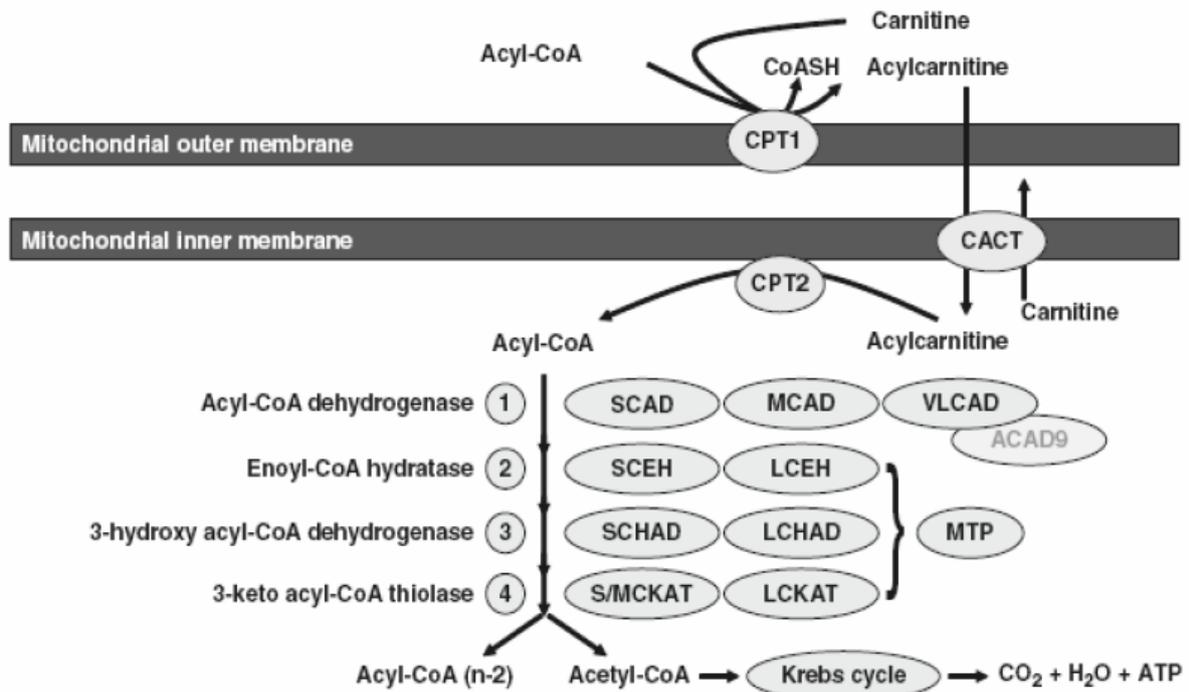
Chez les mammifères, les peroxysomes initient la  $\beta$ -oxydation des AG à très longue chaîne et des AG insaturés, et leur dégradation se poursuit dans la mitochondrie (Bartlett & Eaton, 2004). Mais cette double localisation n'est pas retrouvée dans l'ensemble du règne végétal ou fongique. Les plantes oléagineuses ne semblent avoir qu'une  $\beta$ -oxydation peroxysomale contrairement aux autres organismes végétaux supérieurs (Masterson & Wood, 2001). La  $\beta$ -oxydation chez les levures Ascomycètes semble exclusivement localisée dans les peroxysomes, comme décrit chez *S. cerevisiae* (Hiltunen & Qin, 2000; Hiltunen *et al.*, 1992, 1996, 2003), *C. tropicalis* (Kurihara *et al.*, 1992; Moreno de la Garza *et al.*, 1985) et *Y. lipolytica* (García *et al.*, 2007; Haddouche *et al.*, 2010; Smit *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2000; Wache *et al.*, 2001) et prédit par une étude *in silico* (Shen & Burger, 2009). Cependant, plusieurs travaux réalisés au cours de la dernière décennie ont révélé l'existence d'une  $\beta$ -oxydation mitochondriale chez des champignons filamenteux (*Aspergillus niger* (Baltazar *et al.*, 1999), *Aspergillus nidulans* (Maggio-Hall & Keller, 2004), *Podospira anserina* (Boisnard *et al.*, 2009)) ou chez des levures Basidiomycetes (*Sporidiobolus pararoseus* (Feron *et al.*, 2005)).

## 1.2.8.1 La $\beta$ -oxydation mitochondriale

### 1.2.8.1.1 Import mitochondrial et activation des acides gras

Ce n'est qu'une fois activés en esters d'acyl-CoA par les acyl-CoA synthases que les AG peuvent être importés dans la mitochondrie (**Figure 6**). Il existerait cependant une acyl-CoA synthétase mitochondriale spécifique des courtes chaînes carbonées chez *A. nidulans* (Reiser *et al.*, 2010).

A la différence des acyl-CoA à courte et moyenne chaîne, les acyl-CoA à longue chaîne ne traversent pas directement les deux membranes de la mitochondrie. Le transfert à travers la membrane externe se fait grâce à la carnitine palmitoyl-transférase I : l'AG est transféré de l'atome de soufre du CoA vers le groupe hydroxyle de la carnitine afin de former une acyl-carnitine. Puis le transport de l'acyl-carnitine de l'espace inter-membranaire jusqu'à la matrice mitochondriale à travers la membrane interne s'effectue grâce à l'action de la carnitine acyl-carnitine translocase. La carnitine palmitoyl transférase II, associée à la membrane interne, lie le groupe acyl à du CoA mitochondrial afin de former de l'acyl-CoA qui peut alors être dégradé par la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. L'entrée dans la mitochondrie des AG permet le contrôle et la régulation du flux de  $\beta$ -oxydation (mécanismes revus par Eaton, 2002).



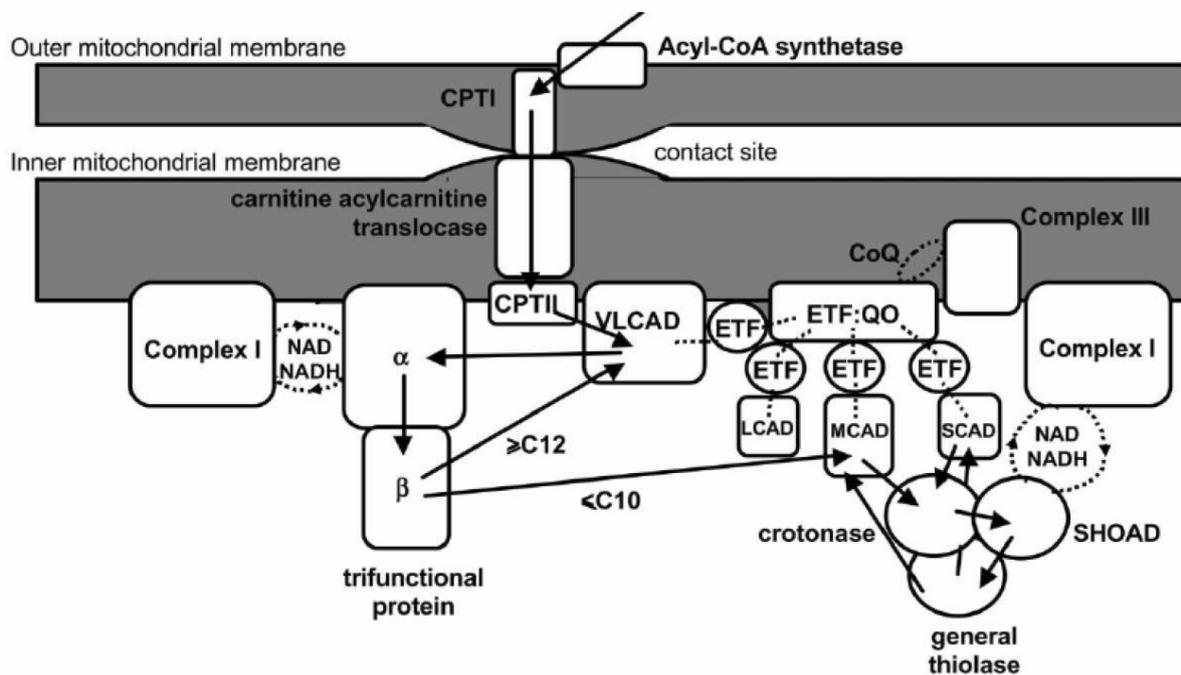
**Figure 6.** La  $\beta$ -oxydation mitochondriale chez les mammifères (Wanders *et al.*, 2010). CPT1 : carnitine palmitoyl-transférase I, CPT2 : carnitine palmitoyl-transférase II, CACT : carnitine acylcarnitine translocase, VLCAD : very-long-chain acyl-CoA déshydrogénase, ACAD9 : acyl-CoA déshydrogénase 9, SCEH : short-chain enoyl-CoA hydratase, LCEH : long-chain enoyl-CoA hydratase, LCAD : long-chain hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, SCAD : short-chain hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, S/MCKAT : short/medium-chain ketoacyl-CoA thiolase, LCKAT : long-chain ketoacyl-CoA thiolase, MTP : mitochondrial trifunctional protein.

### 1.2.8.1.2 Chez les mammifères, deux systèmes de $\beta$ -oxydation mitochondriale

Deux systèmes de  $\beta$ -oxydation mitochondriale sont décrits : l'un faisant intervenir des enzymes solubles dans la matrice mitochondriale (type I), l'autre des enzymes associées à la membrane interne de la mitochondrie (type II).

La  $\beta$ -oxydation mitochondriale de type I permet la dégradation d'AG à chaîne carbonée courte ou moyenne. Elle est médiée par 4 enzymes distinctes, probablement organisées sous forme de complexe. Ces protéines solubles interagiraient avec la membrane interne mitochondriale par l'intermédiaire de leurs partenaires redox (notamment l'électron transferring flavoprotein et le complexe I de la chaîne respiratoire (Eaton, 2002)).

La  $\beta$ -oxydation mitochondriale de type II permet le catabolisme des AG à longue chaîne et ne fait intervenir que deux enzymes. La VLCAD permet la déshydrogénation des acyl-CoA, tandis que les trois dernières étapes sont catalysées par une protéine trifonctionnelle (460 kDa) composée de deux sous-unités organisées en dimère de tétramère ( $\alpha_4\beta_4$ ). La sous-unité  $\alpha$  comporte les activités 2-énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (spécifique des AG à longue chaîne) et permet la liaison à la membrane interne mitochondriale. La sous-unité  $\beta$  porte l'activité 3-kétoacyl-CoA thiolase (Uchida *et al.*, 1992).



**Figure 7. Organisation supramoléculaire de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale de mammifères (Eaton, 2002).** Le schéma indique les interactions démontrées ou suspectées entre les enzymes de la  $\beta$ -oxydation. CPT I : carnitine palmitoyl-transferase I, CPT II : carnitine palmitoyl-transferase II, VLCAD : very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, LCAD : long-chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD : medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, SCAD : short-chain acyl-CoA dehydrogenase, ETF : electron transfer flavoprotein, ETF:QO electron transfer flavoprotein : ubiquinone oxidoreductase, CoQ : coenzyme Q, SHOAD : short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, NAD : nicotinamide adenine dinucleotide, Complex I : NADH oxydoréductase, Complex III : cytochrome *bc1* complex.

La  $\beta$ -oxydation mitochondriale et la chaîne respiratoire sont intimement associées à deux niveaux (**Figure 7**) (Eaton *et al.*, 2000; Eaton, 2002):

- ❶ Au niveau métabolique. Dans les deux systèmes de  $\beta$ -oxydation mitochondriale, la première étape est catalysée par une ACD. Cette réaction génère des électrons qui seront transférés au complexe III de la chaîne respiratoire. Deux ubiquinones servent alors d'intermédiaires : l'électron transferring flavoprotein et l'électron transfer flavoprotéine-ubiquinone oxydoréductase. De plus, le NADH,  $H^+$  produit par la HAD lors de la 3<sup>ème</sup> étape de la  $\beta$ -oxydation est réoxydé par le complexe I.

② Au niveau spatial. L'électron transfer flavoprotéine-ubiquinone oxydoréductase, le complexe I de la chaîne respiratoire, mais aussi la carnitine acyl-carnitine translocase, la carnitine palmitoyl transférase II, la VLCAD et la protéine trifonctionnelle sont liées à la membrane interne mitochondriale. Il est donc probable que l'ensemble des enzymes de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et de la chaîne respiratoire soient associées dans un métabolon, comme représenté.

### 1.2.8.1.3 Chez les plantes

La  $\beta$ -oxydation est exclusivement localisée dans les peroxysomes lors de la germination des plantes oléagineuses. Chez les autres organismes végétaux supérieurs, elle peut se dérouler dans les peroxysomes et les mitochondries (Masterson & Wood, 2001). Chez le pois (*Pisum sativum*) en début de croissance, la  $\beta$ -oxydation mitochondriale ne représente qu'une faible part du catabolisme des AG. Elle est très fortement induite à certains stades de développement (à J7 et entre J10 et J11) et peut alors représenter jusqu'à 82% de l'activité totale de  $\beta$ -oxydation (Masterson & Wood, 2001, 2009). Il est important de noter que chez les plantes aucune protéine multifonctionnelle n'a été identifiée dans la mitochondrie et qu'aucune protéine multifonctionnelle décrite ne possède un signal d'adressage mitochondrial (Arent *et al.*, 2010).

### 1.2.8.1.4 Chez les champignons

L'étude *in silico* de Shen & Burger a révélé l'existence d'orthologues de toutes les enzymes de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale de type I des mammifères chez les champignons filamenteux Ascomycètes analysés, notamment les *Aspergillus* spp. et les *Fusarium* spp. Par contre, aucun homologue du gène de la protéine trifonctionnelle mitochondriale n'a été retrouvé (Shen & Burger, 2009).

Hynes *et al.* avaient déjà identifié les enzymes de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale de type I chez *A. nidulans* (Hynes *et al.*, 2008) : une ACD, une ECH-2, une HAD et une thiolase. Chez *A. nidulans* (Hynes *et al.*, 2008; Maggio-Hall & Keller, 2004) et *P. anserina* (Boisnard *et al.*, 2009), un mutant *echA* $\Delta$  déficient pour l'enzyme catalysant la deuxième réaction s'est révélé incapable de croître sur AG à courte chaîne utilisés comme seule source de carbone. Une absence de croissance du mutant *echA* $\Delta$  de *P. anserina* est observée également sur AG à longue chaîne. L'étude de l'assimilation des AG, utilisés comme seule source de carbone, par les mutants déficients pour l'import des protéines dans les peroxysomes a permis de montrer que la dégradation des AG courte chaîne s'effectue exclusivement dans les mitochondries chez *P. anserina* (Boisnard *et al.*, 2009). A l'inverse, chez *A. nidulans*, leur catabolisme nécessite des peroxysomes fonctionnels (Hynes *et al.*, 2008).

## 1.2.8.2 La $\beta$ -oxydation peroxysomale

Les peroxysomes et les glyoxysomes font partie des « microbodies », petits organites sphériques séparés du cytoplasme par une membrane unique (Kunau *et al.*, 1995; Poirier *et al.*, 2006). La fonction première des peroxysomes est de dégrader le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) très toxique pour la cellule et généré localement par diverses enzymes, dont les ACO. Tous les peroxysomes contiennent en principe la catalase, permettant de dégrader l' $H_2O_2$  en produisant de l'oxygène et de l'eau. Les glyoxysomes se différencient des peroxysomes par le fait qu'ils hébergent en plus le cycle du glyoxylate. Afin de simplifier, nous utiliserons le terme général de peroxysomes pour nous référer indifféremment aux peroxysomes et aux glyoxysomes.

Les enzymes nécessaires aux métabolismes peroxysomaux sont acheminées dans les peroxysomes grâce aux peroxines (codées par les gènes *PEX*) après leur synthèse dans le cytoplasme (Gabaldón, 2010; Kiel *et al.*, 2006; Schrader & Fahimi, 2008). Pex5p permet l'adressage au peroxysome des protéines comportant en C-terminal la séquence PTS1, constituée du tripeptide consensus {S/A/G/C/N}-{R/K/H}-{L/I/V/M/A/F} (Gould *et al.*, 1987; Neuberger *et al.*, 2003). Pex7p est le récepteur cytosolique des protéines contenant le signal d'adressage PTS2 en N-terminal, défini par la séquence aminée {R/K}-{L/V/I}-X<sub>5</sub>-{H/Q}-{L/A} (Miyata *et al.*, 2009; Osumi *et al.*, 1991; Swinkels *et al.*, 1991).

Il n'a été admis que récemment que la membrane peroxysomale n'était pas imperméable à tous les facteurs solubles, mais seulement aux molécules volumineuses comme l'ATP, les cofacteurs  $NAD^+/NADH+H^+$ ,  $NADP^+/NADPH+H^+$ , le CoA et ses dérivés (Antonenkov & Hiltunen, 2006; Rottensteiner & Theodoulou, 2006). Le transport des substrats de taille réduite (< 300-400 Da), comme certains intermédiaires du cycle du glyoxylate, semble facilité par des protéines qui forment des pores dans la membrane peroxysomale (Antonenkov *et al.*, 2009; Grunau *et al.*, 2009).

La première étape de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale est classiquement catalysée par une ACO. Une protéine multifonctionnelle est responsable des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> étapes enzymatiques, la dernière étape étant assurée par une thiolase indépendante. Il existe cependant un système peroxysomal hybride dans lequel la première réaction est catalysée par une ACD (Shen & Burger, 2009).

### 1.2.8.2.1 Import peroxysomal et activation des acides gras

L'import peroxysomal des AG à longue chaîne carbonée d'abord activés dans le cytosol est assuré par des transporteurs de la superfamille des protéines ABC. Ces dernières possèdent un domaine (ATP-binding cassette ou ABC), permettant la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, et dont la séquence peptidique contient deux motifs hautement conservés, Walker A et Walker B (Gaur *et al.*, 2005).

**Chez les mammifères**, ces transporteurs ont été revus par Wanders *et al.* (Wanders *et al.*, 2006). L'Homme en possède deux : l'ABCD1 ou Adrenoleucodystrophy protein (ALDP) dont le gène est sur le chromosome X, et l'ABCD2 ou Adrenoleucodystrophy related protein (ALDRP) dont le gène est sur le chromosome 12. L'adrénoleucodystrophie est due à l'absence d'une ALDP ou d'une ALDRP fonctionnelle. L'accumulation des AG à très longue chaîne peut alors se traduire par trois tableaux cliniques différents (Cappa *et al.*, 2011):

- ❶ La démyélinisation centrale progressive se manifeste initialement entre 4 et 8 ans par des troubles de l'attention ou une hyperactivité. Puis les troubles atteignent la cognition, la vision, l'audition et les fonctions motrices entraînant un handicap total dans les 2 ans.

- ② L'adrénomyélonéuropathie se manifeste plus tardivement (deuxième décennie) et entraîne paraparésie, troubles sphinctériens et sexuels, ainsi qu'une insuffisance surrénalienne. Les symptômes s'amplifient avec les années. La moitié des femmes qui portent la mutation développent ce tableau clinique mais le début est plus tardif (> 35 ans) et la maladie moins grave.
- ③ la 3<sup>e</sup> forme clinique ne comporte que l'insuffisance surrénalienne, qui apparaît à partir de l'âge de 2 ans.

**Chez les plantes,** un seul ABC transporteur a été décrit. Il se nomme COMATOSE (CTS), PXA1 ou PED3. Chez *A. thaliana*, l'inactivation de ce transporteur chez le mutant *ped3Δ* permet la croissance en présence d'un proherbicide, l'acide 2,4-dichlorophenoxybutyrique. La croissance du plant sauvage en présence de ce substrat est impossible car après être importé dans les peroxyosomes, il y est transformé par la  $\beta$ -oxydation en un herbicide, l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (Hayashi *et al.*, 2002). Le mutant *ped3Δ* est également résistant à une phytohormone favorisant l'enracinement, l'acide indole-3-butyrrique, car il ne peut la métaboliser (Zolman *et al.*, 2001). Le gène *CTS* est fortement surexprimé pendant la germination juste après l'imbibition (Footitt *et al.*, 2002).

**Chez les champignons,** l'import et l'activation des AG a été bien décrit chez *S. cerevisiae* (Black & DiRusso, 2003). Les AG à courte et moyenne chaîne semblent traverser la membrane peroxyosomale sous forme libre. Initialement, van Roermund *et al.* avaient suggéré que les AG à moyenne chaîne étaient pris en charge par Pex11p. L'inactivation du gène de cette peroxyne impliquée dans la régulation de la prolifération peroxyosomale chez le mutant *pex11Δ* se traduit, en plus de l'absence d'augmentation du nombre de ses peroxyosomes en présence d'AG, par un déficit de croissance sur AG à moyenne chaîne. Pour les auteurs, c'était la dégradation des AG à moyenne chaîne qui permettait la prolifération peroxyosomale, en générant un métabolite signal, et non la peroxyne Pex11p (van Roermund *et al.*, 2000). Mais cette hypothèse a été contredite deux ans plus tard par Li et Gould qui ont démontré que Pex11p pouvait induire la prolifération des peroxyosomes, même en l'absence de catabolisme peroxyosomal (Li & Gould, 2002). Les AG à courte et moyenne chaîne carbonées sont activés à leur entrée dans le peroxyosome (Hettema *et al.*, 1996; Hiltunen *et al.*, 2003) par l'acyl-CoA synthase Faa2p (Hettema & Tabak, 2000).

Dans le cas des AG à longue chaîne, le transport à travers la membrane peroxyosomale et l'activation des AG sont combinés et sont dépendants d'un ABC transporteur hétérodimérique, Pxa1p-Pxa2p (Hettema & Tabak, 2000; Hiltunen *et al.*, 2003; Shani *et al.*, 1995). Très récemment, l'équipe de van Roermund & Wanders vient de montrer que les deux protéines humaines ABCD1 et ABCD2 étaient nécessaires pour compléter un double mutant *pxa1Δ/pxa2Δ* de *S. cerevisiae*, incapable d'oxyder l'acide oléique et de croître sur C18:1 comme seule source de carbone. La complémentation n'était que partielle si une seule des deux protéines était apportée. Les auteurs ont pu montrer qu'ABCD1 et ABCD2 possédaient des spécificités de substrat différentes. L'expression d'ABCD2 chez le double mutant *pxa1Δ/pxa2Δ* de *S. cerevisiae* permettait de restaurer la  $\beta$ -oxydation du C22:0 et de différents AG à très longue chaîne insaturés (C24:6 et surtout C22:6). L'expression d'ABCD1 restaurait surtout l'activité sur les AG à très longue chaîne saturés (C24:0 et C26:0) (van Roermund *et al.*, 2011).

Chez *A. nidulans*, Hynes *et al.* ont identifié la protéine antA orthologue de Pxa1p. La délétion du gène codant pour cet ABC transporteur s'accompagnait d'une diminution importante de la croissance du mutant sur tous les AG utilisés comme seule source de carbone (Hynes *et al.*, 2008), y compris les AG à courte chaîne catabolisés par les mitochondries. La  $\beta$ -oxydation peroxyosomale permet donc la dégradation des AG quelque soit la longueur de la chaîne carbonée. La délétion des peroxyines impliquées dans l'import des protéines peroxyosomales confirme cette notion (Hynes *et al.*, 2008).

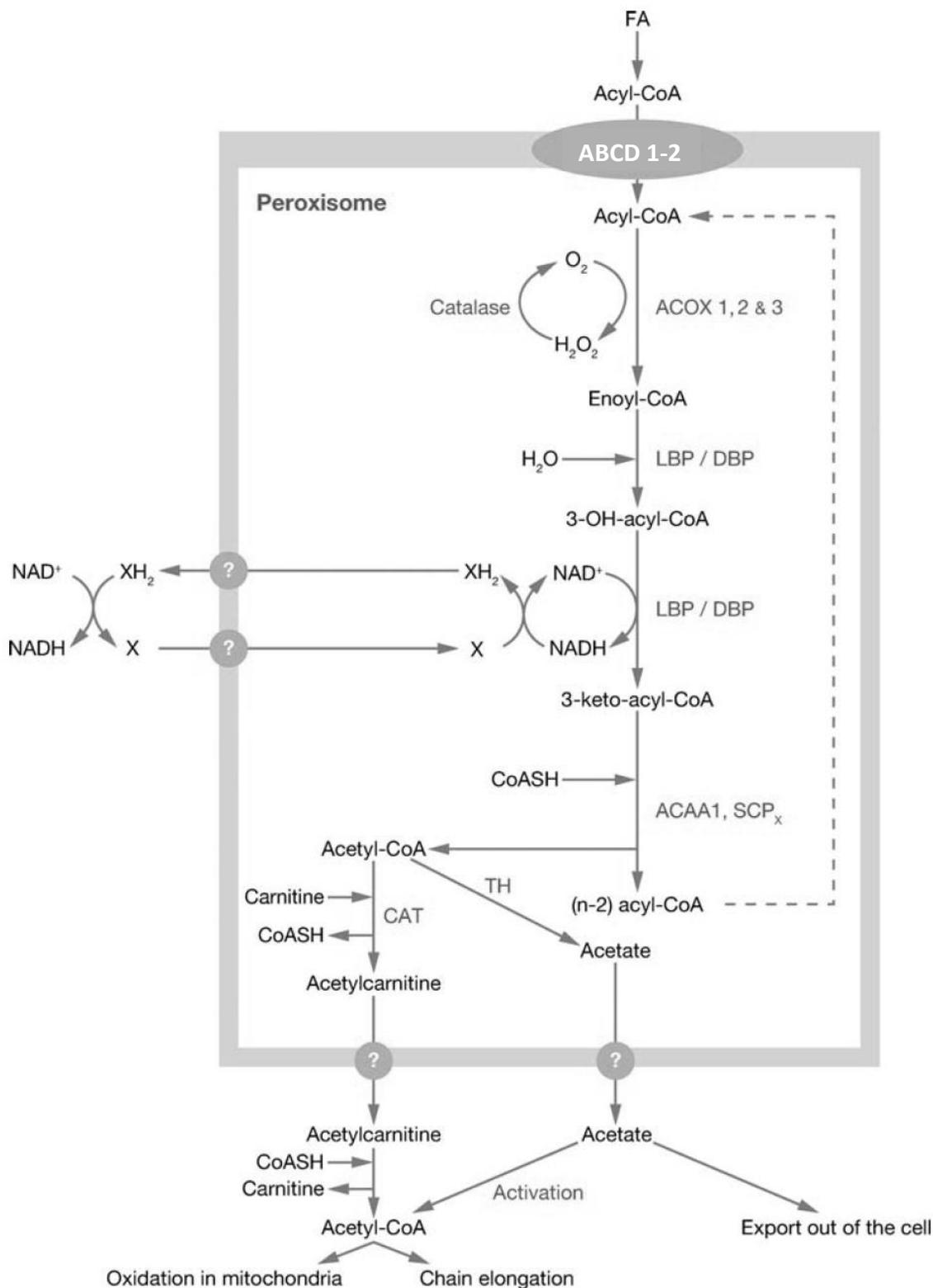
Le champignon filamentueux *P. anserina* possède un ABC transporteur hétérodimérique (pABC1-pABC2). Mais contrairement à *S. cerevisiae*, l'absence d'une ou des deux protéines n'affecte pas sa croissance sur AG à longue chaîne utilisés comme seule source de carbone. L'inactivation de la protéine multifonctionnelle de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale Fox2p chez le double mutant *pxa1* $\Delta$  *pxa2* $\Delta$  de *P. anserina* se traduit néanmoins par une diminution de sa croissance sur un milieu contenant de l'acide oléique comme seule source de carbone, comme pour le simple mutant *fox2* $\Delta$ . Ces travaux suggèrent donc l'existence d'une autre voie d'import peroxysomal des AG à longue chaîne carbonée chez *P. anserina* (Boisnard *et al.*, 2009).

### 1.2.8.2.2 Chez les mammifères, deux protéines multifonctionnelles peroxysomales

Alors que les AG de courte et moyenne chaînes sont exclusivement catabolisés par la mitochondrie et que les AG à longue chaîne sont dégradés préférentiellement par la mitochondrie, les AG de très longue chaîne (en particulier le C26:0) ne peuvent être catabolisés que par les peroxysomes (**Figure 8**). De même, les acides dicarboxyliques de longue chaîne (produits par l' $\omega$ -oxydation), certains AG polyinsaturés comme le C24:6, certaines prostaglandines ou leucotriènes, ou bien les vitamines A ou E sont exclusivement dégradés par la  $\beta$ -oxydation peroxysomale (Wanders & Waterham, 2006).

La première et la dernière réaction de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale sont catalysées respectivement par une ACO et une KAT. Les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> étapes enzymatiques sont médiées par une protéine multifonctionnelle (Poirier *et al.*, 2006; Tsuchida *et al.*, 2011).

- Chez le rat (Osumi & Hashimoto, 1979), la protéine multifonctionnelle de type 1 (MFP-1, MFE-1) est une protéine monomérique de 722 acides aminés (79 kDa) avec une activité 2-énoyl-CoA hydratase de type 1 (en N-terminal), une activité (L)-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (en C-terminal) et une activité  $\Delta_3, \Delta_2$ -énoyl-CoA isomérase (en N-terminal) (Poirier *et al.*, 2006). Cette protéine possède un signal d'adressage peroxysomal PTS1 (-SKL<sub>COOH</sub>). MFE-1 accepte les esters de CoA à courte et longue chaîne, les intermédiaires hydroxylés de la voie de biosynthèse des acides biliaires et les acides dicarboxyliques issus de l' $\omega$ -oxydation (Ferdinandusse *et al.*, 2004). Aucun déficit en MFE-1 n'a été décrit chez l'Homme. De même, la délétion de MFE-1 n'entraîne pas de symptôme clinique ni de modification sensible du métabolisme lipidique chez la souris (Qi *et al.*, 1999).
- La structure de la protéine multifonctionnelle de type 2 (MFE-2) a été déterminée par cristallographie chez l'Homme (Kristian Koski *et al.*, 2005). Homodimérique, elle comporte trois domaines fonctionnels au sein de la même chaîne peptidique (Poirier *et al.*, 2006) : un domaine déshydrogénase, un domaine hydratase et à son extrémité C terminale un domaine Sterol Carrier Protein 2 (SCP2). SCP2 forme une poche hydrophobe capable de se lier avec les stérols, les AG et les esters de CoA (Stolowich *et al.*, 2002), mais son rôle exact n'est pas déterminé (Haapalainen *et al.*, 2001; Kristian Koski *et al.*, 2005). MFE-2 possède comme MFE-1 un signal d'adressage PTS1 (-AKL<sub>COOH</sub>). MFE-2 est essentielle au métabolisme lipidique au sens large :  $\beta$ -oxydation des AG (en particulier AG à longue et très longue chaîne et AG  $\alpha$ -méthylés) mais aussi synthèse des acides biliaires et de l'acide docosahéxaénoïque (AG  $\omega$ -3 composant du cerveau humain et de la rétine). Le déficit en MFE-2 s'accompagne chez l'Homme d'un syndrome dysmorphique (macrocéphalie) et hypotonique, léthal au cours de la première année de vie (Huyghe *et al.*, 2006).



**Figure 8. Représentation schématique de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale chez l'Homme (Wanders & Waterham, 2006).** La molécule d'oxygène est l'accepteur d'électron au cours de la première étape de la  $\beta$ -oxydation, générant de l' $H_2O_2$ , dont la dégradation en  $O_2$  est catalysée par la catalase. Deux protéines multifonctionnelles (LBP et DBP) de stéréospécificité différente peuvent catalyser les 2ème et 3ème réactions de la  $\beta$ -oxydation. ACOX : acyl-CoA oxydase, LBP : protéine multifonctionnelle peroxysomale de type I, DBP : protéine multifonctionnelle peroxysomale de type II, ACAA1 : 3-kétoacyl-CoA thiolase 1, SCPx : Sterol-Carrier-Protein 2-3-kétoacyl-CoA thiolase, TH : acétyl-CoA synthétase, CAT : carnitine acétyl-CoA transférase, ABCD1 : adrenoleucodystrophy protein, ABCD2 : adrenoleucodystrophy related protein

### 1.2.8.2.3 Chez les végétaux, plusieurs protéines multifonctionnelles peroxysomales

Chez les végétaux supérieurs, la  $\beta$ -oxydation a initialement été étudiée chez le concombre (*Cucumis sativus*), pour lequel 4 protéines multifonctionnelles ont été décrites (Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995). Parmi elles, CsMFPa comporte en plus des activités énoyl-CoA hydratase et (*L*)-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, une activité  $\Delta_3, \Delta_2$ -énoyl-CoA isomérase et (*D*)-3-hydroxyacyl-CoA épimérase (Preisig-Müller *et al.*, 1994).

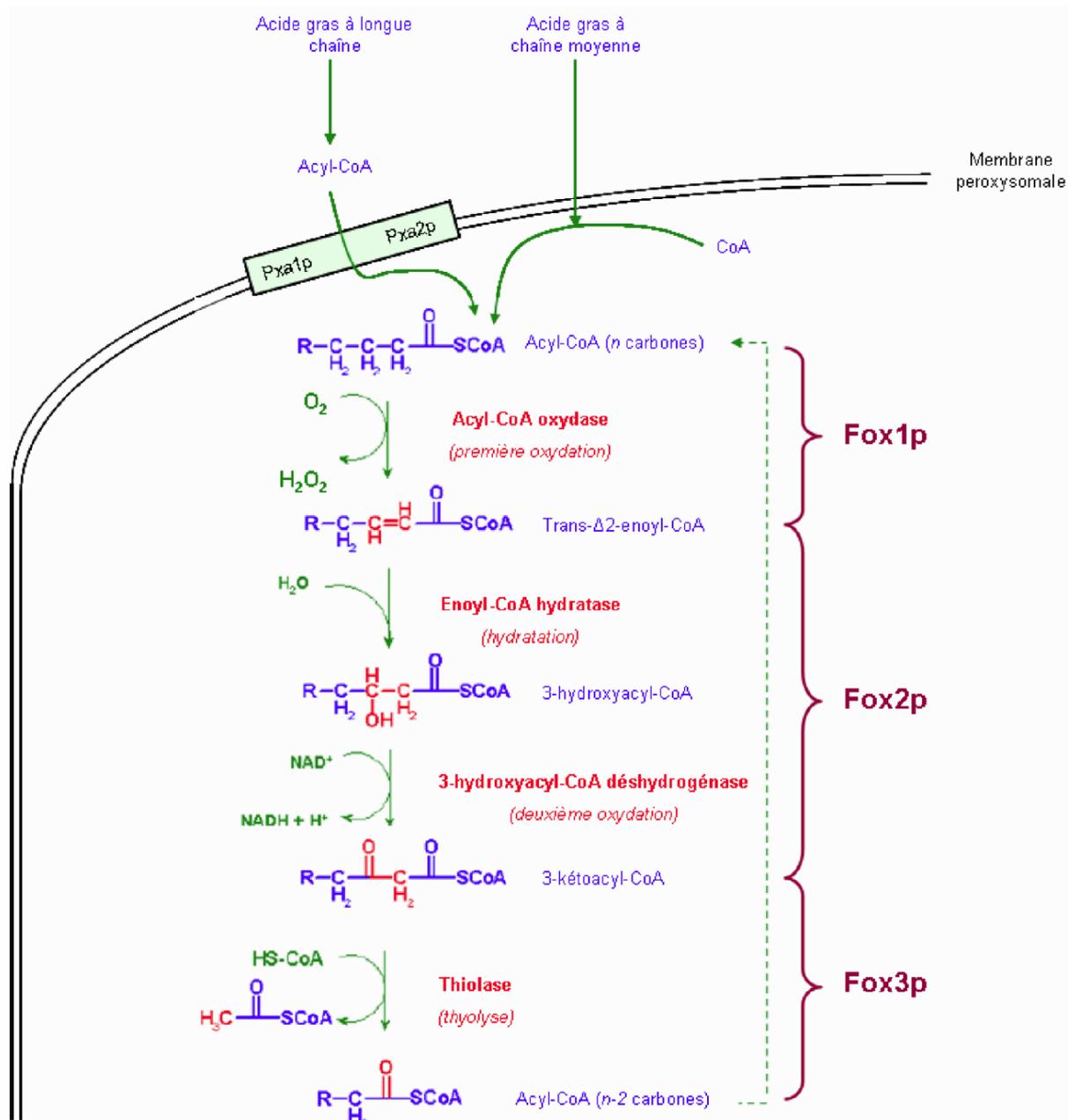
Le génome d'*A. thaliana* ne contient que deux gènes, *AIM1* et *MFP2*, qui possèdent respectivement 56 et 75% d'identité avec CsMFPa (Arent *et al.*, 2010). Mfp2p est une protéine monomérique de 79 kDa, dont les 3 domaines sont similaires à ceux de la MFE-1 de mammifère. Mfp2p est induite durant la germination et exprimée au début de la phase de croissance (Rylott *et al.*, 2006). Aim1p est surtout exprimée dans les fleurs, siliques et plants de plus de 8 jours (Richmond & Blecker, 1999). Ces deux protéines multifonctionnelles diffèrent par leur domaine ECH. L'ECH d'Aim1p peut catalyser les substrats jusqu'au 2-*trans*-tétradécénoyl-CoA mais présente une plus grande affinité pour ceux à courte chaîne carbonée (Arent *et al.*, 2010). MFP2 comporte une ECH pour les substrats à courte et moyenne chaînes (maximum d'activité entre le 2-*trans*-octénoyl-CoA et le 2-*trans*-dodécénoyl-CoA) (Arent *et al.*, 2010; Rylott *et al.*, 2006). L'étude de la spécificité de substrats des ECH de Mfp2p et Aim1p révèle qu'aucune des deux protéines n'est capable d'efficacement cataboliser les substrats non ramifiés de plus de 14 carbones. Il reste donc à identifier une ECH peroxysomale, spécifique des esters de CoA à longue chaîne carbonée chez *A. thaliana* (Arent *et al.*, 2010).

### 1.2.8.2.4 Chez les champignons, une seule protéine multifonctionnelle peroxysomale

La  $\beta$ -oxydation peroxysomale de *S. cerevisiae* a longtemps servi de modèle pour l'ensemble du règne fongique. Elle ne fait intervenir que trois enzymes, pour lesquelles il n'existe pas de paralogues (**Figure 9**, revue par Hiltunen *et al.* (Hiltunen *et al.*, 2003)) : une ACO (Pox1p ou Fox1p), la protéine multifonctionnelle de type 2 (Fox2p) et une KAT (Pot1p ou Fox3p). Chez d'autres levures, il existe plusieurs ACO (6 chez *Y. lipolytica*, 3 chez *C. tropicalis*), ayant différentes spécificités de substrat.

*Neurospora crassa* présente un système de  $\beta$ -oxydation non mitochondriale particulier. En effet, il ne s'agit pas d'une  $\beta$ -oxydation peroxysomale *stricto sensu* puisqu'elle a lieu dans des organites dépourvus d'activité catalase (Kunau *et al.*, 1988; Thieringer & Kunau, 1991). La première réaction est alors catalysée par une ACD et non par une ACO. Shen & Burger dans leur analyse *in silico* prédisent l'existence du même catabolisme lipidique chez deux espèces proches de *N. crassa*, *Magnaporthe grisea* et *Chaetomium globosum*, ainsi que chez deux espèces du genre *Hypocrea* (Shen & Burger, 2009).

Chez les organismes fongiques, il n'existe que des protéines multifonctionnelles de type 2 (MFE-2). La MFE-1 peroxysomale de rat est cependant capable de restaurer la croissance sur acide oléique d'un mutant de *S. cerevisiae* déficient en MFE-2. La stéréospécificité des réactions d'hydratation de l'énoyl-CoA et de déshydrogénation du 3-hydroxyacyl-CoA est alors inversée (Filpula *et al.*, 1995).



**Figure 9. La  $\beta$ -oxydation peroxysomale des acides gras saturés chez *S. cerevisiae*** (d'après Hiltunen *et al.*, 2003). Les acides gras sont préalablement activés par une acyl-CoA synthétase et importés dans le peroxysome. La dégradation peroxysomale des acyl-CoA saturés à n carbones requiert 4 réactions catalysées par 3 enzymes :

- Fox1p (acyl-CoA oxydase) qui permet la formation de *trans*-2-énoyl-CoA,
- Fox2p, protéine multifonctionnelle (énoyl-CoA hydratase de type II et (D)-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, qui permet la formation de 3-kétoacyl-CoA,
- Fox3p (3-kétoacyl-CoA thiolase) qui génère un acétyl-CoA et un acyl-CoA possédant n-2 carbones.

La structure de MFE-2 a été déterminée par cristallographie chez *C. tropicalis* (Ylianttila *et al.*, 2006). Même si les MFE-2 de levures comportent 3 domaines comme celles des mammifères, leur composition est différente : deux domaines (D)-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et un domaine ECH-2 mais pas de domaine Sterol Carrier Protein 2 (Poirier *et al.*, 2006). La conformation secondaire et tertiaire des MFE-2 de levures et de mammifères est donc probablement différente, ce qui fait que les domaines permettant la dimérisation de ces MFE-2 sont probablement différents, ainsi que la structure quaternaire en découlant (Kristian Koski *et al.*, 2005; Ylianttila *et al.*, 2006). Il semblerait que celle de *N. crassa* soit tétramérique (Thieringer & Kunau, 1991).

Les MFE-2 décrites sont des protéines de 894 aa (*N. crassa* (Fossà *et al.*, 1995; Thieringer & Kunau, 1991)), 900 aa (Fox2p ou Fox2p, *S. cerevisiae* (Hiltunen *et al.*, 1992)) ou 905 aa (Mfe2p, *C. tropicalis* (Moreno de la Garza *et al.*, 1985)), portant un signal d'adressage PTS1. Les deux domaines déshydrogénases chez *S. cerevisiae* possèdent 40% d'homologie entre eux (Qin *et al.*, 1999). Il existe une spécificité de substrat : le domaine N-terminal (Déshydrogénase A, résidus 1 à 313) chez *C. tropicalis* peut catalyser la réaction à partir d'esters de CoA à moyenne et longue chaîne. Le deuxième domaine (Déshydrogénase B, acides aminés 314 à 604) possède lui une plus forte affinité pour les substrats à courte chaîne (Ylianttila *et al.*, 2006). Chaque déshydrogénase contient un site de liaison au NAD et comporte la triade de résidus catalytiques Ser-Tyr-Lys caractéristique de la superfamille des Short-chain alcohol Dehydrogenase / Reductase.

Les premières études fonctionnelles réalisées chez *C. tropicalis* avaient suggéré une activité épimérase pour Mfe2p (Moreno de la Garza *et al.*, 1985). Mais cette hypothèse résultait de l'observation d'une consommation de (*D*)-3-hydroxyacyl-CoA, qui est en fait l'intermédiaire réactionnel de Mfe2p. Les travaux de Hiltunen *et al.* ont par la suite permis de montrer chez *S. cerevisiae* que Fox2p seule n'est pas capable d'effectuer l'isomérisation du (*L*)-3-hydroxyacyl-CoA (Hiltunen *et al.*, 1992).

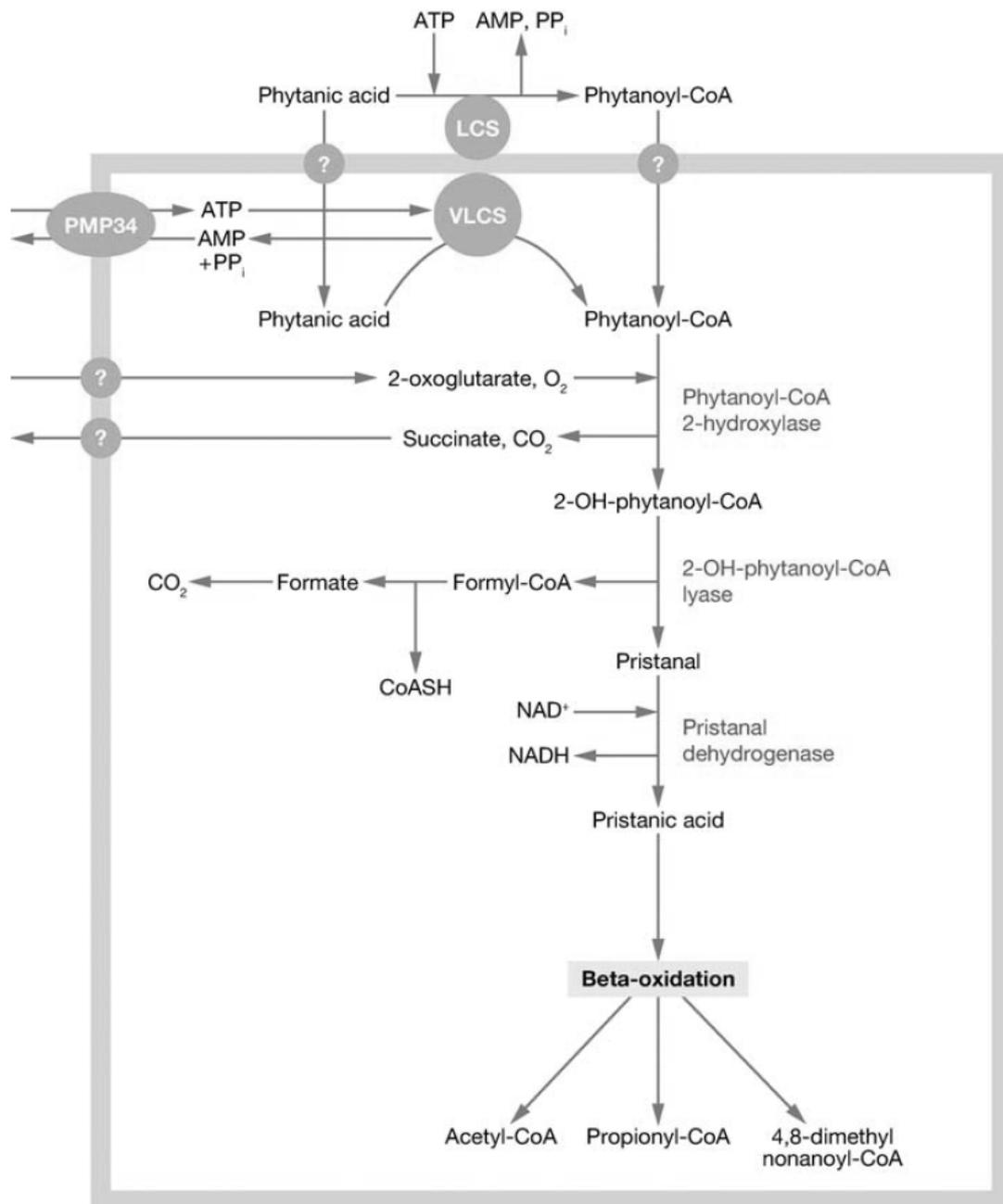
Les mutants *fox2Δ* de *S. cerevisiae* (Hiltunen *et al.*, 1992) et de *C. albicans* (Piekarska *et al.*, 2006; Ramírez & Lorenz, 2007) sont incapables de pousser sur AG utilisés comme seule source de carbone. En revanche chez *A. nidulans*, la perte de MFE-2 (FoxA) affecte la croissance sur AG longue chaîne, mais pas sur AG courte chaîne. Etant donné que la  $\beta$ -oxydation peroxysomale peut aussi dégrader les AG courte chaîne, il semble donc qu'il existe chez *A. nidulans* des enzymes redondantes à FoxA dont la nature reste à préciser (Reiser *et al.*, 2009).

### 1.3 L' $\alpha$ -oxydation des acides gras

Les AG possédant un groupe méthyle sur le carbone 3, comme l'acide phytanique, ne peuvent pas subir de  $\beta$ -oxydation (Wanders *et al.*, 2010). Chez les mammifères, ils sont préférentiellement catabolisés par l' $\alpha$ -oxydation (**Figure 10**) localisée exclusivement dans les peroxysomes (Jansen & Wanders, 2006). Chez l'Homme, le blocage de l' $\alpha$ -oxydation (en particulier au niveau de la première étape) entraîne l'accumulation d'un AG ramifié issu de la dégradation de la chlorophylle, l'acide phytanique, à l'origine du syndrome de Refsum (Refsum, 1947). L'anomalie la plus fréquente et la plus précoce est une rétinite pigmentaire évoluant vers la cécité. Puis peuvent notamment apparaître une anosmie, une ataxie cérébelleuse, une neuropathie périphérique (Wanders *et al.*, 2010).

Comme pour la  $\beta$ -oxydation, l'AG doit être préalablement activé en acyl-CoA avant d'être dégradé. L'estérification de l'acide phytanique en phytanoyl-CoA a lieu dans le peroxysome grâce à la very-long-chain acyl-CoA synthétase (Steinberg *et al.*, 1999), ou à l'extérieur du peroxysome grâce à la long-chain acyl-CoA synthétase (Watkins *et al.*, 1996). Le phytanoyl-CoA est ensuite importé dans le peroxysome par un transporteur de la membrane peroxysomale (à notre connaissance, non encore caractérisé). Ce dernier mécanisme d'activation semble le plus fréquent.

La première étape de l' $\alpha$ -oxydation, l'hydroxylation du carbone 2, est catalysée par la phytanoyl-CoA hydroxylase. Cette réaction est dépendante de l'ion  $\text{Fe}^{2+}$ , de la vitamine C et du 2-oxoglutarate et génère, en plus du 2-hydroxyphytanoyl-CoA, du  $\text{CO}_2$  et de l'acide formique, par la suite transformé à son tour en  $\text{CO}_2$  (Poulos *et al.*, 1993). La cristallisation de la phytanoyl-CoA hydroxylase a permis de prédire les conséquences des mutations de ce gène sur la configuration de la protéine et leur implication dans le syndrome de Refsum (McDonough *et al.*, 2005).



**Figure 10. Organisation des enzymes impliquées dans l' $\alpha$ -oxydation de l'acide phytonoïque dans les peroxysomes de mammifères (Jansen & Wanders, 2006).** LCS : Long-chain acyl-CoA synthase, VLCS : Very-long-chain acyl-CoA synthase.

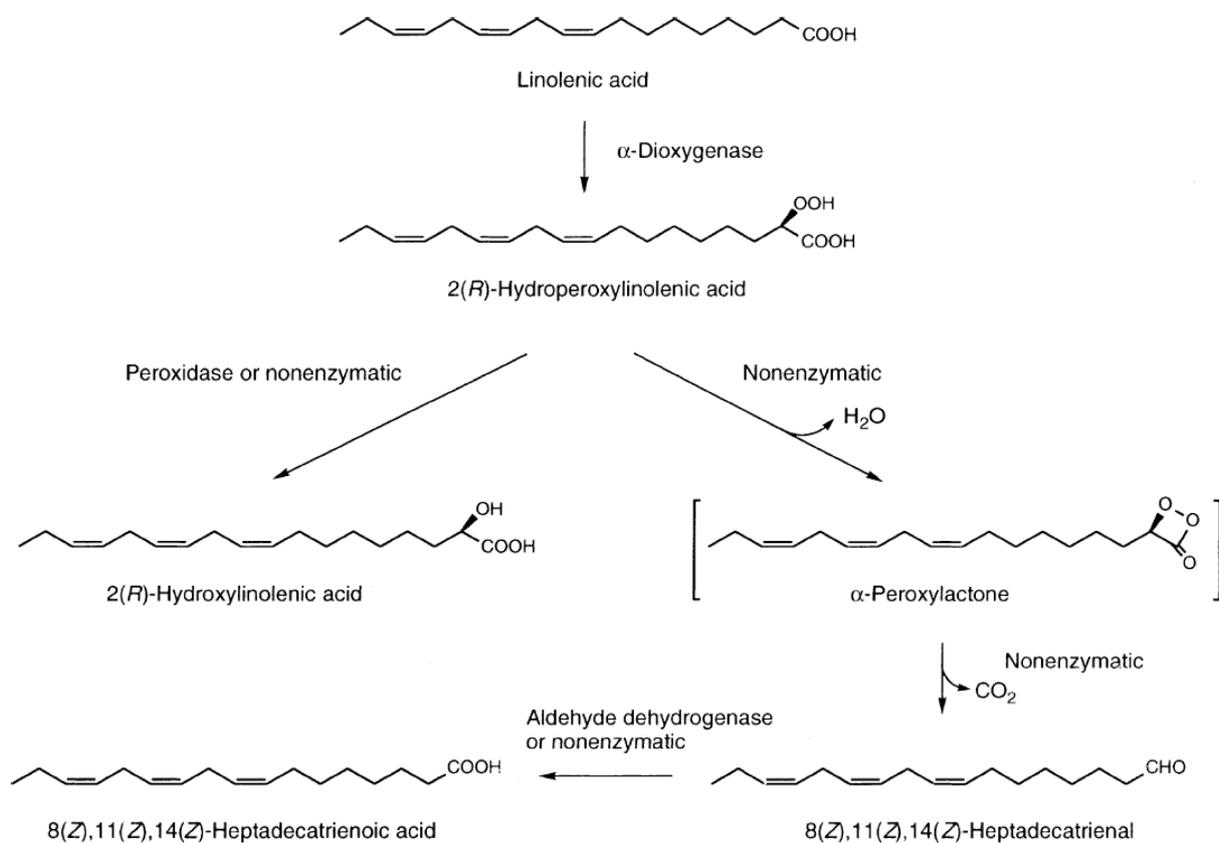
La deuxième étape est une décarboxylation du 2-hydroxy-phytanoyl-CoA par la 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase. Cette réaction nécessite la présence de l'ion  $Mg^{2+}$  et de thiamine pyrophosphate (TPP) et produit du pristanal et du formyl-CoA, instable et spontanément hydrolysé en formate et  $CO_2$  (Croes *et al.*, 1997). Il semblerait que le formate soit ensuite oxydé par la catalase (Jansen & Wanders, 2006).

Dans la dernière étape, une aldéhyde déshydrogénase NAD(P) dépendante convertit le pristanal en acide pristanique. La protéine possédant cette activité pristanal déshydrogénase peroxysomale reste cependant à déterminer (Wanders *et al.*, 2010). L'acide pristanique peut ensuite être activé en (2R)-pristanoyl-CoA (par exemple par la very-long-chain acyl-CoA

synthétase). L' $\alpha$ -méthylacyl-CoA épimérase (ou racémase) (Schmitz *et al.*, 1995) transforme le (2*R*)-pristanoyl-CoA en (2*S*)-pristanoyl-CoA, qui entrera dans la  $\beta$ -oxydation.

Chez les végétaux, un autre procédé d' $\alpha$ -oxydation existe (Akakabe *et al.*, 2000; Borge *et al.*, 1999). Il est médié par les  $\alpha$ -dioxygénases (revues par Hamberg *et al.*, 2002) et permet, à partir de l'acide linolé(n)ique, la synthèse d'AG hydroperoxylés sur le carbone 2 (**Figure 11**) (Hamberg *et al.*, 1999)). Ces composés sont des oxylipines encore plus instables que les hydroperoxydes générés par les lipoxygénases. Ils sont spontanément convertis en un dérivé  $\alpha$ -péroxylactone qui va rapidement être décarboxylé.

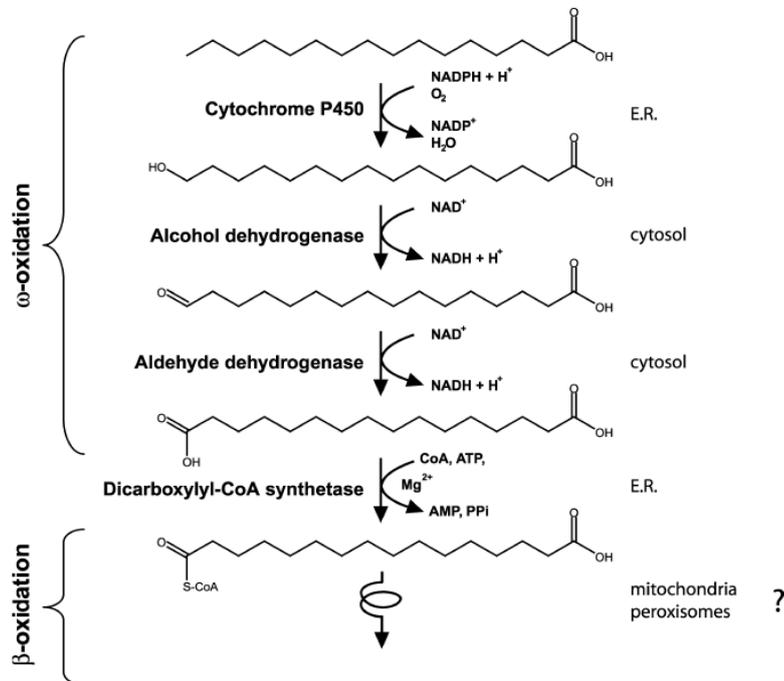
A notre connaissance, aucune  $\alpha$ -oxydation n'a été décrite chez les champignons.



**Figure 11.** Oxygénation de l'acide linolé(n)ique catalysée par l' $\alpha$ -dioxygénase (Hamberg *et al.*, 2002).

## 1.4 L'ω-oxydation des acides gras (Figure 12)

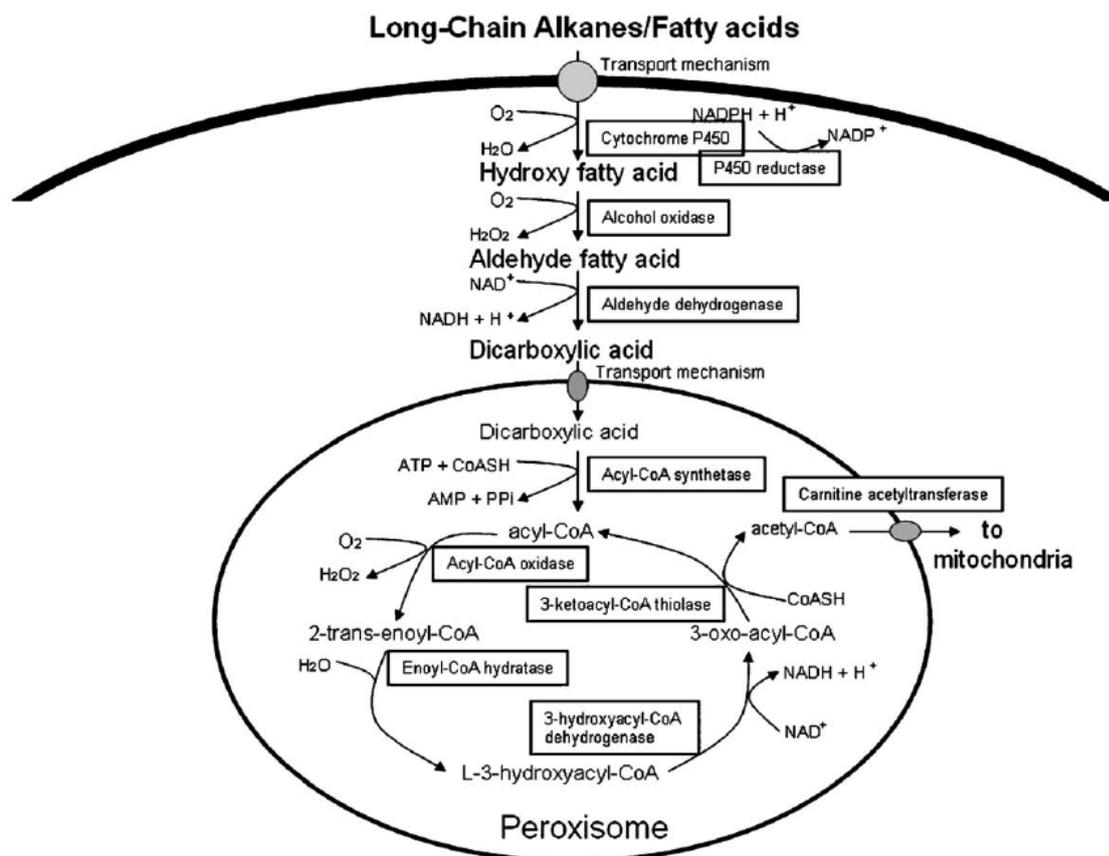
L'ω-oxydation d'un acide monocarboxylique aboutit à la formation d'un acide dicarboxylique (Ferdinandusse *et al.*, 2004).



**Figure 12.** Formation des acides dicarboxyliques à partir des acides monocarboxyliques par ω-oxydation et leur dégradation secondaire par la β-oxydation dans les cellules de mammifères (Ferdinandusse *et al.*, 2004). E.R.: réticulum endoplasmique.

Les AG sont tout d'abord convertis en acide ω-hydroxy-monocarboxylique par un cytochrome P450 microsomal. Cette réaction nécessite de l'oxygène et du  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  comme cofacteurs. Une alcool déshydrogénase cytosolique produit de l'acide ω-oxo-monocarboxylique, puis une aldéhyde déshydrogénase cytosolique permet la formation d'un acide dicarboxylique. Après l'activation par une dicarboxylyl-CoA synthétase microsomale (dans le foie de rat), les dicarboxylyl-CoA peuvent ensuite être raccourcis par la β-oxydation. Ferdinandusse *et al.* ont pu montrer que les principales enzymes concernées chez l'Homme sont l'ACO courte chaîne et la MFE-1 (Ferdinandusse *et al.*, 2004).

Chez les organismes fongiques, l'ω-oxydation a en particulier été décrite chez *C. tropicalis* (Cheng *et al.*, 2005; Craft *et al.*, 2003; Eirich *et al.*, 2004; Picataggio *et al.*, 1992), *Candida maltosa* (Ohkuma *et al.*, 1998) et *Candida cloacae* (Casey *et al.*, 1990) (**Figure 13**). Elle est induite par la présence d'alcane dans le milieu de culture. La long-chain alcohol oxydase Faotp de *C. tropicalis* est nécessaire à la croissance sur octadécane mais pas sur hexadécane ou sur AG à longue chaîne carbonée (C16 :0 et C18 :1) (Cheng *et al.*, 2005).



**Figure 13. Organisation des voies d' $\omega$ -oxydation et de  $\beta$ -oxydation dans les cellules de levures industrielles (Cheng *et al.*, 2005). L' $\omega$ -oxydation permet la transformation des alcanes et des acides gras en acides dicarboxyliques.**

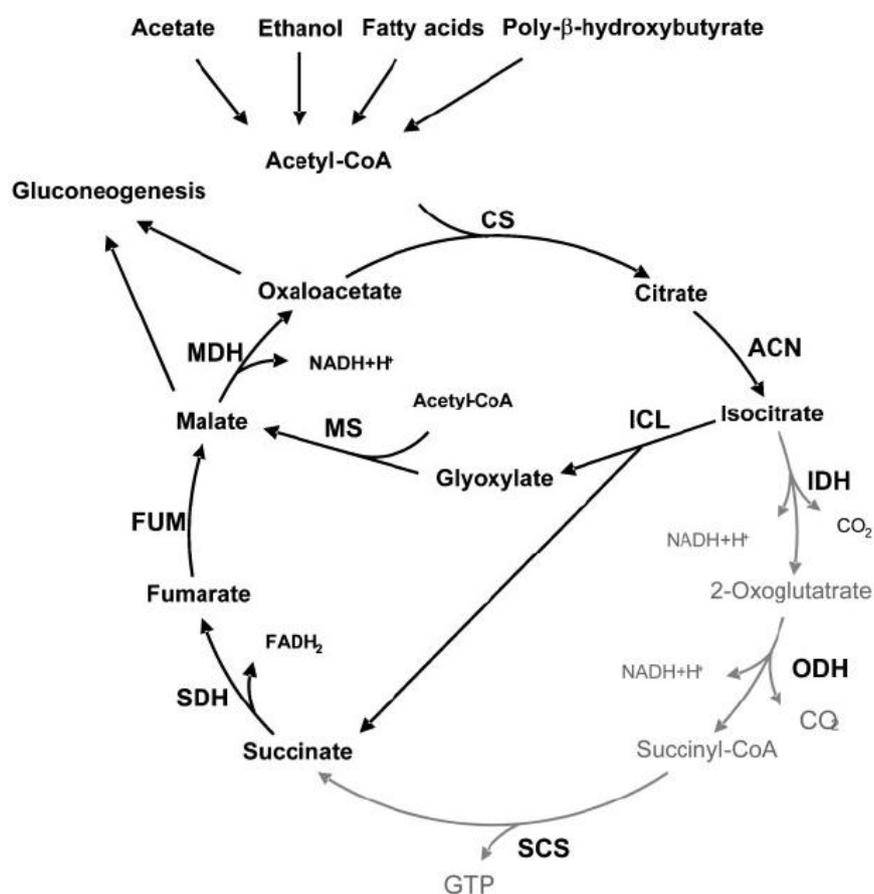
### 1.5 Cycle du glyoxylate et entrée dans la néoglucogénèse

Le cycle du glyoxylate (**Figure 14**), présent chez les champignons, les plantes et les bactéries mais pas chez les mammifères, transforme l'acétyl-CoA en oxaloacétate (Dunn *et al.*, 2009 ; Lorenz & Fink, 2002). Cette voie métabolique permet ainsi l'utilisation de composés tels que les alcanes, les AG, l'éthanol, l'acétate. Sa localisation peut être peroxysomale et / ou cytoplasmique.

Trois réactions, catalysées par la citrate synthase, l'aconitase et la malate déshydrogénase, sont empruntées au cycle des acides tricarboxyliques. Les deux autres réactions spécifiques du cycle du glyoxylate sont catalysées par l'isocitrate lyase (ICL, Icl1p) et la malate synthase (MLS, Mls1p) et réalisent un véritable shunt métabolique. En évitant les deux réactions de décarboxylation du cycle de Krebs, elles permettent l'entrée des composés à deux atomes de carbone (sous forme de succinate puis d'oxaloacétate) dans la néoglucogénèse. La disruption d'Icl1p ou de Mls1p inhibe toute croissance sur les sources de carbone non fermentables chez *S. cerevisiae* (Hartig *et al.*, 1992) ou *C. albicans* (Lorenz & Fink, 2001).

ICL est un homotétramère nécessitant du  $Mg^{2+}$  ou du  $Mn^{2+}$ . Sa structure a été déterminée chez *E. coli* (Britton *et al.*, 2001), *Mycobacterium tuberculosis* (Sharma *et al.*, 2000) et *A. nidulans* (Britton *et al.*, 2000). Les ICL d'eucaryotes (67 kDa) possèdent au centre de l'enzyme 100 résidus supplémentaires par rapport aux ICL de procaryotes (48 kDa). Icl1p et Mls1p sont peroxysomales chez les plantes et les fongiques (signal d'adressage PTS1 chez *C. albicans* et

*C. tropicalis* (Strijbis & Distel, 2010)). Seule exception, *S. cerevisiae*, chez laquelle ces deux protéines peuvent aussi être localisées dans le cytoplasme selon les conditions de culture (Kunze *et al.*, 2002; McCammon *et al.*, 1990). Chez *A. nidulans*, la délocalisation du cycle du glyoxylate dans le cytosol, secondaire à l'invalidation de plusieurs gènes codant pour des peroxines impliquées dans l'import des enzymes peroxysomales, n'affecte pas la croissance sur butyrate ou hexanoate (Hynes *et al.*, 2008).



**Figure 14. Réactions enzymatiques des cycles du glyoxylate et des acides tricarboxyliques (Dunn *et al.*, 2009).** De nombreux métabolisme peuvent générer de l'acétyl-CoA. Les deux réactions spécifiques du cycle du glyoxylate (ICL et MS) permettent d'éviter les deux réactions de décarboxylation du cycle des acides tricarboxyliques. Les trois réactions spécifiques du cycle des acides tricarboxyliques sont représentées en grisé. CS : citrate synthase, ACN : aconitase, IDH : isocitrate déshydrogénase, ODH : 2-oxoglutarate déshydrogénase, SCS : succinyl-CoA synthétase, SDH : succinate déshydrogénase, FUM : fumarase, MDH : malate déshydrogénase, MS : malate synthase, ICL : isocitrate lyase.

La néoglucogénèse permet la transformation en 8 étapes de l'oxaloacétate en glucose-6-phosphate. Six réactions font intervenir les mêmes enzymes que la glycolyse (Turcotte *et al.*, 2010). Deux enzymes sont spécifiques de la néoglucogénèse et permettent sa régulation : la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Pck1p chez *S. cerevisiae*) qui catalyse la conversion de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate (première étape) et la fructose 1-6-biphosphatase (Fbp1p), permettant la conversion du fructose 1,6 biphosphate en fructose 6-phosphate (avant-dernière étape).

## 2 Lipides et champignons

### 2.1 Lipides et membranes fongiques

Phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylethanolamine et cardiolipine sont les principaux PL de membrane. Leurs voies de biosynthèse, étudiées chez *S. cerevisiae* sont les mêmes dans l'ensemble du règne fongique (Carman & Zeimet, 1996; Iwanyshyn *et al.*, 2004; Mysyakina & Feofilova, 2011). Les enzymes de la biosynthèse des PL sont surtout localisées dans les microsomes, les mitochondries et les granules lipidiques. Le catabolisme des PL est médié par les phospholipases A1, A2, C et D (Chopra & Khuller, 1983). La synthèse des sphingolipides débute dans le réticulum endoplasmique et se poursuit dans l'appareil de Golgi. Les sphingolipides sont ensuite envoyés à la membrane plasmique dans les vésicules de sécrétions (Futerman & Riezman, 2005). L'ergostérol est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique (Zinser *et al.*, 1993). Sa concentration globale dans les membranes plasmiques fongiques est de l'ordre de 30-40% (Alvarez *et al.*, 2007).

La composition lipidique de la membrane joue un rôle dans l'adaptation de la cellule à des changements environnementaux, notamment en régulant la fluidité membranaire. Chez *S. cerevisiae*, l'inactivation du gène *OLE1* codant pour une désaturase s'accompagne d'une diminution de la résistance à l'éthanol. La quantité d'acide oléique contenue dans les mutants *ole1Δ* est significativement plus faible. La double liaison *cis* de cet AG lui confère une structure non linéaire, à la différence des AG saturés non ramifiés, augmentant l'encombrement stérique. L'incorporation d'acide oléique dans les phospholipides membranaires diminue ainsi l'effet fluidifiant membranaire de l'éthanol (You *et al.*, 2003). La fluidité membranaire augmente avec la température, du fait des propriétés thermodynamiques des AG (températures de fusion, conséquences de l'insaturation et de la longueur de la chaîne aliphatique). A l'inverse, la fluidité diminue à basse température. L'induction des trois gènes codant pour les désaturases chez *Mucor rouxii* à basse température (10°C) s'accompagne ainsi d'une augmentation du degré d'insaturation des AG membranaires, avec accumulation de C18:2 et de C18:3 (Cheawchanlertfa *et al.*, 2010). L'ergostérol joue un rôle de régulation de la rigidité membranaire : son addition rigidifie la membrane en état fluide et au contraire, fluidifie la membrane en état rigide (Dufourc, 2008). Très hydrophobe, il diminue la perméabilité membranaire (Subczynski *et al.*, 1994).

Les lipides membranaires ont également un rôle dans la morphogénèse. Chez *C. albicans*, les sphingolipides (et en particulier le glucosylcéramide) sont nécessaires pour l'induction de la filamentation et la croissance normale de l'hyphe (Oura & Kajiwara, 2008, 2010). L'inactivation de la glucosylcéramide synthétase 1 diminue la virulence dans un modèle murin de candidose disséminée (Noble *et al.*, 2010). Chez *A. nidulans*, les sphingolipides participent à l'organisation dynamique du cytosquelette d'actine et sont nécessaires pour l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire et de la structure du filament (Cheng *et al.*, 2001).

Les domaines riches en stérol (DRS) identifiés dans les membranes plasmiques des cellules fongiques sont des radeaux lipidiques de grande taille (pouvant atteindre 15 μm<sup>2</sup>), spécifiques des organismes fongiques, qui n'ont jamais été observés chez les mammifères (Alvarez *et al.*, 2007). Les sphingolipides membranaires jouent un rôle dans leur formation (Martin & Konopka, 2004). Les DRS sont localisés au niveau des sites de morphogénèse active : chez *S. cerevisiae*, ils sont retrouvés au niveau du site de bourgeonnement. Ils jouent un rôle important dans la polarisation cellulaire et la localisation appropriée des composants nécessaires à la fusion membranaire et cellulaire pendant le mating (Bagnat & Simons, 2002a, b). Chez *C. albicans*, les DRS sont uniquement détectés à l'extrémité apicale du filament et au niveau des septa. Ils ne sont pas retrouvés dans les formes levure ou pseudofilament. Il est probable que les DRS

permettent ainsi de restreindre la croissance du filament à sa seule extrémité (Martin & Konopka, 2004). Puisque la filamentation est nécessaire à la virulence de *C. albicans*, Martin & Konopka suggéraient également que les DRS jouent un rôle dans la virulence.

*Candida albicans* produit de nombreuses protéines possédant une ancre glycosylphosphatidyl-inositol (GPI), qui sont des facteurs de virulence et qui sont retrouvées dans les DRS : adhésines (Hwp1p, Als1p,...) responsables de l'adhésion aux cellules de l'hôte et de la formation de biofilms, secreted aspartyl proteases (Sap9 et Sap10) (Brown *et al.*, 2007; Navarro-García *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2005). Il a été suggéré que l'induction des protéines à ancre GPI pendant le mating de *S. cerevisiae* et la croissance du filament de *C. albicans* puisse favoriser le regroupement des radeaux lipidiques (Martin & Konopka, 2004). Les protéines acylées sur la face intracellulaire semblent également présentes dans les DRS, comme Ras1p, qui permet la transduction du signal déclenchant la filamentation de *C. albicans* en présence de sérum (Feng *et al.*, 1999).

Le rôle des DRS dans la virulence est également lié à leurs propriétés biophysiques. Nous venons de voir qu'ils sont localisés dans des régions soumises à un remodelage rapide de la paroi cellulaire. La concentration de protéines acylées au niveau des DRS permet d'augmenter la rigidité de ces zones sur la face intracellulaire afin de les rendre moins déformables (Alvarez *et al.*, 2007). Cette rigidité permet ainsi au filament de mieux envahir les tissus.

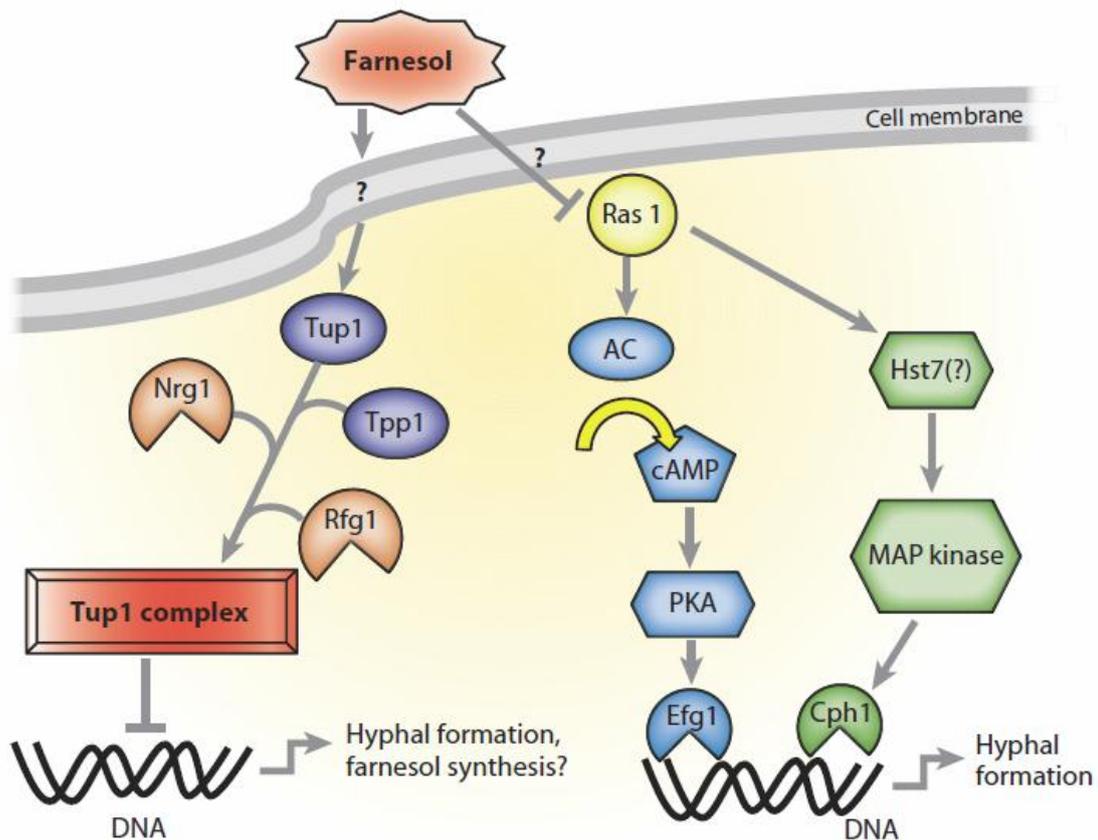
## 2.2 Les lipides, molécules signal

Les micro-organismes régulent leur croissance, leur métabolisme et leur virulence par l'intermédiaire de communications à la fois intra- mais aussi intercellulaires. Chez les champignons pathogènes, le farnésol, les sphingolipides et les oxylipines ont un rôle de molécules signal et interviennent dans la régulation de nombreuses fonctions fongiques (reproduction sexuée, morphogénèse, pathogénicité (Noverr *et al.*, 2003; Shea & Del Poeta, 2006; Singh & Del Poeta, 2011)). Mais elles interfèrent aussi avec les cellules de l'hôte (croissance, différenciation, signalisation, apoptose,... (Hannun & Obeid, 2002; Noverr *et al.*, 2003; Shea & Del Poeta, 2006; Singh & Del Poeta, 2011)) et même avec des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (Cugini *et al.*, 2007; McAlester *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Le farnésol

Le farnésol (1-hydroxy-3,7,11-triméthyl-2,6,10-dodécatriène) est un sesquiterpène (trois unités isoprènes) avec une fonction alcool qui dérive de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Shea & Del Poeta, 2006; Singh & Del Poeta, 2011). En identifiant le farnésol en 2001, Hornby *et al.* ont identifié chez *C. albicans* la première molécule participant au quorum-sensing chez les organismes eucaryotes (Hornby *et al.*, 2001). Le farnésol inhibe la transition levure-filament mais ne bloque pas la croissance du filament. L'effet est obtenu à faible concentration, puisque 1µM de farnésol suffit à réduire de 50% la formation de nouveaux filaments.

Cette molécule est aussi impliquée dans le développement des biofilms chez les *Candida* spp. (Blankenship & Mitchell, 2006; Ramage *et al.*, 2002a, b). Le farnésol entraîne la formation de blastospores en induisant le facteur de transcription *TUPI* qui inhibe la filamentation (Cao *et al.*, 2005), et en réprimant *EFG1* et *CPHI* (Rhome & Del Poeta, 2009), deux facteurs de transcription favorisant la filamentation (**Figure 15**). Ces blastospores vont permettre la dissémination de l'infection à distance (Shea & Del Poeta, 2006). Selon Singh et De Poeta, il semble en effet être dans l'intérêt d'un organisme commensal comme *C. albicans* de pouvoir réguler sa propre croissance afin de prévenir des dommages tissulaires et donc une réponse immunitaire de l'hôte (Singh & Del Poeta, 2011).



**Figure 15. Transduction du signal farnésol chez *Candida albicans* (Rhome & Del Poeta, 2009).** En présence de farnésol, le répresseur Tup1 s'associe avec Tpp1, Nrg1 et Rfg1 pour former un complexe se liant à l'ADN. Ce complexe inhibe l'expression de gènes impliqués dans la filamentation et jouerait un rôle dans le contrôle de la synthèse de farnésol. Le farnésol inhibe également la protéine Ras qui contrôle les voies de l'AMP cyclique et des MAP kinases. Ces cascades favorisent l'expression des facteurs de transcription Efg1 et Cph1 permettant la filamentation. AC : adenylate cyclase; cAMP : cyclic adenosine monophosphate, MAP : mitogen-activated protein; PKA : protein kinase A.

A l'intérieur d'un biofilm, le farnésol peut atteindre des concentrations élevées ( $\geq 1\text{mM}$ ). Weber *et al.* rapportent justement que les *Candida* spp. peuvent tolérer des concentrations de farnésol fongicides ou fongistatiques pour d'autres organismes fongiques (Weber *et al.*, 2010) (par exemple *Aspergillus* spp. (Rhome & Del Poeta, 2009)). Ces auteurs pensent que de par sa nature lipophile, le farnésol peut diffuser librement à travers les membranes et la matrice extracellulaire sans être toxique pour les *Candida* spp., ce qui n'est pas vrai pour d'autres organismes fongiques ou des bactéries. Cette propriété pourrait être exploitée par *C. albicans* pour se protéger d'autres commensaux humains. Ainsi, chez *Pseudomonas aeruginosa* le farnésol inhibe sa motilité (McAlester *et al.*, 2008) et diminue la production d'un facteur de virulence, la pyocyanine (Cugini *et al.*, 2007).

D'autres études ont montré que le farnésol régulerait également chez *C. albicans* des gènes impliqués dans la résistance au stress oxydatif, comme ceux codant pour la catalase ou des superoxyde dismutases (Westwater *et al.*, 2005). Le mécanisme exact n'est pas encore totalement élucidé mais le farnésol régulerait la phosphorylation de protéines kinases activées par le stress, comme Hog1 (Enjalbert & Whiteway, 2005). Récemment, Deveau *et al.* ont montré que le farnésol induisait l'expression de la catalase et la résistance aux ROS (reactive oxygen species) en réprimant la voie Ras1-AMPcyclique (Deveau *et al.*, 2010).

Le lien entre pathogénicité et farnésol chez *C. albicans* a déjà été suggéré par Navarathna *et al.* (Navarathna *et al.*, 2005). Les voies de biosynthèse du farnésol et de l'ergostérol possèdent un précurseur commun, le farnésyl-pyrophosphate. Le traitement par un antifongique azolé, en

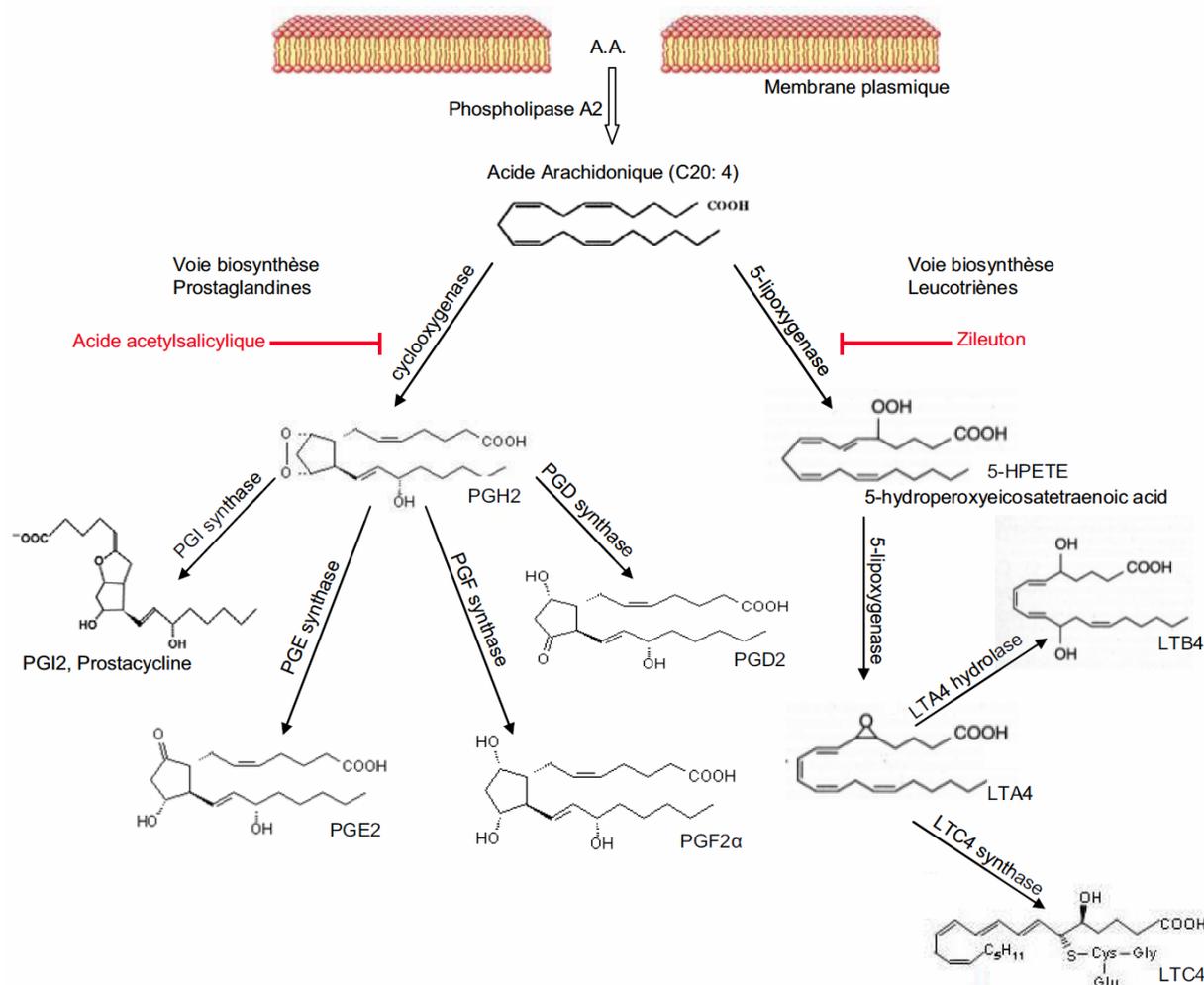
bloquant la synthèse d'ergostérol, entraîne une accumulation de farnésyl-pyrophosphate, et donc induit une augmentation de la production de farnésol (Hornby & Nickerson, 2004). Navarathna *et al.* ont ainsi eu l'idée d'infecter des souris avec une souche de *C. albicans* prétraitée par de faibles concentrations de fluconazole : la virulence de la souche prétraitée par le fluconazole était significativement supérieure à celle de la souche non traitée. A l'inverse, un mutant *dpp3Δ* de *C. albicans*, dont le gène codant pour la phosphatase qui convertit le farnésyl pyrophosphate en farnésol est invalidé et donc qui produit moins de farnésol, était 4 fois moins virulent que la souche sauvage dans un modèle murin de candidose systémique (Navarathna *et al.*, 2007). D'un autre côté, il est intéressant de noter que le farnésol diminue l'expression de deux gènes qui sont induits après l'internalisation de *C. albicans* dans le macrophage (Lorenz *et al.*, 2004). Il s'agit du gène codant pour une acyl-CoA oxydase (orf 19.1652) et d'*ICLI* (Enjalbert & Whiteway, 2005), essentiel à la virulence de *C. albicans* dans deux modèles murins de candidémie (Lorenz & Fink, 2001; Piekarska *et al.*, 2006). Ces données montrent bien que la virulence d'un organisme implique plusieurs facteurs intervenant à différentes étapes de la pathogénèse. Enfin, chez deux champignons filamenteux ascomycètes, *Aspergillus nidulans* (Semighini *et al.*, 2006) et *Fusarium graminearum* (Semighini *et al.*, 2008), le farnésol exerce un rôle proapoptotique. Il inhibe également la germination des conidies et la croissance des colonies de *F. graminearum* (Semighini *et al.*, 2008). Il est essentiel au mating sexuel de *Cryptococcus neoformans* (Shea & Del Poeta, 2006).

### 2.2.2 Les oxylipines

Le terme « oxylipine » (ou oxylipide) désigne tout lipide oxygéné. La classe la plus représentée d'oxylipide dans le monde vivant est celle des éicosanoïdes, comprenant d'une part les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TX), et d'autre part les leucotriènes (LT) (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 éicosanoïdes dérivent tous de l'acide arachidonique (C20:4), acide gras essentiel d'origine végétale et libéré à partir des membranes après activation de la phospholipase A2 au cours de l'inflammation (Ricciotti & FitzGerald, 2011). Les PG et TX sont synthétisés par des cyclooxygénases, inhibées par l'acide acétylsalicylique (Vane & Botting, 1998), et les LT synthétisés par des lipooxygénases, inhibées par le zileuton (**Figure 16**) (McGill & Busse, 1996). Ces éicosanoïdes 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).

Même si *C. albicans* et *Cryptococcus neoformans* ne possèdent pas de cyclooxygénase, ces levures peuvent produire des PG, des TX et des LT (Noverr *et al.*, 2001). En fait, l'équipe de Noverr a montré que de nombreux autres organismes fongiques produisaient des PG et des LT : des champignons filamenteux (*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp.), des zygomycètes (*Absidia corymbifera*, *Rhizopus* spp., *Rhizomucor pusillus*), des dermatophytes (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporium audouinii*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*) et des champignons dimorphiques (*Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*) (Noverr *et al.*, 2002). Les voies de biosynthèse sont cependant encore mal connues. L'acide arachidonique n'est pas présent naturellement chez de nombreux champignons, mais son addition au milieu de culture permet d'augmenter la quantité d'éicosanoïdes synthétisés, indiquant son rôle probable de substrat pour la synthèse d'éicosanoïdes (Ells *et al.*, 2011; Noverr *et al.*, 2003, 2001; Singh & Del Poeta, 2011). *In vivo*, la source d'acide arachidonique pour les pathogènes peut provenir de l'hôte, soit après action de phospholipases fongiques, soit après son relargage direct grâce à la phospholipase A2 de la cellule hôte. Un autre élément en faveur d'une synthèse fongique d'éicosanoïde est que l'aspirine, qui inhibe les cyclooxygénases chez les mammifères, entraîne également une diminution de la production de PG chez les champignons. Cela suggère l'existence d'enzymes

de biosynthèse des éicosanoïdes communes aux deux règnes (Nucci & Anaissie, 2001; Shea & Del Poeta, 2006). Cependant, plusieurs oxylipides fongiques ne dérivent pas de l'acide arachidonique mais plutôt des acides linoléique et linolénique (Noverr *et al.*, 2003) et sont synthétisés par d'autres cascades enzymatiques encore inconnues. Il est également possible que des mécanismes non enzymatiques, impliqués dans la réponse au stress oxydatif et générant des isoprostanes proches des PG, puissent être impliqués dans leur synthèse (Morrow *et al.*, 1996).



**Figure 16. 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.

Une PGE2-like produite par *C. albicans* à partir de l'acide arachidonique possède une activité sur des cellules de mammifère comparable à celle de la PGE2 de mammifère (Noverr & Huffnagle, 2004b) : les PG fongiques pourraient donc interférer dans la modulation de la réponse immunitaire régulée par les PG de l'hôte (Singh & Del Poeta, 2011). En effet, les PG 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 (Noverr & Huffnagle, 2004b; Noverr *et al.*, 2003). Les éicosanoïdes sont des ligands des récepteurs intracellulaires PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferation-Activated Receptor), facteurs de transcription entraînant une polarisation M2 (anti-inflammatoire) des macrophages et la neutralisation de la polarisation M1 (pro-inflammatoire) (Galès *et al.*, 2010).

Les éicosanoïdes jouent également un rôle dans le contrôle de la morphogénèse fongique et dans la formation de biofilm (Singh & Del Poeta, 2011). La PGE2 et le TXB2 augmentent nettement la filamentation de *C. albicans* induite par le sérum, alors que l'addition d'anticorps

anti-PG ou anti-TX au sérum l'inhibe d'environ 30% (Noverr & Huffnagle, 2004a). L'oxylipide 3,18-diHETE (acide 3,18-dihydroxyéicosatétraénoïque) est spécifiquement produit par les formes filamenteuses de *C. albicans* (Noverr *et al.*, 2001). Un produit de la  $\beta$ -oxydation de l'acide linoléique, l'acide 3(R)-hydroxytétradécanoïque, participe aux mécanismes de quorum sensing de *C. albicans* en favorisant la filamentation et la formation de biofilm (Nigam *et al.*, 2011).

Les gènes de la famille *ppo* (*psi* producing oxygénase) qui permettant la production des facteurs *psi* (precocious sexual inducer) ont un rôle dans la régulation du cycle sexuel chez les *Aspergillus* (Tsitsigiannis & Keller, 2007). Certains sont également impliqués dans la synthèse de PG (Tsitsigiannis *et al.*, 2005). L'inactivation de 3 d'entre eux chez *A. fumigatus* entraîne une augmentation de la virulence et de la tolérance à l' $H_2O_2$  (Tsitsigiannis & Keller, 2007).

Chez *Cr. neoformans*, la production de PGE2 s'effectue grâce à l'action de la laccase 1 (Lac1) et éventuellement de deux autres enzymes qu'il reste à caractériser (Erb-Downward & Noverr, 2007). Lac1 peut également générer une série d'oxylipines qui seraient produites dans les mitochondries (Sebolai *et al.*, 2008).

La production d'éicosanoïdes par les organismes fongiques pourrait donc être impliquée dans la virulence à plusieurs niveaux : régulation de la morphogénèse et du cycle cellulaire du champignon, mais aussi communication avec les cellules de l'hôte afin de moduler la réponse immunitaire (Tsitsigiannis *et al.*, 2007). Le développement de molécules ciblant spécifiquement la voie de synthèse des PG fongiques ou leur récepteurs intracellulaires PPAR pourrait constituer une nouvelle stratégie pour combattre l'infection et la colonisation fongique (Erb-Downward & Noverr, 2007; Galès *et al.*, 2010). Dans ce contexte, l'aspirine pourrait même avoir un effet antifongique (Kock *et al.*, 2007)...

### 2.2.3 Les sphingolipides

Les premières études effectuées chez *S. cerevisiae* ont établi que les sphingolipides interviennent également dans la réponse au stress, le blocage du cycle cellulaire, l'apoptose et la croissance cellulaire (Jenkins *et al.*, 1997; Patton *et al.*, 1992; Wells *et al.*, 1998). Chez *Cr. neoformans*, les sphingolipides régulent de nombreux processus cellulaires, comme l'intégrité de la paroi et la production de mélanine (Heung *et al.*, 2004; Luberto *et al.*, 2001). Ils induisent la transcription de la protéine antiphagocytaire App1 par l'activation du facteur de transcription 2, protégeant le cryptocoque de la phagocytose macrophagique (Tommasino *et al.*, 2008). La croissance intra- ou extramacrophagique de *Cr. neoformans* semble régulée de manière spécifique par différents sphingolipides (mécanismes revus par Singh & Del Poeta, 2011). Un mutant de *Cr. neoformans* ne produisant pas de glucosylcéramide est avirulent et incapable d'atteindre le cerveau d'une souris immunocompétente après avoir été administré par voie intranasale (Rittershaus *et al.*, 2006).

Des sphingolipides sont aussi impliqués dans la mort des organismes fongiques. Des défensines de plante peuvent se lier aux glucosylcéramides des *Candida* spp. et provoquer la mort du pathogène (Aerts *et al.*, 2009; Zäuner *et al.*, 2010). Le mécanisme exact n'est cependant pas connu (Singh & Del Poeta, 2011). La structure biochimique des glucosylcéramides diffère parmi les pathogènes fongiques, et donc des glucosylcéramides différents se lient à différentes défensines de plante (Ramamoorthy *et al.*, 2009). Pour que la même défensine puisse tuer différents champignons, il faut que la structure de leur glucosylcéramide soit similaire. Dans un modèle murin de candidémie (inoculation de  $2.10^5$  *C. albicans*), l'administration par voie intraveineuse d'une défensine de radis (14  $\mu\text{g/g/j}$ ), *RsAFP2*, diminuait significativement la charge fongique rénale cinq jours après l'infection, sans être toxique pour les cellules de mammifère (Tavares *et al.*, 2008). Même si ces résultats doivent être confirmés, il semble envisageable que des défensines végétales puissent être utilisées comme antifongique (leur spectre d'activité reste cependant à préciser). Les sphingolipides sont également impliqués dans la mort des champignons filamenteux : les phyto- et dihydro-sphingosine induisent

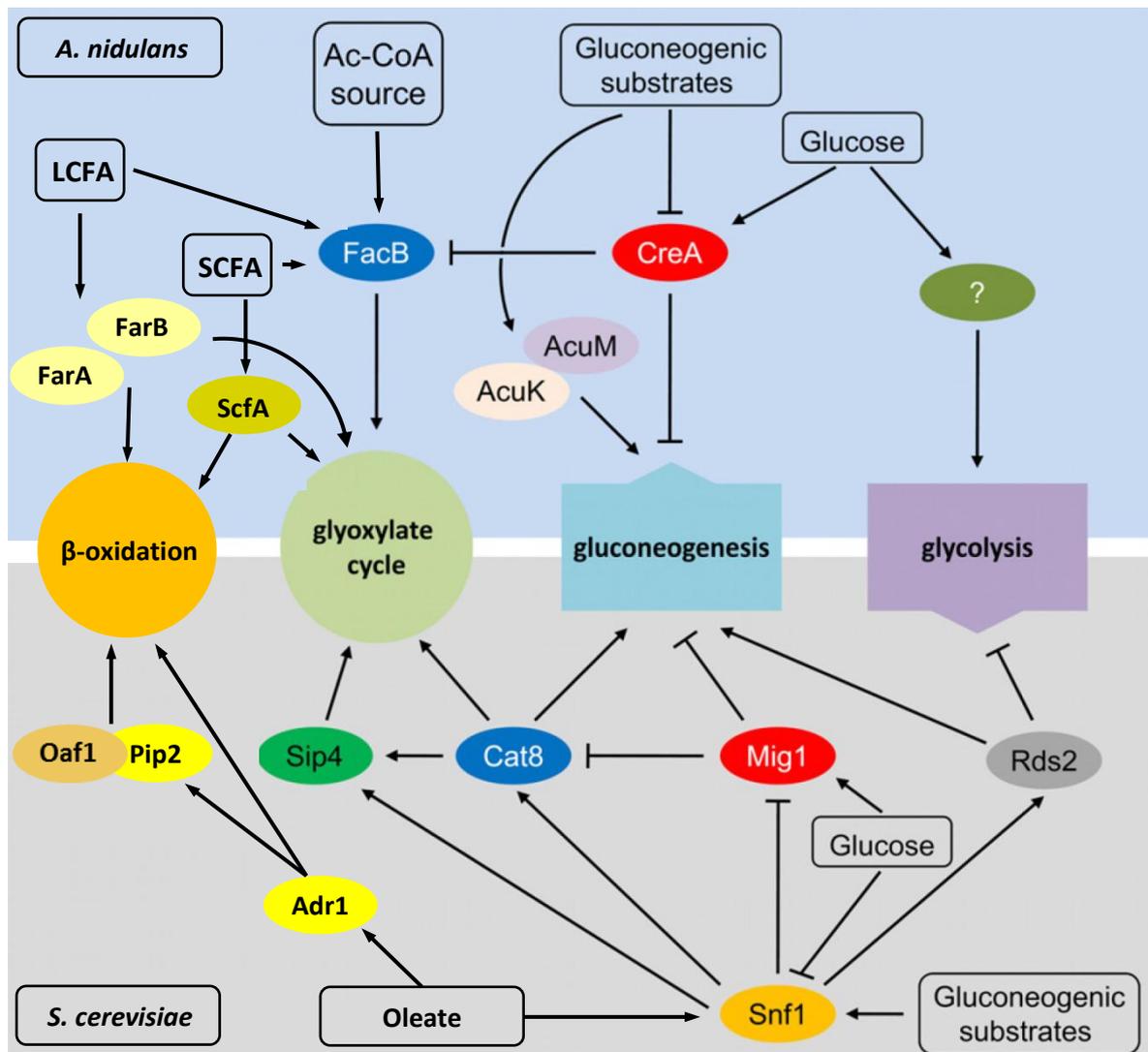
l'apoptose chez *A. nidulans* (Cheng *et al.*, 2003), et un phytocéramide semble responsable de la mort de *Neurospora crassa* dans certaines conditions de stress (Plesofsky *et al.*, 2008).

### 2.3 Régulation du métabolisme lipidique et rôle dans la virulence

La régulation du métabolisme carboné chez les fongiques a surtout été étudiée chez *S. cerevisiae*. Ce n'est que plus récemment que des données sont disponibles pour d'autres organismes, comme *A. nidulans* ou *C. albicans*. De manière générale, les champignons utilisent préférentiellement le glucose comme source de carbone. La présence de ce nutriment dans le milieu de culture inhibe le catabolisme des autres sources de carbone (Barelle *et al.*, 2006; Barnett & Entian, 2005)(Barnett & Entian, 2005) par la voie des represseurs transcriptionnels Mig1p (*S. cerevisiae* et *C. albicans*) et CreA (*A. nidulans*) (Carlson, 1999; Ruijter & Visser, 1997; Schüller, 2003).

L'utilisation par la cellule fongique d'autres sources de carbone lorsque le glucose n'est pas disponible est également régulée au niveau transcriptionnel. Les mécanismes en jeu chez *S. cerevisiae* sont complexes et ont été revus récemment par Turcotte *et al.* (Turcotte *et al.*, 2010). Ils impliquent d'une part la répression de la glycolyse et d'autre part la surexpression des gènes permettant l'assimilation des sources alternatives de carbone. L'induction de la néoglucogénèse est alors indispensable pour produire à partir de ces sources de carbone non fermentable du glucose-6-phosphate, essentiel notamment à la synthèse de différents composants de la paroi fongique ainsi que des nucléotides par la voie des pentoses phosphate (Barnett & Entian, 2005). De faibles concentrations en glucose activent la sérine-thréonase kinase Snf1p, sans que l'on sache encore précisément comment (Turcotte *et al.*, 2010). Snf1p va alors phosphoryler le répresseur transcriptionnel Mig1p, ce qui conduit à son inactivation puisqu'il est exporté hors du noyau. Le principal facteur de transcription induisant l'expression des gènes clés du cycle du glyoxylate et de la néoglucogénèse est une protéine à doigt de zinc, Cat8p, réprimée par Mig1p et activée par Snf1p (**Figure 17**). La réponse transcriptionnelle en présence d'AG est complexe et fait appel à un réseau de gènes régulateurs qui agissent de façon coordonnée (Smith *et al.*, 2007). Schématiquement, la présence d'oléate induit immédiatement la transcription du gène *ADRI*, codant pour une autre protéine à doigt de zinc responsable de l'expression de nombreux gènes, dont *FOX2* et un autre régulateur de transcription, *PIP2*. La protéine Pip2p, qui forme un hétérodimère avec la protéine constitutive Oaf1p, se lie aux domaines « oleate response elements » (séquence consensus : CGGN<sub>3</sub>TNAN<sub>9-12</sub>CCG) retrouvés dans les promoteurs des gènes de la  $\beta$ -oxydation et induit leur transcription (Rottensteiner *et al.*, 1997). Mais les mécanismes sont souvent plus subtils et par exemple l'activation de *FOX2* s'effectuerait par l'intermédiaire d'un homodimère de Oaf1p, indépendamment de Pip2p (Trzcinska-Danielewicz *et al.*, 2008).

Comme *S. cerevisiae*, *A. nidulans* possède de multiples circuits pour réguler le métabolisme carboné (Hynes *et al.*, 2007). Certaines différences existent cependant. La localisation (nucléaire ou cytosolique) du répresseur transcriptionnel CreA (orthologue à Mig1p) n'est pas dépendante de la source de carbone présente dans le milieu (Roy *et al.*, 2008). Le facteur de transcription FacB (orthologue à Cat8p) entraîne la surexpression de l'acétyl-CoA synthase et des deux enzymes clé du cycle du glyoxylate (Katz & Hynes, 1989; Todd *et al.*, 1997), mais pas de la pyruvate carboxykinase et des autres gènes de la néoglucogénèse. L'induction de la néoglucogénèse semble principalement sous le contrôle de deux autres facteurs de transcription, AcuK et AcuM (Hynes *et al.*, 2007). L'induction du cycle du glyoxylate et de la  $\beta$ -oxydation est liée aux facteurs de transcription homologues FarA et FarB en présence d'AG à longue chaîne, et à ScfA en présence d'AG à courte chaîne (Hynes *et al.*, 2006).



**Figure 17. Schéma simplifié de la régulation de la  $\beta$ -oxydation, du cycle du glyoxylate, de la néoglucogénèse et de la glycolyse chez *Aspergillus nidulans* et *Saccharomyces cerevisiae*** (d'après Fleck *et al.*, 2011 et Turcotte *et al.*, 2010 ). Chez *A. nidulans*, le répresseur métabolique principal CreA inhibe en présence de glucose l'expression des gènes permettant l'utilisation des sources de carbone non catabolisées par la glycolyse. L'absence de glucose et la présence d'une autre source de carbone sont nécessaires à l'induction du cycle du glyoxylate par l'intermédiaire de FacB. L'induction de la  $\beta$ -oxydation dépend de FarA et FarB en présence d'acides gras à longue chaîne, et de ScfA en présence d'acides gras à courte chaîne. La glycolyse est stimulée par un facteur qui n'est pas encore identifié. Chez *S. cerevisiae*, Mig1 est le répresseur métabolique principal. En l'absence de glucose, Snf1 inactive Mig1, ce qui permet l'activation de Cat8 et l'induction du cycle du glyoxylate et la néoglucogénèse. La présence d'oléate permet l'expression d'Adr1 qui est responsable de l'induction notamment de FOX2 et de PIP2. L'hétérodimère Oaf1-Pip2 permet la transcription des gènes de la  $\beta$ -oxydation. LCFA : long-chain fatty acid, SCFA : short-chain fatty acid, Ac-CoA source : acetyl-CoA generating source.

*Candida albicans* possède des gènes orthologues à *CAT8/FACB*, à *MIG1* et à *ADR1*. En revanche, Mig1p ne semble pas posséder de site de phosphorylation comme chez *S. cerevisiae*, ce qui sous-entend qu'il y aurait d'autres protéines impliquées dans le contrôle du catabolisme carboné chez *C. albicans* (Fleck *et al.*, 2011). De plus, *C. albicans* ne possède pas de gènes homologues à *OAF1* et *PIP2*. La régulation du catabolisme des AG et la biogénèse peroxysomale ne s'effectue que par l'intermédiaire de Ctf1p, facteur de transcription homologue aux protéines Far d'*A. nidulans* (Ramirez & Lorenz, 2009).

Plusieurs études ont montré que les gènes impliqués dans le métabolisme lipidique sont nettement induits après l'internalisation de *C. albicans* dans le macrophage, suggérant que les lipides pourraient être la source préférentielle de carbone après phagocytose. Il a ainsi été

démontré par Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Prigneau *et al.*, 2003) et microarray (Lorenz *et al.*, 2004) qu'une heure après l'internalisation, le gène *ICLI* (Prigneau *et al.*, 2003) et l'ensemble des gènes codant pour les enzymes du cycle du glyoxylate (Lorenz *et al.*, 2004) sont induits (ces gènes sont en moyenne exprimés 9 fois plus qu'avant phagocytose). Les transcrits de *FOX1* et *FOX2*, ainsi que ceux des gènes clés de la néoglucogénèse (*PCK1* codant pour la phosphoénolpyruvate carboxykinase et *FBP1* codant pour la fructose 1-6-biphosphatase) sont également fortement augmentés (Lorenz *et al.*, 2004; Prigneau *et al.*, 2003). A l'inverse, les enzymes spécifiques du cycle des acides tricarboxyliques ne sont pas affectées et les gènes codant les enzymes spécifiques de la glycolyse (phosphofructokinase - *PFK1* - et pyruvate kinase - *CDC19*) sont réprimés. *PCK1* et *FBP1* sont 30 à presque 300 fois plus exprimés que *PFK1* et *CDC19* (Lorenz *et al.*, 2004).

Chez *C. albicans*, les mutants nuls *icl1Δ* et *mls1Δ* sont hypovirulents sur modèle murin : le cycle du glyoxylate est essentiel à la virulence de *C. albicans* (Barelle *et al.*, 2006; Lorenz & Fink, 2001; Piekarska *et al.*, 2006). Cependant, l'analyse chez la souris de l'expression d'Icl1p de *C. albicans* (monitorée par la GFP, green fluorescent protein) a montré qu'à l'intérieur des lésions tissulaires, seulement certaines cellules exprimaient cette protéine, tandis que d'autres utilisaient la glycolyse (Barelle *et al.*, 2006). Cette expérience a par la suite été confirmée par l'analyse comparative du profil transcriptionnel de deux souches de *C. albicans* (l'une invasive, l'autre non) après inoculation intrapéritonéale chez la souris : alors que les enzymes de la glycolyse étaient exprimées aux différents points de l'infection (de 30 minutes à 5 heures), seulement une partie des levures induisaient la transcription d'*ICLI* (uniquement à t=5h pour la souche sauvage). Pour la souche non invasive, l'expression d'Icl1p était plus importante et ce dès le début de l'infection (Thewes *et al.*, 2007).

Le cycle du glyoxylate joue également un rôle dans la virulence d'organismes procaryotes (*Mycobacterium tuberculosis* (McKinney *et al.*, 2000)), et de champignons phytopathogènes (*Leptosphaeria maculans* (Idnurm & Howlett, 2002), *Magnaporthe grisea* (Wang *et al.*, 2003), *Colleotrichium lagenarium* (Asakura *et al.*, 2006)). Cependant pour d'autres champignons pathogènes pour l'Homme, Icl1p n'est pas essentiel à la virulence. Chez *A. fumigatus*, la délétion d'Icl1p n'entraîne pas d'atténuation de virulence dans un modèle murin d'aspergillose pulmonaire invasive (Olivas *et al.*, 2008; Schobel *et al.*, 2007). Icl1p est pourtant exprimée lors de la germination de conidies dans les macrophages (Ebel *et al.*, 2006). De même, le gène *ICLI* est fortement induit chez *Cr. neoformans* après phagocytose macrophagique, mais un mutant *icl1Δ* n'est pas hypovirulent dans deux modèles d'infection (inoculation par injection intracisternale chez le lapin, ou par inhalation chez la souris (Rude *et al.*, 2002)).

Le rôle de la  $\beta$ -oxydation des AG dans la virulence des organismes fongiques reste controversé. L'hypovirulence d'un mutant *fox2Δ*, déficient pour la  $\beta$ -oxydation a été décrite chez *C. albicans* (Piekarska *et al.*, 2006; Ramírez & Lorenz, 2007), et chez un champignon filamenteux pathogène du maïs, *Ustilago maydis* (Klose & Kronstad, 2006). Piekarska *et al.* ont construit une souche mutante de *C. albicans* (*pex5Δ*) présentant un défaut d'adressage peroxysomal des enzymes de la  $\beta$ -oxydation et du cycle glyoxylique (Piekarska *et al.*, 2006). Le mutant *pex5Δ* peut croître sur des sources de carbone non fermentables autres que les AG et est virulent dans un modèle murin de candidémie, à l'inverse d'un mutant ne possédant plus d'activité spécifique au niveau de la  $\beta$ -oxydation (*fox2Δ*) ou de cycle glyoxylique fonctionnel (*icl1Δ*). Pour les auteurs, la virulence de *pex5Δ* s'explique par l'existence d'un cycle glyoxylique cytosolique fonctionnel, permettant l'utilisation d'autres métabolites à deux carbones (en particulier acétate et lactate). L'hypovirulence de *fox2Δ* serait secondaire à un cycle peroxysomal du glyoxylate déficient (car non alimenté par l'acétyl-CoA issu de la  $\beta$ -oxydation).

### 3 Le modèle biologique *Candida lusitaniae*

#### 3.1 Taxonomie, morphologie et reproduction des *Candida* spp.

Les *Candida* spp. sont des organismes eucaryotes appartenant au règne des champignons. Leur classification a beaucoup évolué. Celle présentée ici date de 2000 (Barnett *et al.*, 2000) :

**Règne** : Champignon

**Phylum** : *Ascomycota*

**Classe** : Hemiascomycètes

**Ordre** : Saccharomycétales

**Famille** : *Candidaceae*

**Genre** : *Candida* (Berkhout, 1923)

Le genre *Candida* regroupe des levures aérobies non pigmentées, non capsulées, dont l'appareil végétatif peut se présenter sous des formes variées (blastospores ovales de 2 à 5 µm, filaments ou pseudofilaments). Leur multiplication, principalement asexuée, est assurée par bourgeonnement de la blastospore. Ainsi, par bourgeonnement et croissance des bourgeons selon un mode subcylindrique, la plupart des *Candida* spp. peuvent former 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, par exemple *Candida krusei* (forme téléomorphe : *Issatchenkia orientalis*), et *Candida lusitaniae* (forme téléomorphe : *Clavispora lusitaniae*). Ce clade est caractérisé par une variation du code génétique : le codon CTG est décodé en sérine plutôt qu'en leucine. De nombreux génomes sont séquencés. Leurs tailles varient de 10 Mb pour *Candida guilliermondii* à 15 Mb pour *Lodderomyces elongisporus* et ils contiennent environ 6000 gènes (MIT, Harvard).

#### 3.2 Pouvoir pathogène et épidémiologie des *Candida* spp.

Les *Candida* spp. sont des agents pathogènes opportunistes. Sur plus de 200 espèces composant le genre *Candida*, seules quelques-unes sont reconnues responsables de candidose chez l'Homme. La plus fréquente est *C. albicans*. Les *Candida* spp. sont commensales des muqueuses (*C. albicans* et *C. glabrata*) et de la peau (*C. parapsilosis*) ou peuvent être saprophytes (**Tableau 3**) (Develoux & Bretagne, 2005; Eggimann *et al.*, 2003; Krcmery & Barnes, 2002; Pfaller *et al.*, 2010a; Tortorano *et al.*, 2004).

Le passage du commensalisme à l'état pathogène tient essentiellement à la multiplication des *Candida* dans leur biotope. Les facteurs favorisant les candidoses peuvent être intrinsèques, c'est-à-dire liés à l'hôte (âges extrêmes de la vie, facteurs hormonaux, facteurs locaux comme l'humidité et l'acidité, maladies sous-jacentes comme le diabète ou une immunodépression,...) ou bien extrinsèques, c'est-à-dire iatrogènes (antibiothérapie à l'origine d'un déséquilibre myco-bactérien, immunodépression thérapeutique,...). Le spectre clinique des candidoses s'étend des formes superficielles (localisées à la peau ou aux muqueuses) aux atteintes invasives, systémiques et disséminées chez les patients hospitalisés cumulant de nombreux facteurs de risque. L'origine de ces infections profondes peut être endogène (à partir d'un

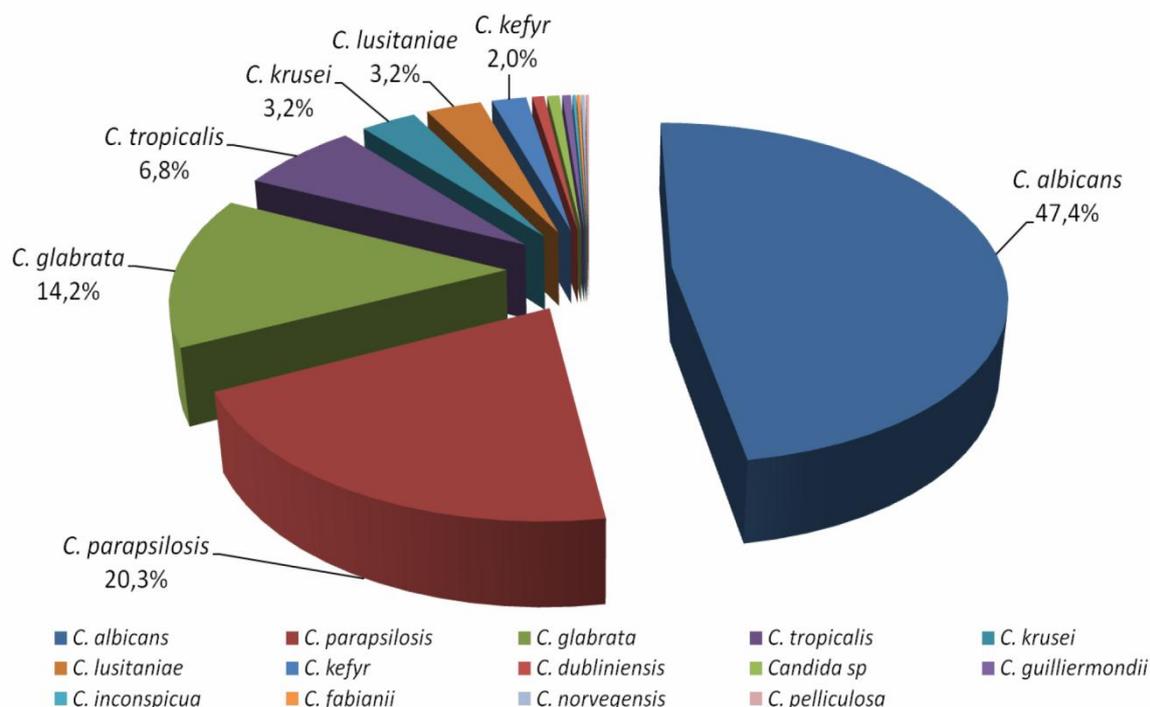
foyer digestif) ou bien exogène (par exemple suite à la rupture de la barrière cutanée par un cathéter ou une chirurgie).

**Tableau 3. Principales espèces de *Candida* rencontrées en pathologie humaine** (Develoux & Bretagne, 2005; Eggimann *et al.*, 2003; Krcmery & barnes, 2002; Pfaller *et al.*, 2010; Tortorano *et al.*, 2004)

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

L'épidémiologie des candidoses profondes, systémiques et disséminées s'est modifiée ces dernières années. Depuis le début des années 80, 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 plus de leur pathologie sous-jacente mais de complications infectieuses. Parmi celles-ci, on retrouve les infections fongiques. Les *Candida spp.* sont les agents les plus fréquemment responsables d'infections fongiques invasives (Eggimann *et al.*, 2003; Lewis, 2009). 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; Lewis, 2009; Pfaller & Diekema, 2007). Une étude réalisée par notre équipe au CHU de Bordeaux entre 2005 et 2010 a mis en évidence 391 candidémies, soit une incidence de 0,76 pour 10000 journées d'hospitalisation (**Figure 18**). Les résultats de cette enquête sont similaires à ceux décrits dans la littérature, où l'on observe une augmentation de la proportion des candidémies dues à des espèces de *Candida non-albicans* qui peut atteindre 65% des isolats (Lewis, 2009; Pfaller *et al.*, 2010b). Sur l'ensemble des 391 candidémies, 52,6% étaient dues à des espèces non-*albicans*. *Candida parapsilosis* représentait ainsi 20,3% des souches

responsables, *C. glabrata* 14,2% et *C. tropicalis* 6,8%. *Candida lusitaniae* était la 5<sup>ème</sup> espèce isolée (3,2%), à égalité avec *C. krusei*.



**Figure 18. Répartition par espèce des 409 souches de *Candida* spp. responsables des 391 épisodes de candidémie diagnostiqués au CHU de Bordeaux de 2005 à 2010.** Un épisode de candidémie est défini par l'isolement d'une ou plusieurs espèces de *Candida* dans au moins un flacon d'hémoculture chez un même patient dans un délai de 30 jours. Sur la période 2005-2010, 17 épisodes de candidémie à plusieurs espèces de *Candida* ont été diagnostiqués.

### 3.3 *Candida lusitaniae*

Depuis plusieurs années, l'équipe « *Candida* et Pathogénicité » a fait de *C. lusitaniae* son modèle biologique. 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. *Candida lusitaniae* est un organisme pathogène émergent. Cette levure se rencontre surtout en milieu hospitalier, où elle est responsable de 1 à 3 % des candidémies dans la plupart des études (Concia *et al.*, 2009; Eggimann *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2010b). En 2003, Favel *et al.* ont revus 50 cas publiés dans la littérature de candidoses invasives à *C. lusitaniae* (Favel *et al.*, 2003) depuis 1979. Un tiers des cas concernaient des enfants, dont 50% était des prématurés. La moitié des patients avaient une néoplasie sous-jacente (une leucémie dans 44% des cas). Les manifestations cliniques ne sont pas différentes de celles des autres espèces de *Candida*. Des cas d'endocardite à *C. lusitaniae* (Michel *et al.*, 2009), d'infection intra-utérine (Huang *et al.*, 2011), d'arthrite (Bariola & Saccente, 2008) ont par exemple été récemment décrits. 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). Actuellement, l'importance épidémiologique de cette résistance à l'amphotéricine B est toujours débattue (Atkinson *et al.*, 2008; De Carolis *et al.*, 2010; Favel *et al.*, 2003; Prigitano *et al.*, 2010). De manière intéressante, cette levure semble se différencier

d'autres organismes fongiques au niveau de l'adaptation au stress oxydatif et du développement des pseudofilaments (Boisnard *et al.*, 2008; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2007).

*Candida 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 *MAT $\alpha$*  ou *MAT $\beta$*  (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 en microscopie électronique a permis de caractériser les différentes étapes cytologiques conduisant à la formation des ascospores (François *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.

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, des outils performants de biologie moléculaire (El-Kirat-Chatel *et al.*, 2011; François *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005) la rendent accessible à la génétique inverse.

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.

# **MATERIELS & METHODES**

Tableau 4. Souches de *C. lusitanae* utilisées au cours de ce travail.

Souche	Génotype	Exigence pour l'uracile	Origine
6936	<i>MAT a</i> , <i>URA3</i> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Sauvage (Prototrophe)	CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures)
CL38	<i>MAT a</i> , <i>URA3</i> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Sauvage (Prototrophe)	Isolat clinique (François <i>et al.</i> , 2001)
<i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup>	<i>MAT a</i> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Auxotrophe	François <i>et al.</i> , 2004 ; El kirat-Chatel <i>et al.</i> , 2011
<i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup>	<i>MAT a</i> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Auxotrophe	El kirat-Chatel <i>et al.</i> , 2011
<i>icl1</i> <sup>Δ::GUN</sup>	<i>MAT a</i> , <i>icl1</i> <sup>Δ::npt</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>icl1</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>icl1</i> <sup>Δ::npt</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Auxotrophe	Ce travail
<i>icl1</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>icl1</i> <sup>Δ::npt</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>ICL1Re</i>	<i>MAT a</i> , <i>icl1</i> <sup>Δ::npt</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox2</i> <sup>Δ::GUN</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ::npt</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox2</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ::npt</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Auxotrophe	Ce travail
<i>fox2</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ::npt</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>FOX2Re</i>	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ::FOX2-URA3</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox2</i> <sup>Δ</sup> _EL	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ::URA3-npt</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox2</i> <sup>Δ</sup> _el, <i>ura3</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Auxotrophe	Ce travail
<i>fox2</i> <sup>Δ</sup> _el	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>pxa1</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>pxa1</i> <sup>Δ::pGEMT-URA3-pxa1</sup> <sup>(see)</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox2</i> , <i>pxa1</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ::npt</sup> , <i>pxa1</i> <sup>Δ::pGEMT-URA3-pxa1</sup> <sup>(see)</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox2</i> _el, <i>pxa1</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ</sup> , <i>pxa1</i> <sup>Δ::pGEMT-URA3-pxa1</sup> <sup>(see)</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox2</i> , <i>fox1a</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox2</i> <sup>Δ::npt</sup> , <i>fox1a</i> <sup>Δ::URA3</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ360)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox1a</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox1a</i> <sup>Δ::URA3</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox1b</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox1b</i> <sup>Δ::URA3</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox1b</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox1b</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Auxotrophe	Ce travail
<i>fox1c</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox1c</i> <sup>Δ::URA3</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox1b</i> <sup>Δ</sup> , <i>fox1c</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Auxotrophe	Ce travail
<i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox1b</i> <sup>Δ</sup> , <i>fox1c</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox1a</i> , <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox1a</i> <sup>Δ::URA3</sup> , <i>fox1b</i> <sup>Δ</sup> , <i>fox1c</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox3-1</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox3-1</i> <sup>Δ::URA3</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox3-2</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox3-2</i> <sup>Δ::URA3</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail
<i>fox3-1</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox3-1</i> <sup>Δ</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-2</i> , <i>PXA1</i>	Auxotrophe	Ce travail
<i>fox3-1</i> , <i>fox3-2</i> <sup>Δ</sup>	<i>MAT a</i> , <i>fox3-1</i> <sup>Δ</sup> , <i>fox3-2</i> <sup>Δ::URA3</sup> , <i>ura3</i> <sup>(Δ990)</sup> , <i>ICL1</i> , <i>FOX1a</i> , <i>FOX1b</i> , <i>FOX1c</i> , <i>FOX2</i> , <i>FOX3-1</i> , <i>PXA1</i>	Prototrophe	Ce travail

# 1 Matériel biologique

## 1.1 Souches de *Candida lusitaniae*, conditions de culture

Les différentes souches utilisées au cours de ce travail sont listées dans le **Tableau 4**. La souche de référence 6936 *MATa* provient du CBS (CentraalBureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, Pays-Bas). La souche CL38 *MATa* a été utilisée pour les expériences de reproduction sexuée. Toutes les souches mutantes sont dérivées de la souche 6936 *MATa*. Les souches mutantes auxotrophes pour l'uracile *ura3*<sub>[Δ360]</sub> et *ura3*<sub>[Δ990]</sub> ont été utilisées pour les expériences de transformation génétique.

*Candida lusitaniae* est cultivée en routine dans du milieu YPD [extrait de levure 1% (m/v), peptone 2% (m/v), glucose 2% (m/v)]. La contre-sélection des transformants auxotrophes pour l'uracile ayant éliminé le marqueur de sélection *URA3* a été effectuée sur un milieu YNB glucose [yeast nitrogen base sans acides aminés et sans sulfate d'ammonium (Difco laboratories) 0,17% (m/v), sulfate d'ammonium 0,5% (m/v), D-glucose 2% (m/v)] auquel a été rajouté après autoclavage 1 g/L d'acide 5-fluoro-orotique (5-FOA, Sigma Chemicals) et 50 µg/mL d'uracile. Les milieux solides sont obtenus par ajout d'agar 2% (m/v). La stérilisation se fait par autoclavage à 110°C, 30 min. Les cultures en milieu solide sont incubées à 30°C pendant 2 à 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 230 rpm.

La croissance des levures est suivie par la mesure de la densité optique des cultures à 600 nm (DO<sub>600</sub>). La correspondance entre une unité d'absorbance et la concentration cellulaire a été déterminée pour la souche sauvage 6936 de *C. lusitaniae* : 1 unité DO ↔ 1,7 x 10<sup>7</sup> CFU/mL.

Pour le fractionnement cellulaire, le milieu WOYglu [YNB supplémenté avec du yeast extract 0,1% (m/v) et du glucose 0,3% (m/v)] et le milieu d'induction [bactopeptone 0,5% (m/v), yeast extract 0,3% (m/v), acide oléique 0,12% (m/v), Tween 40 0,2% (v/v) et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5% (m/v) ajusté à pH 6.0 avec NaOH] ont été utilisés.

## 1.2 Souches d'*Escherichia coli*, conditions de culture

Les expériences de clonage ont été réalisées à l'aide de souches d'*Escherichia coli* thermocompétentes (Stratagene) : souche JM109 (e14-(McrA-) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* (rK- mK+) *supE44 relA1 Δ(lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacIqZΔM15*]) pour la plupart des clonages ; souche JM110 (*rpsL* (Str) *thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacIqZΔM15*]) déficiente pour la méthylation (*dam dcm Δ*) lorsqu'une digestion par l'endonucléase *BclI* était nécessaire.

Les bactéries sont cultivées dans du milieu LB (Yeast extract 0,5% (m/v), tryptone 1% (m/v), NaCl 0,5% (m/v), pH 7,5) supplémenté en ampicilline à 50 µg/mL final, à 37°C et sous agitation constante (230 rpm) pour les milieux liquides.

## 1.3 Macrophages

Les macrophages murins de la lignée tumorale J774.1 (ATCC TIB-67) issus de souris BALB/C sont cultivés, en condition stérile, dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Glucose 4,5 g/L, Gibco) supplémenté en sérum de veau foetal à 10% (SVF décomplémenté, Gibco), en pyruvate de sodium (1 mM) et en antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine à 100 µg/mL). Les cultures sont réalisées en flasques Falcon<sup>®</sup> de 25 cm<sup>2</sup> à

bouchon ventilé et incubées en atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu DMEM est remplacé en moyenne tous les 2 jours afin de renouveler les nutriments et d'éliminer les cellules mortes. Un repiquage est effectué tous les 4 jours après décollement des cellules du fond de la flasque à l'aide d'une spatule stérile (Cell-Scraper<sup>®</sup>, Costar).

#### 1.4 Vecteurs plasmidiques

Le plasmide commercial pGEM-T (Proméga) (3000 pb) a été utilisé pour les clonages. 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 LAX (milieu LB supplémenté en ampicilline (50 µg/mL final), en isopropyl-thio-galactoside (IPTG, 1mM) et en bromo-chloro-indolyl-galactoside (X-gal, 40µg/mL) après stérilisation) grâce au crible visuel blanc/bleu.

Le plasmide pGEM-U (4556 pb) résulte du clonage dans le plasmide pGEM-T d'un fragment PCR portant le gène *URA3* de *C. lusitaniae* codant pour l'orotidine-5'-phosphate décarboxylase de la voie de biosynthèse de l'uridine (François *et al.*, 2004).

Le plasmide pGUN (5147 pb) a été construit à partir du plasmide pGEM-T par clonage de la cassette GUN, composée du gène *URA3* de *C. lusitaniae* entouré de deux séquences répétées directes npt, d'environ 300 pb chacune (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

Le plasmide pG-URA3-pxa1<sub>[core]</sub> (5120 pb) a été construit à partir du plasmide pGEM-U. Un fragment de 564 pb correspondant au cœur de la région codante de *PXA1* a été amplifié par PCR à l'aide des amorces 5'Pxa1NcoI et 3'Pxa1SacII. Cet amplifiat a ensuite été cloné dans les sites de restriction *NcoI* et *SacII* du plasmide pGEM-U (voir **Figure 20** page 76).

#### 1.5 Oligonucléotides

Différents oligonucléotides ont été employés comme amorces pour des réactions de PCR (**Tableaux 5A, 5B et 5C**). Leur séquence comprend le cas échéant un site de restriction reconnu par une endonucléase. Ils ont été synthétisés par Eurofins MWG Operon.

Tableau 5A. Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail

Amorce	Sequence (5' vers 3') *	Utilisation
NotURA3	GACATGCATGCGGCCACAGAGAGGTAAGACAGG	Clonage d'URA3 dans pGEM-T
SpeURA3	GCATCACACTAGTACCCGTTGATGGCAGAGTTG	Clonage d'URA3 pour l'inactivation d'CLI
BclGUN	TCGAGATGATCACCCGAGGTCGCATGCTCC	Clonage d'URA3 pour l'inactivation de FOX2
StuGUN	CAGTGAAGGCTCCAAGCTATTAGGTGACAC	
MfeGUN	TCGAGACAATTGCCGAGGTCGCATGCTCC	
Bgl2GUN	CGGCCGAGATCTCCAAGCTATTAGGTGAC	
3'URA3F	CTTCTATCCGTCCTGTTCC	
5'URA3R	ACATCATCTTCACCAACTCTGC	Caractérisation par PCR des transformants
URA3del	ACCGGTGACTCCATGAGCGTTG	
URA3ex	CTCAGCGTCAGGTGTTTACG	
5Ura3	<i>cccggtgalsggccagagttggtgaa</i>	Amplification par PCR du locus URA3 sauvage, Sonde URA3
3Ura3	<i>atgcaatctccattcaatgac</i>	
FIcLI	CGGTACATTACCTGTGCTTG	Clonage d'CLI dans pGEM-T, sonde ICL1
RIcLI	GACAGTTCAGGTAATCCG	
FIcLIex	ACTTCCAGATGGCTTCTCCA	Caractérisation par PCR des transformants <i>icl1</i>
RIcLIex	TTCAGTCCACATGGATGGTC	
FFOX2	CGAGGTGTCCACCATAAAGCC	Clonage de FOX2 dans pGEM-T, Sonde FOX2
RFOX2	GCTCAGCAAGCAAGGCTTAC	Clonage de FOX2 dans pGEM-T, PCR du fragment aval pour l'obtention de fox2 Δ_EL, Sonde FOX2
5amFox2	GGTCTGTAACACATCGCAATAIT	PCR du fragment amont pour l'obtention de fox2 Δ_EL
3amFox2Ura	<i>atggcaatacaatccc ttaacaaactctccattcaatgaggg</i> AGAGAAAGCGAGTTAGTTCGAG	
5Fox2niche	GAGTTTCGTCTCTTTCAAGGTT	PCR nichée pour l'obtention de fox2 Δ_EL
3Fox2niche	ACATTTCACACTCCTGAGACA	
5AmFox2clean	CTGAGGCACCAAGTGTGAGGTA	PCR du fragment amont pour l'obtention de fox2 Δ_cl
3amFox2clean	TTTCAGAAACAGAAACATTTCACACTCCTGAGACATAAAAGAGAAAGCGAGTTAGTTCGAG	
5AvFox2clean	TTTATGTCTCAGGAGTGTGAAATGTTCTGTTTCTGAAAGTAGGCTTTCITTCGTGAGC	PCR du fragment aval pour l'obtention de fox2 Δ_cl
3AvFox2clean	CGGTTCCGTTACGAAATACCAAGGC	PCR du fragment aval pour l'obtention de fox2 Δ_cl, sonde FOX2-2
5AvFox2Southern	GTAGGCTTTCGTGTTGAGC	Sonde FOX2-2
5Fox2cleanniche	GCAAGAAAGTCTCTACCCGCACAC	PCR nichée pour l'obtention de fox2 Δ_cl
3Fox2cleanniche	CACATTGATGGTGCCATGCACCGCA	
5exFox2clean	CTAGACACTATTGTTGCTCAAGT	
3exFox2clean	CTGCACGACTGAGCTTTGTGCCG	Caractérisation par PCR des transformants fox2
FFOX2ex	ATCTCGTCCGTCATGAGTG	
RFOX2ex	ATATGGCCTCCGAACAGAG	

\* Les séquences en minuscule italique représentent les homologies pour la fusion avec le marqueur de sélection URA3 par PCR chevauchantes. Les séquences en gras comprennent les sites de restriction pour les enzymes dont le nom est spécifié dans le nom de l'amorce.

Tableau 5B. Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail

Amorce	Sequence (5' vers 3') *	Utilisation
5'PxaINcol	CATGCCATGGCACCAAGCAAGGGCAG	Clonage du coeur de <i>PXA1</i> dans pG-URA3, sonde PXA1
3'PxaISacII	TCACCGGGGCTCAACATATCGTGTACG	
5'PxaIex	GACAGGTGTATTGTGGC	Caractérisation par PCR des transformants <i>pxa1</i>
3'PxaIex	CGTATCCCTTGTGATCTCAACAC	
EF1a	TGTTATCGGTCACGTGCA	Analyse transcriptomique par RT-PCR du gène <i>EF1α</i>
EF1d	TACCCAATTCAGCGGCT	
5 FOX1a	CCGTGTCAGCAGATTTGGAAATC	Analyse transcriptomique par RT-PCR du gène <i>FOX1a</i>
3 FOX1a	TATGTTTCAGTCGAATTATGAGCGATGG	
5 FOX1b	TCAAAGGACCAAAAGTTGTGGCAGA	Analyse transcriptomique par RT-PCR du gène <i>FOX1b</i>
3 FOX1b	CAACTTGTGATGTGACAAATCAAACTAGC	
5 FOX1c	TTCGGCTAAAAACGGTCTACTG	Analyse transcriptomique par RT-PCR du gène <i>FOX1c</i>
3 FOX1c	GAGTAAGCTTGTGATTTTCGGAGCAA	
5 FOX3-1	TCCAGTCCGAGCCACATCTTTGA	Analyse transcriptomique par RT-PCR du gène <i>FOX3-1</i>
3 FOX3-1	CTTGCCAAAGCCAAAGTCCCTGA	
5 FOX3-2a	TGAAGAGGCCTTTGTCTCAGT	Analyse transcriptomique par RT-PCR du gène <i>FOX3-2a</i>
3 FOX3-2a	GATGACAAATCGAAGCAGCACCCAT	
5 FOX3-2b	CGAGGACGAGCCAAAGCTTGACGA	Analyse transcriptomique par RT-PCR du gène <i>FOX3-2b</i>
3 FOX3-2b	GTTCGCAAGCCCAACACAGA	
5AmFox1a	ATGGTGACAGAGCCCAAGAAGAGCAAATC	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox1aΔ</i>
3AmFox1aUra	<i>ttaccatactatgccaatcaacssgg</i> CACATACGGCAAGGCAACAGACTG	
5AvFox1aUra	<i>gcattttcaatfsgagaaatgctat</i> ATGGCCAAAATCCACCACCGTTAG	PCR du fragment aval pour l'obtention de <i>fox1aΔ</i>
3AvFox1a	CTTGTGTAGAGAGTGAATTCGCCGG	
5Fox1a_niche	AGCTTCTCCATGGTGACAGACGC	PCR nichée pour l'obtention de <i>fox1aΔ</i>
3Fox1a_niche	GCCAGACCACCGCATGTATTCCA	
5Fox1a_ex	GAATTCGAAAGTATCTTAAAGTTGCG	Caractérisation par PCR des transformants <i>fox1a</i>
3Fox1a_ex	CTTCTATAATGGACATGTGCG	
5AmFox1b	CGAAGTGTGATCACACGTATTGG	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox1bΔ</i>
3AmFox1bUra	<i>atggcaaacatcatcc ttaccatactatgccaatcaacssgg</i> GAAGGAGGGGAGTGATATCG	
5AvFox1bUra	<i>atttggtttgccaaa gcattttcaatfsgagaaatgctat</i> GCGTCTCCATTCAGGTATA	PCR du fragment aval pour l'obtention de <i>fox1bΔ</i>
3AvFox1b	GAGCAAGAGGATAGCTGGGGTGG	
3AvFox1b_niche	GAGGCTGCTTGAACCGGGGTCT	PCR nichée pour l'obtention de <i>fox1bΔ</i>
5AmFox1b_niche	CACGTAGTGTATAGAAGCTACGTG	
5Fox1b_ex	GTCCCAAGAGCTGTGGTGGCCACG	Caractérisation par PCR des transformants <i>fox1b</i>
3Fox1b_ex	TAACGTGAGCGCGGATTTGGTC	

\* Les séquences en minuscule italique représentent les homologies pour la fusion avec le marqueur de sélection *URA3* par PCR chevauchantes. Les séquences en gras comprennent les sites de restriction pour les enzymes dont le nom est spécifié dans le nom de l'amorce.

Tableau 5C. Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail

Amorce	Sequence (5' vers 3') *	Utilisation
5AvFox1bFox1c	TATACCTGAATCGGACAGCGTGGAGAAGACAGATGATCCGAGGG	PCR du fragment aval pour l'obtention de <i>[fox1b, fox1c]</i> Δ
3AmFox1bFox1c	CCCTCGGATCATCTCTCCACGGCTGTCGCAATCAGGTATA	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>[fox1b, fox1c]</i> Δ
5AmFox1c	CGCACATTCGGTGTGCAGAGGCA	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox1c</i> Δ, PCR nichée pour l'obtention de <i>[fox1b, fox1c]</i> Δ
3AmFox1cUra	<u>ggcaaacatcatcctc</u> <u>ttaccacaactctccatcaacggg</u> TGGAGAAGACAGATGATCCGAG	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox1c</i> Δ
5AvFox1cUra	<u>atttggtggccaaa</u> <u>gcattlgaatggagatctcat</u> CTGTGCCATGATGGCACTGC	PCR du fragment aval pour l'obtention de <i>fox1c</i> Δ
3AvFox1c	CAACCCACAGCAGCATGGATCCATG	PCR nichée pour l'obtention de <i>fox1c</i> Δ
5AmFox1c_niche	CTGGTTCAAATTGGCTGTCATCTC	PCR nichée pour l'obtention de <i>fox1c</i> Δ
3AvFox1c_niche	TCT GGA GTG CCT TCT AAG ATC TG	PCR nichée pour l'obtention de <i>fox1c</i> Δ
5Fox1c_ex	GCGCCATACGGTGCACAAACAGCG	Caractérisation par PCR des transformants <i>fox1c</i> , PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>[fox1b, fox1c]</i> Δ
3Fox1c_ex	AGTGCCATCTCTCTCGACACGGCA	Caractérisation par PCR des transformants <i>fox1c</i>
5AmFox3-1	GCCAGGCGACACCTCTTCGGAATGAC	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox3-1</i> Δ
3AmFox3-1Ura	<u>ttaccacaactctccatcaacggg</u> CGGCATTTGGTGCAGACCATCACAC	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox3-1</i> Δ
5AvFox3-1Ura	<u>tgttggccaaa</u> <u>gcattlgaatggagatctcat</u> GGGTGTAGAACTGCTGGTGGAGGTAT	PCR du fragment aval pour l'obtention de <i>fox3-1</i> Δ
3Avfox3-1	TGGCTGTATAGATTGATGGTCTCAGT	PCR du fragment aval pour l'obtention de <i>fox3-1</i> Δ
5AmFox3-1_ex	TGGGCGCAACAGGCTTTATCTCAG	Caractérisation par PCR des transformants <i>fox3-1</i>
3AvFox3-1_ex	GTCCATGTTGACAGTATGGGAGAG	Caractérisation par PCR des transformants <i>fox3-1</i>
5AmFox3-1_cl	AGGAAAGACGATTGCTGATAGTGGG	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox3-1</i> Δ, <i>ura3</i> Δ
3AmFox3-1_cl	ATACTCCACAGCATTTACACACCCCGGCAATGGTGCAGACCATCACAC	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox3-1</i> Δ, <i>ura3</i> Δ
5AvFox3-1_cl	GTGTGATGGTCTGCACCAATGCCGGGTGTAGAAATGCTGGGAGGTAT	PCR du fragment aval pour l'obtention de <i>fox3-1</i> Δ, <i>ura3</i> Δ
3AvFox3-1_cl	AAATCTCTGGTGATCATGTAATCGAC	PCR du fragment aval pour l'obtention de <i>fox3-1</i> Δ, <i>ura3</i> Δ
5AmFox3-2	CACCAGAACAATTTGATCTATTAGAC	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox3-2</i> Δ
3AmFox3-2Ura	<u>ttaccacaactctccatcaacggg</u> AGGGAAACGACGGCCGGTCAG	PCR du fragment amont pour l'obtention de <i>fox3-2</i> Δ
5AvFox3-2Ura	<u>atttggtggccaaa</u> <u>gcattlgaatggagatctcat</u> GTTGGAAACGATTGATATTTCAA	PCR du fragment aval pour l'obtention de <i>fox3-2</i> Δ
3AvFox3-2	CGTATTTCATGTCAGGCCAACAAATAGAC	Caractérisation par PCR des transformants <i>fox3-2</i>
5AmFox3-2_ex	GGAGTGATTCGACACGATTGACAG	Caractérisation par PCR des transformants <i>fox3-2</i>
3AvFox3-2_ex	CCGCAGGTGCAGCACCCACCACCG	Caractérisation par PCR des transformants <i>fox3-2</i>

\* Les séquences en minuscule italique représentent les homologies pour la fusion avec le marqueur de sélection *URA3* par PCR chevauchantes. Les séquences en gras comprennent les sites de restriction pour les enzymes dont le nom est spécifié dans le nom de l'amorce.

## 2 Techniques de biologie moléculaire

### 2.1 Extraction et purification des acides nucléiques

#### 2.1.1 ADN génomique de levure

Un volume de 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 [Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 2% (v/v) et SDS 1% (v/v)]. 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 (v:v:v)] 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<sup>ème</sup> 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.

#### 2.1.2 ARN de levure

Les ARN totaux ont été extraits des souches sauvage 6936 et mutante *fox2Δ* récoltées à partir de cultures liquides (2 mL de milieu à une DO<sub>600</sub> entre 0.5 et 0.6) ou solides (colonies grattées à l'aide d'un Cell-Scraper<sup>®</sup> et resuspendues dans 2 mL d'eau DEPC RNase Free) à l'aide de solutions et de matériels RNase free. Lorsque l'extraction d'ARN était différée, les levures étaient congelées instantanément dans l'azote liquide puis conservées à -80°C. Après centrifugation (5 min 10000 rpm à 4°C), le surnageant est jeté et le culot de levure est resuspendu dans 2 mL (culture liquide) ou 500 µL (culture solide) de tampon de lyse Y1 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, Sorbitol 1 M, EDTA 0,1 M dans de l'eau DEPC RNase Free) additionné extemporanément de β-mercaptoéthanol 0,1 % (v/v) et de zymolyase (0,4 mg/mL). Après une incubation de 45 min à 37 °C sous agitation légère, l'extraction à partir des sphéropastes ainsi obtenus est réalisée avec le kit RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini Kit (QIAGEN), selon les recommandations du fournisseur.

Les ARN totaux sont alors traités à la DNase de façon à dégrader les ADN matrices potentiels résiduels [1µg d'ARN dans de l'eau DEPC RNase Free qsp 8 µL, 1 µL tampon DNase 10X, 1 µL DNase RNase Free (Promega M610A)]. Après une incubation de 30 min à 37°C, 1 µL de DNase Stop Solution (Promega M199A) est ajouté, le mélange est incubé pendant 10 min à 65°C, puis mis dans la glace. Afin de vérifier l'efficacité de la dégradation de l'ADN génomique, 1µL d'échantillon traité par la DNase mélangé à 10 µL de formamide, 3.5 µL de tampon de charge et 5.5 µL d'eau DEPC sont ensuite déposés sur gel d'électrophorèse. Les ARN sont conservés à -80°C.

#### 2.1.3 ADN plasmidique d'*Escherichia coli*

Miniprep : 1,5 mL de culture stationnaire de bactéries cultivées dans du LB-AMP sont centrifugés 5 min à 2800 g. Le culot bactérien est repris dans 300 µL de tampon de lyse STET [NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 5% (v/v)] contenant 5 µL 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 µl de matrice (Miniprep Express Matrix®). Après centrifugation et rinçage à l'éthanol à 70%, la résine séchée est remise en suspension dans 75 µl 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) ou NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) 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 µg/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 1,8 et 2 pour une préparation optimale. Le ratio  $A_{(260 \text{ nm})}/A_{(230 \text{ nm})}$  représente la contamination totale (sels, composés aromatiques, sucres...) et doit être supérieur à 2.

## 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 pour permettre les constructions plasmidiques. L'amplification des séquences génomiques contenant les régions codantes ou une partie des gènes *ICL1*, *FOX2*, *PXA1*, *FOX1a*, *FOX1b*, *FOX1c*, *FOX3a*, *FOX3b* et *URA3* a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de chaque séquence (**Tableaux 5A, 5B et 5C**).

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 6**. 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 6. Mélanges réactionnels et paramètres de l'amplification par PCR selon les enzymes utilisées.**

	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

Le séquençage nucléotidique est réalisé selon le protocole du kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction<sup>®</sup> v1.1 (Applied Biosystems) à partir d'ADN plasmidique (300 à 600 ng) ou de produits de PCR purifiés (50 à 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 l'Université Bordeaux Segalen. Les chromatogrammes sont récupérés via un serveur FTP et analysés par bioinformatique.

## 2.5 Rétrotranscription

La rétrotranscription est réalisée avec le kit Superscript<sup>®</sup> II Reverse Transcriptase (invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc sont ensuite amplifiés par PCR en utilisant les différents couples d'amorces (voir **Tableau 5B**) à l'aide de la Hot Star Taq polymérase (Qiagen) comme spécifié précédemment. Les témoins négatifs d'amplification (ARN non rétrotranscrits) étaient systématiquement inclus dans chaque réaction.

## 2.6 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).

## 2.7 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<sup>®</sup> (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<sup>®</sup> 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 (Bacto-Yeast extract 0,5%, Bacto-tryptone 2%, D-glucose 0,36%, NaCl 5M, KCl 0,19 g/L, MgCl<sub>2</sub> 1M, MgSO<sub>4</sub> 4M) 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.

## 2.8 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 ou YPD supplémenté en sorbitol 1 M (YNBS ou YPDS) et incubés à 30°C pendant 48 à 72 heures.

## 2.9 Southern Blot

Synthèse des sondes : la technique utilisée est un marquage froid à la Digoxigénine<sup>®</sup> (Roche). Les sondes sont élaborées par des PCR réalisées en présence de dUTP marqué à la Digoxigénine<sup>®</sup> (rapport DIG-dUTP/dTTP de 1/6) grâce au kit PCR DIG Probe Synthesis Kit<sup>®</sup> (Roche) selon les recommandations du fabricant. La réaction de synthèse est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les oligonucléotides utilisés pour la synthèse des sondes sont répertoriés dans les **Tableaux 5A et 5B**.

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+<sup>®</sup>, 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<sup>®</sup>, 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<sup>®</sup>, Roche). Le substrat (CSPD<sup>®</sup>, Roche) est ajouté et l'ensemble est incubé 15 min à température ambiante. La membrane est ensuite exposée à un

film (Amersham Hyperfilm ECL<sup>®</sup>, 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.

## 2.10 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<sup>®</sup> 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.

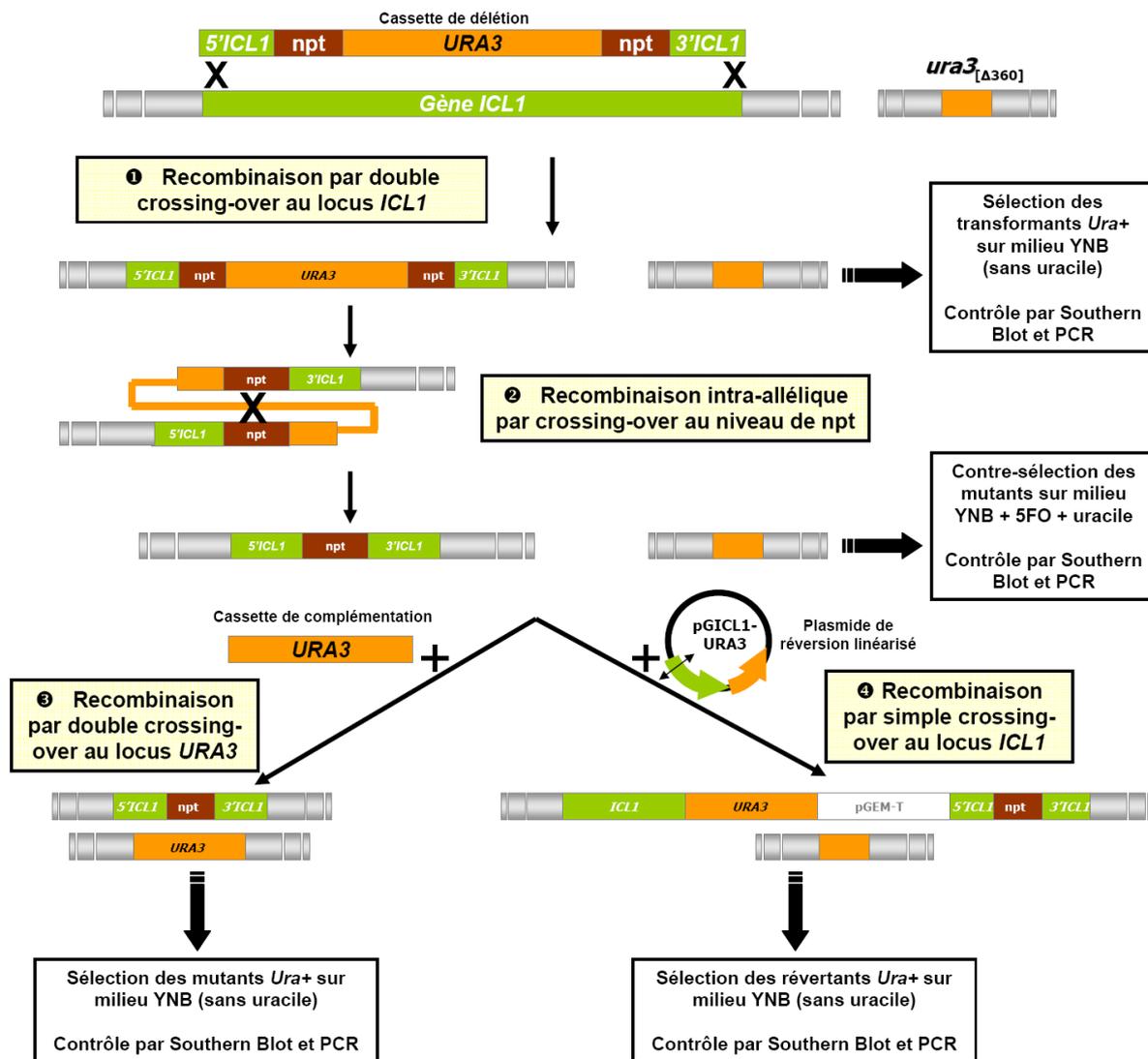
Pour la séparation électrophorétique des ARN, un gel d'agarose à 1% (m/v) sans BET, et le tampon de migration TBE sont utilisés. Le formamide (50% du volume final) permettant de dénaturer les ARN et le BET (30 ng/μL final) sont rajoutés aux échantillons avant la migration (100 V/h).

## 3 Constructions moléculaires pour l'inactivation de gènes

Au cours de nos travaux, plusieurs stratégies ont été utilisées pour l'inactivation de gènes. Toutes permettent de sélectionner les transformants en utilisant le **marqueur de sélection URA3** (François *et al.*, 2004). 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 Ura3p 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 Ura3p 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.

### 3.1 Technique « URA3 blaster »

Cette stratégie nécessite la construction de cassettes de délétion par des techniques de clonage. Cette technique a été utilisée afin d'invalider les gènes *ICL1* (**Figure 19**) et *FOX2* de *C. lusitaniae* pour obtenir les mutants *icl1Δ* et *fox2Δ*. Toutes les constructions ont été réalisées chez *E. coli* JM109 ou JM110.



**Figure 19. Invalidation du gène *ICL1* selon la stratégie « URA3 blaster ».** Obtention d'un mutant nul *icl1Δ* avec et sans marqueur *URA3* intégré au locus *ICL1*, d'un mutant nul *icl1Δ* avec un locus *URA3* reconstitué et d'une souche « révertante » possédant l'allèle sauvage *ICL1*.

Clonage des gènes *ICL1* et *FOX2*, obtention des plasmides pGICL1 et pGFOX2. Les gènes *ICL1* (CLUG\_01411.1) et *FOX2* (CLUG\_01348.1) ont été amplifiés à partir de l'ADN de la souche sauvage 6936 de *C. lusitaniae*, grâce aux couples d'amorces FICL1-RICL1 et FFOX2-RFOX2 respectivement. Les amplifiats de 2593 et 3232 pb ont ensuite été clonés dans le vecteur pGEM-T au niveau du site de clonage A/T afin d'obtenir les plasmides de 5593 et 6232 pb, dénommés pGICL1 et pGFOX2.

Obtention des plasmides délétés pGIcl1Δ et pGFox2Δ. Une délétion de 701 pb dans le gène *ICL1* cloné dans le plasmide pGICL1 a été réalisée par digestion enzymatique avec les endonucléases *BclI* et *StuI*. Une délétion de 1543 pb dans le gène *FOX2* cloné dans le plasmide pGFOX2 a été obtenue par digestion avec les enzymes *BglII* et *MfeI*. Après vérification des doubles digestions par électrophorèse, les fragments de 4892 pb (pGIcl1Δ) et 4689 pb (pGFox2Δ) ont été purifiés sur gel.

Amplification de la cassette GUN. La cassette GUN, constituée du gène *URA3* de *C. lusitaniae* entouré de deux séquences répétées directes issues du gène procaryote *NPT* (néomycine phosphotransférase) a été amplifiée à partir du plasmide pGUN. Les amorces désignées sont constituées d'une partie 3' homologue à la cassette GUN et d'une partie 5' contenant les sites de restriction spécifiques à chaque projet de délétion. Ainsi les couples d'amorces *BclI*GUN-

StuGUN et Bgl2GUN-MfeGUN ont respectivement servi à amplifier la cassette GUN pour la délétion des gènes *ICL1* et *FOX2*. Les produits PCR BclGUNStu et Bgl2GUNMfe (2,1 Kb) après vérification (électrophorèse) ont été purifiés (résine S300) et clonés dans pGEM-T.

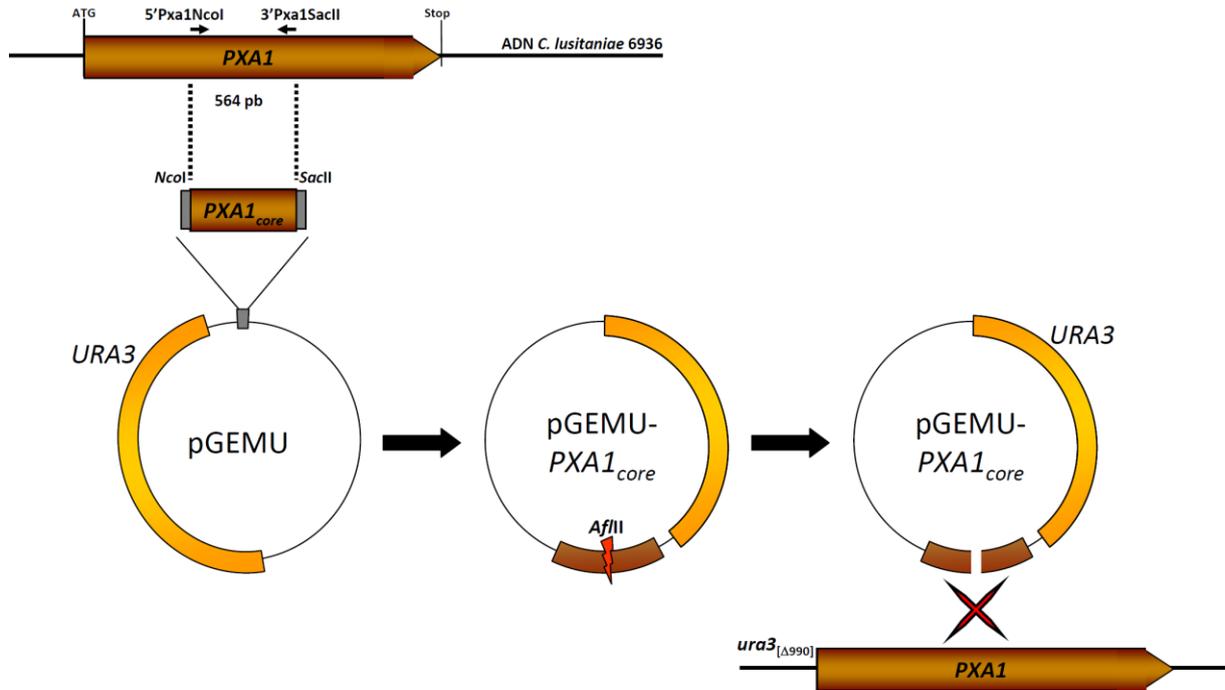
Obtention des plasmides recombinants pGIcl1Δ::GUN et pGFox2Δ::GUN. Les fragments BclGUNStu et Bgl2GUNMfe (respectivement libérés du vecteur pGEM-T par digestion enzymatique avec *BclII* et *StuI*, et *BglIII* et *MfeI*) ont été purifiés sur gel d'agarose et mis en ligation avec les plasmides receveurs pGIcl1Δ et pGFox2Δ. Les plasmides recombinants ont été sélectionnés après analyse des produits de restriction sur gel d'électrophorèse. Les cassettes de délétions contenues dans les plasmides recombinants ont ensuite été extraites par double digestion avec les enzymes *NdeI* et *SphI* afin de transformer la souche *ura3*<sub>[Δ360]</sub> de *C. lusitaniae*, auxotrophe pour l'uracile. L'intégration au locus cible de la cassette de délétion par double crossing-over permet d'obtenir les mutants prototrophes *icl1Δ::GUN* et *fox2Δ::GUN*.

Amplification de la cassette URA3. Les mutants nuls *icl1Δ::npt*, *ura3*<sub>[Δ360]</sub> et *fox2Δ::npt*, *ura3*<sub>[Δ360]</sub> ayant perdu le marqueur de sélection *URA3* par un événement de recombinaison intra-allélique sont sélectionnés sur milieu supplémenté en uracile et en 5-FOA. Leur transformation avec l'allèle *URA3* sauvage (amplifié PCR purifié de *URA3* de *C. lusitaniae* obtenu avec le couple d'amorces NotURA3-SpeURA3) permet de restaurer la prototrophie.

Obtention des plasmides recombinants pGICL1-URA3 et pGFOX2-URA3. Les plasmides de réversion ont été construits afin de réintroduire les allèles sauvages de *ICL1* et *FOX2* chez les mutants nuls *icl1Δ* et *fox2Δ* de *C. lusitaniae* et obtenir les souches «révertantes». Pour cela, le marqueur de sélection *URA3* de *C. lusitaniae* a été obtenu par amplification avec le couple d'amorces NotURA3-SpeURA3 à partir du plasmide pGEMU. Après clonage dans le plasmide pGEM-T de l'amplifié, le gène *URA3* a été libéré par double digestion *NotI-SpeI* et le fragment a été cloné aux sites correspondants présents dans le multisite de clonage des plasmides pGICL1 et pGFOX2 pour donner les plasmides pGICL1-URA3 et pGFOX2-URA3. Les révertants *ICL1Re* et *FOX2Re* ont respectivement été obtenus par transformation des mutants nuls avec les plasmides de réversion linéarisés dans la région 5' du gène *ICL1* et 3' du gène *FOX2* par les endonucléases *AleI* et *Tth111I*, respectivement.

### 3.2 Technique « cœur de gène »

Cette méthode a été utilisée afin d'inactiver le gène *PXA1* en interrompant la séquence codante par l'insertion du vecteur pGEMU (**Figure 20**). Pour cela le cœur de gène (564 pb), correspondant à une partie du gène cible *PXA1* a été amplifié avec les amorces 5'Pxa1NcoI et 3'Pxa1SacII 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 pGEMU ont ensuite été digérés par les enzymes *NcoI* et *SacII* et les produits de digestion ont été ligués avant transformation bactérienne. Le vecteur pGEMU-cœur *PXA1*, obtenu après criblage des clones bactériens, a été linéarisé par *AflIII* ayant un site de restriction unique situé dans le cœur de gène *PXA1*. Cette linéarisation du vecteur dans le cœur de gène a permis d'adresser l'intégration du vecteur au locus *PXA1* après transformation de la souche *ura3*<sub>[Δ990]</sub> de *C. lusitaniae*.



**Figure 20. Invalidation du gène *PXA1* selon la stratégie « cœur de gène ».** Le cœur de gène *PXA1* est amplifié puis inséré, grâce aux enzymes de restriction *NcoI* et *SacII*, dans le vecteur pGEMU qui porte le marqueur de sélection *URA3*. La linéarisation du vecteur dans le cœur de gène par l'enzyme *AflIII* permet d'adresser la recombinaison par crossing-over au locus *PXA1*. Les transformants ayant intégré le vecteur possèdent un locus *PXA1* invalidé et sont prototrophes pour l'uracile.

### 3.3 Technique « PCR chevauchante »

Cette méthode, récemment développée par notre équipe (El-Kirat-Chatel *et al.*, 2011) et basée uniquement sur la PCR permet d'obtenir rapidement une cassette de délétion d'un locus. Nous avons utilisé cette stratégie pour l'invalidation des paralogues de *FOX1* et *FOX3* chez *C. lusitaniae*, et l'avons adapté pour l'obtention du mutant *fox2Δ<sub>cl</sub>*. Dans la première étape d'amplification, un produit de 1436 pb correspondant au marqueur de sélection *URA3* 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' 20 à 40 nucléotides homologues à l'une des extrémités du marqueur *URA3*. Chaque produit de PCR est purifié puis dilué au 1/10<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup> et 1/1000<sup>e</sup>. Dans la seconde étape, le produit de PCR *URA3* et la région amont sont mélangés et utilisés comme matrice de PCR chevauchante avec les amorces externes. Un mélange réactionnel est fait pour chaque dilution. Le produit de fusion de la région amont du gène X 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. Une PCR nichée est réalisée si nécessaire afin de purifier la cassette de délétion.

## 4 Caractérisation phénotypique

### 4.1 Etude de l'assimilation in vitro des sources de carbone

Le milieu de base est constitué de YNB (Yeast Nitrogen Base sans acides aminés (Difco) 0,17% (m/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5%) auquel sont ajoutés 2% de la source de carbone à étudier : glucose, acétate de potassium, glycérol, acide caprique (C10:0), acide laurique (C12:0), acide myristique (C14:0), acide palmitique (C16:0), acide stéarique (C18:0), acide oléique (C18:1). Les acides gras solides à température ambiante (C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0) sont liquéfiés au bain marie à 80°C. Le mélange d'émulsion [49% (v/v) d'acide gras, 49% (v/v) d'eau milliQ stérile, 2% (v/v) de Tween spécifique de chaque AG (Tween 20 pour le C10:0 et le C12:0, Tween 40 pour le C14:0 et le C16:0, Tween 60 pour le C18:0, Tween 80 pour le C18:1)] 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 mécaniquement, est aussitôt coulé en boîte de Pétri.

Tests en goutte : A une absorbance de 0,5 à 600 nm, les levures sont centrifugées, lavées à l'eau stérile et 5 dilutions successives au  $1/5^{\text{ème}}$  sont effectuées dans une microplaque. 5  $\mu\text{L}$  de chacune des dilutions sont ensemencés sur les différents milieux solides à tester et incubés entre 3 et 7 jours à 30°C et à 37°C.

Croissance en milieu liquide : Après deux lavages à l'eau, une dilution au  $1/100^{\text{ème}}$  des précultures en milieu liquide YNB+2% glucose à 30°C ou 37°C est ensemencée dans les différents milieux liquides à tester et incubés sous agitation à 30°C et à 37°C. Le suivi de croissance est effectué par turbidimétrie à 600 nm pendant 5 à 7 jours. En milieu YNB + 2% C18 :1, la mesure de la turbidimétrie est réalisée après deux lavages à l'eau (4000g 10 min).

### 4.2 Profils lipidiques

#### 4.2.1 Analyse des acides gras

Après une culture sur milieu YPD ou YNB + 2% C16:0 (acide palmitique), les levures sont récoltées et lavées 3 fois dans l'eau distillée. Une quantité équivalente à 15 mg de poids sec est ensuite centrifugée (4000g 5 min) et resuspendue dans 1 mL de  $\text{CH}_3\text{OH} / 2,5\% \text{H}_2\text{SO}_4$  contenant 5  $\mu\text{g}$  d'acide heptadecanoïque (C17:0). Après transestérification (1 h à 80°C), 1,5 mL d'eau est ajoutée et les esters méthylés d'acide gras sont extraits avec 0,75 mL d'hexane. La séparation des esters méthylés d'acide gras est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (GC) (Hewlett-Packard 5890 series II; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) comme décrit préalablement (Le Guédard *et al.*, 2009).

L'analyse qualitative est conduite à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6850 équipé d'une colonne HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) et d'un détecteur de spectrographie de masse Agilent 5975 (70 eV, mass-to-charge ratio 50-750). La température initiale de 50°C est maintenue 1 min puis augmentée de  $50^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à atteindre 200°C, puis maintenue 1 min à 200°C, augmentée de nouveau de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à 320°C, et maintenue pendant 8 minutes à 320°C, en utilisant l'hélium (1,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) comme gaz porteur.

#### 4.2.2 Analyse des lipides neutres

Après une culture sur milieu YPD ou YNB + 2% C16:0 (acide palmitique), les levures sont récoltées et lavées 3 fois dans l'eau distillée. Une quantité équivalente à 15 mg de poids sec est

ensuite transformée en sphéropastes (en utilisant la zymolyase comme décrit dans le paragraphe 5.1 page 71). Pour extraire les lipides, 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  /  $\text{CH}_3\text{OH}$  2:1 (v/v) sont ajoutés à la suspension cellulaire. Après agitation et centrifugation, la phase organique est recueillie. Les lipides restants sont extraits à nouveau par addition de 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  à la phase aqueuse et par agitation puis centrifugation. Les phases organiques poolées sont évaporées jusqu'à dessiccation. Les lipides sont alors redissous dans 70  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$  /  $\text{CH}_3\text{OH}$  2:1 (v:v). Les lipides neutres sont séparés par chromatographie couche mince sur plaque de silice (10 x 10 cm) en utilisant un mélange hexane / diethyl ether / acide acétique [90:15:2 (v:v:v)] comme solvant. Les lipides sont ensuite visualisés sous UV après la pulvérisation sur la plaque d'une solution à 0,001% (m/v) de primuline dans l'acétone à 80%. Les zones de la plaque de silice correspondant aux différents lipides sont récupérées par grattage et placées dans 1 mL de  $\text{CH}_3\text{OH}$  / 2,5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  contenant 5  $\mu\text{g}$  d'acide heptadécanoïque (C17:0). Les acides gras sont ensuite transestérifiés et séparés comme précédemment par chromatographie en phase gazeuse.

### **4.3 Etude de la pseudofilamentation**

Les tests de pseudofilamentation sont réalisés par ensemencement de 5  $\mu\text{L}$  d'une préculture sur milieu YCB solide [Yeast Carbon Base (Difco), 1,17% (m/v)]. La pseudofilamentation est observée quotidiennement pendant 7 jours. La longueur des pseudofilaments est mesurée en microscopie optique à l'aide d'un micromètre oculaire (x40, x100 ou x400).

### **4.4 Etude de la reproduction sexuée**

Les différentes souches dérivant de *ura3*<sub>[ $\Delta$ 360]</sub> ou *ura3*<sub>[ $\Delta$ 990]</sub>, *MATa* sont, après préculture, mises en suspension à quantité égale avec l'isolat CL38 de type sexuel *MATa* dans de l'eau stérile et ensemencées en goutte sur gélose YCB (François *et al.*, 2001). Un examen direct entre lame et lamelle des cultures est quotidiennement effectué pendant 5 jours pour identifier la présence de cellules en conjugaisons, d'ascospores et d'asques ouverts.

### **4.5 Infection de macrophages**

Les levures recueillies en phase exponentielle sous forme de blastospores sont centrifugées (1200g, 5 min), lavées dans du sérum physiologique et comptées en cellule de Malassez. La veille de l'infection, les macrophages sont récoltés, dénombrés en cellule de Malassez et mis à adhérer dans des flasques de 25  $\text{cm}^2$ . Ils sont infectés par les levures, préalablement resuspendues dans du DMEM à 37°C. Les flasques sont observées régulièrement en microscopie optique inversée. Des levures cultivées en DMEM dans les mêmes conditions constituent des contrôles pour chaque point d'infection étudié. Les cocultures également réalisées sur Labtek (Lab-tek Chamber Slides<sup>®</sup>, Nalge Nunc International) sont colorées au May-Grünwald-Giemsa (MGG) à différents temps.

Pour estimer la viabilité des différentes souches (sauvages et mutantes) après phagocytose, les *Candida* intramacrophagiques ont été récupérées après lavages et lyse des macrophages (eau distillée stérile glacée, SDS 0,1%). Après numération des levures, des dilutions contenant 100 levures ont été étalées sur gélose YPD et incubées pendant 2 jours à 30°C.

## 4.6 Infection sur modèle murin

Les expériences d'infection *in vivo* ont été conduites au sein de l'animalerie de l'hôpital Saint André (CHU de Bordeaux), sur des souris Swiss femelles (Laboratoires Debré) âgées de 4 semaines et pesant de 23 à 28g, réparties en groupes de 6 animaux, selon le protocole suivant :

- Immunodépression par injection intrapéritonéale à J1, J4 et J7 de 200µg/g de cyclophosphamide (Endoxan<sup>®</sup>)
- Infection à J5 par injection intraveineuse (veine caudale latérale) de  $5 \times 10^7$  *Candida* en phase exponentielle de croissance sous un volume de 100 µL.

Les animaux ont eu accès à volonté à la nourriture et la boisson durant toute la durée de l'expérimentation. Un suivi pondéral bihebdomadaire a été effectué. Les souris mortes ou moribondes (sacrifiées par inoculation intrapéritonéale de 200 µL de Pentobarbital) ont été autopsiées afin de prélever les reins, le foie, le coeur et les poumons. Les appositions sur lame des différents organes ont été colorées au MGG et les broyats d'organe ensemencés sur des géloses Sabouraud-chloramphénicol (incubées 2 jours à 37°C) afin d'évaluer la charge fongique.

## 5 Etude de la $\beta$ -oxydation des acides gras

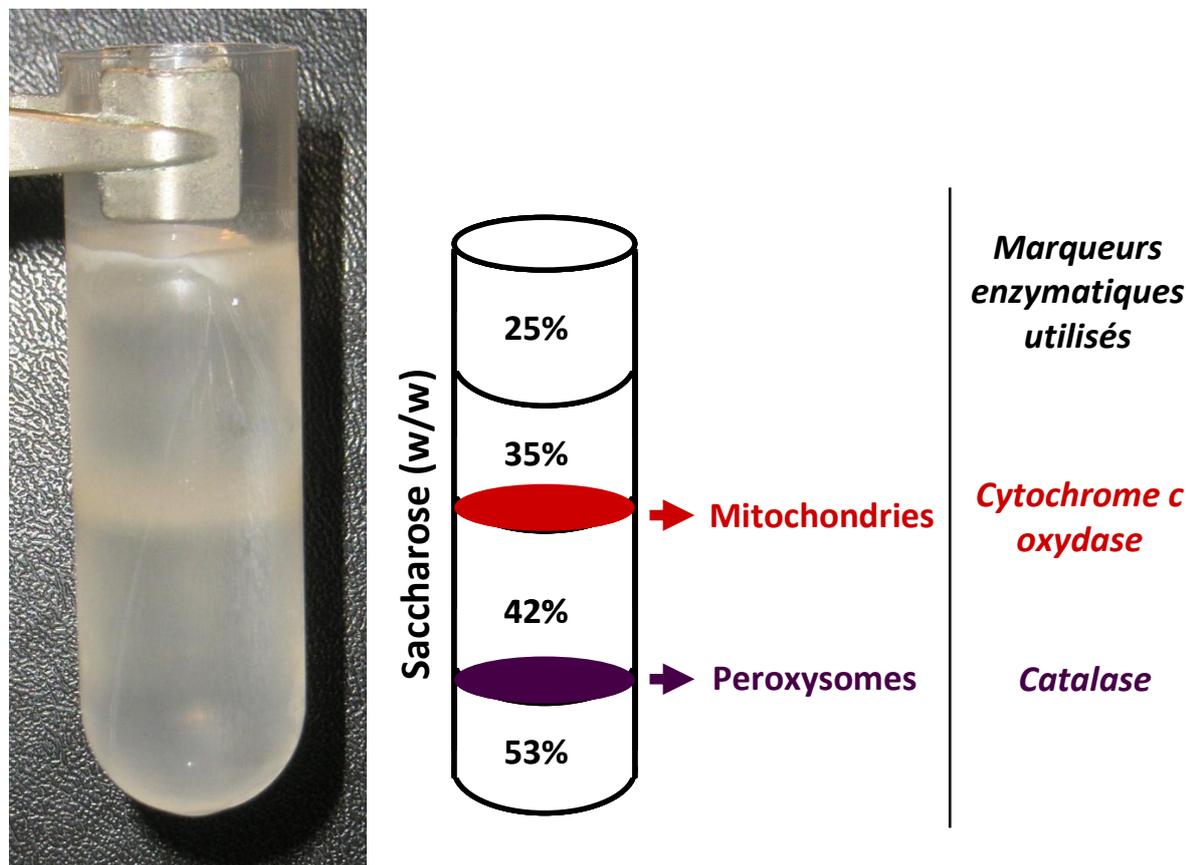
### 5.1 Purification de fractions peroxysomales et mitochondriales à l'aide d'un gradient discontinu de saccharose

Le protocole de purification a été adapté à partir de celui publié par Distel & Kragt (2006). Les levures sont cultivées deux jours à 35°C et sous agitation sur WOYglu. Lorsque la  $DO_{600} = 1$ , les cellules sont récoltées par centrifugation (4000 g, 5 min) et resuspendues dans 10 mL de milieu d'induction. Après ensemencement de 1 L de milieu d'induction par 5 mL de la suspension, et une incubation de 16 h à 30°C sous agitation, les levures sont récoltées par centrifugation (4000 g, 5 min) et lavées deux fois à l'eau distillée. Le poids sec du culot cellulaire est ensuite déterminé (1 mL de suspension cellulaire à  $DO_{600} = 1$  correspond à 0,125 g de poids sec de levure). Les cellules sont resuspendues dans 10 mL de tampon SH préparé extemporanément ( $\beta$ -mercapto-ethanol 0,5M, Tris-HCl 2,5 M pH 9,3) par gramme de poids sec mesuré et incubées 10 minutes à 30°C sous agitation. Les cellules sont lavées deux fois (4000 g, 5 min) dans du tampon Tris-KCl (KCl 0,5M, Tris 10 mM pH 7).

Afin d'obtenir les sphéropastes, les levures sont incubées une heure à 30°C dans 10 mL de tampon de digestion (Sorbitol 1,35 M, EDTA 1 mM, Citrate phosphate 10 mM pH 5.8) supplémenté par 10 mg de Zymolyase par gramme de poids sec initialement mesuré. Toutes les étapes suivantes, incluant la purification des peroxysomes et des mitochondries sont réalisées à 4°C.

Les sphéropastes sont lavés (4000g, 10 min) deux fois dans du tampon sphéropaste [Sorbitol 1,2 M dans du KEM (MES 5 mM, EDTA 1 mM, KCl 1 mM pH 5,5)], puis lysés par une incubation d'une heure dans de la glace dans 10 mL de tampon d'homogénéisation (Sorbitol 0,6 M dans KEM, PMSF 1 mM) par gramme de poids sec initialement mesuré. Les débris membranaires et nucléaires sont éliminés par une centrifugation à faible vitesse (1500g 10 min). Le surnageant est récolté et le culot est repris dans 20 mL de tampon d'homogénéisation. Après 15 minutes dans la glace, la suspension est centrifugée (1500g, 10 min) et les 2 surnageants sont poolés et centrifugés à 20000g pendant 30 min. Le culot ainsi obtenu, contenant les organites cellulaires, est resuspendu avec précaution dans 2 mL de sucrose 20% (m/m, dans du KEM).

Le gradient discontinu de sucrose a été adapté de Kamiryo *et al.* (Kamiryo *et al.*, 1982). La suspension d'organites est déposée sur un gradient discontinu de saccharose, préparé en tube polycarbonate de 36 mL et constitué de 4,5 mL d'une solution de saccharose à 53% (m/m) dans du KEM, de 9 mL à 42%, de 4,5 mL à 35% et de 4,5 mL à 25%. Les tubes sont centrifugés 1 h à 100 000  $g_{av}$  dans un rotor à balancier AH-629 (Sorvall). La petite bande visible à l'interface 53%-42% contient la fraction peroxysomale et la bande plus large à l'interface 42%-35% contient la fraction mitochondriale (**Figure 21**). Les concentrations protéiques des fractions recueillies ont été estimées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976), en utilisant la BSA comme standard.



**Figure 21. Purification de fractions peroxysomales et mitochondriales à l'aide d'un gradient discontinu de saccharose.** Après culture sur milieu d'induction, les levures sont transformées en sphéroplastes. Les organites cellulaires obtenus après lyse osmotique des sphéroplastes sont déposés au sommet d'un gradient discontinu de saccharose. Après centrifugation (1 h à 100.000  $g_{av}$ ), la fraction mitochondriale est obtenue à l'interface 35%-42% et la fraction peroxysomale à l'interface 42%-53%. La pureté des fractions est estimée par la mesure de l'activité cytochrome c oxydase (spécifique des mitochondries) et catalase (spécifique des peroxysomes).

## 5.2 Purification de mitochondries

Pour l'étude de la respiration, les mitochondries ont été purifiées à partir de sphéroplastes (obtenus comme précédemment) selon un protocole adapté de Guérin *et al.* (1979). Cette purification s'effectue notamment sans l'utilisation d'un gradient de saccharose afin de ne pas altérer la membrane externe mitochondriale. Toutes les étapes ont été réalisées à 4°C. Les sphéroplastes ont été lavés trois fois (4000g 10 min) dans un tampon sphéroplaste [Sorbitol 0,75 M, Mannitol 0,4 M, Tris Maléate 10 mM pH 6,8, BSA 0,1 % (m/v)]. Ils ont été lysés par

une incubation d'une heure dans la glace dans 10 mL de tampon d'homogénéisation 2 [Mannitol 0,65 M, EGTA 2mM, Tris Maléate 10 mM pH 6,8, BSA 0,2 % (m/v)] par gramme de poids sec initialement mesuré. Les débris membranaires et nucléaires sont éliminés par centrifugation basse vitesse (900g 10 min). Le surnageant est ensuite centrifugé à 12000g pendant 15 min afin de recueillir dans le culot la fraction mitochondriale, qui est ensuite reprise avec précaution dans 300 µL de tampon d'homogénéisation 2 sans BSA et additionné de sodium phosphate (0,5 mM final). La concentration protéique a été estimée comme précédemment.

### ***5.3 Dosages enzymatiques réalisés sur les fractions peroxysomales et mitochondriales***

Catalase. L'activité de la catalase (EC 1.11.1.6) a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre Cary 100 scan<sup>®</sup> (Varian), à  $\lambda = 240\text{nm}$ , et à 20°C selon la méthode décrite par Aebi (1984). Rapidement, 10 µg de protéines sont ajoutés à 2 mL d'eau et 1 mL de tampon phosphate 50 mM (pH 7) dans une cuve en quartz. La réaction est déclenchée par l'introduction de 10 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%. La dismutation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne une diminution de l'absorbance à 240 nm (coefficient d'extinction molaire =  $4,36 \cdot 10^4 \text{ cm}^2/\text{mole}$ ). L'activité spécifique est exprimée en µmol de substrat converti par minute et par mg de protéine. La cinétique de la réaction est suivie en temps réel par le logiciel Enzymes Kinetics (Varian).

Cytochrome c oxydase. L'activité de la cytochrome c oxydase (EC 1.9.3.1) a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre Cary 100 scan<sup>®</sup> (Varian) dans des cuves thermostatées à 37°C selon une méthode adaptée de Polakis *et al.* (Polakis *et al.*, 1964). Le cytochrome c (Sigma) a préalablement été réduit par l'ajout d'une quantité équimolaire d'acide ascorbique. Le mélange réactionnel contient 1mM EDTA, 100 µL de cytochrome c réduit (6 mg/mL), 150 µL de BSA 1,5%. Le volume est ajusté à 1 mL par un tampon phosphate 100 mM, pH=6,9. La réaction, déclenchée par l'addition de l'extrait protéique (10 µg), entraîne une décroissance de l'absorbance à 550 nm (coefficient d'extinction molaire =  $19,3 \cdot 10^3 \text{ cm}^2/\text{mole}$ ). L'activité spécifique est exprimée en µmol de substrat converti par minute et par mg de protéine. La cinétique de la réaction est suivie en temps réel par le logiciel Enzymes Kinetics (Varian).

### ***5.4 Catabolisme du <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA***

Obtention des extraits cellulaires bruts. Après culture sur milieu riche (YPD) ou milieu d'induction, les levures sont récoltées et transformées en sphéropastes (comme décrit précédemment). Les extraits cellulaires bruts sont obtenus par lyse osmotique des sphéropastes en présence de Tris-HCl 100 mM (pH 7,4).

Dosage de l'activité de catabolisme du <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA. L'équivalent de 35 µg de protéines d'extraits cellulaires bruts ou de 10 µg de protéines des fractions peroxysomales et mitochondriales est ensuite incubé à 37°C dans 100 µL de milieu réactionnel (20 mM NAD, 10 mM CoASH, 1 mM FAD, 100 mM KCN, 2% Triton, 100 mM Tris-HCl pH 7.4). La réaction est démarrée par l'ajout de 1 µL de <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA 10 µM (20 µCi/mL, Sigma-Aldrich). La réaction est stoppée au bout de 15 minutes par l'ajout de 100 µL de KOH 5M. Après saponification (1h à 65°C) et acidification (addition de 100 µL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 36N), les AG sont extraits avec 2 mL de CHCl<sub>3</sub>. Les extraits sont évaporés (sous N<sub>2</sub>) et dissous dans 50 µL de CHCl<sub>3</sub> / CH<sub>3</sub>OH 2:1 (v/v) puis séparés par chromatographie couche mince sur plaque de silice (10 x 10 cm) en utilisant un mélange 75:24:1 (v/v/v) hexane / diethyl ether / acide acétique comme solvant. La révélation est ensuite effectuée à l'aide du système PhosphoImager<sup>®</sup> SI (Amersham Biosciences).

## 5.5 *Respiration mitochondriale*

La consommation mitochondriale d'oxygène est mesurée à 28°C à l'aide d'une électrode de Clark type 0 connectée à un ordinateur permettant de suivre en temps réel la consommation d'oxygène (Manon & Guérin, 1998). Les mesures sont réalisées dans un tampon R de respiration (sorbitol 1 M, EGTA 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, NaCl 1,7 mM, BSA 0,1 % et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7,2), ne comprenant pas de BSA pour les mitochondries, à des concentrations protéiques de 0,3 à 1 mg/mL pour les mitochondries ou de 8 mg/mL pour les sphéropastes (obtenus selon le protocole de purification de mitochondries, cf page 72). Au préalable, les sphéropastes ont été lavés 3 fois (2000 g, 10 min) dans le tampon R et perméabilisés par l'action de la nystatine (40 µg/mL final) pendant 5 à 10 minutes sous agitation douce.

Différents substrats et inhibiteurs sont ajoutés aux concentrations finales suivantes : NADH (4 mM), palmitoyl-CoA (0,2 mM), stéaroyl-CoA (0,2 mM), CCCP (5 µM), ADP (10 µM), valinomycine (5 µg/mL), myxothiazole (0,1 µg/mL), phenylsuccinate (5 mM), KCN (5 mM). NADH, palmitoyl-CoA et stéaroyl-CoA sont utilisés comme substrats respiratoires, la valinomycine, le CCCP et l'ADP comme agents découplants, le myxothiazole et le KCN comme inhibiteurs respiratoires. Les vitesses de consommation de l'O<sub>2</sub> sont exprimées en nmol d'O<sub>2</sub> par milligramme de protéine et par millilitre (nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>).

## 5.6 *Immunodétection des protéines Fox2p et Icl1p par Western-Blot*

L'équivalent de 10 µg de protéines des fractions peroxysomales et mitochondriales et de 20 µg de protéines d'extraits cellulaires bruts sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) selon Laemmli (1970) et transférés sur une membrane polyvinylidene difluoride par électrotransfert. Après saturation en PBS-Tween-Lait (Phosphate 15 mM pH 7,4, NaCl 154 mM, Tween 20 0,05% (v/v), lait écrémé en poudre 5%), la membrane est incubée avec l'anticorps primaire. Un anticorps polyclonal de lapin anti-Fox2p (Fosså *et al.*, 1995), dirigé contre la protéine multifonctionnelle peroxysomale de *Candida tropicalis*, nous a été gracieusement fourni par W. Schliebs (Medizinisch Fakultät Ruhr-Universität Bochum, Allemagne) et un anticorps polyclonal de lapin anti-Icl1p (Schmidt *et al.*, 1996), dirigé contre l'isocitrate lyase de *Ashbya gossypii*, nous a gracieusement été fourni par S. Nieland (Hochschule Lausitz, Senftenberg, Allemagne). Après 3 étapes de lavage et une incubation avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase, l'immunodétection est réalisée en présence de DAB (3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride) et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le logiciel Quantity One<sup>®</sup> (BioRad) est utilisé pour la quantification des signaux.

## 6 **Analyses bioinformatiques et statistiques**

Les bases de données suivantes ont été utilisées :

- *Candida lusitaniae* database ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/candida\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/candida_group/MultiHome.html))
- *Saccharomyces cerevisiae* genome database (<http://www.yeastgenome.org/>)
- *Candida albicans* database (<http://www.candidagenome.org/>)
- *Yarrowia lipolytica* database (<http://www.genolevures.org/yali.html>)
- Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Les logiciels d'analyse de séquence présents sur les plateformes suivantes sont 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 est effectuée avec le logiciel BioEdit. L'analyse de la consommation du  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA est réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant<sup>®</sup> (Amersham Biosciences). L'analyse des numérisations des gels d'électrophorèse ou des membranes de Western-Blot est réalisée à l'aide du logiciel Quantity One (Biorad).

Les analyses statistiques (profils lipidiques, activité de catabolisme du  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA) ont été réalisées à l'aide du *t*-test de Student. Un  $p \leq 0,05$  était considéré comme statistiquement significatif, les expériences étant conduites au moins en triplicats indépendants. Les analyses de Kaplan-Meier et la réalisation des tests de Log-rank ont été réalisées à l'aide du logiciel XLstat.

# **RESULTATS**

**- Partie I -**

**Démonstration de l'existence d'une  $\beta$ -oxydation  
mitochondriale Fox2p-dépendante chez *Candida lusitaniae***

## 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, les macrophages dans les tissus sont les principales cellules permettant le contrôle de l'infection. Cependant, il a été démontré *in vitro* que *C. albicans* et *C. glabrata* sont capables de résister à la phagolyse et d'échapper à la phagocytose macrophagique (Lorenz *et al.*, 2004; Roetzer *et al.*, 2010; Seider *et al.*, 2011). Après internalisation dans le macrophage, *C. albicans* reprogramme son métabolisme pour faire face à une carence carbonée. Deux voies du métabolisme peroxysomal, le cycle du glyoxylate et la  $\beta$ -oxydation des AG, sont alors induites (Lorenz *et al.*, 2004; Prigneau *et al.*, 2003). Il a été clairement démontré que le cycle glyoxylique était un facteur de virulence impliqué dans la résistance à la phagolyse macrophagique de *C. albicans* (Lorenz & Fink, 2001). Cependant le rôle de la  $\beta$ -oxydation des AG reste controversé (Piekarska *et al.*, 2006; Ramírez & Lorenz, 2007).

Chez les levures Ascomycètes *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* et *C. tropicalis*, la  $\beta$ -oxydation des AG, essentielle pour dégrader les AG à longue et courte chaîne carbonée (Hiltunen *et al.*, 2003; Kurihara *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2000), est présumée exclusivement localisée dans les peroxysomes (Hiltunen *et al.*, 2003; Kunau *et al.*, 1995; Kurihara *et al.*, 1992; Shen & Burger, 2009).

Chez *S. cerevisiae*, les AG à longue chaîne sont importés dans les peroxysomes grâce au transporteur hétérodimérique Pxa1p-Pxa2p (Hettema *et al.*, 1996; Shani *et al.*, 1995), tandis que les AG à moyenne chaîne semblent traverser la membrane de manière passive (Hettema & Tabak, 2000; Hiltunen *et al.*, 2003). Après une étape d'activation des AG en acyl-CoA, la  $\beta$ -oxydation catalyse en 4 réactions le raccourcissement des chaînes carbonées entre les carbones 2 et 3 en produisant une molécule d'acétyl-CoA (Hiltunen *et al.*, 2003). La 1<sup>ère</sup> étape de la  $\beta$ -oxydation est catalysée par une acyl-CoA oxydase, les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> par une protéine multifonctionnelle (Fox2p) et la 4<sup>ème</sup> par une kétoacyl-CoA thiolase. L'acétyl-CoA peut alors intégrer le cycle du glyoxylate pour la synthèse des sucres *via* la néoglucogénèse ou bien être exporté hors des peroxysomes par le système de navette des carnitine acétyl-transférases ou bien sous forme de citrate (Strijbis & Distel, 2010).

Contrairement aux levures Ascomycètes, la  $\beta$ -oxydation chez d'autres organismes fongiques n'est pas restreinte aux peroxysomes. Thieringer *et al.* ont décrit chez *N. crassa* un système hybride de  $\beta$ -oxydation, localisé dans des microsomes dépourvus de catalase, et dont la première étape est médiée par une enzyme retrouvée habituellement dans les mitochondries, une acyl-CoA déshydrogénase (Thieringer & Kunau, 1991). L'existence d'une  $\beta$ -oxydation mitochondriale a tout d'abord été suspectée chez *A. niger* (Baltazar *et al.*, 1999) avant d'être démontrée chez *A. nidulans* (Maggio-Hall & Keller, 2004). Feron *et al.* ont suggéré que la  $\beta$ -oxydation était préférentiellement localisée respectivement dans les peroxysomes ou la mitochondrie chez deux levures basidiomycètes, *Sp. ruinenii* et *Sp. pararoseus* (Feron *et al.*, 2005). Malgré ces exemples de  $\beta$ -oxydation extra-peroxysomales existant chez des organismes fongiques phylogéniquement divergents, la  $\beta$ -oxydation mitochondriale semble avoir été perdue au cours de l'évolution chez les levures Ascomycètes (Cornell *et al.*, 2007; Shen & Burger, 2009).

Notre travail avait pour but de préciser la relation entre la  $\beta$ -oxydation des AG et le cycle du glyoxylate chez *C. lusitaniae*, afin d'identifier les sources de l'acétyl-CoA utilisé par le cycle du glyoxylate. Nous avons donc construit trois mutants nuls chez *C. lusitaniae* : *icl1* $\Delta$ , *fox2* $\Delta$  et *pxa1* $\Delta$ , respectivement défectifs pour l'isocitrate lyase (enzyme clé du cycle du glyoxylate), pour la protéine multifonctionnelle de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et pour une protéine responsable de l'import peroxysomal des AG à longue chaîne. L'étude de l'assimilation *in vitro* des sources de carbone et du catabolisme du palmitoyl-CoA a révélé que le catabolisme des acyl-CoA à longue chaîne était toujours fonctionnel chez le mutant *fox2* $\Delta$  de *C. lusitaniae*.

Le développement de plusieurs approches (fractionnement cellulaire, immunolocalisation de la protéine Fox2p, mesure de la respiration mitochondriale) nous a permis de montrer que le siège de la  $\beta$ -oxydation était à la fois peroxysomal et mitochondrial chez *C. lusitaniae*. Nos résultats indiquent que le catabolisme mitochondrial est Fox2p-dépendant, alors que le catabolisme peroxysomal est constitué par deux voies, l'une Fox2p-dépendante et l'autre Fox2p-indépendante.

Ce résultat, extrêmement original, constitue la première démonstration de l'existence d'une localisation extra-peroxysomale de la  $\beta$ -oxydation chez une levure Ascomycète. Nous démontrons également pour la première fois chez un organisme eucaryote la double localisation peroxysomale et mitochondriale de la protéine multifonctionnelle peroxysomale Fox2p. Enfin, nous avons démontré l'existence d'une voie alternative de catabolisme des acides gras, Fox2p-indépendante, dans les peroxysomes de *C. lusitaniae*. Ces travaux ont fait l'objet d'une demande de Brevet Européen (European Patent EP11159920.5 déposée le 25 mars 2011, déposants : CNRS, Université Bordeaux Segalen, CHU de Bordeaux) et d'un article actuellement en soumission.

## **1 Manuscrit de l'article :**

**A Fox2-dependent fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway coexists in both peroxisomes and mitochondria of the ascomycete opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitaniae***

**A Fox2-dependent fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway coexists in both peroxisomes and mitochondria of the ascomycete opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitanae***

Gabriel F.<sup>1,2</sup>, Accoceberry I.<sup>1,2</sup>, Bessoule J.J.<sup>3,4</sup>, Manon S.<sup>5,6</sup>, El-Kirat Chatel S.<sup>1,2</sup>, Dementhon K.<sup>1,2</sup>, Noël T.<sup>1,2</sup>

**Address :**

1 Univ. Bordeaux, Microbiologie fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, F-33000 Bordeaux, France

2 CNRS, Microbiologie fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, F-33000 Bordeaux, France

3 Univ. Bordeaux, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200, F-33000 Bordeaux, France

4 CNRS, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200, F-33000 Bordeaux, France

5 Univ. Bordeaux, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France

6 CNRS, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France

\*Correspondence to: Thierry Noël, Laboratoire de Microbiologie fondamentale et Pathogénicité, Université Bordeaux, CNRS UMR5234, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

E-mail: thierry.noel@u-bordeaux2.fr

**Key words : *Candida* – $\beta$ -oxidation – fatty acid – FOX2 – mitochondria**

## INTRODUCTION

Lipid metabolism in fungal pathogenesis has recently attracted growing interest because of its possible multiple implications during host-pathogen interactions (1, 2). One particular issue addresses the role of the catabolism of fatty acids as a source of nutrient when a fungal pathogen invades the host (2, 3). In the ascomycetous yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, and *Candida tropicalis*, the fatty acid (FA)  $\beta$ -oxidation, which is essential for degrading both long- and short-chain fatty acids (4–7), is exclusively localized in the peroxisome (4, 7–9). In *S. cerevisiae*, the long chain FA are transported across the peroxisomal membrane via a heterodimeric ABC transporter Pxa1p-Pxa2p (4, 10, 11), while the medium-chain FA are thought to be imported into the peroxisomes as free FA (4, 12). Fatty acids are activated to fatty acyl-coenzyme A esters (FA-CoA) by acyl-CoA synthetases, and then shortened between carbon 2 and 3 through the  $\beta$ -oxidation spiral, yielding acetyl-CoA in four steps (**Fig. 1**): **i/** an acyl-CoA-oxidase (Pox1p *alias* Fox1p) converts FA-CoA into *trans*-2-enoyl-CoA and transfers electrons directly to oxygen generating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4), which is detoxified by the Cta1p catalase (13); **ii/ and iii/** a multifunctional enzyme (Fox2p), which have both enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activities, converts *trans*-2-enoyl-CoA into 3-ketoacyl-CoA (14, 15); **iv/** a 3-ketoacyl-CoA thiolase (Pot1p *alias* Fox3p) converts 3-ketoacyl-CoA into acetyl-CoA and FA-CoA shortened by two carbon units, which then can undergo an additional  $\beta$ -oxidation cycle. Acetyl units may integrate the glyoxylate cycle (16) and can be used to synthesize carbohydrates *via* gluconeogenesis, or being exported outside the peroxisome by the carnitine acetyl transferase shuttle system, or under the form of citrate (3).

Unlike ascomycetous yeasts,  $\beta$ -oxidation in other fungi is not restricted to peroxisomes. Yet, an unusual  $\beta$ -oxidation system involving an acyl-CoA dehydrogenase rather than an acyl-CoA oxidase was described in catalase-free microbodies of *Neurospora crassa* (17). The occurrence of  $\beta$ -oxidation in mitochondria was suspected in *Aspergillus niger* (18), and later demonstrated for *Aspergillus nidulans* (19), and *Podospora anserina* (20). Another work with the basidiomycetous yeasts *Sporidiobolus ruinenii* and *Sporidiobolus pararoseus* strongly suggested that  $\beta$ -oxidation was preferentially localized in microbodies and mitochondria, respectively (21). In spite of different examples of extraperoxisomal  $\beta$ -oxidation occurring in evolutionary divergent species of fungi, a common way of thinking is to consider that mitochondrial  $\beta$ -oxidation has been lost during evolution in the ascomycetous yeasts (9, 22). In this work, we demonstrate that several pathways of catabolism of fatty acids coexist in the ascomycetous yeast *Candida lusitanae*, of which one is a fox2p-dependent  $\beta$ -oxidation pathway taking place in both peroxisomes and mitochondria.

*Candida lusitanae* (teleomorph *Clavispora lusitanae*) is an opportunistic pathogenic yeast belonging to the CTG clade of *Sacharomycotina* which can be responsible for infections in immunodeficient patients, especially those suffering from haematological malignancies, and in premature neonates (23). Although its frequency in invasive candidiasis is much lower than other species such as *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, *C. lusitanae* infections are feared because sometimes associated to resistance to antifungal treatment, notably amphotericin B (23). This yeast is interesting as a laboratory model, because it has a sexual reproduction (24) controllable *in vitro* (25), and its haploid genome is easily amenable to genetic manipulations owing to different molecular tools (26–28).

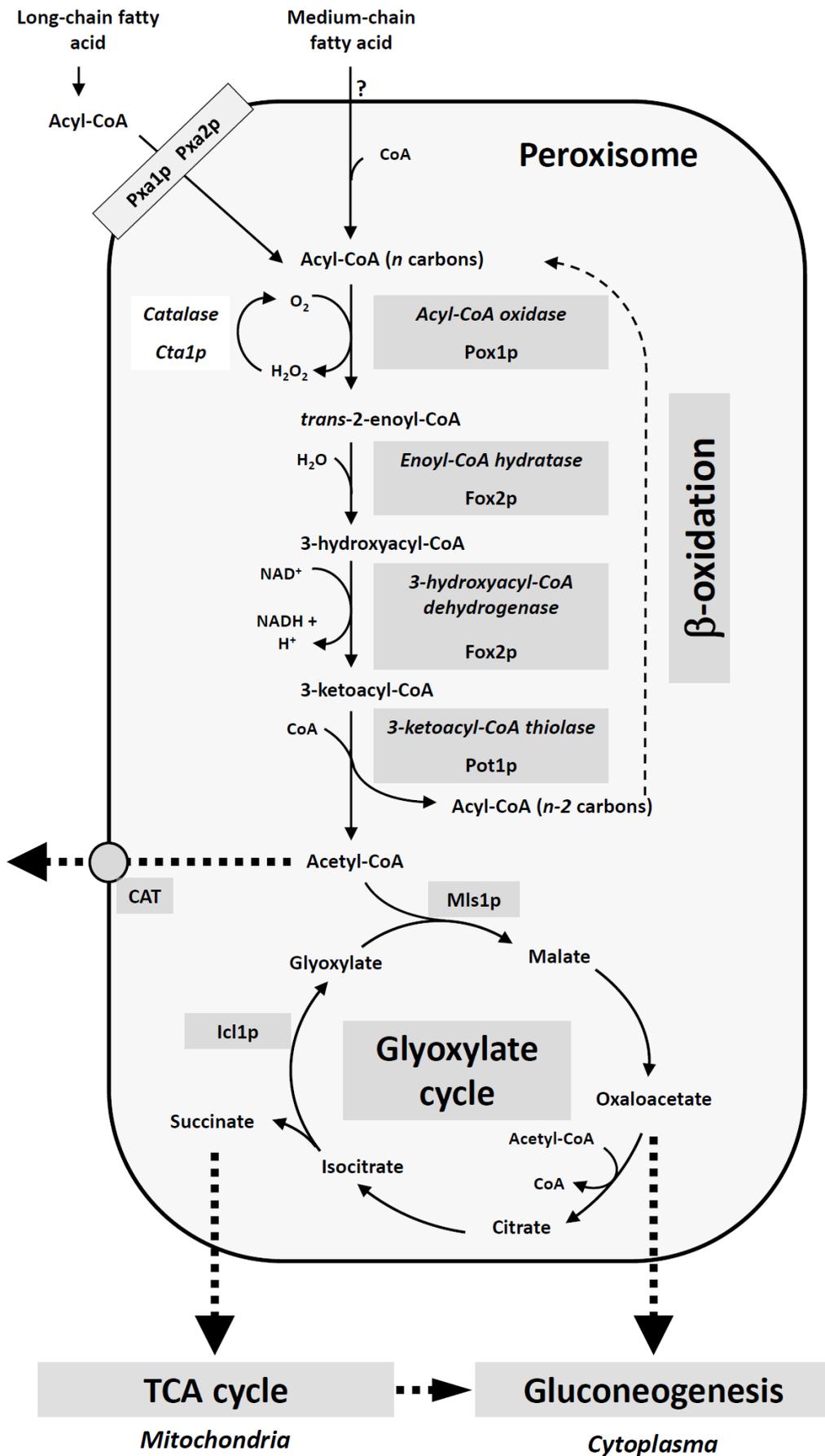


Fig. 1 – Fatty acid catabolism in ascomycetous yeasts. Model adapted from (3-4).

Phagocytic cells are the primary line of defense against *Candida* infections. Nevertheless, it is admitted that, at least *in vitro*, the macrophages alone are inefficient to fight the infection, because *C. albicans* and *C. glabrata* are able to resist to phagolysis, and to escape from the macrophage (16, 29). Upon phagocytosis by macrophages, *C. albicans* reprograms its metabolism to repress glycolysis and overexpress genes involved in the peroxisomal metabolism. The key enzymes of the glyoxylate cycle, isocitrate lyase and malate synthase (Icl1p and Mls1p), are thus strongly induced along with the fatty acids  $\beta$ -oxidation genes (30, 31). Even if the glyoxylate cycle may be considered as a virulence factor in some human and plant pathogenic fungi, such as *C. albicans* (16) and *Magnaporthe grisea* (32), the role of  $\beta$ -oxidation is still controversial (33).

The present work was initiated to better understand the relationship between the  $\beta$ -oxidation of fatty acids and the glyoxylate cycle in *C. lusitaniae*, with the goal to identify the source of acetyl-CoA that fed the glyoxylate cycle. For that, we constructed three null-mutants in *C. lusitaniae*: *icl1* $\Delta$ , *fox2* $\Delta$ , and *pxa1* $\Delta$ , lacking the isocitrate lyase, the multifunctional  $\beta$ -oxidation protein, and a protein responsible of the peroxisomal long chain FA uptake, respectively. Growth assays and palmitoyl-CoA catabolism assays revealed that the catabolism of long-chain FA-CoA was still functional in the *C. lusitaniae fox2* $\Delta$  mutant. Subcellular fractionation, immunodetection and measurement of mitochondrial respiration allowed us to demonstrate that *C. lusitaniae* harbors a peroxisomal and a mitochondrial Fox2p-dependent  $\beta$ -oxidation pathway, and an additional peroxisomal Fox2p-independent pathway that allows the *fox2* $\Delta$  mutant to grow on fatty acid as the sole carbon source.

## RESULTS

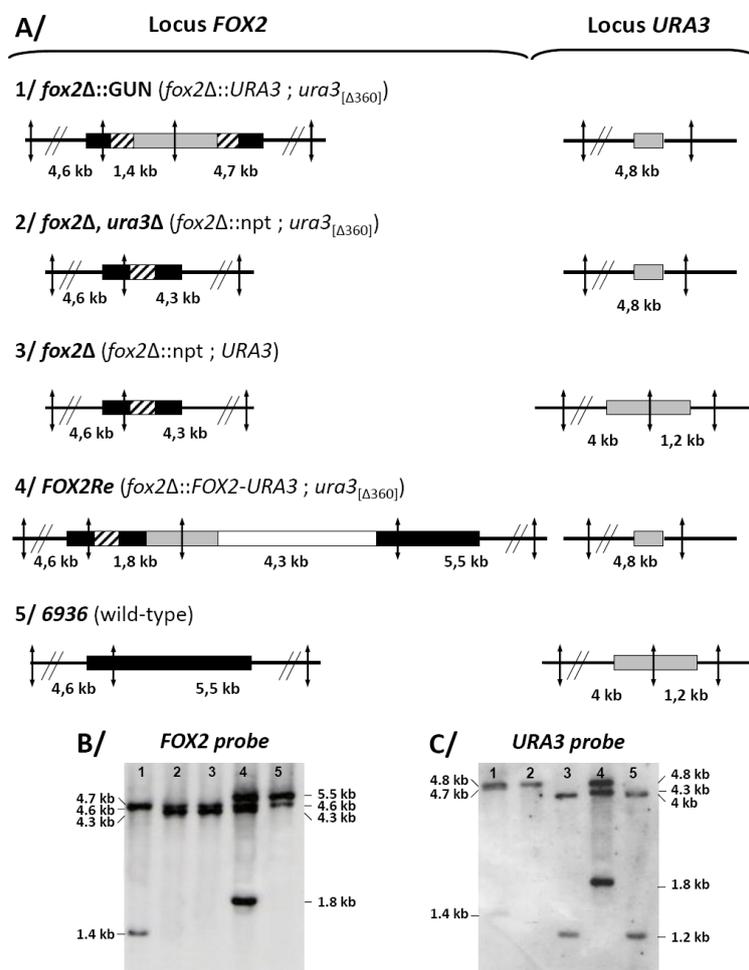
**Identification of the *ICLI*, *FOX2* and *PXA1* genes of *C. lusitaniae*.** The genes *ICLI* encoding the isocitrate lyase, *FOX2* encoding the multifunctional protein of  $\beta$ -oxidation, and *PXA1* encoding part of an ABC transporter responsible for peroxisomal long chain FA uptake, were identified in the genome of *C. lusitaniae* (<http://www.broadinstitute.org/>) with a BLAST analysis (34) using as query the orthologous proteins of *C. albicans* (*Candida* Genome Database, <http://www.candidagenome.org/>). This *in silico* analysis allowed us to identify: **i/** the 1650-bp ORF CLUG\_01411.1 encoding a predicted protein of 549 amino acids (61 kDa) having 79% identity and 89% similarity with Icl1p (orf19.6844) of *C. albicans*, **ii/** the 2709-bp ORF CLUG\_01348.1 encoding a predicted protein of 902 amino acids (98 kDa) having 71% identity and 85% similarity with Fox2p (orf19.1288) of *C. albicans*, **iii/** the 2430-bp ORF CLUG\_01238.1 encoding a predicted protein of 809 amino acids having 66% identity and 79% similarity with Pxa1p (orf19.7500) of *C. albicans*.

The *C. lusitaniae* Icl1p putative protein showed conservation of the K208, K209, C210, H212 amino acids, which were previously identified as the catalytic residues in the isocitrate lyase of *Escherichia coli* (35). As in other yeasts, the *C. lusitaniae* Fox2p contains two dehydrogenase domains (DHaseA at aa 24-180, and DHaseB at aa 323-485), which are short-chain alcohol dehydrogenase/reductase superfamily members, and one enoyl-CoA hydratase domain (aa 780-895) (15). Both Icl1p and Fox2p of *C. lusitaniae* contain a type I peroxisomal targeting signal (-GKL) at the COOH extremity of the protein (36, 37). Synteny was conserved in the close vicinity of CLUG\_01411.1 and CLUG\_01348.1 in *C. lusitaniae* and in *C. albicans*, which reinforced the idea that these ORF are the true orthologs of the *ICLI* gene and *FOX2* gene of *C. albicans*. Furthermore, other paralog genes having significant homology with *ICLI* and *FOX2* could not be detected in the genome of *C. lusitaniae*.

Pxa1p belongs to the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) proteins, and to the adrenoleukodystrophy protein (ALDp) subfamily (11). The *C. lusitaniae* Pxa1p putative

protein have highly conserved residues corresponding to the Walker A (aa 566–589) and Walker B (aa 687-734) domains, possess an ABC signature (aa 668-716) and a motif that resembles (aa 603-635) a sequence described as “new motif” for the ALDp subfamily (38). Synteny was partially conserved in the close vicinity of Pxa1p in *C. lusitaniae* and in *C. albicans*.

**Construction of the *C. lusitaniae* *icl1Δ*, *fox2Δ* and *pxa1Δ* mutants.** The *icl1Δ* and *fox2Δ* null-mutants, and the respective revertant strains having a reconstituted functional allele, were obtained using an improved integrative transformation system based upon the “*URA3*-blaster” strategy adapted for *C. lusitaniae* (26). The *URA3* gene was used as an auxotrophic marker, because its removal from the deleted loci can be easily counterselected on a medium containing 5-fluoro-orotic acid, and it can be further reintroduced at its endogenous locus to avoid positional effects of *URA3* expression (39). The *pxa1Δ* mutant was constructed by disruption of the coding sequence of the wild allele by integration of a plasmid carrying a 500 bp fragment derived from the central part of *PXA1*. The genotypes of all the strains were verified by PCR and Southern blot analysis, e.g. as shown for the *FOX2* and *URA3* loci (**Fig. 2**). Nucleotide sequencing was also used to confirm the genotype of the *fox2Δ* mutant (data not shown).



**Fig. 2. Southern blot analysis of the wild-type and *fox2Δ* strains.**

**A/** Panel showing the genomic configurations of the *FOX2* (left panel) and *URA3* (right panel) loci of the mutants (*fox2Δ::GUN*, *fox2Δ ura3Δ*, *fox2Δ*), the revertant strain (*FOX2Re*), and the wild-type strain (6936). Sequences homologous to *FOX2* are colored in black, npt sequences are hatched, sequences homologous to *URA3* are colored in grey, pGEM-T sequence is colored in white. Genomic DNA was digested with *EcoRV* (arrows) and analyzed by Southern blotting using: **B/** the *FOX2* probe (homologous to the entire sequence of *FOX2*) and **C/** *URA3* probe (homologous to the entire sequence of *URA3*).

**A *C. lusitaniae fox2Δ* mutant can grow on medium-chain and long-chain saturated FA as sole carbon source, whereas a *icl1Δ* mutant cannot.** *S. cerevisiae* and *C. albicans* mutants with defect in peroxisomal  $\beta$ -oxidation (i.e. *fox2Δ*) or in glyoxylate cycle (i.e. *icl1Δ*) are not able to utilize FA as the sole carbon source (4, 33, 40). We tested the ability of the *C. lusitaniae icl1Δ* and *fox2Δ* mutants to grow on minimal medium (YNB) containing glucose, glycerol, acetate, saturated short-chain FA (C10:0), saturated medium-chain FA (C12:0, C14:0), saturated long-chain FA (C16:0, C18:0), or unsaturated long-chain FA (C18:1), as exclusive carbon source (Table 1).

**Table 1. Growth characteristics of mutant, revertant, and wild-type strains on different carbon sources**

	30°C					
	<i>icl1Δ</i>	<i>ICL1Re</i>	<i>fox2Δ</i>	<i>FOX2Re</i>	<i>pxa1Δ</i>	6936
Glucose	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Acetate	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Glycerol	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Capric acid (C10:0)	-	-	-	-	-	-
Lauric acid (C12:0)	-	+++++	+++	+++++	+++++	+++++
Myristic acid (C14:0)	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Palmitic acid (C16:0)	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Stearic acid (C18:0)	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Oleic acid (C18:1)	-	+++++	+++	+++++	+++++	+++++

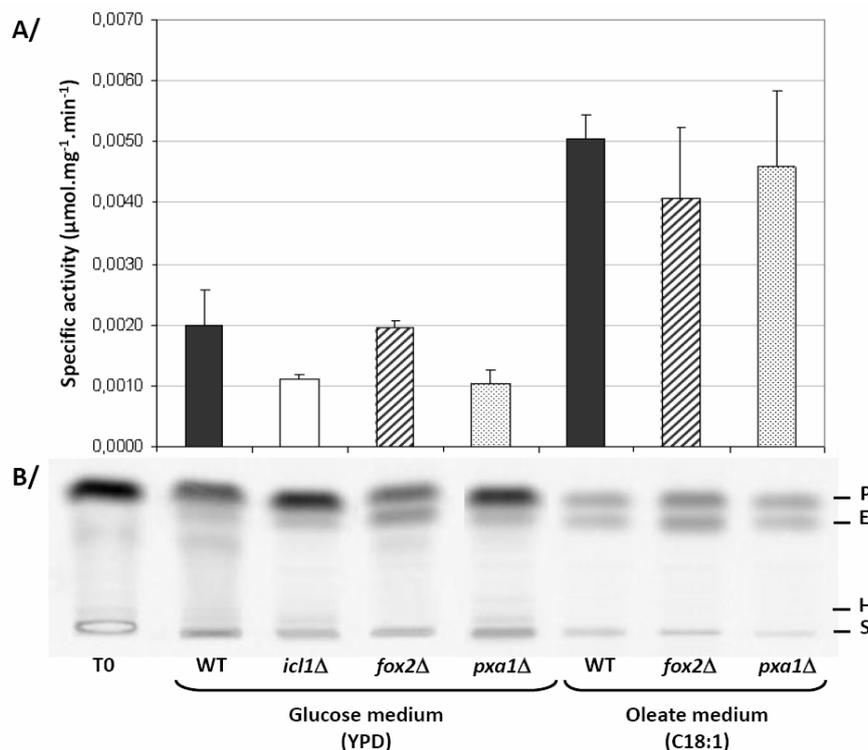
Cells were grown to mid-log phase in YPD, washed, resuspended in water to an OD600 of 0.5 (about  $8.5 \times 10^6$  cells/ml), and serially diluted fivefold. Drops of 7  $\mu$ l of each dilution were deposited onto solid minimum media (YNB), containing 2% of either glucose, acetate, glycerol, or fatty acid as the sole carbon source. Growth was observed after 3 days (glucose) or 5 days (acetate, glycerol, fatty acids) of incubation at 30°C. 37°C only affected growth on oleic acid, decreasing visible growth to the third dilution for wild-type strain, and to the first dilution for *fox2Δ* strain. As indicated in the upper left corner, growth on the first dilution (1:5) was noted '+', on the second dilution (1:5<sup>2</sup>) was noted '++', on the third dilution (1:5<sup>3</sup>) was noted '+++', on the fourth dilution (1:5<sup>4</sup>) was noted '++++', on the fifth dilution (1:5<sup>5</sup>) was noted '+++++', and no growth was noted '-'.

All strains grew equally on medium containing glucose and none of them was able to grow on medium containing C10:0. *C. lusitaniae icl1Δ* was unable to assimilate acetate and FA, as it was previously described for *C. albicans* (16, 40), but was still able to grow on glycerol, whereas the *C. albicans* mutant did not (40). Surprisingly, the deletion of *FOX2* did not abolish growth on medium-chain and long-chain saturated FA in *C. lusitaniae*. Growth on C18:1 was altered in a temperature-dependent manner, with a growth defect marked at 37°C. The *fox2Δ* mutant also grew on acetate and glycerol. The wild-type phenotypes were restored in the revertant strains *icl1Δ::ICL1*, and *fox2Δ::FOX2*. The growth phenotypes of the *fox2Δ* mutants of *C. lusitaniae*, *C. albicans* and *S. cerevisiae* were so divergent that we constructed and characterized another *C. lusitaniae fox2Δ* null-mutant harboring a full deletion of the

*FOX2* open reading frame. The two *fox2Δ* mutants had the same growth phenotypes (data not shown). These results suggested the possible existence of a Fox2p-independent FA catabolism pathway in *C. lusitaniae*.

**A *C. lusitaniae* *pxa1Δ* mutant is able to grow on long-chain saturated FA as sole carbon source.** In *S. cerevisiae*, the disruption of *PXA1* encoding a long-chain FA peroxisomal import protein results in impaired growth on oleic acid and reduced ability to oxidize oleate (11). Disruption of *PXA1* in *C. lusitaniae* had no effect onto fatty acid assimilation. The *pxa1Δ* mutant was able to grow on C18:1, C18:0 and C16:0 as sole carbon source (**Table 1**). One possibility was that long-chain fatty acids could still penetrate peroxisomes using another transporter. However, analysis of the lipid content revealed that the *pxa1Δ* mutant strongly accumulated triacylglycerol (TAG) when compared to the wild-type strain (the TAG content was increased by 300%, data not shown). This suggested that the transport, and maybe the catabolism of fatty acids, was impaired in the *pxa1Δ* mutant. Alternatively, the growth phenotype of *pxa1Δ* raised the possibility that a functional catabolic pathway could take place in a subcellular compartment differing from peroxisomes.

**Long-chain FA-CoA catabolism is still functional in the *C. lusitaniae* *fox2Δ* and *pxa1Δ* mutants.** The *C. lusitaniae* *fox2Δ* and *pxa1Δ* mutants being able to assimilate long-chain FA, we measured the consumption of  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA by crude protein extracts. There was no significant difference between the specific activities observed for the *icl1Δ*, *fox2Δ*, *pxa1Δ* and wild-type strains grown on glucose medium (**Fig. 3**). The *fox2Δ*, *pxa1Δ* and wild-type strains were then cultivated in C18:1 medium to induce FA  $\beta$ -oxidation (reviewed in (41)). The specific activities after induction were increased 2 to 3 fold, but no significant difference could be detected between the mutant and the wild-type strains.



**Fig. 3.** Consumption of  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA by protein crude extracts of the *C. lusitaniae* *icl1Δ*, *fox2Δ*, *pxa1Δ* and wild-type strains. **A/**  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA consumption rates after 15 min at 37°C by crude extracts of the mutant and wild-type strains after analysis of the chromatograms using ImageQuant software. **B/** Corresponding chromatograms. T0: Amount of immediate addition of  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA initially present in the reaction mix. WT: wild-type strain. P:  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA. E:  $^{14}\text{C}_\alpha$ -hexadecenoyl-CoA. H:  $^{14}\text{C}_\alpha$ -3-hydroxyhexadecenoyl-CoA. S: start.

**Long-chain FA-CoA catabolism is still functional in the peroxisomal fraction of the *C. lusitaniae fox2Δ* mutant.** Mitochondrial and peroxisomal fractions were obtained from mutant and wild-type strains using a discontinuous sucrose gradient. The purity of each organelle fraction was estimated by assaying in parallel catalase and cytochrome c oxidase which were considered as enzymatic markers specific to the peroxisomal and mitochondrial fraction, respectively (**Table 2**). The peroxisomal fraction of the *fox2Δ*, *pxa1Δ* and wild-type strains exhibited a high specific activity of catalase (ranging from 404 to 658 U/mg of protein) and a high ratio catalase / cytochrome c oxidase activities (from 918 to 1834). The mitochondrial fraction exhibited nearly a 20-fold lower ratio. The contamination of the mitochondrial fraction by peroxisomes did not exceed 20% (for example, for the wild-type strain, the ratio of the catalase activity of the mitochondrial fraction versus the catalase activity of the peroxisomal fraction was 0.21). The consumption of  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA was then assayed with the protein extracts obtained from each fraction (**Fig. 4**). It was noteworthy that the consumptions of  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA by peroxisomal fractions of the *fox2Δ*, *pxa1Δ* and wild-type strains were similar. This result supported the idea that the peroxisomes of *C. lusitaniae* harboured a Fox2p-independent FA-CoA catabolism pathway.

**Table 2. Purification of peroxisomes and mitochondria from induction medium-grown cells**

Strain	Fraction <sup>a</sup>	Catalase Sp activity (U/mg)	Cytochrome c oxidase Sp activity (U/mg)	catalase / oxidase ratio <sup>b</sup>	mitochondria / peroxisomes catalase ratio <sup>c</sup>
Wild-type	peroxisomes	646 +/- 246	0,352 +/- 0.099	1834	0,21
	mitochondria	136 +/- 68	1,492 +/- 0.444	91	
<i>fox2 Δ</i>	peroxisomes	404 +/- 32	0,440 +/- 0.036	918	0,09
	mitochondria	37 +/- 17	0,764 +/- 0.018	49	
<i>pxa1 Δ</i>	peroxisomes	658 +/- 258	0,360 +/- 0.104	1828	0,22
	mitochondria	145 +/- 82	1,235 +/- 0.333	117	

Sp activity: specific activity

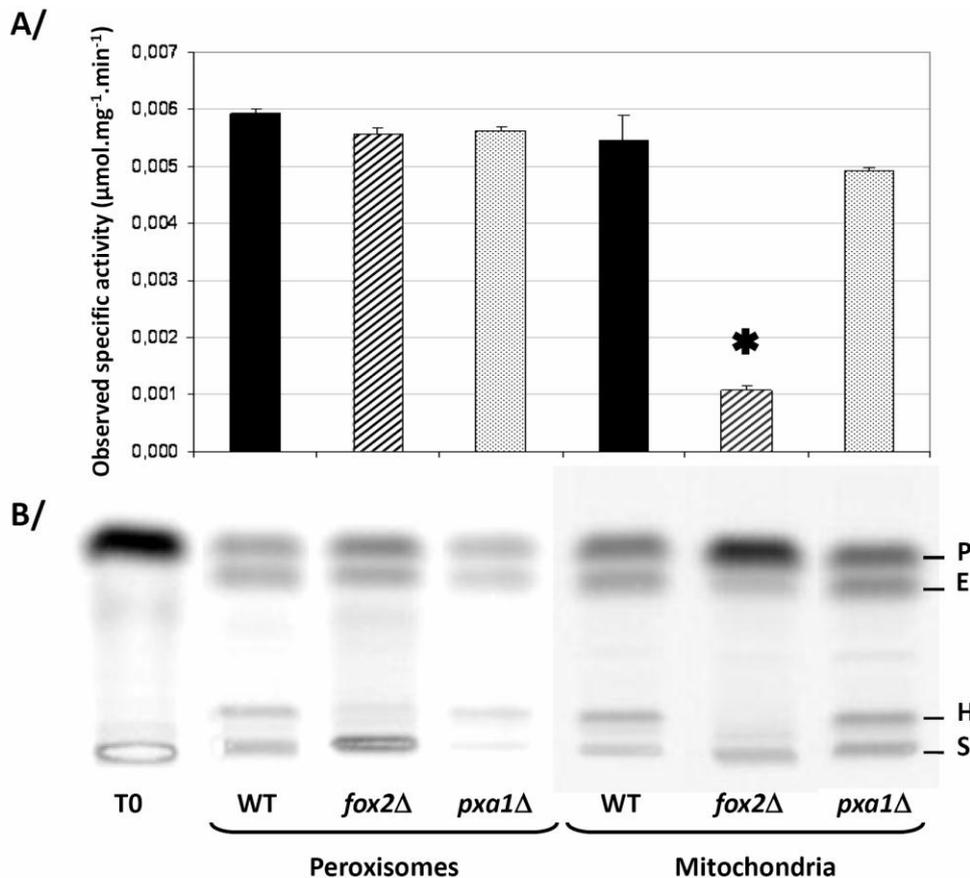
<sup>a</sup> : 10μg of proteins

<sup>b</sup> : Catalase specific activity was divided by cytochrome c oxidase specific activity

<sup>c</sup> : Catalase specific activity in mitochondrial fraction was divided by catalase specific activity in peroxisomal fraction

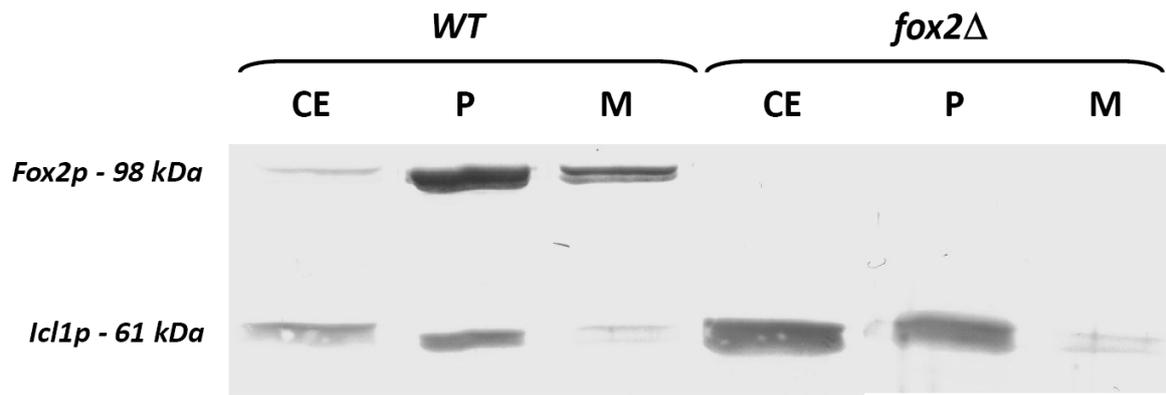
**Long-chain fatty acids can be catabolized in the mitochondrial fraction of the *C. lusitaniae* wild-type strain, but not in the mitochondrial fraction of the *fox2Δ* mutant.**

Unexpectedly, a consumption of  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA was observed in the mitochondrial fractions of the *pxa1Δ* and wild-type strains (**Fig. 4**). The specific activities were similar to those measured in the peroxisomal fractions, even when assays were performed with up to 100-fold lower protein concentrations (data not shown), thus ruling out the possibility that the whole  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA consumption observed in the mitochondrial fraction could be derived from a peroxisomal contamination. A FA-CoA catabolism was therefore functional in the mitochondrial extract of *C. lusitaniae*. In the mitochondrial fractions of the *fox2Δ* mutant,  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA catabolism was significantly decreased ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 4**). These results strongly suggested that the mitochondrial catabolism of FA-CoA in *C. lusitaniae* was Fox2p-dependent.



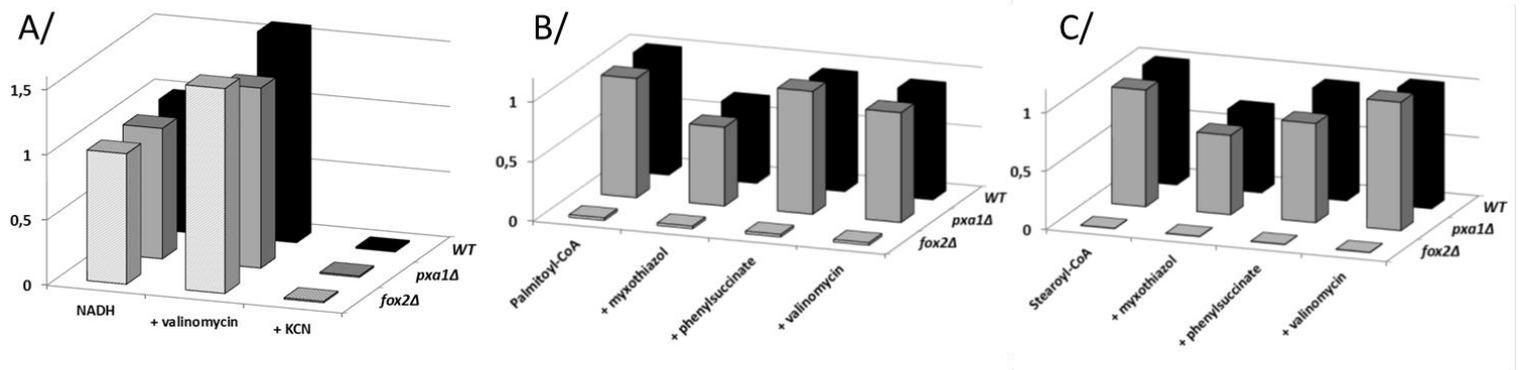
**Fig. 4. Consumption of <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA by peroxisomal and mitochondrial fractions of the *C. lusitaniae fox2Δ*, *pxa1Δ* and wild-type strains. A/ <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA consumption rates after 15 min at 37°C by crude extracts of the mutant and wild-type strains after analysis of the chromatograms using ImageQuant software. The activity observed in the mitochondrial fraction of *fox2Δ* and wild-type strains were compared using a Student's *t*-test (\*, *p* = 0.016). B/ Corresponding chromatograms. T0: Amount of immediate addition of <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA initially present in the reaction mix. WT: wild-type strain. P: <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA. E: <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-hexadecenoyl-CoA. H: <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-3-hydroxyhexadecenoyl-CoA. S: start.**

**Fox2p is co-localized in peroxisomes and mitochondria in *C. lusitaniae*.** Western-blotting analysis was performed using polyclonal anti-Fox2p and anti-Icl1p antibodies on crude extracts, peroxisomal or mitochondrial fractions of the *fox2Δ* mutant and of the wild-type strains. In *C. albicans*, it was shown that the two key enzymes of the glyoxylate cycle, Icl1p and Mls1p, were localized to peroxisomes (42). We confirmed that Icl1p was present in the peroxisomal fractions of both the *C. lusitaniae fox2Δ* mutant and wild-type strains. A faint signal, not exceeding 10 to 20% of the amount of Icl1p present in the peroxisomal fraction, was detected in the mitochondrial fraction (**Fig. 5**, 19% for the wild-type strain and 10% for *fox2Δ*). This corresponded to the level of contamination of the mitochondrial fraction by peroxisomes that we had already estimated using catalase assays. On the other hand, and as expected, Fox2p was undetectable in the *fox2Δ* mutant. Interestingly, Fox2p was detected in both peroxisomal and mitochondrial fractions of the wild type strain (**Fig. 5**). The amount of Fox2p detected in the mitochondrial fraction was nearly 50 % of the amount detected in the peroxisomal fraction. Western-blot thus confirmed that Fox2p was localized in both peroxisomal and mitochondrial fractions.



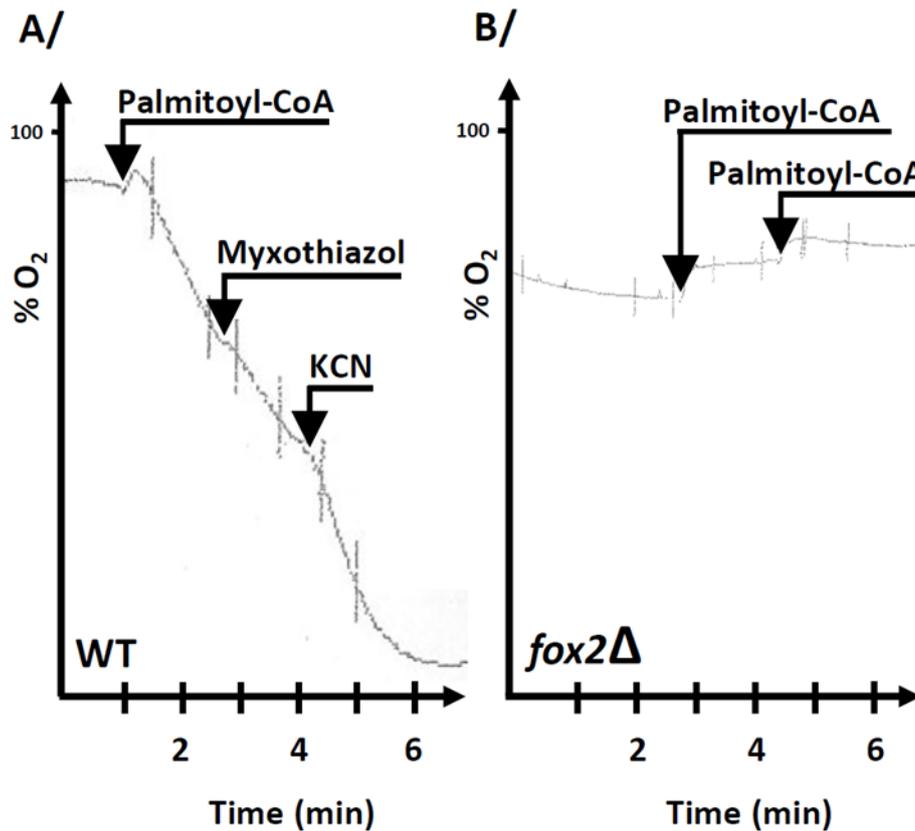
**Figure 5. Immunodetection of Fox2p and Icl1p by Western-blot in the *C. lusitaniae* *fox2Δ* and wild-type strains.** Twenty  $\mu\text{g}$  of proteins of the crude extracts and 10  $\mu\text{g}$  of proteins of the peroxisomal and mitochondrial fractions were separated by SDS-PAGE. WT: wildtype, CE: crude extract, P: peroxisomal fraction, M: mitochondrial fraction.

**Fatty acyl-CoA used as respiratory substrate induce mitochondrial  $\text{O}_2$  consumption in the wild-type strain, but not in the *fox2Δ* mutant.** The mitochondrial respiratory chain oxidizes NADH and  $\text{FADH}_2$ , and reduces  $\text{O}_2$  to water, through electron transfer processes. This results in a substantial release of energy, which generates a proton gradient across the mitochondrial inner membrane that is used to synthesize ATP. In FA  $\beta$ -oxidation, Fox2p uses  $\text{NAD}^+$  as cofactor, releasing NADH (Fig. 1). We thus addressed the question of whether FA-CoA could support mitochondrial respiration in *C. lusitaniae*. Monitoring of the  $\text{O}_2$  consumption rates was performed by oximetry using nystatin-permeabilized spheroplasts from the *fox2Δ*, *pxa1Δ* and wild-type strains (Fig. 6 and Fig. 7).



**Fig. 6. Mitochondrial respiration of *C. lusitaniae* *fox2Δ*, *pxa1Δ* and wild-type strains.** The equivalent of 8 mg of dry weight cells were transformed in spheroplast and used for each reaction. Spheroplasts were permeabilized with nystatin (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) during 10 minutes under gentle agitation before addition of substrates: (panel A) NADH (4 mM), (panel B) palmitoyl-CoA (0.2 mM), and (panel C) stearoyl-CoA (0.2 mM). Inhibitors were further added at the following final concentrations: valinomycin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), myxothiazol (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), phenylsuccinate (5 mM), KCN (5 mM).  $\text{O}_2$  consumption rates observed after the addition of inhibitors were expressed in function of those observed after addition of substrate, whose value is fixed at 1 if there was an oxygen consumption and at 0 if not. (A)  $\text{O}_2$  consumption rates (expressed in  $\text{nmol O}_2$  per minute and per mg of dry weight cells) observed using NADH as substrate were:  $2.4 \pm 0.2$  for WT spheroplasts,  $2.2 \pm 0.52$  for *fox2Δ* spheroplasts, and  $3.08 \pm 0.68$  for *pxa1Δ* spheroplasts. (B)  $\text{O}_2$  consumption rates (expressed in  $\text{nmol O}_2$  per minute and per mg of dry weight cells) observed using palmitoyl-CoA as substrate were:  $6.42 \pm 0.4$  for WT spheroplasts,  $0.084 \pm 0.02$  for *fox2Δ* spheroplasts, and  $4.68 \pm 0.2$  for *pxa1Δ* spheroplasts. (C)  $\text{O}_2$  consumption rates (expressed in  $\text{nmol O}_2$  per minute and per mg of dry weight cells) observed using stearoyl-CoA as substrate were:  $0.6 \pm 0.04$  for WT spheroplasts,  $0.008 \pm 0.008$  for *fox2Δ* spheroplasts and  $0.08 \pm 0.16$  for *pxa1Δ* spheroplasts.

First, respiration rates were assayed using NADH as respiratory substrate, and valinomycin as uncoupling agent. These assays confirmed that mitochondria of the *fox2Δ* the *pxa1Δ* and the wild-type strain were coupled efficiently (**Fig. 6**). Then, the oxygen uptake was measured using palmitoyl-CoA as respiratory substrate. The oxygen uptake increased with wild-type and *pxa1Δ* spheroplasts, until the addition of myxothiazol, an inhibitor of the *bc<sub>1</sub>* complex of the mitochondrial respiratory chain, which reduced the O<sub>2</sub> consumption by 33% (**Fig. 7A**). In contrast, no oxygen uptake could be detected with spheroplasts of the *fox2Δ* mutant (**Fig. 7B**). Similarly, the use of stearyl-CoA induced O<sub>2</sub> consumption in the wild-type and *pxa1Δ* strains, but not in the *fox2Δ* mutant.



**Fig. 7. Oxygrams of mitochondrial respiration observed for the *C. lusitaniae* *fox2Δ* and wild-type strains.** (A) Oxygen uptake by wild-type spheroplasts after permeabilization with nystatin. Oxygen consumption rates measured between two vertical lines after addition of the following substrates: 6.42 nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> after addition of palmitoyl-CoA (0.2 mM final), 4.28 nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> after addition of myxothiazol (0.1 μg/mL final), 8.68 nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> after addition of KCN (5mM final). (B) Oxygen uptake by *fox2Δ* spheroplasts after permeabilization with nystatin. Oxygen consumption rates measured between two vertical lines after addition of the following substrates: 0.084 nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> in the presence of 0.2 mM palmitoyl-CoA, 0.095 nmol O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> in the presence of 0.4 mM palmitoyl-CoA.

To ascertain that O<sub>2</sub> consumption was the consequence of the mitochondrial metabolic activity of the permeabilized spheroplasts, we used potassium cyanide as a second respiratory inhibitor. The cyanyl radical can bind and inhibit the heme centers of cytochrome *c* oxidase and catalase (43). As expected, the NADH-induced respiration of spheroplasts of the wild-type

and mutant strains was completely inhibited by KCN. In contrast, KCN caused a marked increase of O<sub>2</sub> consumption when palmitoyl-CoA was used as respiratory substrate. This paradoxical effect can be explained by the first step of  $\beta$ -oxidation taking place in peroxisomes, during which the conversion of palmitoyl-CoA into *trans*-2-hexadecenoyl-CoA by the acyl-CoA oxidase needs O<sub>2</sub> to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and by the KCN mediated inhibition of catalase, which is normally required for the breaking-down of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub> ((4), **Fig. 1**). Thus, inhibition of the peroxisomal catalase by KCN could certainly result in an increase of the apparent O<sub>2</sub> consumption. Then, we verified that phenylsuccinate (a competitive inhibitor of the succinate shuttle between peroxisomes and mitochondria) and valinomycin (a mitochondrial inner-membrane uncoupling agent and also a H<sup>+</sup> dependent transport inhibitor) had no significant effect on the oxygen uptake induced by palmitoyl-CoA on the wild-type and *pxa1* $\Delta$  strains. This was a supplemental indication that the O<sub>2</sub> consumption that we measured in our experiments was not due to the sole peroxisomal catabolism of FA-CoA. Finally, the lack of mitochondrial respiration of the *fox2* $\Delta$  mutant in the presence of FA-CoA confirmed that the mitochondrial FA-CoA catabolism pathway in *C. lusitaniae* was Fox2p-dependent.

## DISCUSSION

In this work, we showed that a mutant of *C. lusitaniae* lacking the multifunctional enzyme fox2p of the  $\beta$ -oxidation pathway was still able to grow on fatty acids as sole carbon source, suggesting that *C. lusitaniae* had an alternative pathway for fatty acid catabolism. Using <sup>14</sup>C $_{\alpha}$ -palmitoyl-CoA, we demonstrated that fatty acid catabolism took place in both peroxisomal and mitochondrial subcellular fractions, and that a *fox2* $\Delta$  null mutant was unable to catabolize fatty acids in the mitochondrial fraction, indicating that the mitochondrial pathway was Fox2p-dependent, as also confirmed by western blotting experiments. Finally, oxymetry measurements showed that mitochondria were able to consume oxygen when fed with palmitoyl-CoA. Accordingly, this work constitutes the first demonstration of the existence of a mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathway in an ascomycetous yeast, *C. lusitaniae*. So far, it was demonstrated that the ascomycete yeasts, such as *S. cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, and *C. tropicalis*, possessed only a peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway (4, 5, 7), and then it was extrapolated and widely admitted that all the species of the subphyllum Saccharomycotina lacked mitochondrial  $\beta$ -oxidation (8). More recently, an *in silico* analysis of diverse fungal genomes failed to identify complete sets of enzymes that could be involved in non-peroxisomal  $\beta$ -oxidation in ascomycetes yeasts, and it was logically concluded that this pathway was lost likely very early during the evolution of Saccharomycotina (9, 22). However, not all fungi have lost extra-peroxisomal  $\beta$ -oxidation; it was recently clearly demonstrated to occur both in peroxisomes and mitochondria of the ascomycete filamentous fungi *A. nidulans* (19) and *P. anserina* (20), and possibly in the basidiomycetous yeast *S. pararoseus* (21). Though, a mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathway was suspected for a long time in the ascomycetous yeast *C. tropicalis*, when both acyl-CoA oxidase and acyl-CoA dehydrogenase, which were thought to be linked to peroxisomal and mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathway, respectively, were characterized at the biochemical level (44). However, it was argued that acyl-CoA dehydrogenases were not specific to mitochondrial  $\beta$ -oxidation, as they can be also involved in the degradation of valine, leucine, and isoleucine, as recently confirmed in *A. nidulans* (45). It was then definitely considered that  $\beta$ -oxidation was exclusively located to the peroxisomes in *C. tropicalis*, because the four main enzymes of  $\beta$ -oxidation, *i.e.* acyl-CoA oxidase, enoyl-CoA hydratase, hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and 3-ketoacyl-CoA thiolase were localized in the same subcellular compartment than the typical peroxisomal enzymes catalase and isocitrate lyase (5).

Using a polyclonal antibody (WH Kunau Laboratory), western blot analysis of protein extracts obtained from organelle fractions of *C. lusitaniae* allowed us to detect the Fox2 protein in both the peroxisomal and mitochondrial fractions. Another evidence that supported a mitochondrial localization of Fox2p was provided by the significant defect ( $p < 0.05$ ) of  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA catabolism in the *fox2Δ* mitochondrial fraction. This demonstrated that the mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathway of *C. lusitaniae* was Fox2p-dependent. The presence of Fox2p in the mitochondria of *C. lusitaniae* constitutes an unique phenotype in eukarotes, for which the mitochondrial  $\beta$ -oxidation is known to involve two other sets of enzymes, depending on the organism and on the length of the fatty acyl chain: **i/** in filamentous fungi, e.g. *A. nidulans*, and in mammals for fatty acyl chain of 12 carbons and fewer, the mitochondrial  $\beta$ -oxidation catabolizes fatty acids through four reactions involving the four individual enzymes acyl-CoA dehydrogenase, enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase, and 3-keto-acyl-CoA thiolase (9, 18, 19); **ii/** in mammals, for degrading fatty acyl greater than 12 carbons, the last three steps of the reaction are catalyzed by a multienzyme complex associated with the inner mitochondrial membrane, and called the trifunctional protein (46).

When analyzed *a posteriori*, the double localization of Fox2p to peroxisomes and mitochondria was difficult to predict with bioinformatic tools. A characteristic type I peroxisomal targeting signal (GKL) is present at the C-ter part of the protein (37), but the softwares TargetP (47), SherLoc (48), pTARGET (49), Predotar (50), and MitoProt (51) failed to predict any mitochondrial targeting signal for Fox2p. Only a hydrophobic cluster analysis ((52), <http://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=HCA>) suggested that the position of one helice alpha could be compatible with a mitochondrial localization (data not shown).

Finally, we used oximetry to show that a mitochondrial respiration could be induced by long chain acyl-CoA in spheroplasts of both the wild-type and the *pxa1Δ* mutant strains. The oxygen uptake induced by palmitoyl-CoA was unaffected by the presence of phenylsuccinate, a competitive inhibitor of the succinate shuttle between peroxisomes and mitochondria, and of valinomycin, a mitochondrial inner-membrane uncoupling agent and also a  $\text{H}^+$  dependent transport inhibitor. This strongly suggested that  $\text{O}_2$  consumption was not dependent from the peroxisomal  $\beta$ -oxidation of palmitoyl-CoA. The lack of mitochondrial respiration after induction by acyl-CoA in the *fox2Δ* mutant, in contrast to the *pxa1Δ* and wild-type spheroplasts, provided an additional proof that a fatty acyl  $\beta$ -oxidation pathway was taking place in the mitochondria of *C. lusitaniae*. Surprisingly, attempts to inhibit the acyl-CoA-induced mitochondrial respiration with KCN failed. Inversely, cyanide caused a marked increase of  $\text{O}_2$  consumption when palmitoyl-CoA was used as respiratory substrate, whereas it completely inhibited the respiration when NADH was used as respiratory substrate. Alternative cyanide-insensitive respiratory pathways were already described in *Candida* yeasts, and were shown to be induced after cell growth in presence of KCN or after over-reduction of the coenzyme Q pool in *C. albicans* (53) and *C. parapsilosis* (54), respectively. When these pathways are recruited for the transfer of electrons from the Q pool, the respiratory rates are quite similar before and after addition of KCN, whatever the substrate. The existence of such an alternative cyanide-insensitive respiratory pathway is possible in *C. lusitaniae*. Indeed, a BLAST analysis allowed the identification of an ORF of *C. lusitaniae* homolog (58% identity, 73% similarity) to the alternative oxidase 1 of *C. albicans* (orf19.4774, *Candida* Genome Database). However, the sole existence of an alternative oxidase activity is not sufficient to explain the strong increase of  $\text{O}_2$  consumption by KCN when palmitoyl-CoA was used as respiratory substrate. We assume that the decrease of  $\text{O}_2$  consumption resulting from the inhibition of the cytochrome c oxidase by KCN could be largely overbalanced by the concomitant inhibition of the peroxisomal catalase, which is required to detoxify the hydrogen peroxide generated from molecular oxygen in the first reaction of  $\beta$ -oxidation taking place in peroxisomes.

Another unique feature of the catabolism of fatty acids in *C. lusitaniae* is the existence of a palmitoyl-CoA catabolism in purified peroxisomes of the *fox2Δ* mutant. This alternative peroxisomal pathway is Fox2p-independent, and allows the *C. lusitaniae fox2Δ* mutant to grow and assimilate the saturated fatty acids C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, whereas a *fox2Δ* mutant of *C. albicans* cannot (33, 40). Fox2p is a multifunctional protein, which possesses three catalytic domains, one for enoyl-CoA hydratase and two for 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activities. One can imagine that these activities could also be harboured by independent proteins, as in the mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathway of filamentous fungi. Alternatively, two other mechanisms are known to drive fatty acid oxidation. The first one,  $\omega$ -oxidation, occurs in peroxisomes of mammalian cells (55), and was already described in the yeast *C. tropicalis* (56, 57). Through this pathway, the monocarboxylic acids are first transformed into dicarboxylic acids and after activation by a dicarboxyl-CoA synthetase, the dicarboxyl-CoA esters then need a functional  $\beta$ -oxidation to be shortened. Accordingly,  $\omega$ -oxidation can not explain the breakdown of the COOH- extremity of  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA observed in the *fox2Δ* mutant. The second one,  $\alpha$ -oxidation, is involved in the shortening of fatty acids that cannot directly undergo  $\beta$ -oxidation, because of a methyl group in position 3 or a hydroxyl group in position 2, by the removal of a single carbon from the carboxyl end through four enzymatic steps (58, 59). Both peroxisomes and mitochondria were reported to host  $\alpha$ -oxidation (58–60), but to our knowledge, this pathway was only described in mammals, where its deficiency may lead to the refsum's disease (61). Further investigations are needed to determine if an  $\alpha$ -oxidation-like pathway does exist in *C. lusitaniae* and if it can compensate a defect in  $\beta$ -oxidation for allowing a *fox2Δ* mutant to grow on fatty acid as the sole carbon source.

The way fatty acids are imported into peroxisome and mitochondria of *C. lusitaniae* is unclear. Indeed, the *pxa1Δ* mutant, deleted for a gene encoding a protein responsible for peroxisomal long chain fatty acid uptake, could still grow on long-chain fatty acids as sole carbon source. However, fatty acid import into peroxisome seemed affected since triacylglycerol, involved in carbon storage from fatty acid (62), were significantly more accumulated in *pxa1Δ* ( $p \leq 0.05$ ) than in wild-type after growth on C16:0 medium. A *C. lusitaniae pxa1Δ fox2Δ* double mutant had the *fox2Δ* phenotype, as it was able to grow on C14:0, C16:0 and C18:0 as the wild-type strain (data not shown). Since the mitochondrial  $\beta$ -oxidation was inhibited in the *pxa1Δ fox2Δ* mutant, fatty acids were probably catabolized into the peroxisomes, and therefore imported *via* a transport system alternative to Pxa, as also recently suggested in *P. anserina* (20). Other alternative long-chain fatty acid import system were already described in *Eucaryota*. For example, carnitine-palmitoyl-transferases were demonstrated to be responsible for the mitochondrial uptake of palmitoyl-CoA in mammals (first described in *Rattus norvegicus* (63)). In the yeast *P. guilliermondii*, which is a species very close to *C. lusitaniae*, inducible mitochondrial carnitine palmitoyl-transferase were also detected and assayed in different culture conditions, along with peroxisomal carnitine octanoyl-transferase activities (64). Furthermore, the localization of fatty acid catabolism in two distinct organelles in *C. lusitaniae*, each housing specific metabolic cycles, *i.e.* glyoxylate cycle in peroxisomes and TCA cycle in mitochondria, suggests a crucial role of the shuttling systems required for exchanges of carbon units between mitochondria, peroxisomes and cytoplasm. Besides acyl-CoA, citrate, succinate and malate transporters, the acetyl-CoA shuttles have attracted most interest thus far. In *C. albicans* and *A. nidulans* (3, 65, 66), it seems that the transport of acetyl units between the cellular compartments is only mediated by carnitine acetyltransferases, while in *S. cerevisiae*, it also involves the citrate shuttle *via* the peroxisomal citrate synthase which catalyses the condensation of acetyl-CoA with oxaloacetate to form citrate (67). Due to its potential to produce acetyl-CoA from fatty acid catabolism in distinct compartments, *C. lusitaniae* could constitute an alternative biological model to study the intracellular shuttling systems of acetyl-CoA.

The discovery of a mitochondrial and peroxisomal fox2p-dependent fatty acid oxydation pathway in an ascomycetous yeast, along with an additional peroxisomal fox2p-independent pathway of catabolism that remains to be characterized, confirms that the catabolism of fatty acid in fungi displays strong evolutionary divergence across different taxonomic groups (9, 22). Contrary to common thinking, our data demonstrate that some ascomycetous yeast have retained the mitochondrial pathway of fatty acid degradation. Our goal is now to characterize the different pathways of fatty acid catabolism in *C. lusitaniae*, to explore if these pathways exist in other *Candida* species, and to determine their contribution to the virulence of this clade of yeasts which includes important opportunistic pathogens.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains and media.** The *C. lusitaniae* strains used in this study are listed in **Table 4**. All the mutant strains were derived from the wild-type strain 6936 *MATa* (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands). Yeast were routinely cultivated in YPD (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose). Carbon assimilation tests were performed using YNB (0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and without ammonium sulfate (Difco laboratories), 0.5% (w/v) ammonium sulfate) supplemented with 2% (w/v) of either glucose (so called YNB glucose) or other carbon sources. Counterselection of uracil auxotrophs after pop-out of the *URA3* marker gene in transformants was done on YNB glucose supplemented with 1 mg/ml of 5-fluoroorotic acid (5-FOA, Sigma Chemicals Co.) and 50 µg/ml uracil (26). For subcellular fractionation, we used the WOYglu medium made of YNB supplemented with 0.1% (w/v) yeast extract and 0.3% (w/v) glucose and the Induction medium containing 0.5% (w/v) bactopectone, 0.3% (w/v) yeast extract, 0.12% (v/v) oleic acid, 0.2% (v/v) Tween 40 and 0.5% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (adjusted to pH 6.0 with NaOH) as described in (68). Yeasts were cultivated at 30°C, 35°C or 37°C, under constant agitation (230 rpm) for liquid cultures.

**Table 4. Genotypes of the *Candida lusitaniae* strains used in this study**

Strain	Genotype	Source or reference
6936	<i>MATa, URA3, ICL1, FOX2, PXA1</i> (wild-type)	CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures)
<i>ura3</i> [Δ360]	<i>MATa, ura3</i> [Δ360], <i>ICL1, FOX2, PXA1</i>	(26, 28)
<i>ura3</i> [Δ990]	<i>MATa, ura3</i> [Δ990], <i>ICL1, FOX2, PXA1</i>	(28)
<i>icl1</i> Δ::GUN	<i>MATa, icl1</i> Δ:: <i>URA3, ura3</i> [Δ360], <i>FOX2, PXA1</i>	This study
<i>icl1</i> Δ, <i>ura3</i> Δ	<i>MATa, icl1</i> Δ, <i>ura3</i> [Δ360], <i>FOX2, PXA1</i>	This study
<i>icl1</i> Δ	<i>MATa, icl1</i> Δ, <i>URA3, FOX2, PXA1</i>	This study
<i>ICL1Re</i>	<i>MATa, icl1</i> Δ:: <i>ICL1-URA3, ura3</i> [Δ360], <i>FOX2, PXA1</i>	This study
<i>fox2</i> Δ::GUN	<i>MATa, fox2</i> Δ:: <i>URA3, ura3</i> [Δ360], <i>ICL1, PXA1</i>	This study
<i>fox2</i> Δ, <i>ura3</i> Δ	<i>MATa, fox2</i> Δ, <i>ura3</i> [Δ360], <i>ICL1, PXA1</i>	This study
<i>fox2</i> Δ	<i>MATa, fox2</i> Δ, <i>URA3, ICL1, PXA1</i>	This study
<i>FOX2Re</i>	<i>MATa, fox2</i> Δ:: <i>FOX2-URA3, ura3</i> [Δ360], <i>ICL1, PXA1</i>	This study
<i>pxa1</i> Δ	<i>MATa, pxa1</i> Δ:: <i>pGEMT-URA3-pxa1</i> [core], <i>ura3</i> [Δ990], <i>ICL1, FOX2</i>	This study

**PCR amplifications and gene cloning.** *C. lusitaniae* genomic DNA was extracted as described (69) from spheroplasts prepared using zymolyase (Euromedex). Hot-Star (Qiagen) or Pfu (Promega) Taq DNA polymerase was used for the PCR amplification of DNA fragments. PCR were performed as recommended by the supplier. All the primers were synthesized by Eurofins MWG Operon and are listed in **Table 5**. The complete *ICL1* and *FOX2* genes with their 5' and 3' non coding regions were isolated from the wild-type strain 6936 by PCR amplification and cloned into pGEM-T (Promega), to yield the plasmids pG-ICL1 and pG-FOX2.

**Table 5. Oligonucleotides used in this study**

Primer	Sequence (5' to 3')	Use
<b>Not</b> URA3	GACATGCAT <b>GCGGCCG</b> CACAGAGGAGTAAGACAGG	Cloning <i>URA3</i> in complementation plasmids, <i>URA3</i> probe
<b>Spe</b> URA3	GCATC <b>ACTAGT</b> ACCCGTTGATGGCAGAGTTG	Cloning <i>URA3</i> in complementation plasmids, <i>URA3</i> probe
<b>Bcl</b> GUN	TCGAGAT <b>GATCA</b> CCCCGAGGTCGCATGCTCC	Cloning <i>URA3</i> within <i>ICL1</i> ORF
<b>Stu</b> GUN	CACGTG <b>AGGC</b> TCCAAGCTATTTAGGTGACAC	Cloning <i>URA3</i> within <i>ICL1</i> ORF
<b>Mfe</b> GUN	TCGAG <b>CAATTG</b> CCCCGAGGTCGCATGCTCC	Cloning <i>URA3</i> within <i>FOX2</i> ORF
<b>Bgl</b> 2GUN	CGCGC <b>AGATCT</b> CCTCAAGCTATTTAGGTGAC	Cloning <i>URA3</i> within <i>FOX2</i> ORF
<b>3'URA3F</b>	CTTCTCTATCCGTCTCTGTTC	PCR characterization of transformants
<b>5'URA3R</b>	ACATCATCTTCACCAACTCTGC	PCR characterization of transformants
<b>URA3del</b>	ACCGGTGACTCCATGAGCGTTG	PCR characterization of transformants
<b>URA3ex</b>	CTCAGCGTCAGGTGTTTACG	PCR characterization of transformants
<b>FICL1</b>	CGGTACATTACCTGTGCTTGC	Cloning <i>ICL1</i> in pGEM-T, <i>ICL1</i> probe
<b>RICL1</b>	GAGCAGTTCAGGTAATCCG	Cloning <i>ICL1</i> in pGEM-T, <i>ICL1</i> probe
<b>FICL1ex</b>	ACTTCCAGATGGCTTCTCCA	PCR characterization of <i>icl1</i> transformants
<b>RICL1ex</b>	TTCAGTCCACATGGATGGTC	PCR characterization of <i>icl1</i> transformants
<b>FFOX2</b>	CGAGGTGCACCATATAAGCC	Cloning <i>FOX2</i> in pGEM-T, <i>FOX2</i> probe
<b>RFOX2</b>	GCTCACGAACGAAAGCCTAC	Cloning <i>FOX2</i> in pGEM-T, <i>FOX2</i> probe
<b>FFOX2ex</b>	ATCTCGGTCCGTCATGAGTG	PCR characterization of <i>fox2</i> transformants
<b>RFOX2ex</b>	ATATGGCCTCCGAACAGAG	PCR characterization of <i>fox2</i> transformants
<b>5'Pxa1NcoI</b>	CAT <b>GCCATGG</b> CACCAAGACGAAGGCGAG	Cloning <i>PXA1</i> [core] in pG-URA3, <i>PXA1</i> probe
<b>3'Pxa1SacII</b>	TC <b>ACCGCGG</b> GCTCAACATATCGTCGTACG	Cloning <i>PXA1</i> [core] in pG-URA3, <i>PXA1</i> probe
<b>5'Pxa1ex</b>	GACAGGTGCTATTGTTGGC	PCR characterization of <i>pxa1</i> transformants
<b>3'Pxa1ex</b>	CGTATCCCCTTTGATCTCCAACAC	PCR characterization of <i>pxa1</i> transformants

Sequences in bold character are recognition sites for the restriction endonuclease specified in the name of the primer

***Icl1*Δ and *fox2*Δ mutant construction.** *ICL1* and *FOX2* null mutants were constructed by using an integrative transformation system based upon the "*URA3*-blaster" strategy, adapted for *C. lusitaniae* by François *et al.* (26). The central part of the coding region of each cloned gene was deleted by digestion with adequate restriction enzymes from New England Biolabs (*Bcl*I and *Stu*I for *ICL1*, resulting in 701-bp deletion ; *Bgl*II and *Mfe*I for *FOX2*, resulting in 1543-bp deletion) and was replaced by the GUN fragment ; this fragment consisted of the *C. lusitaniae* *URA3* gene flanked on both sides by a noncoding 327-bp repeat (npt) obtained by amplification from the prokaryotic *NPTI* gene encoding neomycin phosphotransferase. The resulting disruption cassettes (*Icl1*Δ-GUN, *Fox2*Δ-GUN) were liberated from the plasmid backbone using *Nde*I and *Sph*I and were separately used to transform the strain *ura3*<sub>[Δ360]</sub> to prototrophy, as described previously (26), in order to obtain the mutant strains *icl1*Δ::GUN and *fox2*Δ::GUN. All the genotypes were confirmed by PCR and Southern Blot hybridization, and for the *fox2*Δ locus, by nucleotide sequencing.

**Complementation of the *icl1Δ* and *fox2Δ* null mutant alleles.** Selection of mutant strains that had excised the *URA3* marker was achieved by plating yeast cells from the mutant strains *icl1Δ::GUN* and *fox2Δ::GUN* onto YNB glucose plates containing 5FOA and uracil. Ura-clones resistant to 5FOA were selected and their genetic organization, *i.e.* the loss of the *URA3* gene and of one of the flanking npt fragments, was confirmed by PCR and Southern Blot hybridization. The resulting mutant strains *icl1Δ*, *ura3Δ* and *fox2Δ*, *ura3Δ* were used further in two ways. First, they were transformed to uracil prototrophy by the complementation plasmid pG-*URA3* to restore a functional *URA3* at its resident locus, allowing the selection of two new mutant strains having the genotypes *icl1Δ*, *ura3*<sub>[Δ360]</sub>::*URA3* (abbreviated *icl1Δ*) and *fox2Δ*, *ura3*<sub>[Δ360]</sub>::*URA3* (abbreviated *fox2Δ*). This methodology was proved to be phenotypically neutral and avoids a possible position effect on the expression level of *URA3* (39). Second, the strains *icl1Δ*, *ura3Δ* and *fox2Δ*, *ura3Δ* were transformed to uracil prototrophy by the complementation plasmids pG-*ICL1-URA3* and pG-*FOX2-URA3*, obtained after insertion of an *URA3* allele at the *NotI* and *SpeI* restriction site of the plasmids pG-*ICL1* and pG-*FOX2*. Integration of the plasmids into the genome of the recipient strains was targeted at the *icl1Δ* and the *fox2Δ* loci, respectively, to give the “revertant” strains *ICL1Re* and *FOX2Re*. All genotypes were verified by PCR and Southern Blot hybridization; the genotype of the *fox2Δ* strain was also confirmed by nucleotide sequencing of the deleted locus.

**Disruption of the *PXA1* gene of *C. lusitaniae*.** The *pxa1Δ* mutant was constructed by disruption of the coding sequence of the wild allele. To do that, a 564-bp fragment corresponding to the core of the coding region of *PXA1* was amplified by PCR and cloned to the *NcoI* and *SacII* restriction sites of the plasmid pG-*URA3* (corresponding to a pGEM-T plasmid harbouring a cloned *URA3* gene). The resulting plasmid pG-*URA3-pxa1*[core] was then linearized by *AflIII*, a single restriction site localized within the *PXA1* cloned sequence, before transforming the strain *ura3*<sub>[Δ990]</sub> to prototrophy. The *pxa1Δ::URA3* mutant strain was obtained after homologous integration of the plasmid at the *PXA1* locus.

**Southern hybridizations.** A least 2 μg of *C. lusitaniae* DNA was digested with *HindIII* or *EcoRV* and separated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto a nylon membrane (Hybond N<sup>+</sup>; Roche Molecular Biochemicals) and hybridized with digoxigenin-labeled DNA probes synthesized with a PCR DIG probe synthesis kit (Roche Molecular Biochemicals), as recommended by the supplier. *ICL1*, *FOX2*, *PXA1* and *URA3* DNA probes were generated by PCR amplification with the relevant primers (see **Table 5**). The *bla* DNA probe, which was specific for the plasmidic ampicillin resistance gene, was also generated with specific primers, as described previously (26).

**DNA sequencing and sequence analysis.** Sequence reaction was realized using ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction<sup>®</sup> v1.1 Kit (Applied Biosystems) from plasmidic DNA (300 à 600 ng) or PCR amplification (100 ng), as recommended by the supplier. Sequencing was done by the genotyping-sequencing facility of Bordeaux Segalen University. The similarity searches in databases were performed with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programs (34), available on the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and on the BROAD Institute website ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/candida\\_group/Blast.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/candida_group/Blast.html)). Consensus multiple alignments for nucleotide and amino acid sequences was done with the ClustalW program (70), available on the European Bioinformatics Institute website (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

**In vitro growth assays.** Growth assays were performed on solid YNB media containing 2% of either glucose, potassium acetate, ethanol, citrate, glycerol, oleic acid (C18:1), stearic acid (C18:0), palmitic acid (C16:0), myristic acid (C14:0), lauric acid (C12:0), or capric acid (C10:0) as the sole carbon source. Inoculated media were incubated at room temperature,

30°C, or 37°C for 3 to 7 days, depending on the carbon source, as indicated in the figure legends. For the spot dilution assays, the strains were grown to mid-log phase in YPD, collected by centrifugation, washed with water, and resuspended in water to an OD<sub>600</sub> of 0.5. Cells were transferred to 96-well plates, and serially diluted fivefold (1:5). Drops of 7 µl of each dilution were deposited onto solid media. For growth assays in liquid media, strains were grown in YNB-glucose at 30°C or 37°C overnight. The next day, cells were harvested by centrifugation, washed twice with water, and resuspended at an OD<sub>600</sub> of 0.08 in YNB media containing the appropriate carbon source. Growth of the cultures was assessed over a period of 5 to 7 days by measuring the OD at 600 nm.

**Purification of organelle fractions with sucrose density gradient.** Preparation of subcellular fraction was adapted from Distel & Kragt protocol (68). Briefly, yeast strains were grown for 2 days in WOYglu at 35°C with agitation. When OD<sub>600</sub> reached 1.0, cells were harvested by centrifugation (4000 g, 5 min) and resuspended in 10 ml of induction medium. Then, 5 ml were used to inoculate one liter of induction medium. After 16 h of incubation at 30°C, yeasts were harvested, washed twice (4000 g, 5 min) with distilled water. Wet weight of the cell pellet was determined and cells were resuspended in 10 ml of buffer SH (β-mercapto-ethanol 0.5M, Tris-HCl 2.5 M, pH 9.3) per gram and incubated 10 minutes at 30°C under agitation. Then, cells were washed twice (4000 g, 5 min) in Tris-KCl buffer (KCl 0.5M, Tris 10 mM, pH 7). Yeasts were converted in spheroplasts after 1 hour of incubation at 30°C under agitation in 10 ml of Digestion Buffer (Sorbitol 1.35 M, EDTA 1 mM, Citrate phosphate 10 mM, pH 5.8) supplemented with 10 mg zymolyase per gram of fresh cells. All subsequent steps, including the separation of peroxisomes, were performed at 4°C. Spheroplasts were washed (4000 g, 10 min) twice in Spheroplast Buffer (Sorbitol 1.2 M in KEM (MES 5 mM, EDTA 1 mM, KCl 1 mM, pH 5.5)). Then, spheroplasts were broken by incubation 1 h on ice in 10 ml homogenization buffer (Sorbitol 0.6 M in KEM, PMSF 1 mM) per gram of initial fresh cells. The homogenate was centrifuged at 1500 g for 10 min. The supernatant was saved, and the pellet was homogenized again in 20 ml of homogenization buffer. After 15 min on ice, the suspension was centrifuged; the supernatants were pooled and were further centrifuged at 20,000 g for 30 min. The organelle pellet was resuspended in 2 ml of sucrose 20% (w/w, in KEM).

Sucrose density gradient were adapted from Kamiryo *et al.* (71). The organelle fraction was applied onto a discontinuous gradient consisting of 4,5-, 4,5-, 9-, and 4,5- ml sucrose solutions of 25, 35, 42, and 53% (w/w in KEM), respectively. The tubes were centrifuged at 100,000 g<sub>av</sub> for 1 h with a AH-629 swinging-bucket rotor (Sorvall). The small visible band at the 53 to 42% sucrose interphase contained the peroxisomal fraction, the larger one at the 42 to 35% interphase contained the mitochondrial fraction. Protein concentrations were estimated by the Bradford method (72), using bovine serum albumin as standard.

**Enzymatic assays.** Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed using a Cary 100 scan (Varian) spectrophotometer at λ=240 nm and at 20°C, as described by Aebi (73). The reaction mixture contained 10 µg protein sample, 50 mM potassium phosphate (pH 7) and 11 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used to start the reaction. Cytochrome c oxidase (EC 1.9.3.1) activity was measured at λ=550 nm and 37 °C, following a method adapted from Polakis *et al.* (74). Cytochrome c (Sigma) was previously reduced by equimolar addition of ascorbic acid. The reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate (pH 6.9), 1 mM EDTA, and 28 µM cytochrome c reduced with ascorbic acid. The addition of protein sample was used to start the reaction. One enzyme unit is defined as the amount which catalyzes the conversion of 1 µmol of substrate per min.

**Palmitoyl-CoA catabolism assay.** Crude protein extracts (35 µg) or organelle fraction lysates (10 µg) were incubated at 37°C in 100 µL reaction mixture containing 20 mM NAD, 10 mM CoASH, 1 mM FAD, 100 mM KCN, 2% Triton, Tris-Hcl 100 mM pH 7.4. Reaction was started by addition of 1 µL of <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA 10 µM (20 µCi/ml, Sigma-Aldrich).

Reaction was stopped by addition of 100  $\mu$ L KOH 5M. After saponification (one hour at 65  $^{\circ}$ C), and acidification (addition of 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 36 N), fatty acids were extracted with 2 mL of CHCl<sub>3</sub>. Extracts were evaporated (under N<sub>2</sub>), dissolved in 50  $\mu$ L CHCl<sub>3</sub>/ CH<sub>3</sub>OH 2:1 (v/v) and the compounds were separated by thin layer chromatography (TLC) on 10x10 cm silica gel plates (Merck) in 75:24:1 hexane/diethyl ether/acetic acid (v/v/v). Revelation was done using Phosphorimager SI system (Amersham Biosciences). Analysis of <sup>14</sup>C <sub>$\alpha$</sub> -palmitoyl-CoA consumption were then done using ImageQuant analysis software (Amersham Biosciences).

**Immunodetection of Fox2p and Icl1p by western-blotting.** Ten  $\mu$ g of proteins of peroxisomal and mitochondrial fraction were separated by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis), as described by Laemmli (75), and transferred to polyvinylidene difluoride membrane. After a saturation phase in PBS-Tween-Milk (Phosphate 15 mM, pH 7.4, NaCl 154 mM, Tween 20 0.05% (v/v), milk powder 5%), the membrane was incubated with primary rabbit antiserum. The polyclonal antibody against Fox2p (76), designed against the *C. tropicalis* (17) multifunctional beta-oxidation enzyme, was graciously provided by W. Schliebs (Medizinisch Fakultät Ruhr-Universität Bochum, Germany). The polyclonal antibody against Icl1p (77), designed against the *Ashbya gossypii* isocitrate lyase, was a gift from S. Nieland (Hochschule Lausitz, Senftenberg, Germany). After 3 washing steps and incubation with a secondary anti-rabbit antibody coupled with peroxidase, immunodetection was realized in the presence of 3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The Quantity One software (BioRad) was used for the signal quantification.

**Mitochondrial respiration** (adapted from Avéret *et al.* (78)). Assays were performed using spheroplasts instead of purified mitochondria, because the FA-CoA, at the concentrations used, behaved as a detergent inducing lysis of mitochondria. Spheroplasts obtained as above were washed three times (2000 g, 10 min) in buffer R (sorbitol 1 M, EGTA 0.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, NaCl 1.7 mM, BSA 0.1 % and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.2) and resuspended in the same buffer at a concentration of 8 mg/ml. Spheroplasts were then permeabilized with nystatin (40  $\mu$ g/ml) during 10 minutes under gentle agitation. The respiratory activity was measured at 28 $^{\circ}$ C with a Clark-type electrode connected to a computer giving an on-line display of O<sub>2</sub> consumption. Different substrates and inhibitors were added to the following final concentrations: NADH (4 mM), palmitoyl-CoA (0.2 mM), stearoyl-CoA (0.2 mM), valinomycin (5  $\mu$ g/ml), myxothiazol (0.1  $\mu$ g/ml), phenylsuccinate (5 mM), KCN (5 mM). Oxygen consumption rates are expressed in nmol O<sub>2</sub> per milligram of proteins and per milliliter (nmol O<sub>2</sub> .mg<sup>-1</sup> .ml<sup>-1</sup> ).

**Statistical analysis.** All the data obtained from the assay were analyzed using the two-tailed Student's *t*-test with a statistical significance at  $p \leq 0.05$ . All assays and experiments were carried out at least in triplicate.

**Acknowledgements :** The authors would like to thank W. Schliebs (Medizinisch Fakultät Ruhr-Universität Bochum, Germany) and S. Nieland (Hochschule Lausitz, Senftenberg, Germany) for graciously providing anti-Icl1p and anti-Fox2p antibodies. We are also grateful to René Lessire and Frédéric Domergue for helpful discussions, and to Valérie Fitton-Ouabi and Sabine Charron for technical assistance. We would like to acknowledge the Genotyping and Sequencing Facility of Bordeaux for participating to the sequencing of *ICLI*, *FOX2* and *PXA1* genes. This work was supported by grants from the CNRS and the University Bordeaux Segalen.

**Declaration of interest:** The authors have no conflicts of interest. The authors are responsible for the content and writing of the paper.

## References

1. Singh A, Del Poeta M (2011) Lipid signalling in pathogenic fungi. *Cell. Microbiol* 13:177-185.
2. Brock M (2009) Fungal metabolism in host niches. *Current Opinion in Microbiology* 12:371-376.
3. Strijbis K, Distel B (2010) Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryotic Cell* 9:1809-1815.
4. Hiltunen JK et al. (2003) The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev* 27:35-64.
5. Moreno de la Garza M, Schultz-Borchard U, Crabb JW, Kunau W-H (1985) Peroxisomal Beta-oxidation system of *Candida tropicalis*. *European Journal of Biochemistry* 148:285-291.
6. Kurihara T et al. (1992) Beta-oxidation of butyrate, the short-chain-length fatty acid, occurs in peroxisomes in the yeast *Candida tropicalis*. *J. Biochem* 111:783-787.
7. Smith JJ, Brown TW, Eitzen GA, Rachubinski RA (2000) Regulation of peroxisome size and number by fatty acid beta -oxidation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem* 275:20168-20178.
8. Kunau W-H, Dommes V, Schulz H (1995)  $\beta$ -Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Progress in Lipid Research* 34:267-342.
9. Shen Y-Q, Burger G (2009) Plasticity of a key metabolic pathway in fungi. *Functional & Integrative Genomics* 9:145-151.
10. Hetteema EH et al. (1996) The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 15:3813-3822.
11. Shani N, Watkins PA, Valle D (1995) PXA1, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:6012 -6016.
12. Hetteema EH, Tabak HF (2000) Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1486:18-27.
13. Cohen G, Fessl F, Traczyk A, Rytka J, Ruis H (1985) Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation. *Mol. Gen. Genet.* 200:74-79.
14. Hiltunen JK et al. (1992) Peroxisomal multifunctional beta-oxidation protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular analysis of the *fox2* gene and gene product. *J. Biol. Chem* 267:6646-6653.
15. Ylianttila MS et al. (2006) Crystal Structure of Yeast Peroxisomal Multifunctional Enzyme: Structural Basis for Substrate Specificity of (3R)-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Units. *J. Mol. Biol.* 358:1286-1295.
16. Lorenz MC, Fink GR (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 412:83-86.
17. Thieringer R, Kunau WH (1991) Beta-oxidation system of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Structural characterization of the trifunctional protein. *J. Biol. Chem.* 266:13118 -13123.

18. Baltazar MF, Dickinson FM, Ratledge C (1999) Oxidation of medium-chain acyl-CoA esters by extracts of *Aspergillus niger*: enzymology and characterization of intermediates by HPLC. *Microbiology* 145 ( Pt 1):271-278.
19. Maggio-Hall LA, Keller NP (2004) Mitochondrial  $\beta$ -oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 54:1173-1185.
20. Boissard S et al. (2009) Peroxisomal ABC transporters and  $\beta$ -oxidation during the life cycle of the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology* 46:55-66.
21. Feron G, Blin-Perrin C, Krasniewski I, Mauvais G, Lherminier J (2005) Metabolism of fatty acid in yeast: characterisation of beta-oxidation and ultrastructural changes in the genus *Sporidiobolus* sp. cultivated on ricinoleic acid methyl ester. *FEMS Microbiol. Lett* 250:63-69.
22. Cornell MJ et al. (2007) Comparative genome analysis across a kingdom of eukaryotic organisms: Specialization and diversification in the Fungi. *Genome Res* 17:1809-1822.
23. Favel A 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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 47:331-339.
24. Rodrigues de Miranda L (1979) *Clavispora*, a new yeast genus of the *Saccharomycetales*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 45:479-483.
25. François F et al. (2001) Alternative identification test relying upon sexual reproductive abilities of *Candida lusitanae* strains isolated from hospitalized patients. *J. Clin. Microbiol* 39:3906-3914.
26. François F, Chapeland-Leclerc F, Villard J, Noël T (2004) Development of an integrative transformation system for the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitanae* using *URA3* as a selection marker. *Yeast* 21:95-106.
27. Shen J, Guo W, Kohler JR (2005) CaNAT1, a heterologous dominant selectable marker for transformation of *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species. *Infect. Immun.* 73:1239-1242.
28. El-Kirat-Chatel S, Dementhon K, Noël T (2011) A two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes in the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitanae*. *Yeast* 28:321-330.
29. Roetzer A, Gratz N, Kovarik P, Schüller C (2010) Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell. Microbiol.* 12:199-216.
30. Prigneau O et al. (2003) Genes involved in beta-oxidation, energy metabolism and glyoxylate cycle are induced by *Candida albicans* during macrophage infection. *Yeast* 20:723-730.
31. Lorenz MC, Bender JA, Fink GR (2004) Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell* 3:1076-1087.
32. Wang Z-Y, Thornton CR, Kershaw MJ, Debaio L, Talbot NJ (2003) The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Microbiol.* 47:1601-1612.
33. Piekarska K et al. (2006) Peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation is not essential for virulence of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 5:1847-1856.
34. Altschul S et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.

35. Rehman A, McFadden BA (1997) Lysine 194 is functional in isocitrate lyase from *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 35:14-17.
36. Gould SG, Keller GA, Subramani S (1987) Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J. Cell Biol.* 105:2923-2931.
37. Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A, Eisenhaber F (2003) Prediction of Peroxisomal Targeting Signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 328:581-592.
38. Gaur M, Choudhury D, Prasad R (2005) Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* 9:3-15.
39. Brand A, MacCallum DM, Brown AJP, Gow NAR, Odds FC (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. *Eukaryotic Cell* 3:900-909.
40. Ramírez MA, Lorenz MC (2007) Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryotic Cell* 6:280-290.
41. Gurvitz A, Rottensteiner H (2006) The biochemistry of oleate induction: Transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1763:1392-1402.
42. Piekarska K et al. (2008) The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Microbiology (Reading, Engl.)* 154:3061-3072.
43. Chen Y-R, Deterding LJ, Tomer KB, Mason RP (2000) Nature of the Inhibition of horseradish peroxidase and mitochondrial cytochrome c oxidase by cyanyl radical. *Biochemistry* 39:4415-4422.
44. Dommes P, Dommes V, Kunau WH (1983) beta-Oxidation in *Candida tropicalis*. Partial purification and biological function of an inducible 2,4-dienoyl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 258:10846-10852.
45. Maggio-Hall LA, Lyne P, Wolff JA, Keller NP (2008) A single acyl-CoA dehydrogenase is required for catabolism of isoleucine, valine and short-chain fatty acids in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 45:180-189.
46. Eaton S et al. (2000) The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon? *Biochem. Soc. Trans.* 28:177-182.
47. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc.* 2:953-71.
48. Shatkay H et al. (2007) SherLoc: high-accuracy prediction of protein subcellular localization by integrating text and protein sequence data. *Bioinformatics* 23:1410-1417.
49. Guda C, Subramaniam S (2005) pTARGET [corrected] a new method for predicting protein subcellular localization in eukaryotes. *Bioinformatics* 21:3963-3969.
50. Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4:1581-1590.
51. Claros MG, Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241:779-786.
52. Callebaut I et al. (1997) Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* 53:621-645.

53. Helmerhorst EJ, Stan M, Murphy MP, Sherman F, Oppenheim FG (2005) The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*. *Mitochondrion* 5:200-211.
54. Milani G et al. (2001) Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Letters* 508:231-235.
55. Ferdinandusse S, Denis S, van Roermund CWT, Wanders RJA, Dacremont G (2004) Identification of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids. *J. Lipid Res.* 45:1104-1111.
56. Cheng Q et al. (2005) *Candida* yeast long chain fatty alcohol oxidase is a c-type haemoprotein and plays an important role in long chain fatty acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1735:192-203.
57. Picataggio S et al. (1992) Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Biotechnology (N.Y.)* 10:894-898.
58. Foulon V et al. (1999) Purification, molecular cloning, and expression of 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, a peroxisomal thiamine pyrophosphate-dependent enzyme that catalyzes the carbon-carbon bond cleavage during  $\alpha$ -oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:10039 -10044.
59. Jansen GA, Wanders RJA (2006) Alpha-Oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763:1403-1412.
60. Wanders RJ, van Roermund CW, Jakobs C, ten Brink HJ (1991) Identification of pristanoyl-CoA oxidase and phytanic acid decarboxylation in peroxisomes and mitochondria from human liver: implications for Zellweger syndrome. *J. Inherit. Metab. Dis* 14:349-352.
61. Refsum S (1947) Heredopathia atactica polyneuritiformis: A familial syndrome not hitherto described. A contribution to the clinical study of the hereditary diseases of the nervous system. *Journal of the American Medical Association* 133:1319.
62. Beopoulos A, Chardot T, Nicaud J-M (2009) *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* 91:692-696.
63. Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H (1995) High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Letters* 363:41-45.
64. Pagot Y, Belin JM (1996) Involvement of carnitine acyltransferases in peroxisomal fatty acid metabolism by the yeast *Pichia guilliermondii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3864-3867.
65. Strijbis K et al. (2010) Contributions of carnitine acetyltransferases to intracellular acetyl unit transport in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem* 285:24335-24346.
66. Hynes MJ, Murray SL, Andrianopoulos A, Davis MA (2011) Role of carnitine acetyltransferases in acetyl coenzyme A metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 10:547-555.
67. van Roermund CW, Hetteema EH, van den Berg M, Tabak HF, Wanders RJ (1999) Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *EMBO J* 18:5843-5852.
68. Distel B, Kragt A (2006) Purification of yeast peroxisomes. *Methods Mol. Biol* 313:21-26.
69. Scherer S, Stevens DA (1987) Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 25:675-679.

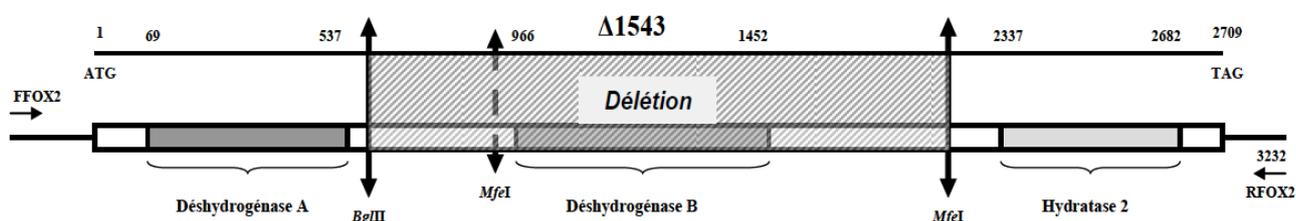
70. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680.
71. Kamiryo T, Abe M, Okazaki K, Kato S, Shimamoto N (1982) Absence of DNA in peroxisomes of *Candida tropicalis*. *J. Bacteriol* 152:269-274.
72. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254.
73. Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Meth. Enzymol* 105:121-126.
74. Polakis ES, Bartley W, Meek GA (1964) Changes in the structure and enzyme activity of *Saccharomyces cerevisiae* in response to changes in the environment. *Biochem. J* 90:369-374.
75. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
76. Fosså A, Beyer A, Pfitzner E, Wenzel B, Kunau WH (1995) Molecular cloning, sequencing and sequence analysis of the fox-2 gene of *Neurospora crassa* encoding the multifunctional beta-oxidation protein. *Mol. Gen. Genet* 247:95-104.
77. Schmidt G, Stahmann K-P, Kaesler B, Sahm H (1996) Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiology* 142:419-426.
78. Avéret N, Fitton V, Bunoust O, Rigoulet M, Guérin B. (1998) Yeast mitochondrial metabolism: from *in vitro* to *in situ* quantitative study. *Mol Cell Biochem* 184:67-79.

## 2 Données complémentaires

### 2.1 Construction, caractérisation génotypique et phénotypique du mutant *fox2Δ<sub>cl</sub>*, et des doubles mutants *fox2Δ<sub>pxa1Δ</sub>*, *fox2Δ<sub>cl</sub><sub>pxa1Δ</sub>*

#### 2.1.1 Construction d'un deuxième mutant *fox2Δ* (*fox2Δ<sub>cl</sub>*)

Le mutant *fox2Δ* a été construit par délétion de 1543 nucléotides (nt) au sein de la séquence codante (voir manuscrit de l'article et **Figure 22**). Le séquençage nucléotidique du locus *fox2Δ* a permis de vérifier que la délétion couvrait complètement un domaine déshydrogénase et qu'elle entraînait un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop 48 paires de bases (pb) après l'insertion de la cassette de délétion.



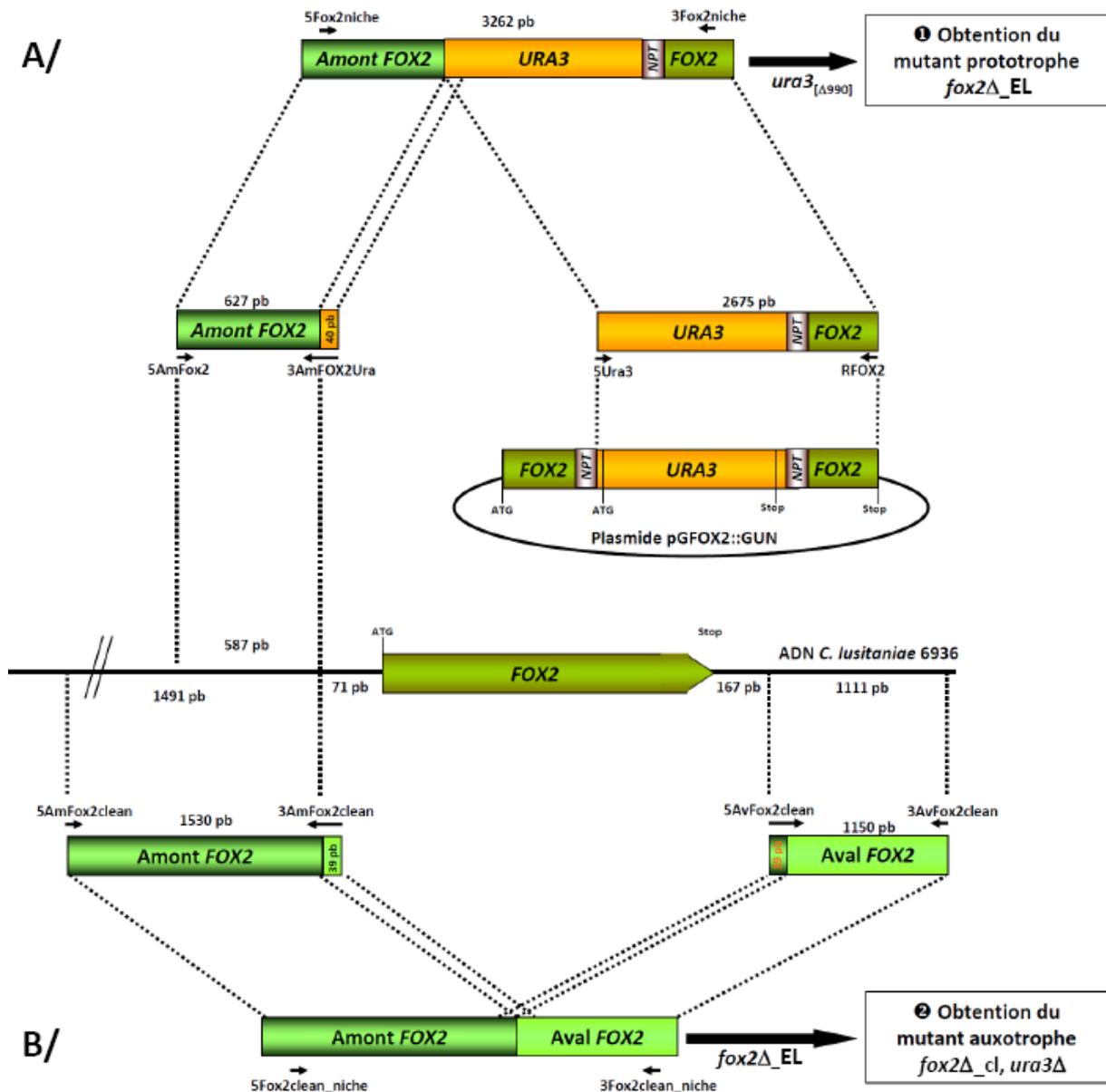
**Figure 22. Carte du locus *FOX2*.** La séquence codante de 2709 nucléotides, les domaines hydroxyacyl-CoA déshydrogénase A et B (respectivement entre les nucléotides 69-537 et 966-1452), le domaine énoyl-CoA hydratase 2 (entre les nucléotides 2337-2682) sont portés par un fragment d'ADN de 3232 nucléotides. FFOX2 et RFOX2 sont les amorces qui ont été utilisées en PCR pour cloner *FOX2* à partir de l'ADN génomique de la souche sauvage 6936 de *C. lusitaniae*. La position des sites *Bgl*III et *Mfe*I ayant permis de créer la délétion pour l'obtention du mutant *fox2Δ* est mentionnée.

Afin de confirmer le phénotype du mutant *fox2Δ* dont la séquence codante n'était que partiellement déléetée, nous avons construit un deuxième mutant *fox2Δ* (*fox2Δ<sub>cl</sub>*) en adaptant la stratégie de PCR chevauchante récemment développée par notre équipe (El-Kirat-Chatel *et al.*, 2011). La totalité de la séquence codante de *FOX2* a ainsi pu être déléetée dans le mutant *fox2Δ<sub>cl</sub>*. Cette délétion s'est faite en 2 étapes de transformation. Elle a nécessité la construction de 2 cassettes de délétion et la sélection successive de 2 mutants *fox2Δ*, l'un portant le marqueur *URA3* intégré au locus *fox2Δ* (mutant *fox2Δ<sub>EL</sub>*), l'autre ayant excisé le marqueur *URA3* (mutant *fox2Δ<sub>cl</sub>*) (**Figure 23**).

#### 2.1.2 Construction du mutant *fox2Δ<sub>EL</sub>*

Une première séquence de 627 nt située dans la partie 5'UTR du gène *FOX2* a été amplifiée à partir de l'ADN de la souche sauvage 6936 à l'aide des amorces 5AmFox2 et 3AmFox2Ura. L'oligonucléotide reverse 3AmFox2Ura possède à son extrémité 3' 21 nt complémentaires de la séquence *FOX2* et à son extrémité 5' une queue flottante de 40 nt complémentaires de la région 5' du marqueur *URA3*.

Une deuxième séquence de 2675 nt (correspondant au gène *URA3*, à une séquence npt, à la partie 3' codante de la séquence de *FOX2* du mutant *fox2Δ* et à 523 nt de la partie 3'UTR de *FOX2*) a été amplifiée à partir du plasmide pGFox2Δ::GUN à l'aide des amorces 5Ura3 et RFOX2.



**Figure 23. Invalidation de la totalité de la séquence codante de FOX2 chez le mutant *fox2Δ\_cl* selon la stratégie de PCR chevauchante.** Cette stratégie s'est déroulée en deux étapes et a nécessité la construction de deux cassettes de délétion. Pour la construction de chaque cassette, trois étapes d'amplification par PCR ont été nécessaires : amplification séparée de deux fragments, fusion des deux fragments par PCR chevauchante, réalisation d'une PCR nichée afin de purifier la cassette de délétion.

**A/** Construction de la cassette de délétion pour l'obtention du mutant *fox2Δ\_EL*. La séquence de l'amorce 3AmFOX2Ura utilisée pour l'amplification du fragment amont contient 40 nucléotides homologues à *URA3*. Le fragment contenant le gène *URA3* et la partie aval de *FOX2* a été amplifié à partir du plasmide pGFOX2::GUN. Le mutant prototrophe *fox2Δ\_EL* a été obtenu après transformation de la souche auxotrophe *ura3[Δ990]* par la cassette de délétion et sélection des transformants sur milieu minimum YNB.

**B/** Construction de la cassette de délétion pour l'obtention du mutant *fox2Δ\_cl*. La séquence de l'amorce 3AmFox2clean utilisée pour l'amplification du fragment amont comprend 39 nucléotides homologues à la séquence du fragment aval. Inversement, la séquence de l'amorce 5AvFox2clean utilisée pour l'amplification du fragment aval comprend 39 nucléotides homologues à la séquence du fragment amont. Le mutant auxotrophe *fox2Δ\_cl, ura3Δ* a été obtenu après transformation de la souche prototrophe *fox2Δ\_EL* par la cassette de délétion et sélection des transformants sur milieu minimum YNB supplémenté en uracile et acide 5-fluoro-orotique.

Ces deux amplifiats ont été utilisés comme matrice après avoir été dilués au 1/1000<sup>e</sup> pour la réalisation d'une PCR chevauchante à l'aide des amorces 5amFox2 et RFOX2 qui a permis d'obtenir un amplifiat de 3262 nt correspondant à la fusion des deux fragments. Une PCR nichée a été réalisée à partir de cet amplifiat dilué au 1/1000<sup>e</sup> à l'aide des amorces 5Fox2niche et 3Fox2niche. La cassette de délétion obtenue a ensuite été utilisée pour transformer la souche *ura3*<sub>[Δ990]</sub> afin d'obtenir après recombinaison homologue au locus *FOX2* le mutant prototrophe *fox2Δ\_EL*.

### 2.1.3 Construction du mutant *fox2Δ\_cl*

Une deuxième cassette de délétion correspondant à la fusion des régions non codantes amont et aval du gène cible *FOX2* a été obtenue par PCR chevauchante. Le fragment amont de 1530 nt comprenant la région amont du gène *FOX2* jusqu'à 71 pb avant le codon start a été amplifiée à partir de l'ADN de la souche sauvage 6936 à l'aide des amorces 5AmFox2clean et 3AmFox2clean. L'oligonucléotide reverse 3AmFox2clean possède à son extrémité 3' 21 nt complémentaires de la séquence amont du gène *FOX2* et à son extrémité 5' une queue flottante de 39 nt complémentaires de la région 5' de la séquence aval du gène *FOX2*. Le fragment aval de 1150 pb correspond à la région 3' non codante située 167 pb après le codon stop du gène *FOX2* et a été amplifiée à partir de l'ADN de la souche sauvage à l'aide des amorces 5AvFox2clean et 3AvFox2clean. L'oligonucléotide 5AvFox2clean possède à son extrémité 5' 39 nt complémentaires de la région 3' de la séquence amont du gène *FOX2* et à son extrémité 3' 20 nt complémentaires de la séquence *FOX2*. Les deux fragments amont et aval ont ensuite servi de matrice après avoir été dilués au 1/1000<sup>e</sup> pour la réalisation d'une PCR chevauchante à l'aide des amorces 5AmFox2clean et 3AvFox2clean. Une PCR nichée a été réalisée à partir de cet amplifiat dilué au 1/1000<sup>e</sup> à l'aide des amorces 5Fox2cleanniche et 3Fox2cleanniche. La cassette de délétion obtenue par fusion de ces fragments a été utilisée pour transformer la souche prototrophe *fox2Δ\_EL*. Après une phase d'expression phénotypique en milieu YPDS, le mutant auxotrophe pour l'uracile *fox2Δ\_cl ura3Δ* a été obtenu après sélection sur du milieu minimum YNB supplémenté en uracile et en 5FOA. Le locus *URA3* a ensuite été reconstitué chez le mutant *fox2Δ\_cl ura3Δ* par transformation avec l'allèle *URA3* sauvage (amplifiat PCR purifié de *URA3* de *C. lusitaniae* obtenu avec le couple d'amorces NotURA3-SpeURA3) afin d'obtenir le mutant *fox2Δ\_cl*.

### 2.1.4 Construction des doubles mutants *fox2Δ pxa1Δ* et *fox2Δ\_cl pxa1Δ*

Les doubles mutants [*fox2, pxa1*]Δ et [*fox2\_cl, pxa1*]Δ ont été construits par disruption de la séquence codante de *PXA1* selon la stratégie cœur de gène qui a permis l'obtention du mutant *pxa1Δ* (voir matériels et méthodes, page 67). Pour cela, le plasmide pGEMU-*pxa1*<sub>[core]</sub> (contenant le marqueur *URA3* ainsi qu'une séquence de 564 pb correspondant au cœur du gène *PXA1*) a été linéarisé par digestion enzymatique à l'aide de *Afl*III puis a été utilisé pour transformer les souches auxotrophes *fox2Δ, ura3Δ* et *fox2Δ\_cl, ura3Δ* afin d'obtenir les mutants prototrophes [*fox2, pxa1*]Δ et [*fox2\_cl, pxa1*]Δ.

## 2.1.5 Caractérisation génotypique des mutants

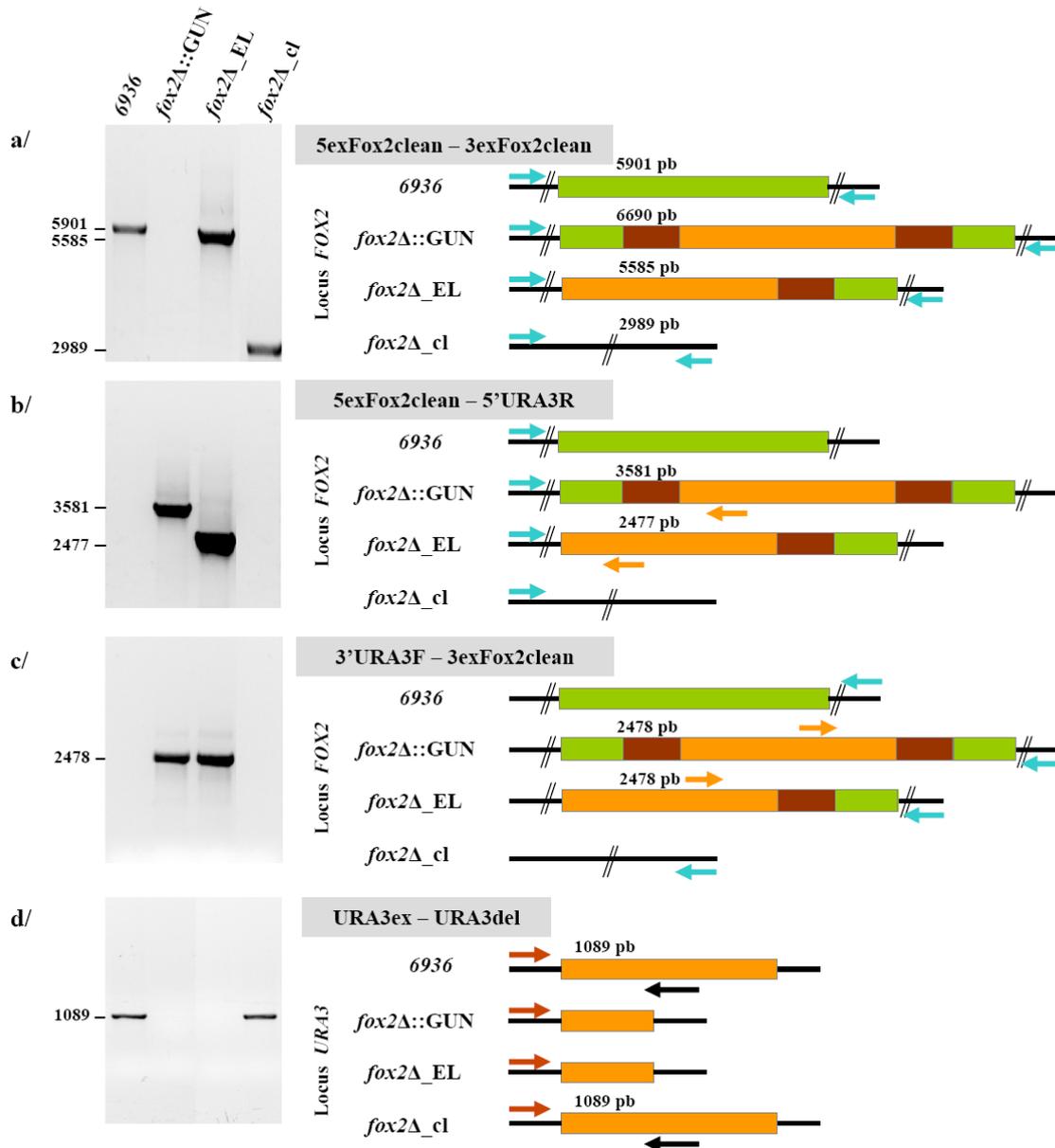
### 2.1.5.1 Caractérisation génotypique des mutants par PCR

Chaque expérience de transformation a permis de sélectionner pour chaque génotype attendu une dizaine de transformants par  $\mu\text{g}$  d'ADN. L'ADN génomique de huit d'entre eux était à chaque fois extrait et caractérisé par PCR. L'intégration au locus *FOX2* d'une cassette de délétion portant ou non le gène *URA3* de même que l'intégration au locus *PXA1* d'un plasmide portant le gène *URA3* ont deux conséquences physiques possibles sur les loci cibles :

- ❶ Une variation de taille des loci détectable par PCR en utilisant des amorces dont la région d'homologie se situe sur le génome à l'extérieur et de part et d'autre de la zone de recombinaison (amorces possédant le suffixe "ex").
- ❷ La formation ou la disparition d'une région recombinante dans le génome où se trouvent associées des régions du gène *URA3* et des séquences propres au gène cible. Ces régions recombinantes sont détectables par PCR grâce à des couples d'amorces homologues d'une part au gène *URA3*, et d'autre part à une zone externe à la zone de recombinaison au niveau du locus cible (amorces possédant le suffixe "ex").

Selon le même principe, la reconstitution de l'allèle *URA3* sauvage à son locus d'origine peut être vérifiée par PCR, en utilisant une amorce homologue à une région externe située sur le génome en amont du gène *URA3* (*URA3ex*) et une amorce spécifique de la région centrale du marqueur et délétée chez les souches *ura3*<sub>[ $\Delta$ 360]</sub> et *ura3*<sub>[ $\Delta$ 990]</sub> (*URA3del*).

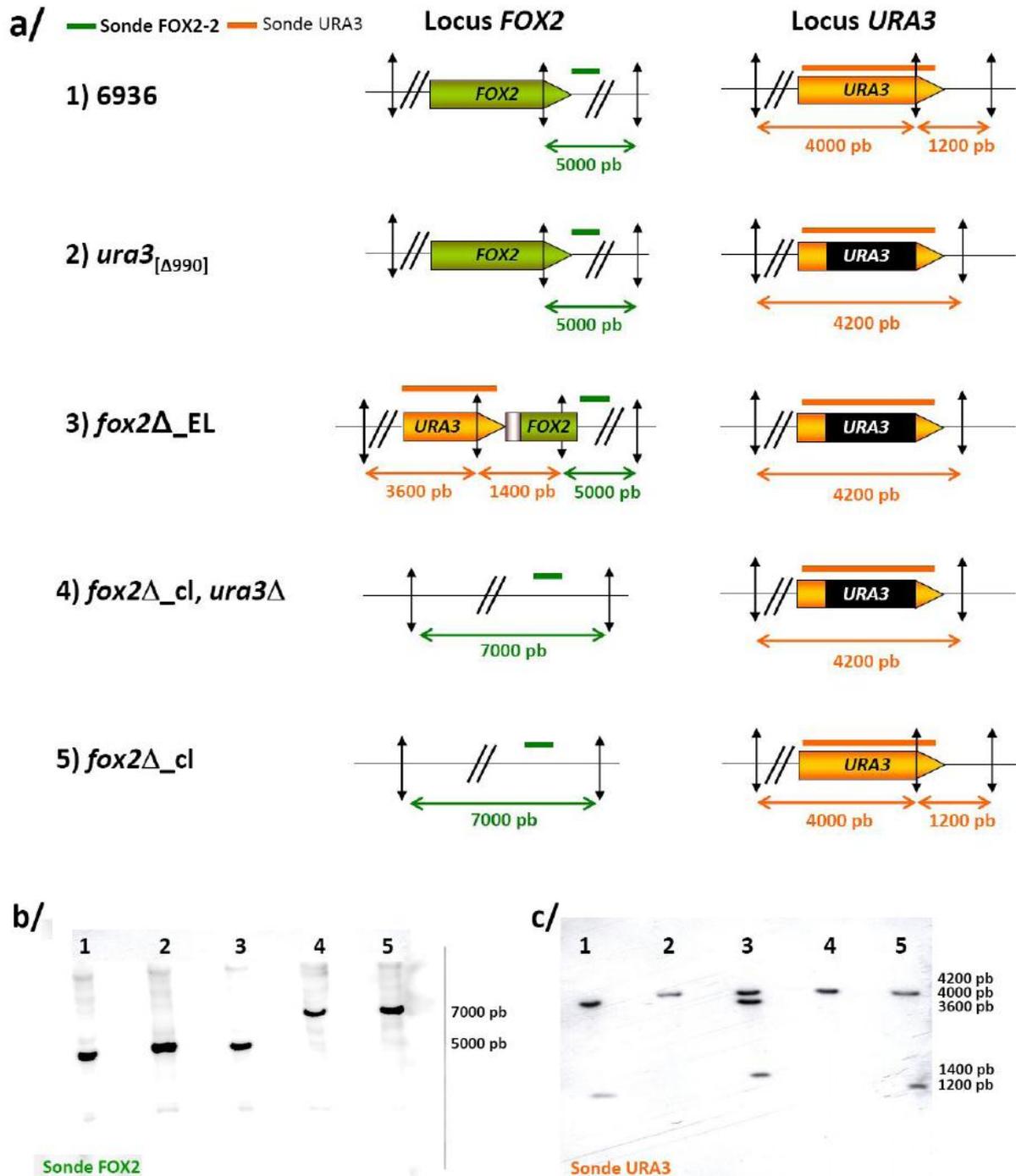
Un exemple de la caractérisation génotypique par PCR de la souche sauvage et des mutants *fox2 $\Delta$ \_EL* et *fox2 $\Delta$ \_cl* est donné **Figure 24**. Les amplifiats possédaient la taille attendue en fonction du couple d'amorces utilisé, à l'exception d'un fragment de grande taille (6690 pb, attendu pour le génotype *fox2 $\Delta$ ::GUN*) qui n'a pas pu être obtenu.



**Figure 24. Caractérisation génotypique par PCR des loci *FOX2* et *URA3* de la souche sauvage et des mutants *fox2Δ::GUN*, *fox2Δ\_EL* et *fox2Δ\_cl*.** Les couples d'amorces utilisés pour chaque PCR sont identifiés en gris. La localisation et l'orientation des oligonucléotides employés, ainsi que les tailles des fragments générés sont figurées sur les représentations schématiques des loci correspondants. Toute séquence codante issue de *FOX2* est représentée en vert clair, de *URA3* en orange, de npt en brun.

### 2.1.5.2 Caractérisation génotypique des mutants par Southern Blot

La structure des loci d'intérêt a été confirmée par Southern Blot pour les mutants *fox2Δ\_EL*, *fox2Δ\_cl*, *ura3Δ* et *fox2Δ\_cl*. Les ADN génomiques de la souche sauvage 6936 et de ses différents mutants ont été digérés par *EcoRV*, séparés par électrophorèse puis transférés sur membrane et hybridés avec les sondes FOX2-2 et URA3. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 25**. La taille des fragments hybridés aux sondes FOX2-2 et URA3 était conforme à l'étude des cartes de restriction des loci d'intérêt et nous a permis de valider la structure des loci des souches étudiées et de démontrer qu'il n'existait pas de copie surnuméraire des gènes *FOX2* et *URA3* dans le génome de la souche sauvage, ni de copie d'ADN surnuméraire dans celui des différents mutants.



**Figure 25. Caractérisation génotypique par Southern Blot des loci FOX2 et URA3.**

**a/** cartes de restrictions au niveau des loci FOX2 et URA3 des cinq souches étudiées, numérotées de 1 à 5 ; les sites de restriction *EcoRV* sont symbolisés par les doubles flèches. En vert est représentée toute séquence issue de FOX2, en marron de npt, en orange de URA3. La délétion du locus URA3 est représentée en noir. Les zones d'homologie avec les sondes FOX2-2 et URA3, ainsi que les tailles des fragments hybridant avec les sondes sont également représentées.

**b/** la membrane a été hybridée avec la sonde FOX2-2 et **c/** avec la sonde URA3.

### 2.1.6 Etude de l'assimilation *in vitro* des sources de carbone

Le profil d'assimilation des sources de carbone des mutants *fox2*Δ<sub>cl</sub>, [*fox2*, *pxa1*]Δ et [*fox2*<sub>cl</sub>, *pxa1*]Δ était identique à celui du mutant *fox2*Δ (voir manuscrit de l'article et le **Tableau 14** dans la partie II des résultats, page 150) : croissance similaire à celle de la souche

sauvage en présence des AG C14:0 (acide myristique), C16:0 (acide palmitique), C18:0 (acide stéarique) utilisés comme seule source de carbone, et une plus faible assimilation à 37°C du C18:1 (acide oléique).

## **2.1.7 Profils lipidiques**

### **2.1.7.1 Etude des lipides neutres**

La composition en phospholipides (PL) et en triacylglycérols (TAG) des souches mutantes *fox2Δ*, *pxa1Δ* et de la souche sauvage 6936 a été étudiée après une culture de 5 jours sur milieu glucosé (YPD) ou milieu d'induction [YNB + 2% acide palmitique (C16:0)]. Les lipides ont été extraits des levures transformées en sphéroplastes et séparés par une chromatographie en couche mince sur plaque de silice.

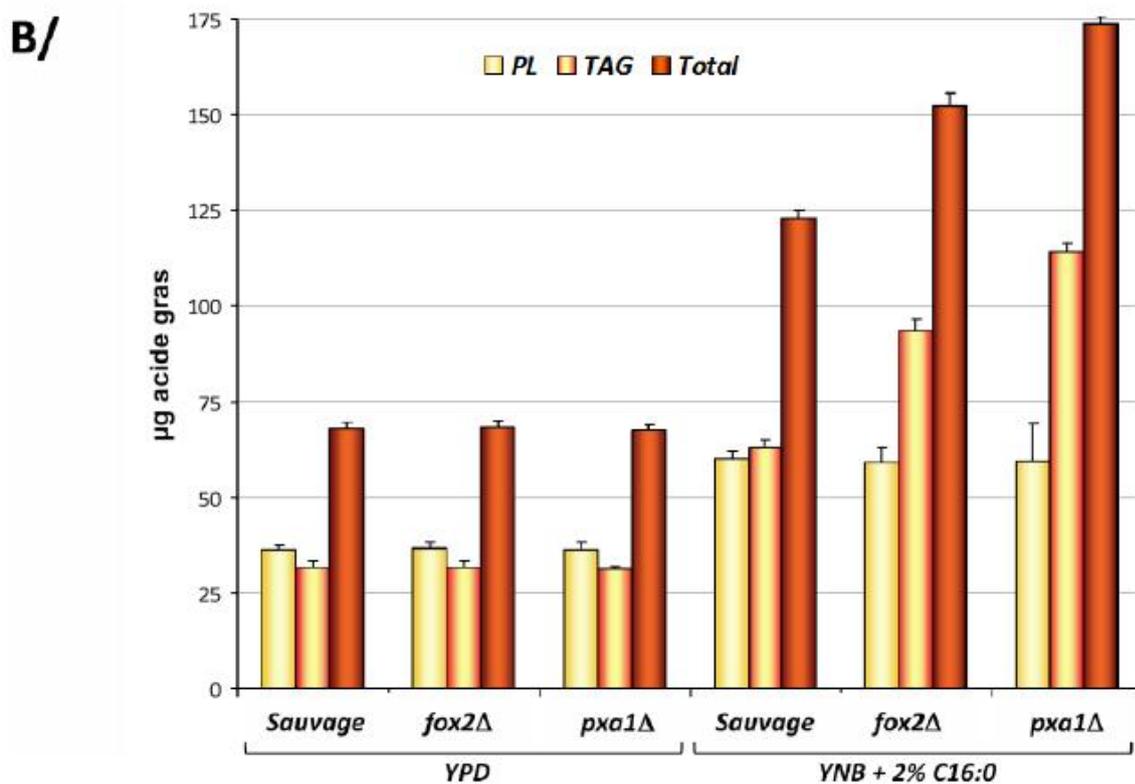
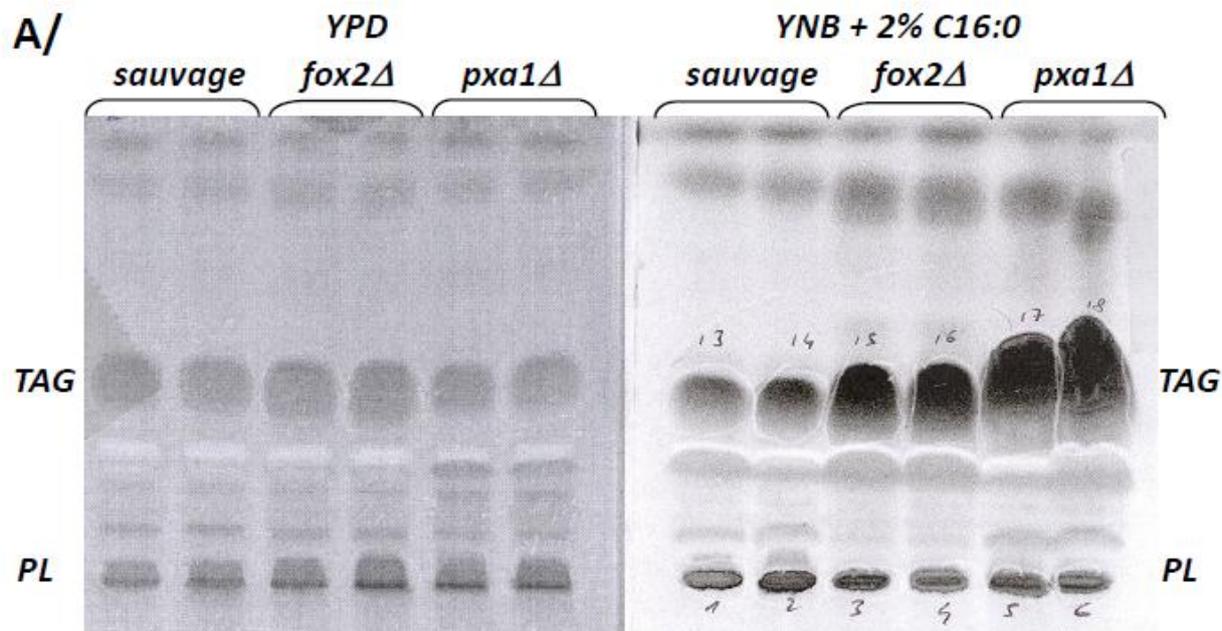
La quantité de PL et de TAG extraits des souches mutantes *fox2Δ* et *pxa1Δ* après culture sur YPD n'était pas significativement différente de celle de la souche sauvage (**Figure 26**).

La culture sur YNB+2% C16:0 (acide palmitique) s'est traduite par une augmentation significative de la quantité de TAG et de PL extraits : x 2 pour la souche sauvage, x 2,9 pour *fox2Δ* et x 3,7 pour *pxa1Δ*. La quantité de TAG extraits de la souche *pxa1Δ* était significativement plus élevée que celle extraite de la souche sauvage ( $p < 0,05$ ).

### **2.1.7.2 Analyse des acides gras contenus dans les phospholipides et les triacylglycérols**

La composition en AG des PL et TAG extraits a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse après transestérification des fractions PL et TAG récupérées par chromatographie en couche mince. Toutefois, cette analyse n'a été réalisée que deux fois.

Après culture sur YPD, les compositions en AG des PL et TAG des souches mutantes *fox2Δ* et *pxa1Δ* étaient globalement comparables à celles de la souche sauvage, à l'exception du C18:1 extrait en quantité significativement plus faible dans les TAG des mutants *fox2Δ* et *pxa1Δ* ( $p < 0,05$ , données non montrées).



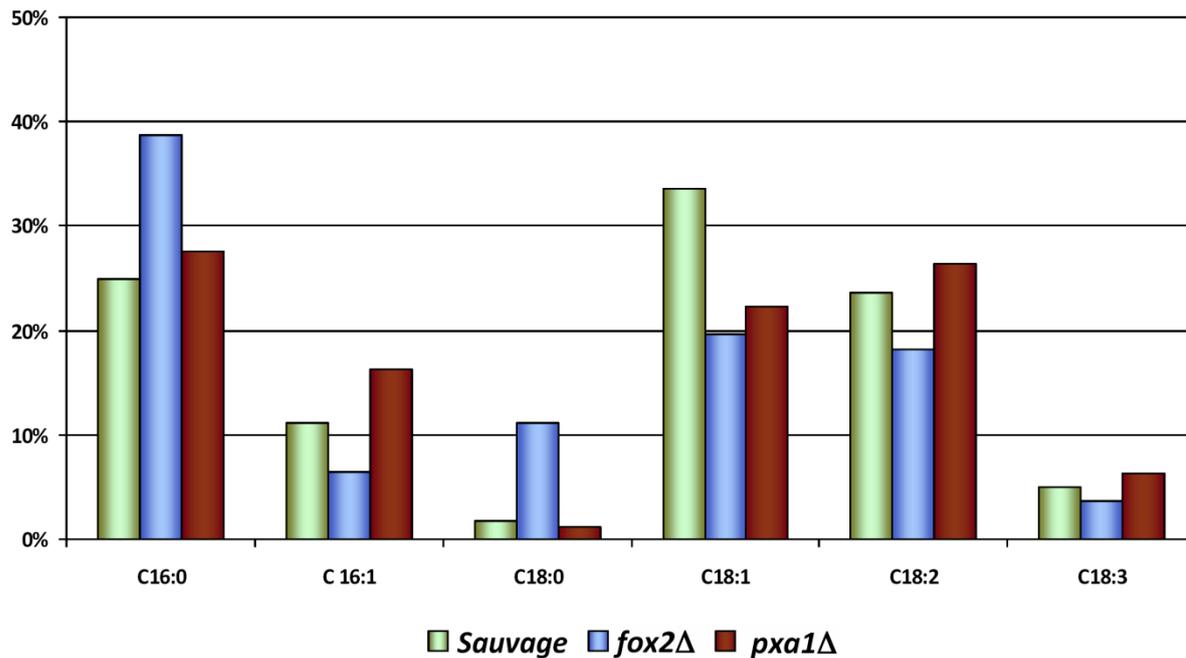
**Figure 26. Composition en lipides neutres des souches sauvage, *fox2Δ* et *pxa1Δ*.**

**A/** Chromatographie couche mince des extraits lipidiques des souches sauvage, *fox2Δ* et *pxa1Δ* après culture sur un milieu glucosé (YPD) ou un milieu contenant de l'acide palmitique (C16:0) comme seule source de carbone. Les plaques de silice sont observées sous ultraviolet après révélation des molécules hydrophobes à l'aide de la primuline. PL : phospholipides, TAG : tri-acyl-glycérols.

**B/** Contenu en acides gras des fractions PL (en jaune) et TAG (en orange) séparées par chromatographie couche mince, extraites et quantifiées par chromatographie en phase gazeuse. Le C17:0 a été utilisé comme standard pour normaliser la quantification. Total (en rouge): somme des fractions PL et TAG.

A/

## Phospholipides (YNB + 2% C16:0)



B/

## Triacylgcérols (YNB + 2% C16:0)

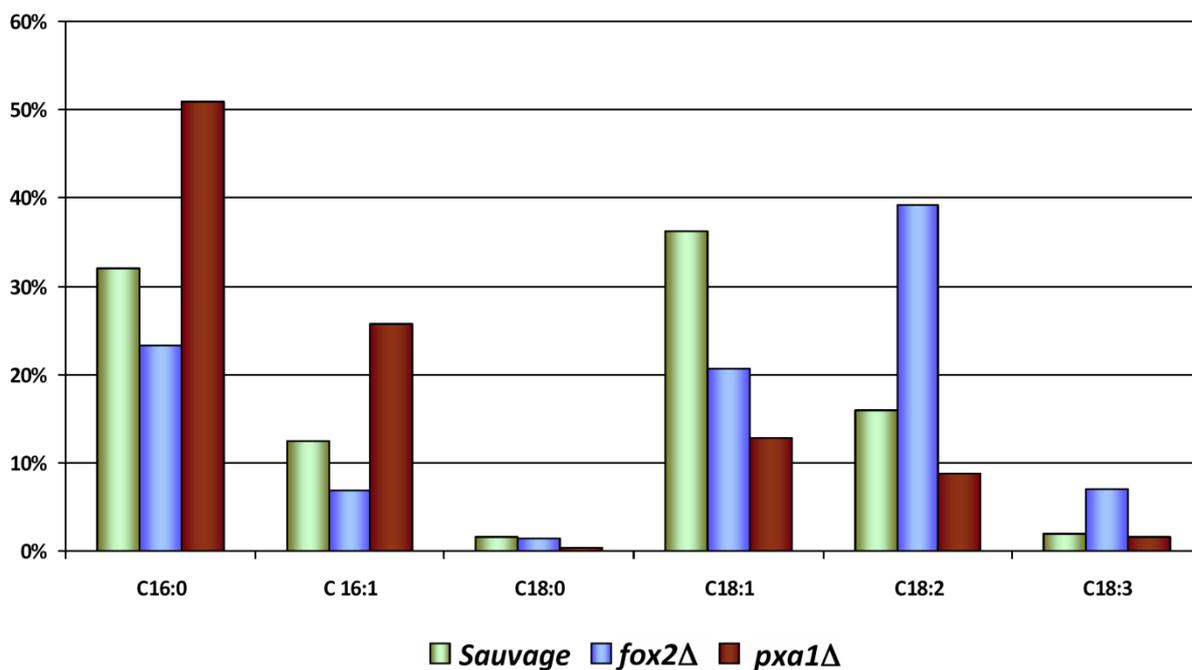


Figure 27. Composition des phospholipides (A) et des triacylgcérols (B) en acides gras des souches sauvage, *fox2Δ* et *pxa1Δ* après culture sur acide palmitique. Les fractions ont été séparés par chromatographie couche mince, extraites et quantifiées par chromatographie en phase gazeuse, en utilisant le C17:0 comme standard.

Après culture en milieu solide en utilisant le C16:0 (acide palmitique) comme seule source de carbone, nous avons constaté que (**Figure 27** et **Tableaux 7 et 8**) :

- L'AG principalement accumulé dans les différentes souches était le C16:0, majoritairement dans les PL chez la souche sauvage (76%) et dans les TAG chez le mutant *fox2Δ* (56%), et le mutant *pxa1Δ* (83%). Le rapport quantité de C16:0 / quantité totale d'AG extraits était plus élevé dans les PL du mutant *fox2Δ* que dans ceux de la souche sauvage, et dans les TAG du mutant *pxa1Δ* que dans ceux de la souche sauvage.
- Les souches mutantes contenaient significativement moins de C18:1 que la souche sauvage dans les PL et les TAG ( $p < 0,01$ ). En revanche, les TAG du mutant *fox2Δ* contenaient significativement plus de C18:2 et C18:3 que ceux du mutant *pxa1Δ* et de la souche sauvage ( $p < 0,01$ ).
- Le rapport AG saturés / AG insaturés était comparable dans les PL des souches sauvage et *pxa1Δ* (compris entre 0,35 et 0,39), alors qu'il atteignait 0,68 dans les PL de la souche mutante *fox2Δ*.
- Dans les TAG, le rapport AG saturés / AG insaturés était plus faible chez la souche mutante *fox2Δ* (0,46) que chez la souche sauvage (0,68), alors qu'il était presque deux fois plus élevé chez le mutant *pxa1Δ* (1,3).

**Tableau 7. Répartition des différents acides gras entre les phospholipides (PL) et les triacylgcérols (TAG).**

Souche	C16:0		C16:1		C18:0		C18:1		C18:2		C18:3	
	PL (%)	TAG (%)										
Sauvage	76.4	23.6	77.6	22.4	79.8	20.2	86.4	13.6	89.3	10.7	90.7	9.3
<i>fox2Δ</i>	43.7	56.3	30.7	69.3	36.3	63.7	40.5	59.5	33.3	66.7	26.2	73.8
<i>pxa1Δ</i>	17.0	83.0	19.1	80.9	32.0	68.0	54.9	45.1	72.0	28.0	72.1	27.9

> 75% dans PL   
 PL (%) > TAG (%)   
 TAG (%) > PL (%)   
 > 75% dans TAG

**Tableau 8. Rapport acides gras saturés / acides gras insaturés**

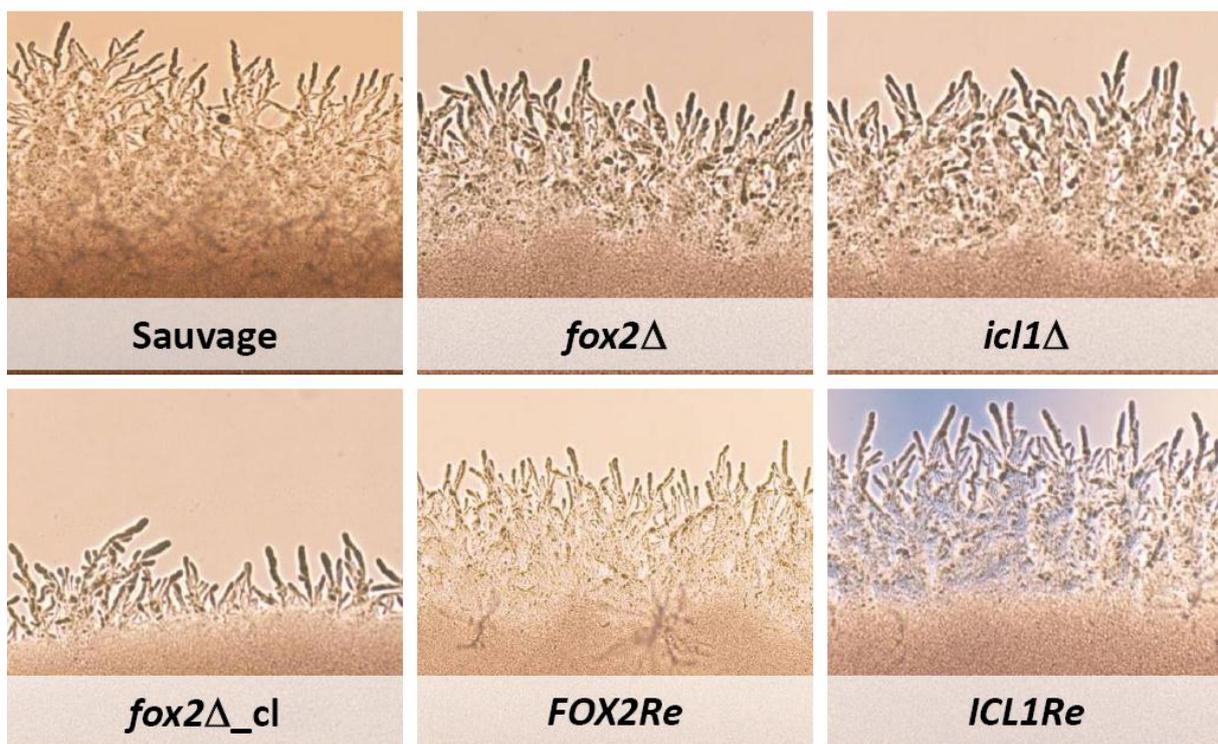
Souche	PL	TAG	PL + TAG
Sauvage	0.35	0.68	0.40
<i>fox2Δ</i>	0.68	0.46	0.53
<i>pxa1Δ</i>	0.39	1.30	0.93

PL : phospholipides, TAG : triacylgcérols

### 2.1.8 Pseudofilamentation

La capacité de pseudofilamentation des souches mutantes *icl1Δ*, *fox2Δ* et *fox2Δ\_cl*, et des souches révertantes *ICL1Re* et *FOX2Re* a été comparée à celle de la souche sauvage 6936. Des inocula de 5  $\mu$ l prélevés à partir de cultures en phase stationnaire en milieu complet YPD liquide ont été déposés sur du milieu solide YCB. Le milieu YCB induit la pseudofilamentation en raison d'une carence en source d'azote.

Après une incubation à 30°C, la périphérie des colonies a été observée au microscope toutes les 24h pendant 3 jours et la longueur des pseudofilaments a été mesurée (**Figure 28**). Toutes les souches étudiées étaient capables de pseudofilamenter, mais avec des vitesses d'élongation des pseudofilaments différentes (**Figure 29**). Pour la souche 6936, l'ensemble du contour de la colonie présentait une forte densité de pseudofilaments longs et ramifiés. Les souches *icl1Δ*, *fox2Δ*, *ICL1Re* et *FOX2Re* présentaient une pseudofilamentation comparable à celle de la souche sauvage, alors que le mutant *fox2Δ\_cl* présentait dès 24 h d'incubation un retard de pseudofilamentation. La vitesse de pseudofilamentation, calculée entre 48 et 72h d'incubation, était de l'ordre de 20  $\mu$ m/h pour les souches sauvage et *icl1Δ*, *fox2Δ*, *ICL1Re* et *FOX2Re* alors qu'elle n'était que de 16  $\mu$ m/h pour le mutant *fox2Δ\_cl*.



**Figure 28.** Pseudofilamentation de la souche sauvage 6936, des mutants *icl1Δ*, *fox2Δ* et *fox2Δ\_cl* et des révertant *ICL1Re* et *FOX2Re* sur milieu solide YCB. Photographies du contour des colonies après 24 h d'incubation, microscopie optique (x100).

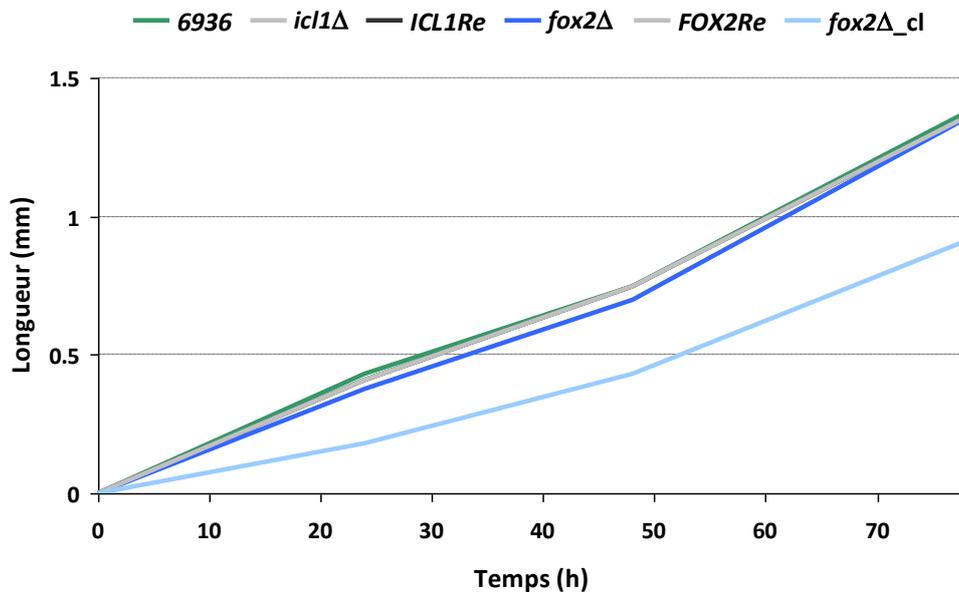


Figure 29. Mesure de l'élongation des pseudofilaments de la souche sauvage 6936, des mutants *icl1Δ*, *fox2Δ* et *fox2Δ\_cl* et des révertant *ICL1Re* et *FOX2Re* sur milieu solide YCB pendant 72h.

### 2.1.9 Reproduction sexuée

Les souches mutantes *icl1Δ*, *fox2Δ* et *fox2Δ\_cl* dérivant toutes de la souche sauvage 6936 de type sexuel *MATa*, elles ont été croisées avec la souche de référence CL38 de type sexuel *MATα* sur du milieu YCB, inducteur de la reproduction sexuée. Après 48 h d'incubation à température ambiante, les mélanges cellulaires ont été examinés dans une goutte d'eau entre lame et lamelle au microscope, afin de mettre en évidence des formes conjuguées, des asques et des ascospores caractéristiques du déroulement normal du cycle sexuel. Les observations réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence de différences dans l'aptitude à la reproduction sexuée des mutants par rapport à la souche sauvage 6936 (voir **Figure 50**, page 155).

## 2.2 Etude de la $\beta$ -oxydation des acides gras

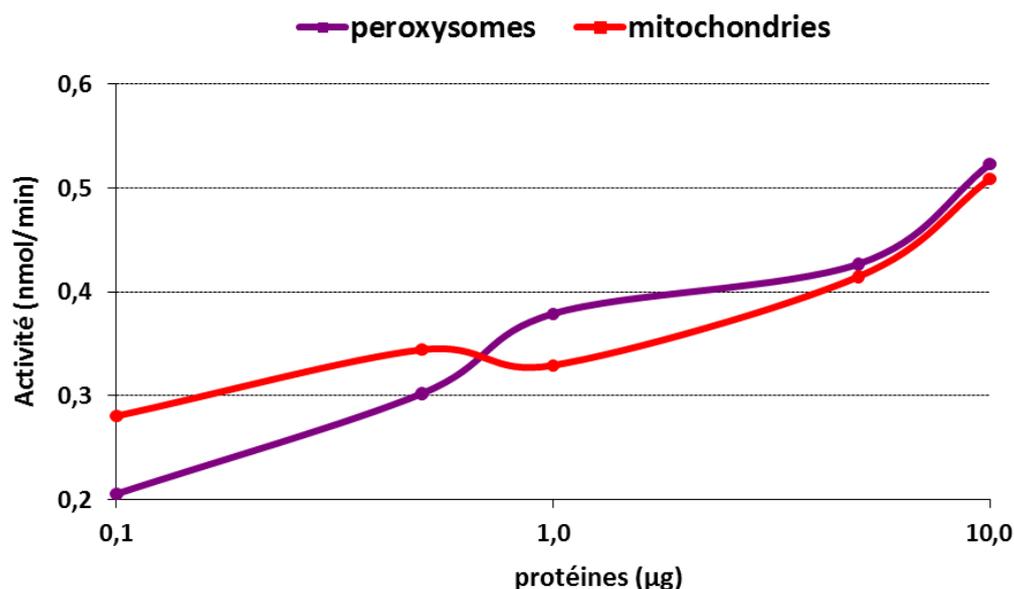
### 2.2.1 Etude du catabolisme du $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA

Comme décrit dans le manuscrit de l'article, la purification des fractions peroxysomales et mitochondriales sur gradient discontinu de saccharose s'accompagnait d'une contamination peroxysomale de la fraction mitochondriale. Cette contamination a été évaluée à environ 20 % pour la souche sauvage par les dosages enzymatiques des activités catalase et cytochrome c oxydase et par l'immunodétection par western-blot des protéines Icl1p et Fox2p.

Alors que chez les levures Ascomycètes la  $\beta$ -oxydation est décrite comme exclusivement localisée dans les peroxysomes, les premiers essais montraient une consommation de  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA par les mitochondries. Afin de nous assurer que la consommation de  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA n'était pas liée à la contamination par les peroxysomes de la fraction mitochondriale, et donc à la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, la consommation de  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA par la fraction mitochondriale de la souche sauvage a été mesurée pour des

concentrations décroissantes en protéines allant jusqu'à 0,1  $\mu\text{g}$  (100 fois moins que la quantité de protéines initialement utilisée). Si le catabolisme du  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA était lié aux protéines peroxysomales présentes dans la fraction mitochondriale, il diminuerait proportionnellement à la diminution de la quantité totale de protéines présentes dans le milieu réactionnel, jusqu'à devenir négligeable.

Les activités spécifiques mesurées dans la fraction mitochondriale sont restées similaires à celles mesurées dans la fraction peroxysomale, quelle que soit la quantité de protéines (**Figure 30**). La contamination de la fraction mitochondriale par les peroxysomes ne pouvait donc pas à elle seule expliquer la consommation de  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA observée dans la fraction mitochondriale, ce qui confortait l'existence d'un catabolisme mitochondrial du  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA chez *C. lusitaniae*.

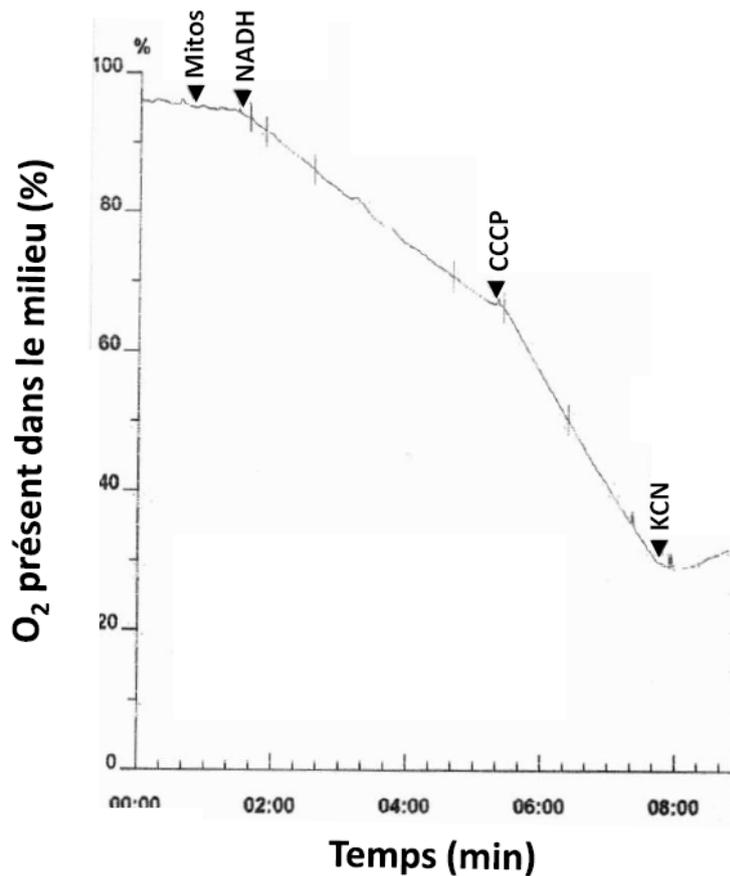


**Figure 30.** Activité de catabolisme du  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA dans les fractions peroxysomale et mitochondriale de la souche sauvage 6936. L'activité a été mesurée avec différentes quantités de protéines, de 10  $\mu\text{g}$  à 0,1  $\mu\text{g}$  par essai.

### 2.2.2 Etude de la respiration mitochondriale sur mitochondries purifiées

A la vue des résultats obtenus au cours de l'étude du catabolisme du  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA, un nouvel objectif était de démontrer que la mitochondrie était capable d'utiliser les AG comme substrat respiratoire chez *C. lusitaniae*. Les premières expériences de respiration mitochondriale ont été effectuées avec des mitochondries purifiées à partir de sphéroplastes sans avoir recours à un gradient de saccharose afin de ne pas altérer la membrane externe mitochondriale.

Les consommations d'oxygène mesurées après l'ajout de NADH utilisé comme substrat respiratoire, puis de CCCP ou ADP comme agents découplants, et enfin de KCN ou de myxothiazole comme inhibiteurs respiratoires ont permis de vérifier que les mitochondries étaient couplées et donc bien fonctionnelles (**Figure 31**).

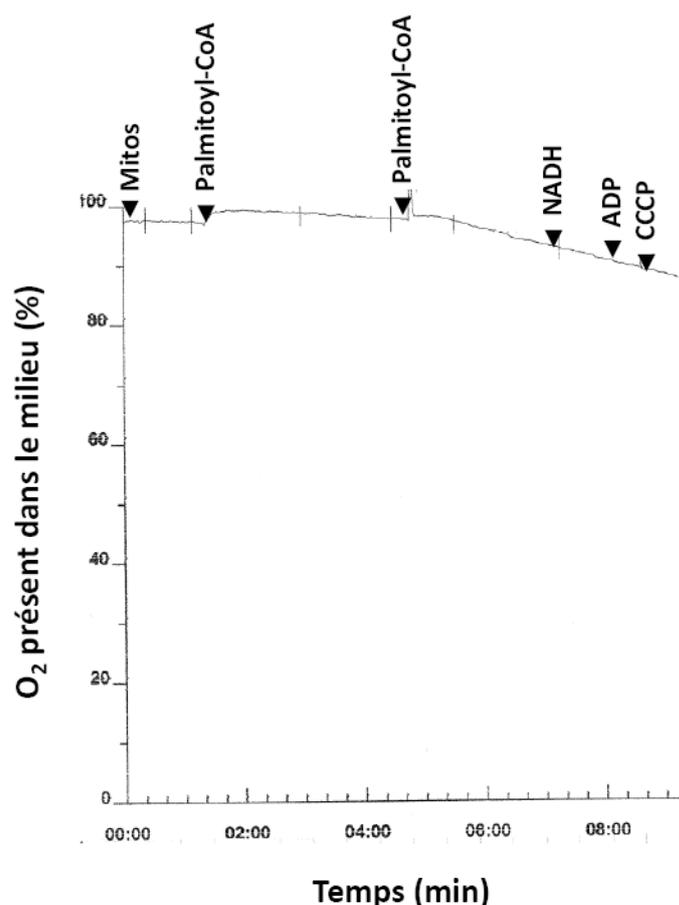


**Figure 31. Respiration mitochondriale (oxymétrie) observée pour les mitochondries purifiées de la souche sauvage 6936 en présence de NADH comme substrat respiratoire.** L'ajout de NADH induit la consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire. Le CCCP, agent découplant, dissipe le gradient de protons, inhibant la synthèse d'ATP : le transfert d'électrons et la consommation d'O<sub>2</sub> par le complexe IV sont à leur maximum. L'ajout de KCN inhibe le complexe IV et entraîne l'arrêt de la consommation d'O<sub>2</sub>.

Pour mesurer la respiration mitochondriale en utilisant l'acyl-CoA comme substrat, le milieu réactionnel était supplémenté en ATP (1 mM final) et en carnitine (1 mM final) afin de faciliter l'import mitochondrial d'acyl-CoA. Une augmentation significative de la consommation d'oxygène par les mitochondries de la souche mutante *pxa1Δ* et de la souche sauvage 6936 en présence de palmitoyl-CoA, de lauroyl-CoA ou de stéaroyl-CoA n'était observée que pour des concentrations en substrat  $\geq 0,6$  mM. Cependant, les mitochondries ne semblaient plus fonctionnelles, puisque l'addition de NADH puis d'ADP ou de CCCP n'avaient plus d'effet sur la consommation d'O<sub>2</sub> mesurée (**Figure 32**). L'emploi du palmitoyl-carnitine comme substrat respiratoire jusqu'à des concentrations de 0,5 mM, pour faciliter l'import mitochondrial par la carnitine-palmitoyl transférase I, donnait les mêmes résultats.

Nous avons alors supposé qu'à ces concentrations élevées ( $\geq 0,6$  mM), les acyl-CoA devenaient détergents et solubilisait les membranes mitochondriales. Pour vérifier cette hypothèse, les mitochondries purifiées (0,3 mg de protéines dans 1 mL de tampon R sans BSA) ont été incubées sous agitation douce en présence d'une concentration croissante de palmitoyl-CoA pendant 5 minutes. Après une centrifugation de 12000g pendant 15 min, la quantité de protéines présentes dans le surnageant a été dosée selon la méthode de Bradford (**Tableau 9**). Pour une concentration de palmitoyl-CoA de 2,5  $\mu$ M, la quantité de protéines dosée était déjà deux fois plus importante que celle des mitochondries témoins incubées en l'absence de palmitoyl-CoA, et trois fois plus pour des concentrations de 25  $\mu$ M de palmitoyl-CoA. Ces résultats pouvaient expliquer l'échec des expériences de respiration sur les mitochondries purifiées qui nécessitaient des concentrations de 600  $\mu$ M d'acyl-CoA. Nous avons donc dû adapter la méthodologie pour réaliser les expériences sur des sphéropastes

perméabilisés par l'action de la nystatine (polyène) et dans lesquels les mitochondries ne sont pas exposées directement à l'action détergente des acyl-CoA (voir manuscrit de l'article).



**Figure 32. Consommation d'oxygène par les mitochondries purifiées de la souche sauvage 6936 en présence de palmitoyl-CoA comme substrat respiratoire.** L'addition de palmitoyl-CoA (0,3 mM final) n'a pas d'effet sur la consommation d'O<sub>2</sub>. En présence de 0,6 mM final de palmitoyl-CoA, une augmentation de la consommation d'O<sub>2</sub> est notée. Cependant les mitochondries ne sont alors plus fonctionnelles puisque l'ajout d'un autre substrat respiratoire, le NADH ou d'un agent découplant (ADP ou CCCP) n'a aucun effet.

**Tableau 9. Quantification de l'effet détergent du palmitoyl-CoA sur les mitochondries purifiées de la souche sauvage.**

Concentration finale de palmitoyl-CoA (μM)	Protéines dans 100 μL de surnageant (μg)
0	5,9
2,5	11,3
5	11,8
10	10,7
25	14,4

0,3 mg de mitochondries purifiées ont été incubées en présence de différentes concentrations de palmitoyl-CoA pendant 5 minutes.

### 2.3 Etude de virulence des mutants *icl1Δ* et *fox2Δ*

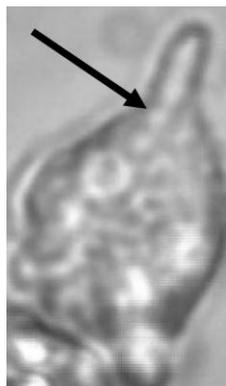
La caractérisation phénotypique des mutants *icl1Δ* et *fox2Δ*, et de leurs révertants respectifs a été complétée par une étude de la virulence *in vitro* (par infection de macrophages murins) et *in vivo* (dans un modèle murin de candidémie).

#### 2.3.1 Infection de macrophages

Les macrophages murins J774.1 ont été infectés à T0 par les différentes souches (*icl1Δ*, *ICL1Re*, *fox2Δ*, *FOX2Re* et 6936) selon un rapport de deux levures pour un macrophage.

L'observation au microscope optique inversé de la souche de référence 6936 a montré que dans les conditions de culture décrites, le phénomène de phagocytose débutait dès les 15 premières minutes d'infection. Les levures de la souche 6936, endocytées à l'état de blastospore, commençaient à former des pseudofilaments à T+3 heures, l'extension pseudohyphale provoquant la déformation des macrophages (**Figure 33**). Après six heures d'incubation, plusieurs pseudofilaments intra-phagocytaires étaient produits par la souche sauvage 6936 alors que dans le même temps, aucune pseudofilamentation n'était observée pour les quatre autres souches (mutantes et révertantes) étudiées. Ces données ont été confirmées par l'analyse de cocultures de macrophages avec les différentes souches réalisées sur des lames Labtek<sup>®</sup> et observées en microscopie optique après coloration au MGG (**Figure 34**).

Afin de quantifier la résistance à la lyse macrophagique des levures internalisées, nous avons réalisé des tests de viabilité, qui ont été répétés à trois reprises. Les résultats des tests de viabilité des levures réalisés à T+1, T+3 et T+6 heures après infection sont rapportés dans la **Figure 35**. À T+3 heures, une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la viabilité du mutant *icl1Δ* (54,6 %) en comparaison avec la souche sauvage 6936 (75 %) a été observée. À T+6 heures, la viabilité des levures *icl1Δ* internalisées augmentait et la différence avec celle de la souche sauvage n'était plus significative ( $p = 0,6$ ). Aucune différence significative entre la viabilité de *fox2Δ* et celle de la souche sauvage n'a été établie. Les révertants possèdent également une résistance à la lyse macrophagique similaire à celle de la souche sauvage.



**Figure 33.** Observation de cocultures de macrophages murins J774.1 avec la souche sauvage 6936 de *C. lusitaniae* en microscopie optique inversée avec contraste de phase (x400), 5 heures après le début de l'infection. La flèche montre un pseudofilament de *C. lusitaniae* intramacrophagique.

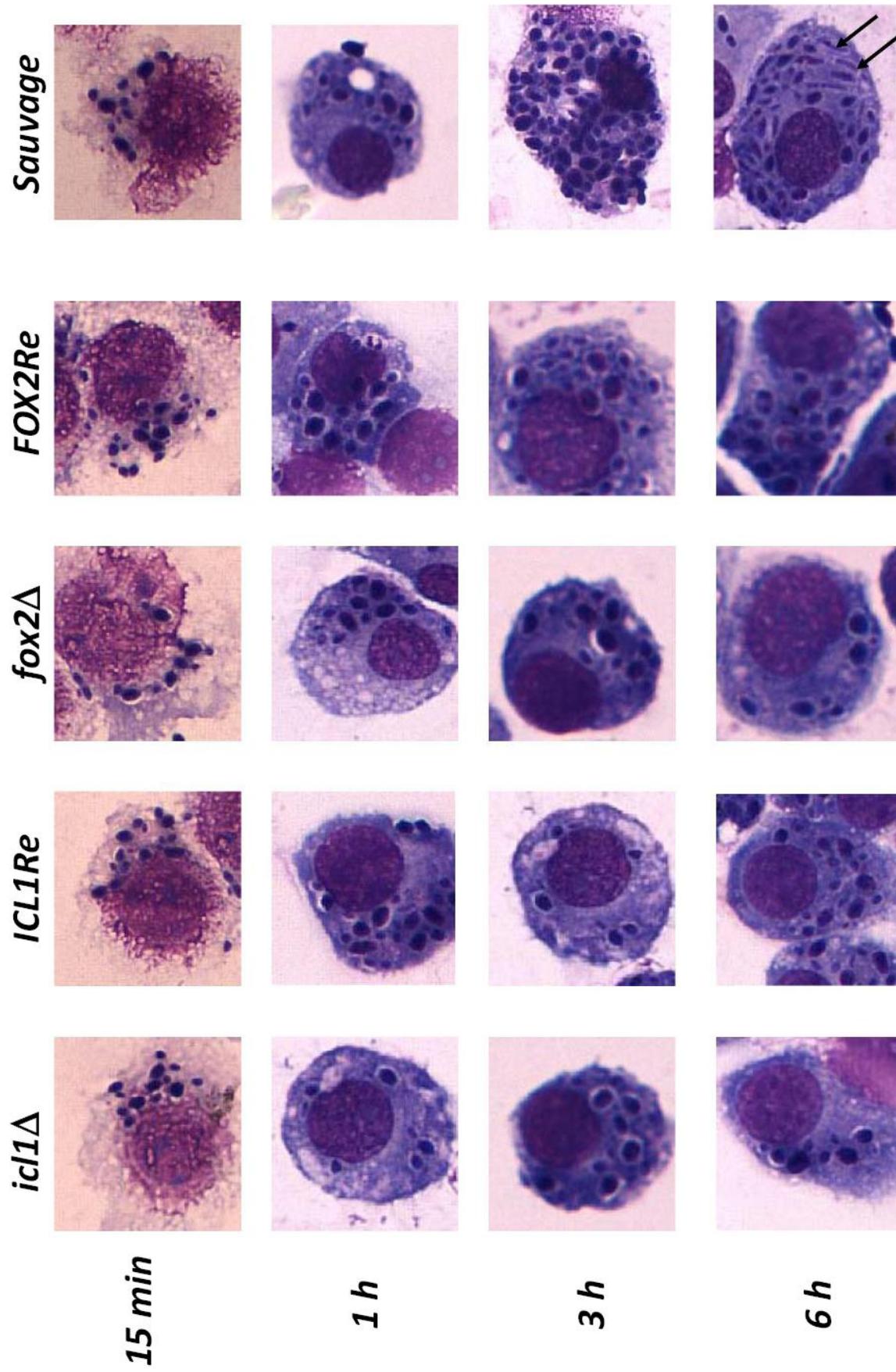
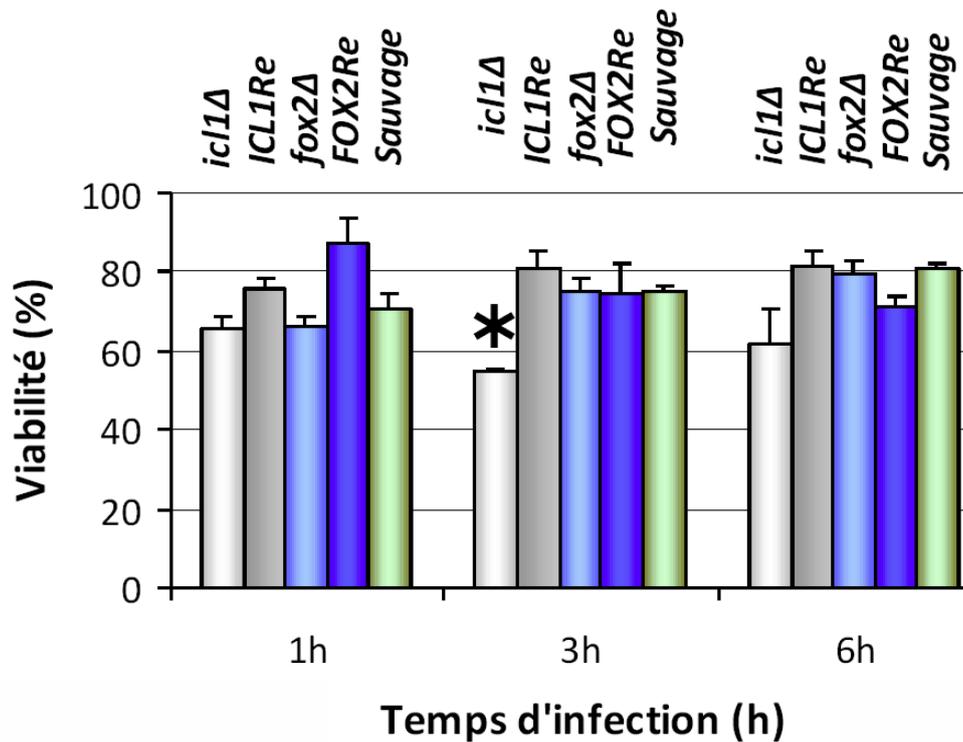


Figure 34. Infection *in vitro* de macrophages murins J774.1 avec les mutants *icl1Δ* et *fox2Δ*, les révertants *ICL1Re* et *FOX2Re* et la souche sauvage 6936 de *C. lusitanae*. Observation à 15 minutes, 1, 3 et 6 heures des cocultures réalisées sur Labtek®. Microscopie optique x1000 (immersion). Coloration au MGG. Les flèches montrent des pseudofilaments intra-macrophagiques.



**Figure 35. Etude de la viabilité des mutants *icl1Δ* et *fox2Δ*, des révertants *ICL1Re* et *FOX2Re* et de la souche sauvage 6936 de *C. lusitaniae* à différents temps d'infection macrophagique.** Les mesures à 1, 3 et 6 heures ont été répétées trois fois. Un test de Student a permis de montrer une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre la viabilité de *icl1Δ* et celle de la souche sauvage à T+3 heures (astérisque).

### 2.3.2 Infection sur modèle murin

Pour un inoculum calibré à  $5 \cdot 10^7$  levures, l'inoculation des souris par voie intraveineuse avec la souche sauvage se traduit par une infection disséminée aiguë. Dix jours après infection, le taux de mortalité était de 100 % (6/6) chez les souris infectées avec la souche sauvage, *fox2Δ* ou son révertant, et de 17 % (1/6) chez celles infectées par *icl1Δ*. Des éléments lévuriformes et pseudomycéliens ont été observés à l'examen direct des appositions de tous les organes prélevés (**Figure 36**) et la charge fongique était comprise entre  $10^9$  et  $10^{12}$  UFC/organe. Dans le même temps, aucune mortalité n'était constatée chez les groupes témoins non immunodéprimés non infectés et immunodéprimés non infectés (**Figure 37**).

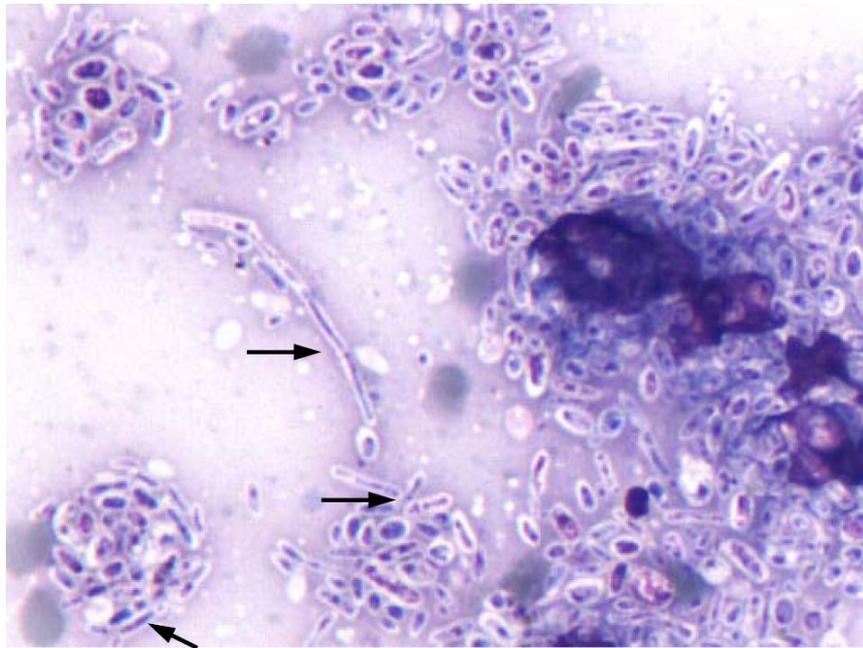


Figure 36. Apposition d'organe prélevé chez une souris infectée par le mutant *fox2Δ* de *C. lusitaniae*. Apposition réalisée à partir du cœur prélevé chez une souris immunodéprimée par injections intrapéritonéales de cyclophosphamide, infectée par la souche mutante *fox2Δ* de *C. lusitaniae* et décédée 4 jours après l'inoculation par voie intraveineuse de  $5 \times 10^7$  levures. Microscopie optique x500 (immersion). Coloration au MGG. De très nombreux éléments lévuriformes et quelques éléments pseudomycéliens sont observés (flèches).

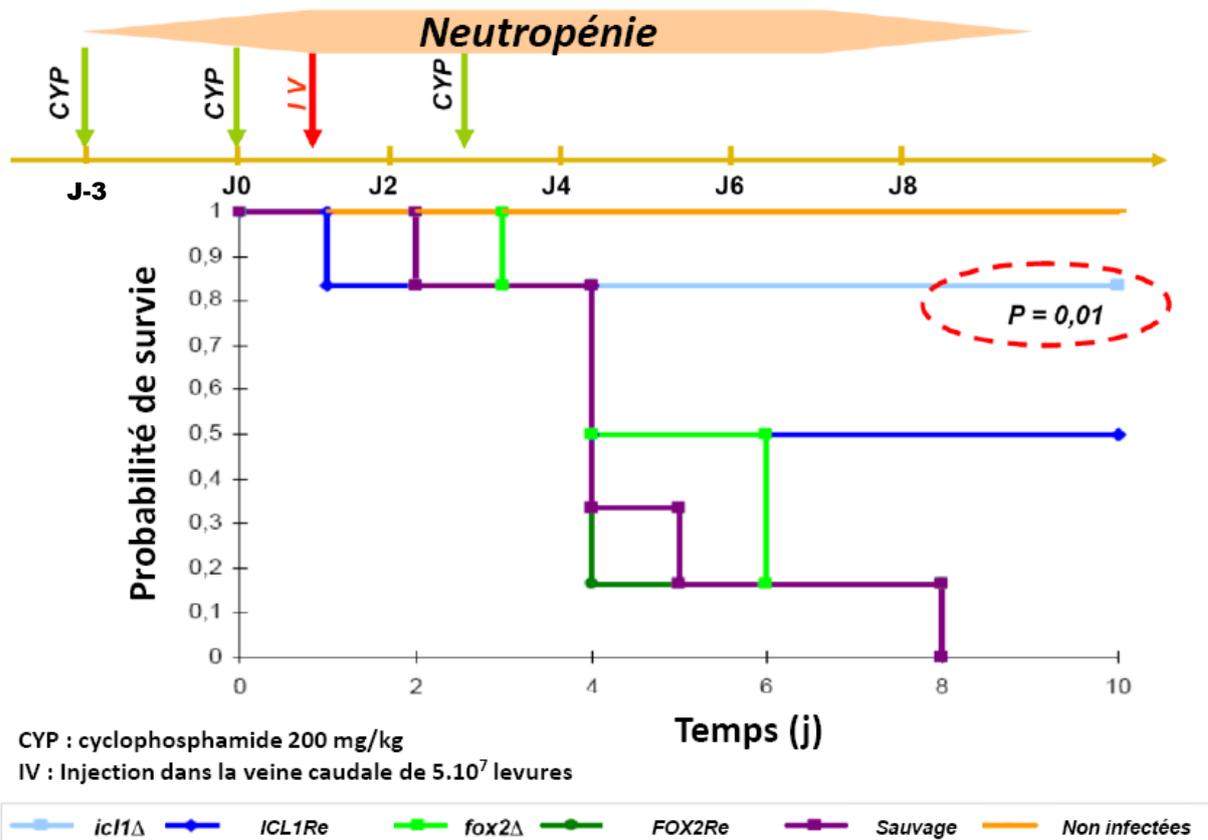


Figure 37. Représentation de Kaplan-Meier de la probabilité de survie des souris infectées par les différentes souches de *C. lusitaniae*.

La valeur du test de log-rank, réalisé par comparaison entre les courbes de survie obtenues après infection avec *icl1*Δ ou avec la souche sauvage, était de 6,73 (valeur critique : 3,84 ; p=0,01). Le mutant *icl1*Δ est donc significativement hypovirulent, comme précédemment décrit chez *C. albicans* (Lorenz & Fink, 2001; Piekarska *et al.*, 2006; Ramírez & Lorenz, 2007).

A l'inverse, les analyses statistiques comparant les courbes de survie obtenues après infection des souris avec le révertant *ICL1Re*, le mutant *fox2*Δ ou son révertant par rapport à la souche sauvage n'ont pas montré de différence significative (**Tableau 10**). Les résultats des essais de virulence *in vivo* sont donc compatibles avec ceux des essais *in vitro*.

**Tableau 10.** Analyse statistique du temps de survie des souris infectées par les souches mutantes *icl1*Δ et *fox2*Δ, révertantes *ICL1Re* et *FOX2Re* et sauvage 6936 de *C. lusitaniae*. Les valeurs statistiques du test de log-rank et de p ont été calculées par comparaison avec la souche sauvage.

Souche	Nombre de souris	Temps de survie moyen (j)	Test de log-rank	p
<i>icl1</i> Δ	6	-	6,73	0,01
<i>ICL1Re</i>	6	3,5	2,01	0,16
<i>fox2</i> Δ	6	5,17	0,25	0,62
<i>FOX2Re</i>	6	4,33	0,02	0,88
<i>Sauvage</i>	6	4,5	-	-

## Conclusion sur les données complémentaires au manuscrit

Au cours de ce travail, nous avons montré qu'un mutant *fox2Δ* de *C. lusitaniae*, dont le gène de la protéine multifonctionnelle de la β-oxydation était invalidé, était toujours capable de croître sur AG utilisé comme seule source de carbone, suggérant l'existence chez *C. lusitaniae* d'une voie alternative de catabolisme des AG. En utilisant un acyl-CoA radiomarqué, le <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA, nous avons démontré que le catabolisme des AG était localisé à la fois dans les fractions peroxysomales et mitochondriales, et que le mutant *fox2Δ* était incapable de cataboliser le palmitoyl-CoA dans la fraction mitochondriale, laissant penser que la voie mitochondriale était Fox2p-dépendante. Ces résultats ont été confirmés par l'immunolocalisation des protéines Icl1p et Fox2p par western-blot. Enfin, des tests de respiration mitochondriale ont montré que les mitochondries étaient capables de consommer de l'oxygène à partir d'acyl-CoAs. Ce travail constitue ainsi la première démonstration de l'existence d'une voie mitochondriale de β-oxydation chez une levure Ascomycète. C'est aussi la première démonstration chez un organisme eucaryote de la localisation mitochondriale d'une protéine multifonctionnelle de la β-oxydation peroxysomale.

Toutefois, la séquence codante de *FOX2* n'était que partiellement délétée chez le mutant *fox2Δ*. La délétion couvrant totalement le domaine déshydrogénase B et provoquant un décalage du cadre ouvert de lecture et l'apparition d'un codon stop en amont du domaine hydratase, il n'était pas exclu que le domaine déshydrogénase A de Fox2p puisse être transcrit chez *fox2Δ*. Les expériences de western-blot réalisées avec un anticorps polyclonal anti-Fox2p n'avaient cependant pas permis de détecter dans les extraits protéiques du mutant *fox2Δ* la présence d'une protéine Fox2p ou d'un peptide reconnu par l'anticorps. Afin de confirmer le phénotype du mutant *fox2Δ*, nous avons construit un deuxième mutant (*fox2Δ\_cl*) en adaptant la stratégie de PCR chevauchante récemment développée par notre équipe (El-Kirat-Chatel *et al.*, 2011). La totalité de la séquence codante de *FOX2* a ainsi été délétée dans le mutant *fox2Δ\_cl*. Le phénotype d'assimilation des sources de carbone *in vitro* de *fox2Δ\_cl* s'est révélé identique à celui de *fox2Δ*, confirmant l'existence d'une voie de catabolisme des AG indépendante de Fox2p chez *C. lusitaniae*. Néanmoins, sa capacité à pseudofilamenter sur un milieu dépourvu en source azotée était très inférieure à celle du mutant *fox2Δ* et de la souche sauvage. Des expériences complémentaires sont requises pour savoir si des domaines fonctionnels de Fox2p sont nécessaires pour la pseudo-filamentation.

La voie d'import peroxysomal et mitochondrial des AG reste à préciser chez *C. lusitaniae*. En effet, nous avons observé qu'un mutant *pxa1Δ*, invalidé pour le gène codant pour une protéine responsable de l'import peroxysomal des AG à longue chaîne, était toujours capable de croître sur AG à longue chaîne utilisé comme seule source de carbone. Cependant, l'import peroxysomal des AG semblait affecté puisque le mutant *pxa1Δ* accumulait significativement plus de TAG (impliqués dans le stockage carboné à partir des AG) que la souche sauvage après croissance sur un milieu contenant de l'acide palmitique (C16:0) comme seule source de carbone. Le double mutant [*fox2, pxa1*]Δ présentait le même phénotype d'assimilation des sources de carbone que le mutant *fox2Δ*. Puisque le catabolisme mitochondrial des AG devrait être inhibé chez le double mutant [*fox2, pxa1*]Δ comme chez *fox2Δ*, il est probable que les AG soient catabolisés dans les peroxysomes et donc importés par un système de transport alternatif à Pxa, comme cela a récemment été suggéré chez *P. anserina* (Boisnard *et al.*, 2009).

Afin de préciser le lien entre catabolisme lipidique et virulence, nous avons entrepris des essais préliminaires d'étude de la virulence *in vitro* (sur macrophages murins) et *in vivo* (dans un modèle murin de candidémie) des mutants *icl1Δ* et *fox2Δ*. Nous avons observé que l'inactivation des gènes *ICL1* et *FOX2* retardait la pseudofilamentation de *C. lusitaniae* dans les macrophages : après 6 h d'incubation, seule la souche sauvage était capable de développer

des pseudofilaments intra-macrophagiques. La réalisation de tests de viabilité à partir des levures phagocytées a montré que seul *icl1Δ* présentait une viabilité significativement réduite au temps T+3h après phagocytose. De même, seul *icl1Δ* était hypovirulent dans le modèle murin de candidémie. L'ensemble des résultats suggère qu'un cycle glyoxylique fonctionnel est essentiel à la survie de *C. lusitaniae* dans le phagolysosome. Le cycle du glyoxylate est également essentiel à la virulence de *C. albicans* (Lorenz & Fink, 2001; Piekarska *et al.*, 2006). En revanche, alors que le mutant *fox2Δ* de *C. albicans*, incapable de pousser sur AG utilisés comme seule source de carbone, est hypovirulent dans deux modèles murins de candidémie (Lorenz & Fink, 2001; Piekarska *et al.*, 2006), le mutant *fox2Δ* de *C. lusitaniae* possède toujours un catabolisme des AG fonctionnel et sa virulence *in vitro* et *in vivo* est comparable à celle de la souche sauvage. Une étude plus approfondie de la virulence des mutants *icl1Δ* et *fox2Δ* pourra être réalisée à l'aide du protocole innovant d'interaction levure-macrophage et d'analyse en cytométrie développé par notre équipe (El Kirat-Chatel, 2010 ; Dementhon *et al.*, publication en cours). Néanmoins, le seul moyen pour préciser le rôle du catabolisme lipidique dans la virulence de *C. lusitaniae* sera d'identifier les gènes permettant au mutant *fox2Δ* d'assimiler les AG, afin de construire un mutant dont le catabolisme lipidique est totalement invalidé.

**- Partie II -**

**Etude fonctionnelle des gènes *FOX1* et *FOX3* chez *Candida lusitaniae***

## Introduction

Notre travail a permis jusqu'à présent de mettre en évidence l'existence de trois voies de catabolisme des acides gras chez *C. lusitaniae* :

- Une voie peroxisomale Fox2p-dépendante,
- Une voie peroxisomale Fox2p-indépendante,
- Une voie mitochondriale Fox2p-dépendante.

Notre objectif est donc de poursuivre la caractérisation de la  $\beta$ -oxydation chez *C. lusitaniae*, à partir de ce qui est déjà connu chez les autres levures. Nous nous sommes donc intéressés aux autres gènes qui interviennent dans la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, *FOX1* et *FOX3*, codant respectivement pour l'acyl-CoA oxydase et la 3-kétoacyl-CoA thiolase, responsables de la première et de la dernière réaction de la  $\beta$ -oxydation.

Ce travail s'est avéré complexe puisque nous avons identifié 3 paralogues pour chacun de ces gènes chez *C. lusitaniae*. Nous avons donc dans un premier temps réalisé une étude de leur expression par RT-PCR semi-quantitative, afin de vérifier qu'ils étaient tous exprimés. Les différents paralogues ont ensuite été invalidés à l'aide d'une stratégie de PCR chevauchantes pour la construction des cassettes de délétion. De la même façon, des doubles et triples mutants ont également été construits. Nous avons ensuite déterminé pour les différentes souches obtenues le profil d'assimilation *in vitro* de différentes sources de carbone, ainsi que leur composition en acides gras, et nous avons précisé l'impact de ces mutations sur la vitesse de pseudofilamentation et sur la reproduction sexuée.

# 1 Identification des gènes *FOX1* et *FOX3*

Les séquences peptidiques des gènes *FOX1* et *FOX3* de *S. cerevisiae* ont été récupérées à partir de la banque de données *Saccharomyces cerevisiae* genome database, puis utilisées pour rechercher dans les génomes de *Candida albicans* (*Candida albicans* database), de *Yarrowia lipolytica* (Génolevures, *Yarrowia lipolytica* database) et dans celui de *Candida lusitanae* (*Candida lusitanae* Database) les séquences nucléotidiques des gènes orthologues en utilisant le logiciel *tBLASTn* (Protein query/Nucleotide database).

Trois séquences codantes homologues à *FOX1* ont été identifiées chez *C. lusitanae* (**Tableau 11**)

- *FOX1a* : séquence de 2124 nt (CLUG\_00156.1) codant pour une protéine de 707 acides aminés (aa), présentant 43% d'identité et 59% de similarité avec la protéine Fox1p de *S. cerevisiae*.
- *FOX1b* : séquence de 2226 nt (CLUG\_00696.1) codant pour une protéine de 741 aa, présentant 39% d'identité et 53% de similarité avec la protéine Fox1p de *S. cerevisiae*.
- *FOX1c* : séquence de 2115 nt (CLUG\_00697.1) codant pour une protéine de 704 aa, présentant 42% d'identité et 58% de similarité avec la protéine Fox1p de *S. cerevisiae*.

**Tableau 11.** Pourcentages d'identité et de similarité entre les protéines Fox1p de *C. lusitanae* et celles de *S. cerevisiae*, *C. albicans* et *Y. lipolytica*.

Protéine	Identité (%) / Similarité (%)		
	Fox1ap (CLUG_00156)	Fox1bp (CLUG_00696)	Fox1cp (CLUG_00697)
Fox1p <i>S. cerevisiae</i>	43 / 59	39 / 53	42 / 58
Pox1p <i>C. albicans</i>	54 / 69	44 / 62	54 / 71
Pox2p <i>C. albicans</i>	47 / 66	51 / 67	51 / 68
Pox3p <i>C. albicans</i>	58 / 74	50 / 67	62 / 76
Pox1p <i>Y. lipolytica</i>	43 / 61	40 / 60	40 / 57
Pox2p <i>Y. lipolytica</i>	45 / 61	42 / 60	39 / 59
Pox3p <i>Y. lipolytica</i>	46 / 60	44 / 61	39 / 56
Pox4p <i>Y. lipolytica</i>	42 / 60	40 / 59	39 / 58
Pox5p <i>Y. lipolytica</i>	41 / 60	43 / 59	41 / 57
Pox6p <i>Y. lipolytica</i>	41 / 59	41 / 59	40 / 58
Fox1ap (CLUG_00156)	100 / 100	48 / 65	54 / 71
Fox1bp (CLUG_00696)	48 / 65	100 / 100	48 / 64
Fox1cp (CLUG_00697)	54 / 71	48 / 64	100 / 100

Nous avons recherché leurs homologies avec les 3 protéines orthologues de *C. albicans* et les 6 de *Y. lipolytica* (**Tableau 11**). Les séquences de ces protéines semblent peu divergentes entre espèces et au sein du même génome. Les trois paralogues de *C. lusitanae* sont situés sur le

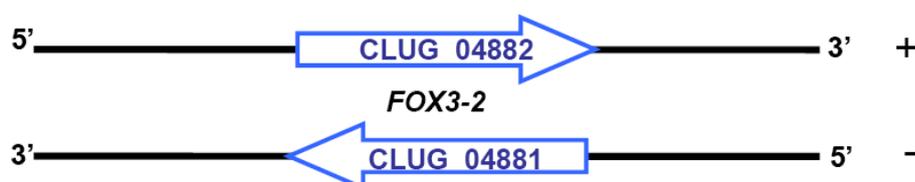
même chromosome correspondant au Contig 1 : 1095 kpb séparent *FOX1a* de *FOX1b*, qui n'est distant de *FOX1c* que de 615 pb. Les trois protéines Fox1p de *C. lusitaniae* ne possèdent pas de signal d'adressage peroxysomal individualisable selon les critères de Neuberger *et al.* (Neuberger *et al.*, 2003) et Miyata *et al.* (Miyata *et al.*, 2009).

Trois gènes potentiels orthologues à *FOX3* ont été identifiés chez *C. lusitaniae* (**Tableau 12**) :

- *FOX3-1* : séquence de 1317 nt (CLUG\_05112.1) codant une protéine de 438 aa, présentant 32% d'identité et 49% de similarité avec la protéine Fox3p de *S. cerevisiae*.
- *FOX3-2* : locus possédant deux cadres ouverts de lecture, sur chacun des deux brins plus et moins de l'ADN (**Figure 38** et **Figure 40**). Le brin plus contient une séquence de 1251 nt (CLUG\_04882.1) codant une protéine de 416 aa (Fox3-2bp) qui présente 57% d'identité et 69% de similarité avec la protéine Fox3p de *S. cerevisiae*. Le brin moins comporte une séquence de 1185 nt (CLUG\_04881.1) codant une protéine de 394 aa (Fox3-2ap) qui possède 32% d'identité et 49% de similarité avec la protéine Fox3p de *S. cerevisiae*.

**Tableau 12. Pourcentages d'identité et de similarité entre les protéines Fox3-1p , Fox3-2ap, Fox3-2bp de *C. lusitaniae* et Fox3p de *C. albicans*.**

Protéine	Identité (%) / Similarité (%)			
	Fox3p <i>C. albicans</i>	Fox3-1p (CLUG_05112)	Fox3-2ap (CLUG_04881)	Fox3-2bp (CLUG_04882)
Fox3p <i>C. albicans</i>	100	33	75	59
Fox3-1p (CLUG_05112)	52	100	9,5	29,3
Fox3-2ap (CLUG_04881)	55	21,2	100	12,3
Fox3-2bp (CLUG_04882)	85	18,2	16,1	100



**Figure 38. Locus *FOX3-2* portant sur le brin plus le cadre ouvert de lecture CLUG\_04882 et sur le brin moins le cadre de lecture CLUG\_04881.**

Les protéines Fox3p de *C. lusitaniae* ont des séquences assez divergentes : elles montrent des pourcentages d'identité et de similarité avec la protéine Fox3p de *C. albicans* supérieurs à ceux obtenus lorsqu'on les compare entre elles. Les trois paralogues de *C. lusitaniae* sont situés sur le même chromosome (Contig 6, 450 kpb séparent *FOX3-1* de *FOX3-2*). Pour simplifier, nous utiliserons indifféremment dans ce manuscrit les termes de gènes ou de loci *FOX3-1* et *FOX3-2*, tout en sachant que le locus *FOX3-2* contient deux cadres ouverts de lecture (*FOX3-2a* et *FOX3-2b*).

### 3 Analyses transcriptomiques par RT-PCR

L'expression des gènes *FOX1a*, *FOX1b*, *FOX1c*, *FOX3-1*, *FOX3-2a* et *FOX3-2b* chez les souches sauvage 6936 et mutante *fox2Δ* a été étudié par RT-PCR semi-quantitative après une culture sur milieu riche ou contenant un AG comme seule source de carbone. Les cultures ont été réalisées à partir d'un inoculum calibré de levures en phase stationnaire (issues d'une préculture de 24h en milieu YPD liquide). Le gène constitutif *EF1α* (Elongation Factor 1 alpha) a été utilisé comme témoin d'expression. Les ARN ont été extraits et purifiés après des cultures de 4h en milieux liquides YPD et YNB + 2% C18:1 (acide oléique) et 6h en milieux solides YPD et YNB + 2% C16:0 (acide palmitique). Les ADNc ont été amplifiés par PCR à l'aide de couples d'amorces spécifiques de chaque séquence, en même temps que des témoins négatifs d'amplification constitués par les ARN non rétrotranscrits (**Figures 39 à 41**). Les niveaux d'expression des gènes *FOX1* et *FOX3* ont été normalisés par rapport à l'expression d'*EF1α*.







FOX3-2a **TT**TCGAT**CTTGCCAAGCCGCAAAGTCCCTGA**TTATCTGACACAAACACCATAAAACATAAAAAATGGATAGATTGAACAT 80  
 FOX3-2b -----ATGGATAGATTGAACAT 17  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a GTTGGGTGGGCAGTTGAACCCATCTTCCAAGCAGGCATTGTTGCAAAAAAACCCGGACGATGTTGTCATTGTCGGCGCGT 160  
 FOX3-2b GTTGGGTGGGCAGTTGAACCCATCTTCCAAGCAGGCATTGTTGCAAAAAAACCCGGACGATGTTGTCATTGTCGGCGCGT 97  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a ACAGAACGGCCATTGCCAAGGGCGGCCGGGGCAGCTTCAAAGATGTTGGGTTCGGACTGGATCTTGACCAAGTTTTTGGAG 240  
 FOX3-2b ACAGAACGGCCATTGCCAAGGGCGGCCGGGGCAGCTTCAAAGATGTTGGGTTCGGACTGGATCTTGACCAAGTTTTTGGAG 177  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a GCCTTTTTGAAGAAGCAAACGTTGGACCCAAAATTGATTGAAGACGTTGGCCGTGGGCAATGTGTTGAACCGTCCCGCTGG 320  
 FOX3-2b GCCTTTTTGAAGAAGCAAACGTTGGACCCAAAATTGATTGAAGACGTTGGCCGTGGGCAATGTGTTGAACCGTCCCGCTGG 257  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a TGGCTCCGAACACCGTGGTGCCTGCTTTCAGCAGGGTATTCCAAACAGCTCGGCATTTATTGCTCTCAACAGACAGTGT 400  
 FOX3-2b TGGCTCCGAACACCGTGGTGCCTGCTTTCAGCAGGGTATTCCAAACAGCTCGGCATTTATTGCTCTCAACAGACAGTGT 337  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a CGTCTGGCTTGATGGCCATTTTCGAAATCGCCAACAAGATCAAGTGTGGCGAGATTGACTGCGGTATCGGCCCGCGGTGTC 480  
 FOX3-2b CGTCTGGCTTGATGGCCATTTTCGAAATCGCCAACAAGATCAAGTGTGGCGAGATTGACTGCGGTATCGGCCCGCGGTGTC 417  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a GAGTCTATGCTGTCCAACACGGGCCAGTCGATTCCATAAGTGGACCCCAAGTTGCAAGAGAATGAGGAGATGGCCAA 560  
 FOX3-2b GAGTCTATGCTGTCCAACACGGGCCAGTCGATTCCATAAGTGGACCCCAAGTTGCAAGAGAATGAGGAGATGGCCAA 497  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a GTGTTTGATTCCAATGGGTATCACGAACGAGAATGTGGCTGCCAAATACAACATTCCTCGCTCCAAGCAGGATGAATTTG 640  
 FOX3-2b GTGTTTGATTCCAATGGGTATCACGAACGAGAATGTGGCTGCCAAATACAACATTCCTCGCTCCAAGCAGGATGAATTTG 577  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a CTGCTGCTTCCTATGCCAAGGCCGAGAAGGCTGTTTCTTCGCGCTGTTCAAGTCTGAGATTTTGCCCATCGAGTCGTAC 720  
 FOX3-2b CTGCTGCTTCCTATGCCAAGGCCGAGAAGGCTGTTTCTTCGCGCTGTTCAAGTCTGAGATTTTGCCCATCGAGTCGTAC 657  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a ATTCGCGAGGACGATGACGACGAAGAAGAGGGTGAAGGCAAAGTGA AAAACCATTGGTGGACACAGACGAAGGACCAAG 800  
 FOX3-2b ATTCGCGAGGACGATGACGACGAAGAAGAGGGTGAAGGCAAAGTGA AAAACCATTGGTGGACACAGACGAAGGACCAAG 737  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a AAAGGGTGTACTGCGCAATCTTTGGGAAAGTTGAAGCCTGCCTTCAAGAAGGATGGTGTACCCACGCCGAAACGCCT 880  
 FOX3-2b AAAGGGTGTACTGCGCAATCTTTGGGAAAGTTGAAGCCTGCCTTCAAGAAGGATGGTGTACCCACGCCGAAACGCCT 817  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a CTCAAGTCTCGGATGGCGCTGCTGCCGCTTTGTTGATGAGACGTTCTTTGGCCGAAAAGAAGGGCTACCCAATCCAGGGT 960  
 FOX3-2b CTCAAGTCTCGGATGGCGCTGCTGCCGCTTTGTTGATGAGACGTTCTTTGGCCGAAAAGAAGGGCTACCCAATCCAGGGT 897  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a AAGTATGTTGTTGTTCTTCTGTTGGTGTTCCTCCAGAAATCATGGGTGTGGGACCAGCAGTTGCCATTCTACTGTGTT 1040  
 FOX3-2b AAGTATGTTGTTGTTCTTCTGTTGGTGTTCCTCCAGAAATCATGGGTGTGGGACCAGCAGTTGCCATTCTACTGTGTT 977  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a GAAGAAGACTGGCTTGACTGTGGACGACATTGATGTTTTGAGGTGAACGAGGCCTTTGCTGCTCAGTGTGTTGACTCTG 1120  
 FOX3-2b GAAGAAGACTGGCTTGACTGTGGACGACATTGATGTTTTGAGGTGAACGAGGCCTTTGCTGCTCAGTGTGTTGACTCTG 1057  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a CTGAAAGCTGCAACATTCCTCCAGAAAAATTGAACATCAACGGCGGTGCCATTGCCTTGGGCAT ----- 1185  
 FOX3-2b CTGAAAGCTGCAACATTCCTCCAGAAAAATTGAACATCAACGGCGGTGCCATTGCCTTGGGCATCCTTTGGGATGCACC 1137  
 Consensus \*\*\*\*\*

FOX3-2a ----- 1185  
 FOX3-2b GGTGCTAGACAGTACGCTACTATTTTGCCTTGTGAAGACGGGCCAGATTGGCTTGACTTCCATGTGTATCGGCACAGG 1217  
 Consensus -----

FOX3-2a ----- 1185  
 FOX3-2b AATGGGTGCTGCTTCGATTGTCATCAAAGAGT ----- 1251  
 Consensus -----

**Figure 41. Séquence nucléotidique du locus FOX3-2 de *C. lusitaniae*.** Les séquences homologues aux amorces utilisées en RT-PCR sont surlignées en jaune (sens) et en gris (anti-sens), les codons start en vert, les codons stop en rouge. Les amorces anti-sens ont été désignées en dehors de la zone d'homologie entre les transcrits de FOX3-2a et FOX3-2b.

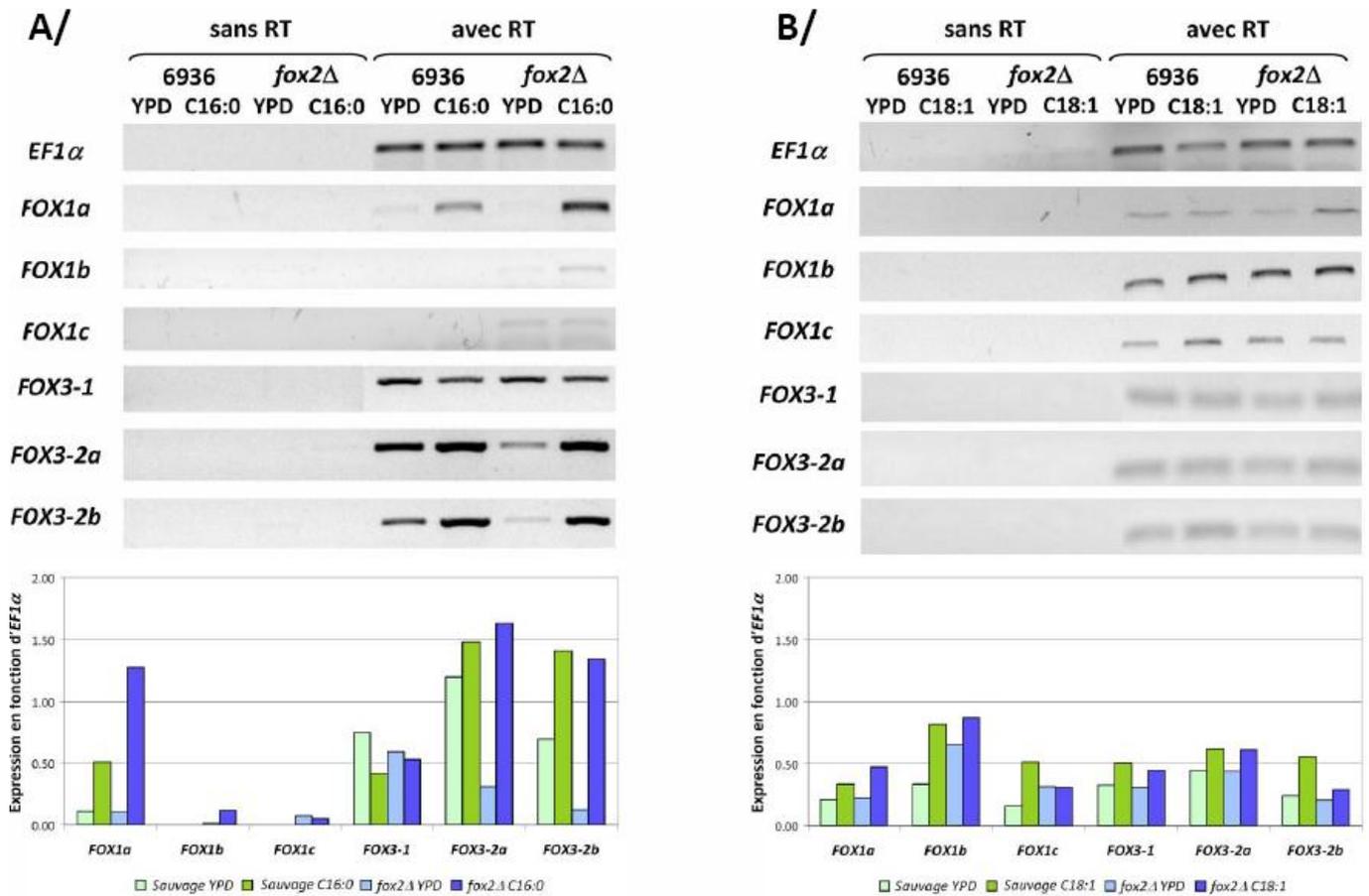
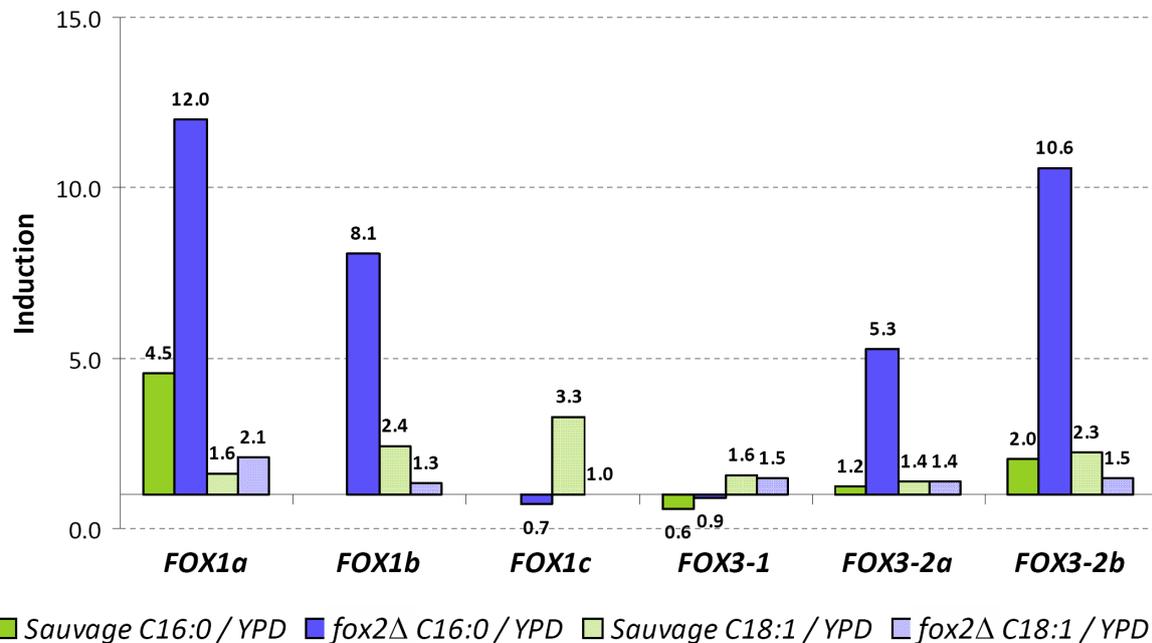


Figure 42. Analyse en RT-PCR de l'expression des gènes *Ef1α*, *FOX1* et *FOX3* chez les souches sauvage 6936 et mutante *fox2Δ* de *C. lusitaniae* en milieu glucosé (YPD) et en milieu contenant un acide gras comme seule source de carbone (acide palmitique C16:0 ou acide oléique C18:1). L'extraction d'ARN a été réalisée après A/ 6 h de culture en milieu solide YPD ou YNB + 2% C16:0 ou B/ après 4 h de culture en milieu liquide YPD ou YNB + 2% C18:1. En haut, numérisations des gels d'électrophorèse ayant permis la séparation des différents amplifiats. Les ARN non rétrotranscrits étaient amplifiés en même temps que les ADNc. En bas, niveaux d'expression des gènes *FOX1* et *FOX3* normalisés par rapport à l'expression d'*EF1α* dans les souches sauvage 6936 et mutante *fox2Δ*. RT : rétrotranscription.

① Nous avons constaté que tous les paralogues des gènes *FOX1* et *FOX3* s'exprimaient chez les levures sauvages ou *fox2Δ* cultivées en milieu liquide contenant du glucose (Figure 42). Après culture sur milieu YPD solide, le niveau de transcripts de *FOX3-1*, *FOX3-2a* et *FOX3-2b* était cependant plus important chez la souche sauvage 6936 que chez *fox2Δ*. L'expression des 3 paralogues de *FOX1* était alors quasiment nulle.

② En présence de C18:1 (acide oléique), les gènes *FOX1* et *FOX3* n'étaient que faiblement induits. L'induction la plus forte était observée pour *FOX1c* (x3,3 – Figure 43).

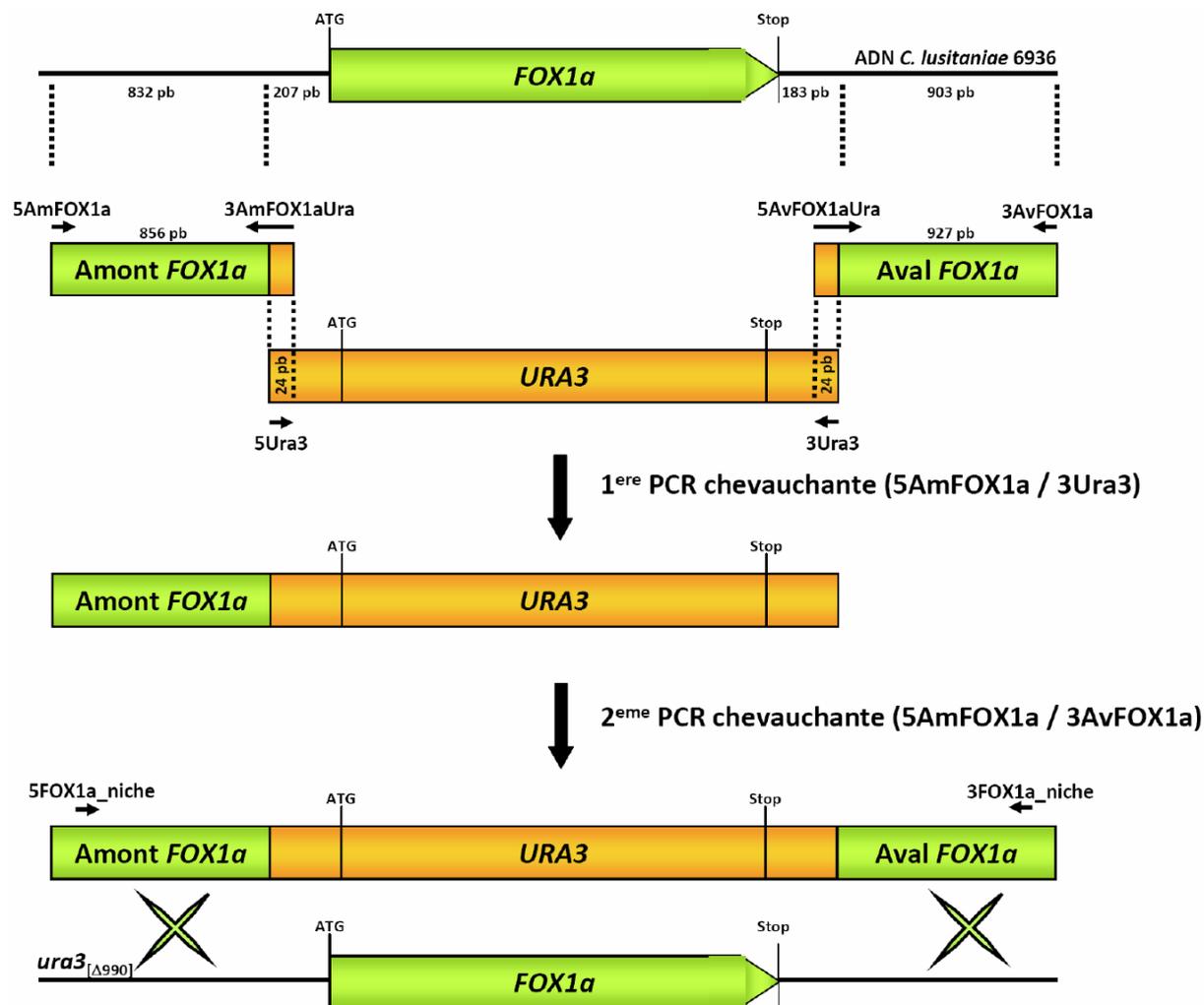
③ En présence de C16:0 (acide palmitique), *FOX1a* était fortement induit (x12 chez *fox2Δ*, x4.5 chez la souche sauvage 6936). Les gènes *FOX1b* (x8.1), *FOX3-2a* (x5.3) et *FOX3-2b* (x10.6) étaient également plus surexprimés chez *fox2Δ* que chez la souche sauvage 6936 (Figure 43). En revanche, le niveau de transcripts des gènes *FOX1c* et *FOX3-1* en présence d'acide palmitique restait comparable à celui après culture sur milieu riche.



**Figure 43.** Induction des gènes *FOX1* et *FOX3* chez les souches sauvage 6936 et mutante *fox2Δ* de *C. lusitaniae* après culture sur un milieu contenant un acide gras comme seule source de carbone (acide palmitique C16:0 ou acide oléique C18:1). Les valeurs correspondent aux rapports entre l'expression du gène sur acide gras (YNB + 2% C16:0 ou C18:1) par rapport à son expression sur glucose (YPD), après 4 h de culture en milieu liquide (YPD ou YNB + 2% C18:1) ou 6 h de culture en milieu solide (YPD ou YNB + 2% C16:0).

#### 4 Invalidation des gènes *FOX1a*, *FOX1b*, *FOX1c*, *FOX3-1* et *FOX3-2*

L'invalidation des paralogues des gènes *FOX1* et *FOX3* a été réalisée selon la stratégie des PCR chevauchantes. À titre d'exemple, les différentes étapes de l'obtention d'une cassette de délétion sont illustrées pour le gène *FOX1a* (**Figure 44**). Tout d'abord, le gène *URA3*, ainsi que les régions amont et aval de *FOX1a*, ont été amplifiés séparément par PCR. Dans chaque couple d'amorces utilisé pour l'amplification des fragments amont (856 pb se terminant à 207 pb en amont du codon start) et aval (927 pb commençant à 183 pb en aval du codon stop) de *FOX1a*, l'une des amorces portait à son extrémité 5' une région de 24 nt homologue aux extrémités du gène *URA3*. L'étape suivante a consisté à réaliser une première PCR chevauchante pour fusionner la région amont de *FOX1a* au fragment *URA3*. Le produit de fusion obtenu a été purifié puis mis en présence du fragment aval de *FOX1a*. Une seconde PCR chevauchante a été alors réalisée pour obtenir le produit de fusion final. Une PCR nichée réalisée à partir d'une dilution au 1/1000<sup>ème</sup> de ce dernier amplifiat a permis d'obtenir la cassette de délétion qui a ensuite été utilisée pour transformer la souche *ura3*<sub>[Δ990]</sub> de *C. lusitaniae* afin de remplacer le gène *FOX1a* par le marqueur *URA3* par double crossing-over. Les transformants prototrophes ont ensuite été sélectionnés sur milieu minimum. La même stratégie a été utilisée pour invalider les gènes *FOX1b*, *FOX1c*, *FOX3-1* et *FOX3-2* (**Tableau 13**). La transformation du mutant *fox2Δ*, *ura3Δ* à l'aide de la cassette d'invalidation du gène *FOX1a* a permis d'obtenir le double mutant [*fox1a*, *fox2Δ*].



**Figure 44. Invalidation de la totalité de la séquence codante de *FOX1a* selon la technique de PCR chevauchante.** L'amplification séparée des régions amont et aval du gène *FOX1a* et du marqueur de sélection *URA3* est préalablement réalisée. Les séquences des amorces 3AmFOX1aUra et 5Av FOX1aUra contiennent 24 nucléotides homologues à *URA3* dans leur partie 5'. La première PCR chevauchante permet la fusion des fragments amont de *FOX1a* et *URA3* à l'aide des amorces 5AmFOX1a et 3Ura3. La deuxième PCR chevauchante permet la fusion du précédent amplifiat avec le fragment aval de *FOX1a*, à l'aide des amorces 5AmFOX1a et 3AvFOX1a. Une PCR nichée est finalement réalisée pour purifier la cassette de délétion à l'aide des amorces 5FOX1a\_niche et 3FOX1a\_niche. Cette cassette de délétion est employée pour transformer la souche auxotrophe *ura3*<sub>[Δ990]</sub>. La sélection des mutants prototrophes ayant intégré la cassette de délétion au locus *FOX1a* par recombinaison homologue est réalisée sur milieu minimum YNB + 2% glucose.

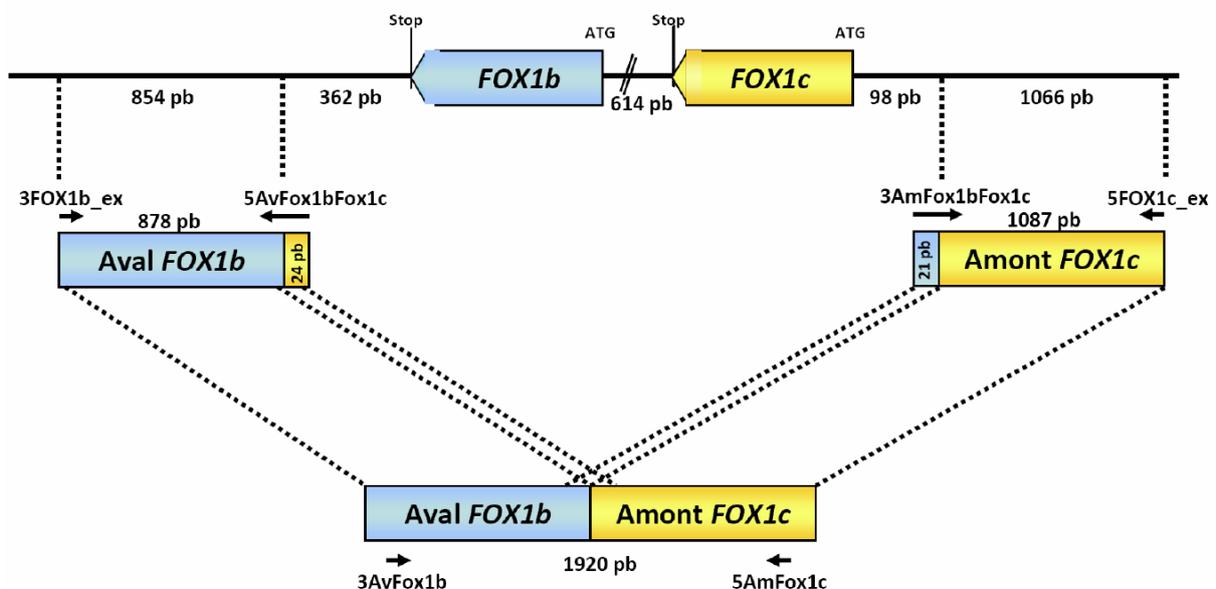
**Tableau 13. Caractéristiques des fragments amont et aval amplifiés pour l'inactivation des gènes *FOX1* et *FOX3*.**

Locus cible	Fragment amont		Fragment aval	
	Taille (pb)	Distance du codon start (pb)	Taille (pb)	Distance du codon stop (pb)
<i>FOX1a</i>	832	207	905	183
<i>FOX1b</i>	1017	162	1047	169
<i>FOX1c</i>	500	98	982	137
<i>FOX3-1</i>	1024	218	1070	166
<i>FOX3-2</i> *	949	225	1010	250

\* Le locus *FOX3-2* comprenant deux cadres ouverts de lecture, chacun situé sur un brin de l'ADN, la distance des fragments amont et aval s'entend à partir du codon stop de *FOX3-2a* pour le fragment amont, et du codon stop de *FOX3-2b* pour le fragment aval.

#### 4.1 Construction du double mutant $[fox1b, fox1c]\Delta$ et du triple mutant $[fox1a, fox1b, fox1c]\Delta$

Le double mutant  $[fox1b, fox1c]\Delta$  a été construit dans le fond génétique du simple mutant prototrophe  $fox1b\Delta$ . Afin d'exciser le marqueur  $URA3$  du locus  $fox1b$ , nous avons construit une cassette d'ADN correspondant à la fusion des fragments amont de  $FOX1c$  (1066 pb situées 98 pb en amont du codon start de  $FOX1c$ ) et aval de  $FOX1b$  (854 pb situées 362 pb en aval du codon stop de  $FOX1b$ ) par PCR chevauchante (**Figure 45**). Le fragment ainsi obtenu a été utilisé pour transformer la souche prototrophe  $fox1b\Delta$ . Après une phase d'expression phénotypique en milieu solide YPDS pendant 24 h, les transformants ayant perdu le marqueur  $URA3$  ( $[fox1b, fox1c]\Delta, ura3\Delta$ ) ont été sélectionnés sur la base de leur résistance au 5-FOA sur un milieu supplémenté en uracile. Le triple mutant  $[fox1a, fox1b, fox1c]\Delta$  a été obtenu en transformant le double mutant  $[fox1b, fox1c]\Delta, ura3\Delta$  avec la même cassette de délétion que pour l'obtention du mutant  $fox1a\Delta$  (marqueur  $URA3$  flanqué des régions amont et aval de  $FOX1a$ ). Les transformants prototrophes ont ensuite été sélectionnés sur milieu minimum. Le locus  $URA3$  a été reconstitué chez le mutant  $[fox1b, fox1c]\Delta, ura3\Delta$  par transformation avec l'allèle  $URA3$  sauvage (amplifié PCR purifié de  $URA3$  de *C. lusitaniae* obtenu avec le couples d'amorces NotURA3-SpeURA3) afin d'obtenir le mutant  $[fox1b, fox1c]\Delta$ .



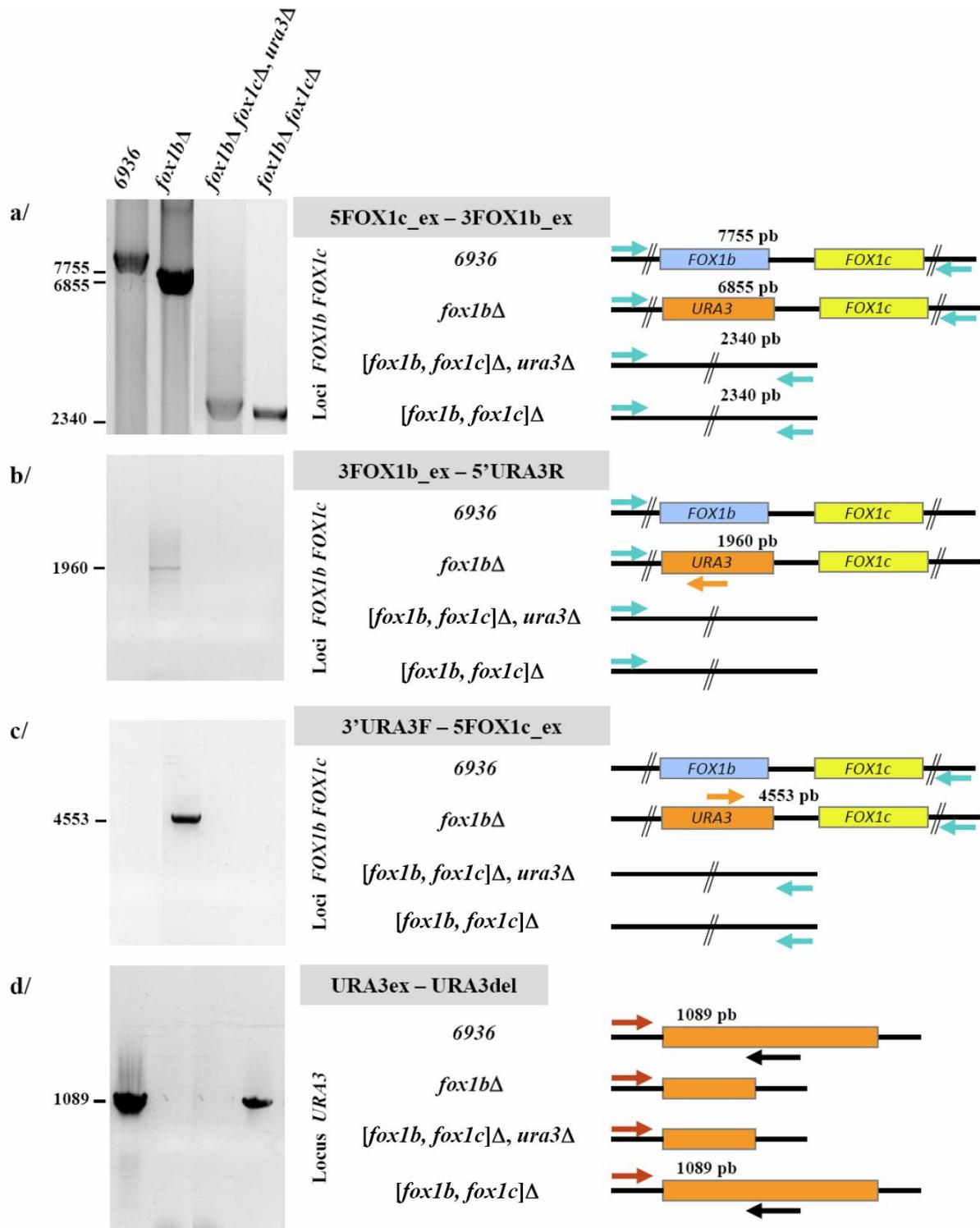
**Figure 45.** Construction de la cassette de délétion pour l'obtention du double mutant  $[fox1b, fox1c]\Delta$  selon la stratégie de PCR chevauchante. Les parties amont de  $FOX1c$  et aval de  $FOX1b$  ont été amplifiées séparément. La séquence de l'amorce 3AmFox1bFox1c utilisée pour l'amplification du fragment amont de  $FOX1c$  comprend 21 nucléotides homologues à la séquence du fragment aval de  $FOX1b$ . Inversement, la séquence de l'amorce 5AvFox1bFox1c utilisée pour l'amplification du fragment aval de  $FOX1b$  comprend 21 nucléotides homologues à la séquence du fragment amont de  $FOX1c$ . Le mutant auxotrophe  $[fox1b, fox1c]\Delta, ura3\Delta$  est obtenu après transformation de la souche prototrophe  $fox1b\Delta$  par la cassette de délétion et sélection des transformants sur milieu minimum YNB +2% glucose.

## 4.2 Construction du double mutant [*fox3-1, fox3-2*] $\Delta$

Les deux loci *FOX3-1* et *FOX3-2* représentant au total 3 allèles exprimés, l'inactivation complète de l'activité 3-kétoacyl-CoA thiolase nécessitait de réaliser seulement un double mutant [*fox3-1, fox3-2*] $\Delta$ . Le double mutant a été construit dans le fond génétique du simple mutant *fox3-1* $\Delta$ . Dans un premier temps, le marqueur *URA3* a été excisé du locus *fox3-1* $\Delta$ . Pour cela, une cassette d'ADN correspondant à la fusion des parties amont et aval du gène *FOX3-1* a été obtenue par PCR chevauchante. Le fragment ainsi obtenu a été utilisé pour transformer la souche prototrophe *fox3-1* $\Delta$  et pour sélectionner les transformants *fox3-1* $\Delta$ , *ura3* $\Delta$  ayant perdu le marqueur *URA3* sur la base de leur résistance au 5-FOA sur un milieu supplémenté en uracile. Le double mutant [*fox3-1, fox3-2*] $\Delta$  a été obtenu en transformant une souche *fox3-1* $\Delta$ , *ura3* $\Delta$  avec la même cassette de délétion que pour l'obtention du mutant *fox3-2* $\Delta$  (marqueur *URA3* flanqué des régions amont et aval de *FOX3-2*). Les transformants prototrophes ont ensuite été sélectionnés sur milieu minimum.

## 5 Caractérisation génotypique des souches *fox1* $\Delta$ et *fox3* $\Delta$ par PCR

L'intégration de la cassette aux différents loci cibles a été vérifiée en utilisant des oligonucléotides s'hybridant dans la séquence *URA3* (3'*URA3F* et 5'*URA3R*) et dans des régions externes à la zone de recombinaison au niveau du locus cible (amorces possédant le suffixe "ex"). Avec ces jeux d'amorces, une amplification d'ADN ne peut être obtenue que chez les transformants ayant intégré le gène *URA3* en remplacement du gène cible. Un exemple de la caractérisation génotypique par PCR de la souche sauvage, du simple mutant *fox1b* $\Delta$  et des doubles mutants [*fox1b, fox1c*] $\Delta$  *ura3* $\Delta$  et [*fox1b, fox1c*] $\Delta$  est donné **Figure 46**.



**Figure 46. Caractérisation génotypique par PCR des loci *FOX1b*, *FOX1c* et *URA3* de la souche sauvage 6936 et des mutants *fox1b*Δ, *[fox1b, fox1c]Δ*, *ura3Δ* et *[fox1b, fox1c]Δ*. Les couples d'amorces utilisés pour chaque PCR sont identifiés en grisé. La localisation et l'orientation des oligonucléotides employés, ainsi que les tailles des fragments générés sont figurées sur les représentations schématiques des loci correspondants. Toute séquence codante issue de *FOX1b* est représentée en bleu, de *FOX1c* en jaune et de *URA3* en orange.**

## 6 Etude de l'assimilation des sources de carbone par les souches mutantes

Nous avons tout d'abord vérifié que les différents mutants nuls possédaient la même vitesse de croissance que la souche sauvage 6936 en milieu liquide YPD et YNB supplémenté en glucose (données non montrées). Dans un deuxième temps, nous avons étudié leur croissance par des tests en gouttes sur le milieu solide YNB supplémenté par différents AG à moyenne chaîne [acide laurique (C12:0), acide myristique (C14:0) et acide palmitique (C16:0)] et à longue chaîne [acide stéarique (C18:0) et acide oléique (C18:1)] à deux températures d'incubation, 30°C et 37°C. Les résultats sont rapportés dans le **Tableau 14**.

**Tableau 14. Etude de l'assimilation des sources de carbone des souches mutantes, révertantes et sauvage à 30°C et 37°C.**

 + ++ +++ ++++ +++++	30°C									
	Glucose	Acetate	Glycerol	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	
6936	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>icl1</i> Δ	+++++	-	+++++	-	-	-	-	-	-	-
<i>ICL1Re</i>	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox2</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++
<i>FOX2Re</i>	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox2</i> Δ_ cl	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++
[ <i>fox2</i> , <i>pxa1</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++
[ <i>fox2</i> _ cl, <i>pxa1</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++
[ <i>fox2</i> , <i>fox1a</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++
<i>pxa1</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox1a</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox1b</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox1c</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
[ <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
[ <i>fox1a</i> , <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox3-1</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox3-2</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	-
[ <i>fox3-1</i> , <i>fox3-2</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	-	-	+++++	+++++	+++++	-

 + ++ +++ ++++ +++++	37°C									
	Glucose	Acetate	Glycerol	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	
6936	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>icl1</i> Δ	+++++	-	+++++	-	-	-	-	-	-	-
<i>ICL1Re</i>	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox2</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+
<i>FOX2Re</i>	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox2</i> Δ_ cl	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+
[ <i>fox2</i> , <i>pxa1</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+
[ <i>fox2</i> _ cl, <i>pxa1</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+
[ <i>fox2</i> , <i>fox1a</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	+
<i>pxa1</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox1a</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox1b</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox1c</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
[ <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
[ <i>fox1a</i> , <i>fox1b</i> , <i>fox1c</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox3-1</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
<i>fox3-2</i> Δ	+++++	+++++	+++++	-	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	-
[ <i>fox3-1</i> , <i>fox3-2</i> ]Δ	+++++	+++++	+++++	-	-	-	+++++	+++++	+++++	-

\* Les levures ont été précltivées jusqu'en milieu de phase exponentielle sur YPD, lavées, resuspendues dans l'eau à une absorbance de 0.5 à 600 nm, et diluées successivement au 1/5e. Des gouttes de 5µL de chaque dilution ont été déposées sur milieu minimum YNB solide supplémenté par 2% de glucose, acétate, glycérol, acide caprique (C10:0), acide laurique (C12:0), acide myristique (C14:0), acide palmitique (C16:0), acide stéarique (C18:0) ou acide oléique (C18:1) et incubés à 30°C ou 37°C pendant 5 jours. Comme indiqué dans le coin supérieur gauche, une croissance au niveau de la première goutte (dilution au 1/5) est notée +, au niveau de la seconde (dilution au 1/5<sup>2</sup>) ++, ... L'absence de croissance est notée par -

Les mutants simples *fox1a*Δ, *fox1b*Δ et *fox1c*Δ, le mutant double [*fox1b, fox1c*]Δ et le mutant triple [*fox1a, fox1b, fox1c*]Δ possédaient un profil d'assimilation identique à celui de la souche sauvage 6936. Le double mutant [*fox1a, fox2*]Δ présentait un léger retard de croissance sur C12:0, comme chez les mutants *fox2*Δ et *fox2*Δ<sub>cl</sub>.

La souche *fox3-1*Δ possédait un profil d'assimilation semblable à celui de la souche sauvage 6936 sur acides gras saturés, mais le simple mutant *fox3-2*Δ présentait un retard de croissance sur C18:1 à 30°C, et ne semblait pas du tout capable d'assimiler cette source de carbone à 37°C. Le double mutant [*fox3-1, fox3-2*]Δ était incapable de croître sur deux AG à moyenne chaîne [acide laurique (C12:0) et acide myristique (C14:0)], ainsi que sur AG à longue chaîne insaturé [acide oléique (C18:1)].

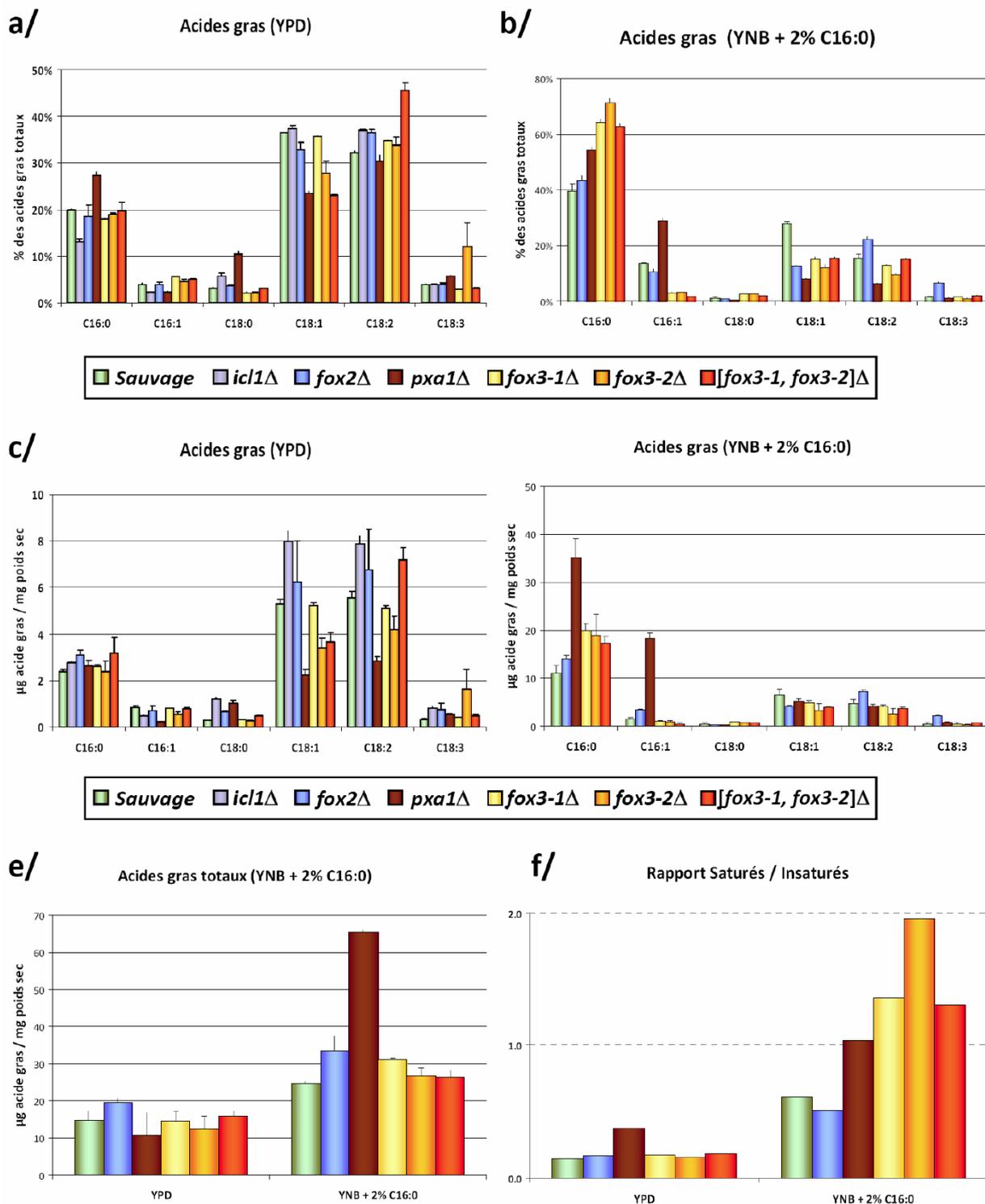
## 7 Composition en acides gras

La composition en AG des mutants simples *fox2*Δ, *pxa1*Δ, *fox3-1*Δ, *fox3-2*Δ, du mutant double [*fox3-1, fox3-2*]Δ et de la souche sauvage 6936 ont été étudiés après culture sur milieu YPD et sur milieu YNB + 2% C16:0 (acide palmitique). Le profil du mutant *icl1*Δ a également été étudié mais seulement à partir de sa culture sur YPD, puisqu'il était incapable d'utiliser un AG comme seule source de carbone. La composition en AG des mutants invalidés pour un ou plusieurs paralogues de *FOX1* n'a pu être déterminée dans ce travail en raison de l'obtention très récente de ces mutants.

Après croissance sur milieu YPD liquide (**Figure 47, panneaux a et c**), la quantité totale d'AG extraite pour chacune des 6 souches testées n'était pas significativement différente, se situant aux alentours de 15 µg d'AG par mg de poids sec de levure (**Figure 47, panneau e**). Trois AG représentent plus de 80% de la quantité totale d'AG extraits : le C18:1, le C18:2 (avec des taux > 30% chez la souche sauvage 6936) et le C16:0 (avec un taux d'environ 20% chez la souche sauvage 6936). *Candida lusitanae* se distingue ainsi de *C. albicans* chez lequel le C18:1 (37%), le C16:0 (25%) et le C16:1 (18%) sont les plus représentés (Abu-Elteen & Whittaker, 1997).

Par ailleurs, pour *C. lusitanae*, il existe des différences remarquables entre les souches mutantes et la souche sauvage 6936 au niveau de la composition en AG. Les différences relevées ci-après étaient significatives à la fois en valeur absolue (quantité d'AG en fonction du poids sec) et en pourcentage (quantité d'un AG sur le total des AG), sauf indications contraires.

- Le rapport quantité d'AG saturés (C16:0 et C18:0) sur quantité d'AG insaturés (C16:1, C18:1, C18:2, C18:3) était similaire (entre 0.22 et 0.3) pour toutes les souches à l'exception du mutant *pxa1*Δ pour lequel ce rapport était 2 à 3 fois plus élevé (0.62) (**Figure 47, panneau f**). La quantité de C16:0 chez *pxa1*Δ était comparable à celle des autres souches, mais celle de C18:1 et C18:2 était significativement plus faible ( $p < 0.001$ ).
- La quantité de C18:1 était significativement plus faible chez les mutants *pxa1*Δ, *fox3-2*Δ et [*fox3-1, fox3-2*]Δ que chez la souche sauvage ( $p < 0.01$ ).
- Le mutant *fox3-2*Δ accumulait le C18:3 par rapport à la souche sauvage 6936 ( $p = 0.02$  en pourcentage,  $p < 0.001$  en valeur absolue).
- Le double mutant [*fox3-1, fox3-2*]Δ contenait plus de C18:2 que la souche sauvage 6936 ( $p = 0.001$  en pourcentage,  $p = 0.05$  en valeur absolue).



**Figure 47. Composition en acides gras des souches sauvages, mutantes *fox1bΔ*, *fox2Δ*, *pxa1Δ* et *fox3Δ*.** Les panneaux a et c représentent la composition en C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 et C18:3 des levures entières cultivées 24h sur YPD liquide, les panneaux b et d celles des levures entières cultivées 7 jours sur milieu solide YNB + 2% C16:0 (acide palmitique). Le panneau e représente la composition totale en acides gras des levures entières et le panneau f les rapports entre la composition en acides gras saturés (C16:0 et C18:0) sur la composition en acides gras insaturés (C16:1, C18:1, C18:2, C18:3) des levures entières.

Après culture en milieu solide utilisant le C16:0 (acide palmitique) comme seule source de carbone (**Figure 47, panneaux b et d**), la quantité totale d'AG présents dans les levures est multipliée par un facteur allant de 1,7 pour la souche sauvage et les mutants *fox2Δ* et [*fox3-1, fox3-2*]Δ, à 6 pour le mutant *pxa1Δ* qui contient 65 μg d'AG par mg de poids sec.

- L'AG principalement accumulé était le C16:0.
- Toutes les souches mutantes contenaient significativement moins de C18:1 que la souche sauvage ( $p < 0.01$  et  $p = 0.05$  pour *pxa1Δ* et *fox3-1Δ* en valeur absolue).
- Le rapport AG saturés / AG insaturés augmentait donc, en particulier pour les mutants *fox3-1Δ*, *fox3-2Δ* et [*fox3-1, fox3-2*]Δ.
- La quantité de C16:1 était significativement augmentée chez le mutant *pxa1Δ* ( $p < 0.001$ ) et représentait plus de 29% du total des AG chez ce mutant.
- La quantité de C18:2 chez les mutants *pxa1Δ*, *fox3-1Δ* et *fox3-2Δ* était significativement plus faible que chez la souche sauvage 6936 ( $p < 0.01$ ).
- La quantité de C18:3 chez le mutant *fox2Δ* était 3 à 4 fois plus élevée que chez les autres souches étudiées ( $p < 0.001$ ), et celle de C18:2 était significativement plus importante que chez la souche sauvage 6936 ( $p = 0.005$  en pourcentage).

## 8 Pseudofilamentation

La capacité de pseudofilamentation des simples mutants *icl1Δ*, *fox2Δ*, *fox1aΔ*, *fox1bΔ*, *fox1cΔ*, *fox3-1Δ*, *fox3-2Δ*, des double mutants [*fox1b, fox1c*]Δ et [*fox3-1, fox3-2*]Δ, du triple mutant [*fox1a, fox1b, fox1c*]Δ a été comparée à celle de la souche sauvage 6936.

Toutes les souches étudiées étaient capables de pseudofilamenter sur milieu solide YCB. Pour la souche 6936 l'ensemble du contour de la colonie présentait une forte densité de pseudofilaments longs et ramifiés.

Par rapport à la souche sauvage, les simples mutants *fox1Δ* et *fox3Δ* présentaient dès 24 h d'incubation un retard de pseudofilamentation, plus marqué pour le mutant *fox3-1Δ* (**Figure 48**). Le double mutant [*fox1b, fox1c*]Δ présentait un déficit en pseudofilamentation comparable à celui des simples mutants *fox1Δ*. Le triple mutant [*fox1a, fox1b, fox1c*]Δ et surtout le double mutant [*fox3-1, fox3-2*]Δ développaient la filamentation la moins longue (**Figure 49**). La vitesse de pseudofilamentation, calculée entre 48 et 72h d'incubation, était de l'ordre de 20 μm/h pour la souche sauvage, aux alentours de 15 μm/h pour les mutants *fox1Δ*, et les simples mutants *fox3-1Δ* et *fox3-2Δ*, et de seulement 10 μm/h pour le double mutant [*fox3-1, fox3-2*]Δ.

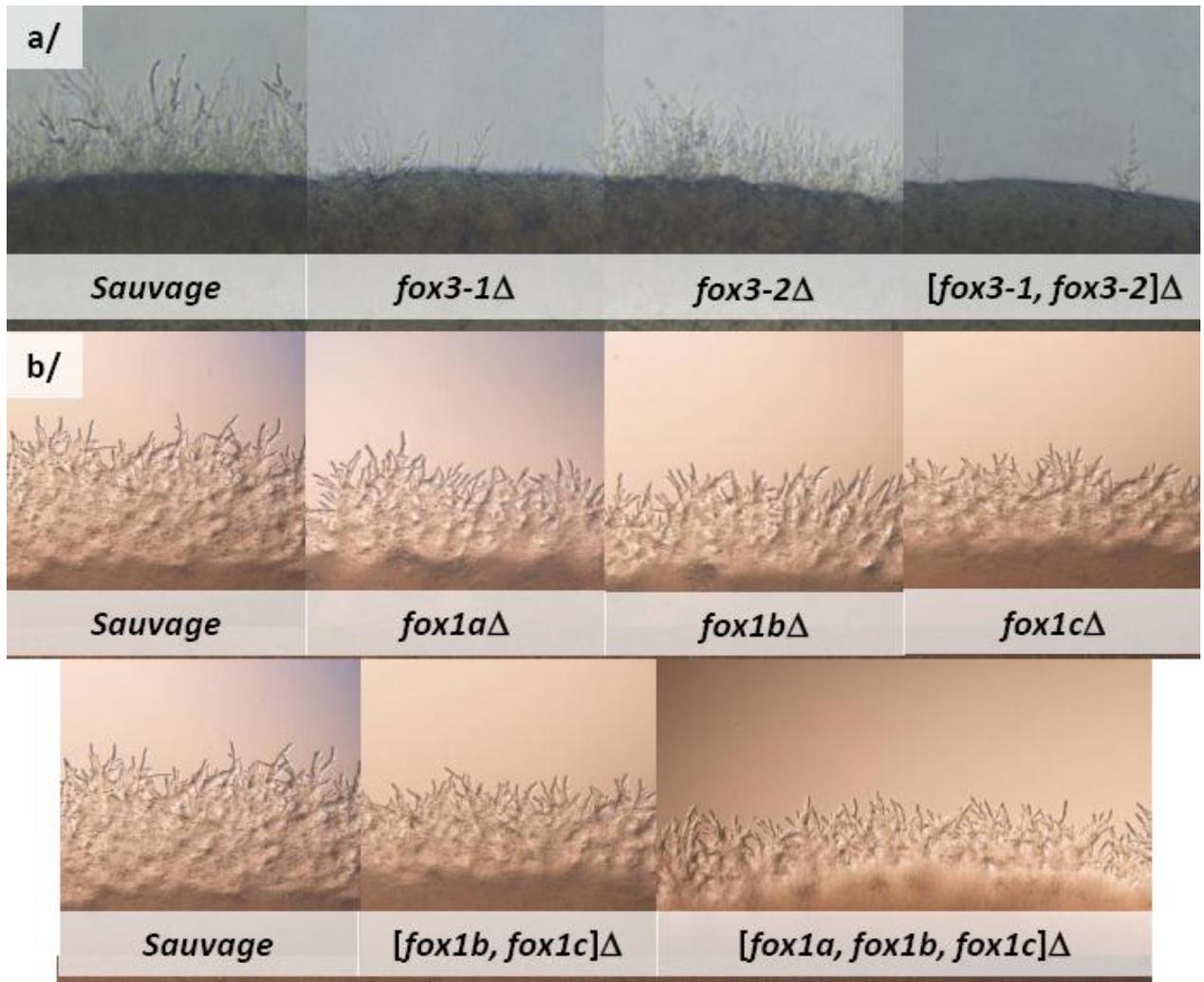


Figure 48. Pseudofilamentation de la souche sauvage 6936, des mutants *fox3*Δ (panneau a) et des mutants *fox1*Δ (panneau b) sur milieu solide YCB. Photographies du contour des colonies après 24 h d'incubation, microscopie optique (x100).

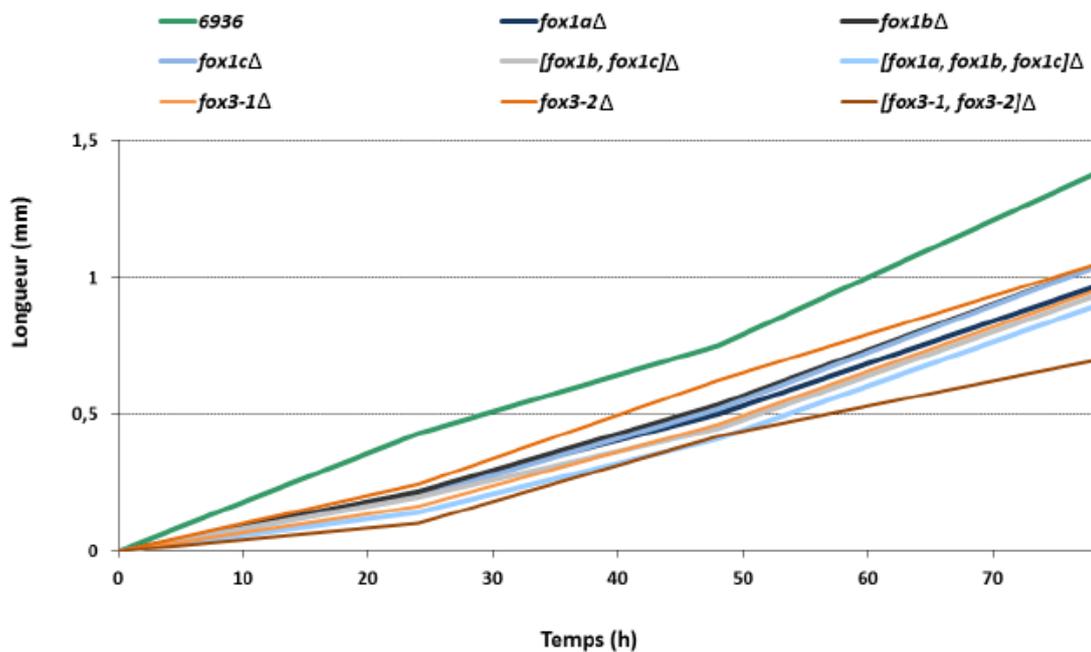
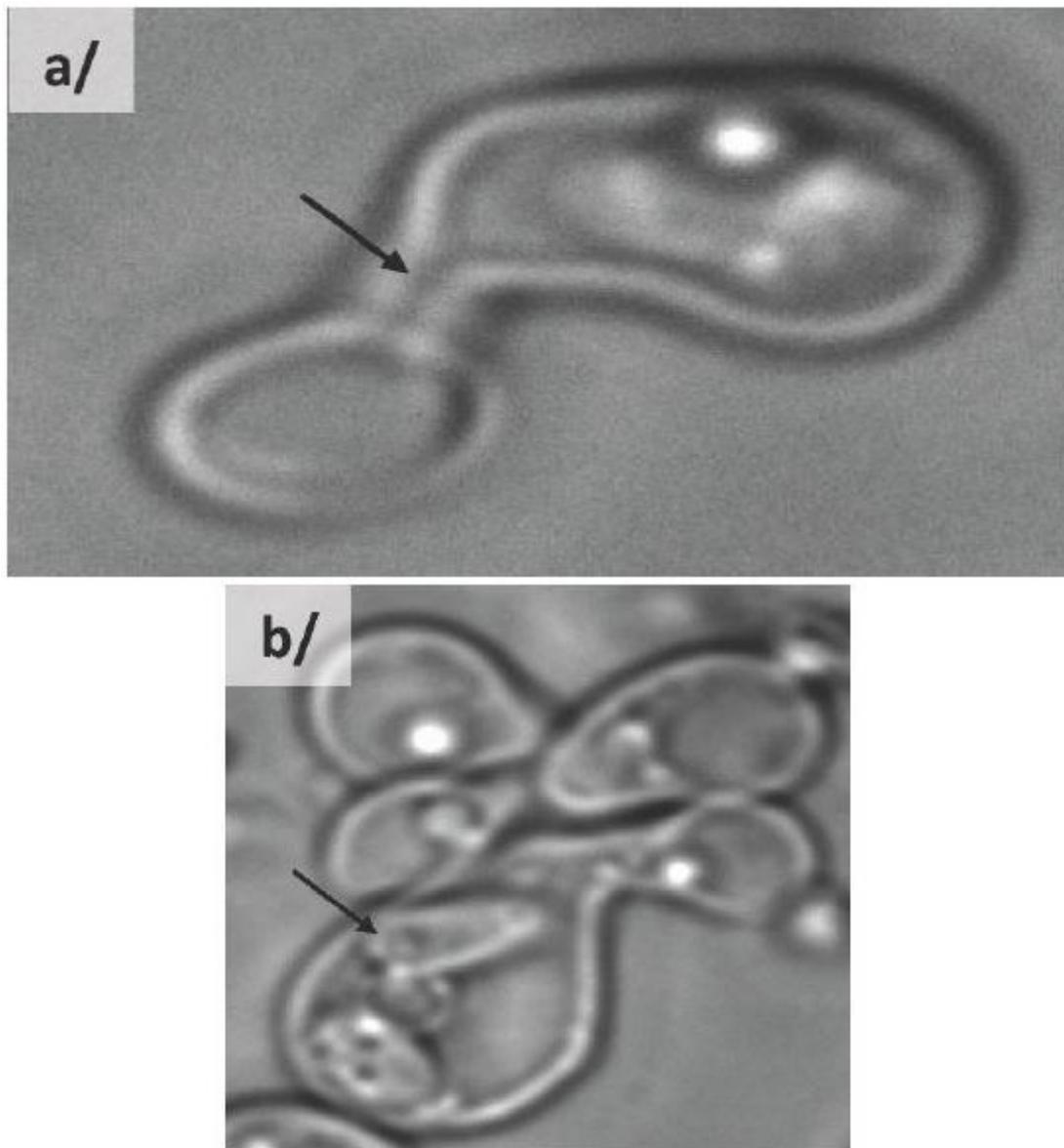


Figure 49. Mesure de l'élongation des pseudofilaments de la souche sauvage 6936 et des mutants *fox1*Δ et *fox3*Δ sur milieu solide YCB pendant 72h.

## 9 Reproduction sexuée

Toutes les souches mutantes construites dans cette étude dérivant toutes de la souche sauvage 6936 de type sexuel *MATa*, elles ont été croisées avec la souche de référence CL38 de type sexuel *MATα* sur du milieu YCB. Après 48 h d'incubation à température ambiante, les observations réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence de différences dans l'aptitude à la reproduction sexuée des mutants par rapport à la souche sauvage 6936 (**Figure 50**).



**Figure 50. Etude de la reproduction sexuée chez *C. lusitaniae*.** Expériences de conjugaison chez *C. lusitaniae* entre les souches 6936 *MATa* et CL38 *MATα* observées en microscopie optique par contraste de phase (x630) ; la flèche en a/ indique le canal de conjugaison, celle en b/ une ascospore.

## Conclusion

Notre travail a permis de montrer que les paralogues de *FOX1* et de *FOX3* étaient tous exprimés chez *C. lusitaniae*, mais que leur niveau d'expression différait selon la source de carbone présente dans le milieu de culture et selon le fond génétique (sauvage ou *fox2Δ*). En effet, l'induction des gènes *FOX1a*, *FOX1b*, *FOX3-2a* et *FOX3-2b* en présence d'acide palmitique (C16:0) était plus importante chez le mutant *fox2Δ* que chez la souche sauvage 6936. Même si le catabolisme du <sup>14</sup>C<sub>α</sub>-palmitoyl-CoA s'est révélé comparable chez la souche sauvage 6936 et le mutant *fox2Δ*, l'absence de Fox2p semble avoir des conséquences sur l'expression de gènes codant pour des enzymes de la β-oxydation. Les mécanismes de cette régulation restent à préciser.

L'étude des phénotypes de croissance des différents mutants *fox1* et *fox3* nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

- ❶ Les gènes *FOX1a*, *FOX1b*, *FOX1c* ne sont pas essentiels pour l'assimilation du C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 et C18:1. Ils sont redondants fonctionnellement. Il semble donc exister une activité acyl-CoA oxydase indépendante de *FOX1*, ou une activité acyl-CoA déshydrogénase dans la cellule permettant l'assimilation des AG à moyenne et longue chaîne.
- ❷ Les gènes *FOX3-1* et *FOX3-2* ne sont pas essentiels pour l'assimilation des AG saturés C16:0 et C18:0. Ils sont redondants fonctionnellement pour l'assimilation de la plupart des AG testés, à l'exception de celle du C18:1 qui semble dépendre du gène *FOX3-2*. Le catabolisme de l'acide oléique (C18:1) requiert 3 cycles de β-oxydation, puis une étape de transformation de la double liaison *cis* entre les carbones β et γ (C3 et C4) par une Δ<sub>3</sub>,Δ<sub>2</sub>-énoyl-CoA isomérase en une double liaison *trans* entre les carbones α et β (C2 et C3). Le produit de cette réaction peut ensuite être catabolisé par de nouveaux cycles de β-oxydation. Nos résultats suggèrent que seule la protéine Fox3-2p serait capable de prendre en charge les kétoacyl-CoA insaturés générés par les 3 premiers tours de β-oxydation.
- ❸ L'invalidation des 3 allèles de *FOX3* est nécessaire pour observer un défaut d'assimilation des AG saturés à chaînes moyennes C12:0 et C14:0.

Ce résultat corrobore les conclusions précédentes mettant en évidence l'existence chez *C. lusitaniae* de trois voies de catabolisme des AG : une peroxisomale Fox2p-dépendante, une mitochondriale Fox2p-dépendante, et une peroxisomale Fox2p-indépendante. Il est légitime de penser que des activités acyl-CoA oxydase ou acyl-CoA déshydrogénase indépendantes de *FOX1*, et qu'une activité thiolase Fox3p-indépendante pourrait faire partie de la voie peroxisomale Fox2p-indépendante. Une voie de catabolisme peroxysomale Fox2p-indépendante n'a pour l'instant jamais été décrite dans le règne fongique.

Toutefois, des investigations pourraient être menées en prenant pour hypothèse l'existence d'une voie d'α-oxydation, connue chez les plantes supérieures et chez les mammifères, dont l'homme, pour cataboliser les acides gras ramifiés dans les peroxisomes (Wanders *et al.*, 2010). Cette voie ne repose pas sur les activités enzymatiques Fox1p, Fox2p et Fox3p, mais sur une phytanoyl-CoA hydroxylase, une 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase et une aldéhyde déshydrogénase. Une étude *in silico* nous a permis d'identifier chez *C. lusitaniae* deux gènes potentiellement orthologues des deux enzymes humaines (CLUG\_02206.1 et CLUG\_02660.1).

L'analyse de la composition en AG a montré que les mutants *fox2Δ*, *pxa1Δ*, *fox3-1Δ*, *fox3-2Δ* et [*fox3-1*, *fox3-2*]Δ accumulaient significativement plus d'acide palmitique (C16:0) que la souche sauvage lorsqu'ils étaient mis en culture sur un milieu contenant cet AG comme seule source de carbone. Après culture sur acide palmitique, la quantité de C16:1 extraite des mutants *fox2Δ* et *pxa1Δ* et celle de C18:2 extraite du mutant *fox2Δ* était significativement plus importante que celle contenue dans la souche sauvage. Le degré de saturation des AG intervient notamment dans la fluidité des membranes biologiques. Il semblerait que les mutants *fox2Δ* et *pxa1Δ* compensent ainsi partiellement le déficit en AG insaturés par une augmentation de C16:1 et/ou C18:2. A l'inverse, la quantité de chaque AG insaturé et la quantité totale d'AG insaturés extraites des mutants *fox3Δ* avaient tendance à être plus faibles que celles de la souche sauvage. Il est également possible que ces AG insaturés servent de substrat à des enzymes catalysant la formation d'AG ramifiés pouvant être par la suite dégradés par les enzymes de l' $\alpha$ -oxydation.

Les mutants simples *fox1aΔ*, *fox1bΔ*, *fox1cΔ*, *fox3-1Δ* et *fox3-2Δ*, les doubles mutants [*fox1b*, *fox1c*]Δ et [*fox3-1*, *fox3-2*]Δ et le triple mutant [*fox1a*, *fox1b*, *fox1c*]Δ sont affectés à la fois dans leurs capacités à déclencher la formation des pseudofilaments (retard par rapport à la souche sauvage) et dans la vitesse d'élongation des pseudofilaments. Toutefois, l'altération des capacités de pseudofilamentation n'a pas d'incidence sur la reproduction sexuée qui se déroule normalement chez les mutants. Une relation entre métabolisme lipidique et la pseudofilamentation a déjà été mise en évidence récemment chez des mutants *ole1Δ* de *C. parapsilosis* (Nguyen *et al.*, 2011) et *ole2Δ* de *C. lusitaniae* (El Kirat-Chatel, 2010), tous deux défectifs pour une  $\Delta^9$  désaturase, et chez un mutant *dpp3Δ* (farnésylpyrophosphate phosphatase) de *C. lusitaniae* (Sabra, 2010). L'homéostasie lipidique semble donc être importante pour la morphogénèse chez les levures du genre *Candida*. En revanche, les deux mutants *ole2Δ* et *dpp3Δ* de *C. lusitaniae* étaient également très affectés pour la reproduction sexuée, contrairement aux mutants *fox1Δ* et *fox3Δ*.

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Notre objectif est de caractériser le rôle de la  $\beta$ -oxydation chez la levure pathogène émergente *C. lusitaniae* au cours de son interaction avec les macrophages. Contrairement à ce qui est rapporté pour *S. cerevisiae* (Hiltunen *et al.*, 2003) et *C. albicans* (Piekarska *et al.*, 2006; Ramírez & Lorenz, 2007), l'inactivation du gène *FOX2*, codant pour la protéine multifonctionnelle de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale ne se traduit pas par un blocage du catabolisme des acides gras chez *C. lusitaniae*. Ce travail de thèse a permis d'expliquer ce phénotype original en mettant en évidence l'existence de 3 voies pour le catabolisme des acides gras chez *C. lusitaniae* : **i/** une voie mitochondriale Fox2p-dépendante, démontrée pour la première fois chez une levure Ascomycète, **ii/** une voie peroxysomale Fox2p-dépendante, **iii/** une voie peroxysomale Fox2p-indépendante.

Deux hypothèses peuvent être émises quant à la nature de la voie peroxysomale Fox2p-indépendante : l'existence d'une voie complète, alternative et indépendante de Fox2p ou l'existence d'une redondance fonctionnelle entre Fox2p et une ou plusieurs enzymes peroxysomales. En effet, Fox2p possède une activité énoyl-CoA hydratase et (*D*)-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Comme Shen & Burger dans leur étude *in silico* (Shen & Burger, 2009), nous n'avons pas identifié dans le génome de *C. lusitaniae* d'autres protéines homologues aux protéines multifonctionnelles peroxysomales d'eucaryotes ou de la protéine trifonctionnelle mitochondriale de mammifères. En revanche, les recherches que nous avons effectuées par tBLASTn dans la *Candida lusitaniae* database ont permis de détecter 3 paralogues possibles d'*EchA* d'*A. nidulans* (AN5916.1), codant pour une énoyl-CoA déshydrogénase mitochondriale (CLUG\_01012.1, CLUG\_01292.1, CLUG\_04032.1). Dans un travail préliminaire, nous avons réalisé l'invalidation du locus CLUG\_04032.1 qui ne s'accompagne pas d'un défaut d'assimilation des acides gras (données non montrées). Notre étude *in silico* a permis d'identifier également 19 gènes possédant un domaine de la famille des short-chain déshydrogénases/réductases, dont font partie les domaines hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de *FOX2*. Plusieurs de ces protéines potentielles semblent contenir un signal d'adressage peroxysomal.

L'inactivation chez *C. lusitaniae* des 3 paralogues des gènes *FOX1* et *FOX3*, codant pour les autres enzymes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale décrite chez les levures Ascomycètes, n'empêche pas la croissance sur un milieu contenant un acide gras à longue chaîne comme seule source de carbone. Nous n'avons cependant pas encore confirmé que le catabolisme du  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA était toujours fonctionnel chez le double mutant [*fox3-1, fox3-2*] $\Delta$  et chez le triple mutant [*fox1a, fox1b, fox1c*] $\Delta$ . La première étape de la  $\beta$ -oxydation peut être catalysée par une acyl-CoA oxydase (codée par un gène *FOX1*) ou une acyl-CoA déshydrogénase. Nous n'avons pas retrouvé dans le génome de *C. lusitaniae* de gènes orthologues aux acyl-CoA déshydrogénases d'*A. nidulans* ni à l'acyl-CoA déshydrogénase identifiée par Shen & Burger chez *C. albicans* (orf19.7288). Même si l'existence d'une voie de catabolisme peroxysomal indépendante de Fox2p n'a jamais été démontrée dans le règne fongique, nous avons observé chez *C. lusitaniae* un catabolisme des acides gras non dépendant de Fox2p, mais également non dépendant de Fox1p et de Fox3p. La nature de cette voie métabolique reste à caractériser. Un des moyens d'y parvenir serait de construire une banque étiquetée de mutants aléatoires dans le fond génétique du mutant *fox2* $\Delta$  de *C. lusitaniae*. Le criblage des mutants selon leur incapacité à se développer sur des milieux contenant des acides gras comme seule source de carbone pourrait nous permettre d'identifier des mutants défectifs pour la voie peroxysomale de catabolisme des acides gras fox2p-indépendante. Par ailleurs, l'existence d'une  $\alpha$ -oxydation chez *C. lusitaniae*, connue chez les plantes supérieures et chez les mammifères pour cataboliser les acides gras ramifiés dans les peroxysomes, devra être explorée par l'invalidation des deux gènes que nous avons identifiés *in silico* et potentiellement orthologues des deux premières enzymes de cette voie métabolique chez l'homme. Si cette hypothèse se confirme, et que l' $\alpha$ -oxydation permet à *C. lusitaniae* d'assimiler des acides gras non ramifiés, il nous restera à préciser quels en sont les mécanismes moléculaires.

Nous avons également pu montrer, pour la première fois chez un organisme eucaryote, la double localisation peroxysomale et mitochondriale de la protéine multifonctionnelle peroxysomale de la  $\beta$ -oxydation. L'adressage de Fox2p aux peroxysomes a été démontré chez *Y. lipolytica* en utilisant une protéine recombinante marquée par l'épitope c-Myc dans sa partie N-terminale (Smith *et al.*, 2000). L'adressage d'une protéine à la mitochondrie étant dépendant d'un signal présent dans sa partie N-terminale, il n'est pas absolument exclu que Fox2p puisse également être localisée dans les mitochondries chez *Y. lipolytica*. La démonstration de la localisation peroxysomale de Fox2p chez *C. tropicalis* est basée sur la mesure dans les fractions peroxysomale et mitochondriale de l'activité énoyl-CoA hydratase après utilisation comme dans notre travail d'un gradient de saccharose (Kurihara *et al.*, 1992). La mesure des activités catalase et cytochrome c oxydase présentes dans les fractions a également été utilisée pour apprécier la contamination de la fraction mitochondriale par les peroxysomes. Néanmoins l'emploi par les auteurs de concentrations en saccharose différentes pour le gradient les a conduits à recueillir les mitochondries purifiées dans deux fractions différentes. Les différentes activités enzymatiques représentées n'ont pas été rapportées à la quantité de protéines présentes dans les fractions. L'activité spécifique énoyl-CoA hydratase dans les 2 fractions mitochondriales ne tient pas compte de la contamination de ces fractions par les peroxysomes. Les quelques données disponibles dans l'article ne semblent pas être suffisantes pour écarter toute localisation mitochondriale de Fox2p chez *C. tropicalis*. Il nous apparaît donc intéressant de rechercher par la technique d'immunolocalisation sur western-blot si la protéine multifonctionnelle peroxysomale est également localisée dans les mitochondries chez d'autres membres du clade CTG des *Saccharomycetales*.

D'autres investigations sont nécessaires afin d'identifier précisément les enzymes impliquées dans les voies Fox2p-dépendantes mitochondriale et peroxysomale chez *C. lusitaniae*. L'étude du catabolisme du  $^{14}\text{C}_\alpha$ -palmitoyl-CoA ou d'autres acyl-CoA radiomarqués dans les fractions mitochondriale et peroxysomale chez les différents mutants *fox1* $\Delta$  et *fox3* $\Delta$  devrait nous y aider.

L'inactivation de l'ensemble des voies de la  $\beta$ -oxydation et de catabolisme des acides gras sera nécessaire pour pouvoir décrire précisément leur rôle dans la virulence de *C. lusitaniae*. L'étude de la résistance à la phagocytose macrophagique sera réalisée *in vitro* à l'aide du protocole innovant d'interaction levure-macrophage et d'analyse en cytométrie développé par notre équipe, qui permet d'évaluer la survie et la multiplication des levures dans le macrophage, mais également la survie des macrophages infectés. Cette étude de virulence sera poursuivie par l'étude *in vitro* des interactions levure - granulocyte neutrophile, la neutropénie constituant un facteur de risque majeur de candidose invasive. Le rôle du catabolisme des acides gras dans la virulence devra ensuite être confirmé *in vivo* dans un modèle murin de candidémie. Si nos travaux permettent d'établir un lien entre catabolisme des acides gras et virulence, il sera alors intéressant d'étudier l'origine des acides gras catabolisés au moment de l'internalisation de la levure dans le macrophage. A l'aide d'acides gras marqués, mais aussi à l'aide de mutants délétés pour les lipases et les phospholipases, il devrait être possible de déterminer s'ils proviennent des réserves de la levure elle-même, ou bien du macrophage infecté.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abu-Elteen, K. H. & Whittaker, P. A. (1997).** Effect of sub-inhibitory concentration of chlorhexidine on lipid and sterol composition of *Candida albicans*. *Mycopathologia* **140**, 69-76.
- Adham, A. R., Zolman, B. K., Millius, A. & Bartel, B. (2005).** Mutations in *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in beta-oxidation. *Plant J* **41**, 859-874.
- Aebi, H. (1984).** Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol* **105**, 121-126.
- Aerts, A. M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., François, I. E. J. A., Madeo, F., Santos, R., Cammue, B. P. A. & Thevissen, K. (2009).** The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Lett* **583**, 2513-2516.
- Akakabe, Y., Matsui, K. & Kajiwara, T. (2000).** Alpha-oxidation of long-chain unsaturated fatty acids in the marine green alga *Ulva pertusa*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**, 2680-2681.
- Alvarez, F. J., Douglas, L. M. & Konopka, J. B. (2007).** Sterol-rich plasma membrane Domains in Fungi. *Eukaryotic Cell* **6**, 755-763.
- Antonenkov, V. D., Van Veldhoven, P. P., Waelkens, E. & Mannaerts, G. P. (1999).** Comparison of the stability and substrate specificity of purified peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolases A and B from rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1437**, 136-141.
- Antonenkov, V. D., Van Veldhoven, P. P. & Mannaerts, G. P. (2000).** Isolation and subunit composition of native sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-coenzyme A thiolase from normal rat liver peroxisomes. *Protein Expr Purif* **18**, 249-256.
- Antonenkov, V. D. & Hiltunen, J. K. (2006).** Peroxisomal membrane permeability and solute transfer. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1697-1706.
- Antonenkov, V. D., Mindthoff, S., Grunau, S., Erdmann, R. & Hiltunen, J. K. (2009).** An involvement of yeast peroxisomal channels in transmembrane transfer of glyoxylate cycle intermediates. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 2546-2554.
- Arent, S., Pye, V. E. & Henriksen, A. (2008).** Structure and function of plant acyl-CoA oxidases. *Plant Physiol Biochem* **46**, 292-301.
- Arent, S., Christensen, C. E., Pye, V. E., Nørgaard, A. & Henriksen, A. (2010).** The Multifunctional Protein in Peroxisomal  $\beta$ -Oxidation. *J Biol Chem* **285**, 24066-24077.
- Asakura, M., Okuno, T. & Takano, Y. (2006).** Multiple contributions of peroxisomal metabolic function to fungal pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6345-6354.
- Atkinson, B. J., Lewis, R. E. & Kontoyiannis, D. P. (2008).** *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. *Med Mycol* **46**, 541-546.
- Bagnat, M. & Simons, K. (2002a).** Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* **383**, 1475-1480.
- Bagnat, M. & Simons, K. (2002b).** Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 14183-14188.
- Baltazar, M. F., Dickinson, F. M. & Ratledge, C. (1999).** Oxidation of medium-chain acyl-CoA esters by extracts of *Aspergillus niger*: enzymology and characterization of intermediates by HPLC. *Microbiology* **145**, 271-278.
- Barelle, C. J., Priest, C. L., Maccallum, D. M., Gow, N. A. R., Odds, F. C. & Brown, A. J. P. (2006).** Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* **8**, 961-971.

- Bariola, J. R. & Saccente, M. (2008).** *Candida lusitanae* septic arthritis: case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* **61**, 61-63.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. & Yarrow, D. (2000).** *Yeasts: Characteristics and identification*, 3rd edn. Cambridge University Press.
- Barnett, J. A. & Entian, K. (2005).** A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* **22**, 835-894.
- Bartlett, K. & Eaton, S. (2004).** Mitochondrial  $\beta$  - oxidation. *Eur J Biochem* **271**, 462-469.
- Barycki, J. J., O'Brien, L. K., Birktoft, J. J., Strauss, A. W. & Banaszak, L. J. (1999).** Pig heart short chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase revisited: sequence analysis and crystal structure determination. *Protein Sci* **8**, 2010-2018.
- Beopoulos, A., Chardot, T. & Nicaud, J.-M. (2009a).** *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* **91**, 692-696.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J.-L., Molina-Jouve, C. & Nicaud, J.-M. (2009b).** *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res* **48**, 375-387.
- Binstock, J. F., Pramanik, A. & Schulz, H. (1977).** Isolation of a multi-enzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 492-495.
- Black, P. N. & DiRusso, C. C. (2003).** Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: Proteins, Enzymes, and Vectorial Esterification. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 454-472.
- Black, P. N. & DiRusso, C. C. (2007).** Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1771**, 286-298.
- Blankenship, J. R. & Mitchell, A. P. (2006).** How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* **9**, 588-594.
- Bode, K., Hooks, M. A. & Couée, I. (1999).** Identification, separation, and characterization of acyl-coenzyme A dehydrogenases involved in mitochondrial  $\beta$ -oxidation in higher plants. *Plant Physiol* **119**, 1305 -1314.
- Boisnard, S., Ruprich-Robert, G., Florent, M., Da Silva, B., Chapeland-Leclerc, F. & Papon, N. (2008).** Role of Sho1p adaptor in the pseudohyphal development, drugs sensitivity, osmotolerance and oxidant stress adaptation in the opportunistic yeast *Candida lusitanae*. *Yeast* **25**, 849-859.
- Boisnard, S., Espagne, E., Zickler, D., Bourdais, A., Riquet, A.-L. & Berteaux-Lecellier, V. (2009).** Peroxisomal ABC transporters and  $\beta$ -oxidation during the life cycle of the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet Biol* **46**, 55-66.
- Borge, G. I., Vogt, G. & Nilsson, A. (1999).** Intermediates and products formed during fatty acid alpha-oxidation in cucumber (*Cucumis sativus*). *Lipids* **34**, 661-673.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Britton, K., Langridge, S., Baker, P. J., Weeradechapon, K., Sedelnikova, S. E., De Lucas, J. R., Rice, D. W. & Turner, G. (2000).** The crystal structure and active site location of isocitrate lyase from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Structure* **8**, 349-362.
- Britton, K. L., Abeysinghe, I. S., Baker, P. J., Barynin, V., Diehl, P., Langridge, S. J., McFadden, B. A., Sedelnikova, S. E., Stillman, T. J., & other authors. (2001).** The structure and domain organization of *Escherichia coli* isocitrate lyase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 1209-1218.

- Brown, A. J. P., Odds, F. C. & Gow, N. A. R. (2007).** Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **10**, 307-313.
- Cao, Y.-Y., Cao, Y.-B., Xu, Z., Ying, K., Li, Y., Xie, Y., Zhu, Z.-Y., Chen, W.-S. & Jiang, Y.-Y. (2005).** cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 584-589.
- Cappa, M., Bizzarri, C., Vollono, C., Petroni, A. & Banni, S. (2011).** Adrenoleukodystrophy. *Endocr Dev* **20**, 149-160.
- Carlson, M. (1999).** Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**, 202-207.
- Carman, G. M. & Zeimet, G. M. (1996).** Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**, 13293 -13296.
- De Carolis, E., Sanguinetti, M., Florio, A. R., La Sorda, M., D'Inzeo, T., Morandotti, G. A., Fadda, G. & Posteraro, B. (2010).** In vitro susceptibility to seven antifungal agents of *Candida lusitanae* isolates from an Italian university hospital. *J Chemother* **22**, 68-70.
- Carrie, C., Murcha, M. W., Millar, A. H., Smith, S. M. & Whelan, J. (2007).** Nine 3-ketoacyl-CoA thiolases (KATs) and acetoacetyl-CoA thiolases (ACATs) encoded by five genes in *Arabidopsis thaliana* are targeted either to peroxisomes or cytosol but not to mitochondria. *Plant Mol Biol* **63**, 97-108.
- Casey, J., Dobb, R. & Mycock, G. (1990).** An effective technique for enrichment and isolation of *Candida cloacae* mutants defective in alkane catabolism. *J Gen Microbiol* **136**, 1197-1202.
- Chapeland-Leclerc, F., Bouchoux, J., Goumar, A., Chastin, C., Villard, J. & Noel, T. (2005).** Inactivation of the FCY2 gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3101-3108.
- Chapeland-Leclerc, F., Paccaliet, P., Ruprich-Robert, G., Rebutier, D., Chastin, C. & Papon, N. (2007).** Differential involvement of histidine kinase receptors in pseudohyphal development, stress adaptation, and drug sensitivity of the opportunistic yeast *Candida lusitanae*. *Eukaryotic Cell* **6**, 1782-1794.
- Cheawchanlertfa, P., Cheevadhanarak, S., Tanticharoen, M., Maresca, B. & Laoteng, K. (2010).** Up-regulated expression of desaturase genes of *Mucor rouxii* in response to low temperature associates with pre-existing cellular fatty acid constituents. *Mol Biol Rep* **38**, 3455-3462.
- Cheng, J., Park, T. S., Fischl, A. S. & Ye, X. S. (2001).** Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **21**, 6198-6209.
- Cheng, J., Park, T.-S., Chio, L.-C., Fischl, A. S. & Ye, X. S. (2003).** Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **23**, 163-177.
- Cheng, Q., Sanglard, D., Vanhanen, S., Liu, H. T., Bombelli, P., Smith, A. & Slabas, A. R. (2005).** *Candida* yeast long chain fatty alcohol oxidase is a c-type haemoprotein and plays an important role in long chain fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1735**, 192-203.
- Chopra, A. & Khuller, G. K. (1983).** Lipids of pathogenic fungi. *Prog Lipid Res* **22**, 189-220.
- Concia, E., Azzini, A. M. & Conti, M. (2009).** Epidemiology, incidence and risk factors for invasive candidiasis in high-risk patients. *Drugs* **69 Suppl 1**, 5-14.

- Cornell, M. J., Alam, I., Soanes, D. M., Wong, H. M., Hedeler, C., Paton, N. W., Rattray, M., Hubbard, S. J., Talbot, N. J. & Oliver, S. G. (2007).** Comparative genome analysis across a kingdom of eukaryotic organisms: Specialization and diversification in the Fungi. *Genome Res* **17**, 1809-1822.
- Craft, D. L., Madduri, K. M., Eshoo, M. & Wilson, C. R. (2003).** Identification and characterization of the CYP52 Family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to  $\alpha$ ,  $\omega$ -dicarboxylic acids. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5983-5991.
- Croes, K., Van Veldhoven, P. P., Mannaerts, G. P. & Casteels, M. (1997).** Production of formyl-CoA during peroxisomal alpha-oxidation of 3-methyl-branched fatty acids. *FEBS Lett* **407**, 197-200.
- Cugini, C., Calfee, M. W., Farrow, J. M., 3rd, Morales, D. K., Pesci, E. C. & Hogan, D. A. (2007).** Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **65**, 896-906.
- Cuvelier, C., Cabaraux, J. F., Dufrasne, I., Hornick, J. L. & Istasse, L. (2004).** Fatty acids: nomenclature and dietary sources. *Ann Méd Vét* **148**, 133-140.
- Deveau, A., Piispanen, A. E., Jackson, A. A. & Hogan, D. A. (2010).** Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryotic Cell* **9**, 569-577.
- Develoux, M. & Bretagne, S. (2005).** Candidoses et levures diverses. *EMC - Maladies Infectieuses* **2**, 119-139.
- Distel, B. & Kragt, A. (2006).** Purification of yeast peroxisomes. *Methods Mol Biol* **313**, 21-26.
- Dmochowska, A., Dignard, D., Maleszka, R. & Thomas, D. Y. (1990).** Structure and transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* *POX1* gene encoding acyl-coenzyme A oxidase. *Gene* **88**, 247-252.
- Dommes, P., Dommes, V. & Kunau, W. H. (1983).** Beta-oxidation in *Candida tropicalis*. Partial purification and biological function of an inducible 2,4-dienoyl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **258**, 10846-10852.
- Dufourc, E. J. (2008).** Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol* **1**, 63-77.
- Dunn, M. F., Ramírez-Trujillo, J. A. & Hernández-Lucas, I. (2009).** Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology* **155**, 3166-3175.
- Eaton, S., Bursby, T., Middleton, B., Pourfarzam, M., Mills, K., Johnson, A. W. & Bartlett, K. (2000).** The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon? *Biochem Soc Trans* **28**, 177-182.
- Eaton, S. (2002).** Control of mitochondrial  $\beta$ -oxidation flux. *Prog Lipid Res* **41**, 197-239.
- Ebel, F., Schwienbacher, M., Beyer, J., Heesemann, J., Brakhage, A. A. & Brock, M. (2006).** Analysis of the regulation, expression, and localisation of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. *Fungal Genet Biol* **43**, 476-489.
- Eggimann, P., Garbino, J. & Pittet, D. (2003).** Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* **3**, 685-702.
- Eirich, L. D., Craft, D. L., Steinberg, L., Asif, A., Eschenfeldt, W. H., Stols, L., Donnelly, M. I. & Wilson, C. R. (2004).** Cloning and characterization of three fatty alcohol oxidase genes from *Candida tropicalis* strain ATCC 20336. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4872-4879.

- El Kirat-Chatel, S. (2010).** *Développements 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.* Thèse de Doctorat d'Université, Bordeaux: université Bordeaux Segalen.
- El-Kirat-Chatel, S., Dementhon, K. & Noël, T. (2011).** A two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes in the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitaniae*. *Yeast* **28**, 321-330.
- Ells, R., Kock, J. L. F., Albertyn, J., Kemp, G. & Pohl, C. H. (2011).** Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on prostaglandin E<sub>2</sub> production by *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms. *Med Microbiol Immunol* **200**, 23-28.
- El-Sharoud, W. M., Belloch, C., Peris, D. & Querol, A. (2009).** Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. *J Food Sci* **74**, M341-346.
- Engel, C. K., Mathieu, M., Zeelen, J. P., Hiltunen, J. K. & Wierenga, R. K. (1996).** Crystal structure of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase at 2.5 angstroms resolution: a spiral fold defines the CoA-binding pocket. *EMBO J* **15**, 5135-5145.
- Enjalbert, B. & Whiteway, M. (2005).** Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth. *Eukaryotic Cell* **4**, 1203-1210.
- Ensenauer, R., He, M., Willard, J.-M., Goetzman, E. S., Corydon, T. J., Vandahl, B. B., Mohsen, A.-W., Isaya, G. & Vockley, J. (2005).** Human acyl-CoA dehydrogenase-9 plays a novel role in the mitochondrial  $\beta$ -oxidation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **280**, 32309-32316.
- Erb-Downward, J. R. & Noverr, M. C. (2007).** Characterization of prostaglandin E<sub>2</sub> production by *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**, 3498-3505.
- Faergeman, N. J., Black, P. N., Zhao, X. D., Knudsen, J. & DiRusso, C. C. (2001).** The Acyl-CoA synthetases encoded within *FAA1* and *FAA4* in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular utilization. *J Biol Chem* **276**, 37051-37059.
- Favel, A., Michel-Nguyen, A., Peyron, F., Martin, C., Thomachot, L., Datry, A., Bouchara, J.-P., Challier, S., Noël, T., Chastin, P., Regli, P. (2003).** Colony morphology switching of *Candida lusitaniae* 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**, 331-339.
- Feng, Q., Summers, E., Guo, B. & Fink, G. (1999).** Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 6339-6346.
- Ferdinandusse, S., Denis, S., van Roermund, C. W. T., Wanders, R. J. A. & Dacremont, G. (2004).** Identification of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids. *J Lipid Res* **45**, 1104-1111.
- Ferdinandusse, S., Kostopoulos, P., Denis, S., Rusch, H., Overmars, H., Dillmann, U., Reith, W., Haas, D., Wanders, R. J. A., Dacremont, G. (2006).** Mutations in the gene encoding peroxisomal sterol carrier protein X (SCPx) cause leukoencephalopathy with dystonia and motor neuropathy. *Am J Hum Genet* **78**, 1046-1052.
- Feron, G., Blin-Perrin, C., Krasniewski, I., Mauvais, G. & Lherminier, J. (2005).** Metabolism of fatty acid in yeast: characterisation of beta-oxidation and ultrastructural changes in the genus *Sporidiobolus* sp. cultivated on ricinoleic acid methyl ester. *FEMS Microbiol Lett* **250**, 63-69.

- Filppula, S. A., Sormunen, R. T., Hartig, A., Kunau, W. H. & Hiltunen, J. K. (1995).** Changing stereochemistry for a metabolic pathway *in vivo*. Experiments with the peroxisomal beta-oxidation in yeast. *J Biol Chem* **270**, 27453-27457.
- Filppula, S. A., Yagi, A. I., Kilpeläinen, S. H., Novikov, D., FitzPatrick, D. R., Vihinen, M., Valle, D. & Hiltunen, J. K. (1998).** Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase from rat liver. Molecular characterization. *J Biol Chem* **273**, 349-355.
- Fleck, C. B., Schöbel, F. & Brock, M. (2011).** Nutrient acquisition by pathogenic fungi: Nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol* **301**, 400-407.
- Fong, J. C. & Schulz, H. (1977).** Purification and properties of pig heart crotonase and the presence of short chain and long chain enoyl coenzyme A hydratases in pig and guinea pig tissues. *J Biol Chem* **252**, 542-547.
- Fong, J. C. & Schulz, H. (1981).** Short-chain and long-chain enoyl-CoA hydratases from pig heart muscle. *Meth Enzymol* **71 Pt C**, 390-398.
- Footitt, S., Slocombe, S. P., Larner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A. & Holdsworth, M. (2002).** Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP. *EMBO J* **21**, 2912-2922.
- Fosså, A., Beyer, A., Pfitzner, E., Wenzel, B. & Kunau, W. H. (1995).** Molecular cloning, sequencing and sequence analysis of the fox-2 gene of *Neurospora crassa* encoding the multifunctional beta-oxidation protein. *Mol Gen Genet* **247**, 95-104.
- François, F., Noël, T., Pépin, R., Brulfert, A., Chastin, C., Favel, A. & Villard, J. (2001).** Alternative identification test relying upon sexual reproductive abilities of *Candida lusitanae* strains isolated from hospitalized patients. *J Clin Microbiol* **39**, 3906-3914.
- François, F., Chapeland-Leclerc, F., Villard, J. & Noël, T. (2004).** Development of an integrative transformation system for the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitanae* using *URA3* as a selection marker. *Yeast* **21**, 95-106.
- Funk, C. D. (2001).** Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-1875.
- Futerman, A. H. & Riezman, H. (2005).** The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* **15**, 312-318.
- Gabaldón, T. (2010).** Peroxisome diversity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**, 765-773.
- Galès, A., Conduché, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olagnier, D., Béraud, M., Martin-Blondel, G., Linas, M.-D., Auwerx, J., & other authors. (2010).** PPARgamma controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **6**, e1000714.
- García, E. E., Nicaud, J.-M., Belin, J.-M. & Waché, Y. (2007).** Effect of acyl-CoA oxidase activity on the accumulation of  $\gamma$ -decalactone by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A factorial approach. *Biotechnol J* **2**, 1280-1285.
- Gargeya, I. B., Pruitt, W. R., Simmons, R. B., Meyer, S. A. & Ahearn, D. G. (1990).** Occurrence of *Clavispora lusitanae*, the teleomorph of *Candida lusitanae*, among clinical isolates. *J Clin Microbiol* **28**, 2224-2227.
- Gaur, M., Choudhury, D. & Prasad, R. (2005).** Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**, 3-15.
- Germain, V., Rylott, E. L., Larson, T. R., Sherson, S. M., Bechtold, N., Carde, J. P., Bryce, J. H., Graham, I. A. & Smith, S. M. (2001).** Requirement for 3-ketoacyl-CoA

thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **28**, 1-12.

**Ghisla, S. & Thorpe, C. (2004).** Acyl - CoA dehydrogenases. *Eur J Biochem* **271**, 494-508.

**Goepfert, S., Vidoudez, C., Rezzonico, E., Hiltunen, J. K. & Poirier, Y. (2005).** Molecular identification and characterization of the *Arabidopsis* delta(3,5),delta(2,4)-dienoyl-coenzyme A isomerase, a peroxisomal enzyme participating in the beta-oxidation cycle of unsaturated fatty acids. *Plant Physiol* **138**, 1947-1956.

**Gould, S. G., Keller, G. A. & Subramani, S. (1987).** Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J Cell Biol* **105**, 2923-2931.

**Grunau, S., Mindthoff, S., Rottensteiner, H., Sormunen, R. T., Hiltunen, J. K., Erdmann, R. & Antonenkov, V. D. (2009).** Channel-forming activities of peroxisomal membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* **276**, 1698-1708.

**Le Guédard, M., Bessoule, J.-J., Boyer, V., Ayciriex, S., Velours, G., Kulik, W., Ejsing, C. S., Shevchenko, A., Coulon, D., Lessire, R., Testet, E. (2009).** PSII is responsible for the stearic acid enrichment that is characteristic of phosphatidylinositol in yeast. *FEBS J* **276**, 6412-6424.

**Guérin, B., Labbe, P. & Somlo, M. (1979).** Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol* **55**, 149-159.

**Gühnemann-Schäfer, K. & Kindl, H. (1995).** Fatty acid beta-oxidation in glyoxysomes. Characterization of a new tetrafunctional protein (MFP III). *Biochim Biophys Acta* **1256**, 181-186.

**Guinet, R., Chanas, J., Goullier, A., Bonnefoy, G. & Ambroise-Thomas, P. (1983).** Fatal septicemia due to amphotericin B-resistant *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* **18**, 443-444.

**Gurvitz, A., Rottensteiner, H., Kilpeläinen, S. H., Hartig, A., Hiltunen, J. K., Binder, M., Dawes, I. W. & Hamilton, B. (1997).** The *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase is encoded by the oleate-inducible gene SPS19. *J Biol Chem* **272**, 22140-22147.

**Gurvitz, A., Mursula, A. M., Firzinger, A., Hamilton, B., Kilpeläinen, S. H., Hartig, A., Ruis, H., Hiltunen, J. K. & Rottensteiner, H. (1998).** Peroxisomal Delta3-cis-Delta2-trans-enoyl-CoA isomerase encoded by ECII is required for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **273**, 31366-31374.

**Gurvitz, A., Mursula, A. M., Yagi, A. I., Hartig, A., Ruis, H., Rottensteiner, H. & Hiltunen, J. K. (1999).** Alternatives to the isomerase-dependent pathway for the beta-oxidation of oleic acid are dispensable in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of YOR180c/DCI1 encoding peroxisomal delta(3,5)-delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase. *J Biol Chem* **274**, 24514-24521.

**Haapalainen, A. M., van Aalten, D. M. F., Meriläinen, G., Jalonen, J. E., Piriäinen, P., Wierenga, R. K., Hiltunen, J. K. & Glumoff, T. (2001).** Crystal structure of the liganded SCP-2-like domain of human peroxisomal multifunctional enzyme type 2 at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* **313**, 1127-1138.

**Haapalainen, A. M., Meriläinen, G. & Wierenga, R. K. (2006).** The thiolase superfamily: condensing enzymes with diverse reaction specificities. *Trends Biochem Sci* **31**, 64-71.

**Haddouche, R., Delessert, S., Sabirova, J., Neuvéglise, C., Poirier, Y. & Nicaud, J.-M. (2010).** Roles of multiple acyl-CoA oxidases in the routing of carbon flow towards  $\beta$ -oxidation and polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.*

- Hadfield, T. L., Smith, M. B., Winn, R. E., Rinaldi, M. G. & Guerra, C. (1987).** Mycoses caused by *Candida lusitanae*. *Rev Infect Dis* **9**, 1006-1012.
- Hamberg, M., Sanz, A. & Castresana, C. (1999).**  $\alpha$ -Oxidation of fatty acids in higher plants. *J Biol Chem* **274**, 24503-24513.
- Hamberg, M., Le<sup>3</sup>n, I. P. de, Sanz, A. & Castresana, C. (2002).** Fatty acid  $\alpha$ -dioxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 363-374.
- Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. (2002).** The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* **277**, 25847-25850.
- Hartig, A., Simon, M. M., Schuster, T., Daugherty, J. R., Yoo, H. S. & Cooper, T. G. (1992).** Differentially regulated malate synthase genes participate in carbon and nitrogen metabolism of *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **20**, 5677-5686.
- Hayashi, H., De Bellis, L., Ciurli, A., Kondo, M., Hayashi, M. & Nishimura, M. (1999).** A novel acyl-CoA oxidase that can oxidize short-chain acyl-CoA in plant peroxisomes. *J Biol Chem* **274**, 12715-12721.
- Hayashi, M., Nito, K., Takei-Hoshi, R., Yagi, M., Kondo, M., Suenaga, A., Yamaya, T. & Nishimura, M. (2002).** Ped3p is a peroxisomal ATP-Binding Cassette transporter that might supply substrates for fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Plant Cell Physiol* **43**, 1-11.
- Hettema, E. H., Van Roermund, C. W. T., Distel, B., Van Den Berg, M., Vilela, C., Rodrigues-Pousada, C., Wanders, R. J. A. & Tabak, H. F. (1996).** The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**, 3813-3822.
- Hettema, E. H. & Tabak, H. F. (2000).** Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1486**, 18-27.
- Heung, L. J., Luberto, C., Plowden, A., Hannun, Y. A. & Del Poeta, M. (2004).** The sphingolipid pathway regulates Pkc1 through the formation of diacylglycerol in *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem* **279**, 21144-21153.
- He, X. Y., Schulz, H. & Yang, S. Y. (1998).** A human brain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is identical to an amyloid beta-peptide-binding protein involved in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **273**, 10741-10746.
- Hiller, E., Zavrel, M., Hauser, N., Sohn, K., Burger-Kentischer, A., Lemuth, K. & Rupp, S. (2011).** Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host : Focus on the function of cell wall proteins. *Int J Med Microbiol* **301**, 384-389.
- Hiltunen, J. K., Palosaari, P. M. & Kunau, W. H. (1989).** Epimerization of 3-hydroxyacyl-CoA esters in rat liver. Involvement of two 2-enoyl-CoA hydratases. *J Biol Chem* **264**, 13536-13540.
- Hiltunen, J. K., Wenzel, B., Beyer, A., Erdmann, R., Fosså, A. & Kunau, W. H. (1992).** Peroxisomal multifunctional beta-oxidation protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular analysis of the fox2 gene and gene product. *J Biol Chem* **267**, 6646-6653.
- Hiltunen, J. K., Filppula, S. A., Koivuranta, K. T., Siivari, K., Qin, Y.-M. & Hayrinen, H. M. (1996).** Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and polyunsaturated fatty Acids. *Ann N Y Acad Sci* **804**, 116-128.
- Hiltunen, J. K. & Qin, Y.-M. (2000).**  $\beta$ -oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1484**, 117-128.
- Hiltunen, J. K., Mursula, A. M., Rottensteiner, H., Wierenga, R. K., Kastaniotis, A. J. & Gurvitz, A. (2003).** The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 35-64.

- Hooks, M. A., Bode, K. & Couée, I. (1996).** Higher-plant medium- and short-chain acyl-CoA oxidases: identification, purification and characterization of two novel enzymes of eukaryotic peroxisomal beta-oxidation. *Biochem J* **320**, 607-614.
- Hooks, M. A., Kellas, F. & Graham, I. A. (1999).** Long-chain acyl-CoA oxidases of *Arabidopsis*. *Plant J* **20**, 1-13.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. & Nickerson, K. W. (2001).** Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2982-2992.
- Hornby, J. M. & Nickerson, K. W. (2004).** Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2305-2307.
- Horn, D. L., Neofytos, D., Anaissie, E. J., Fishman, J. A., Steinbach, W. J., Olyaei, A. J., Marr, K. A., Pfaller, M. A., Chang, C. & Webster, K. M. (2009).** Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. *Clin Infect Dis* **48**, 1695-1703.
- Huang, M., Cham, E., Eppes, C. S., Gerber, S., Reed, K. & Ernst, L. M. (2011).** Placental and Fetal Findings in Intrauterine *Candida lusitanae* Infection Following in Vitro Fertilization and Embryo Transfer. *Pediatr Dev Pathol*. [epub 2011 Aug 24]
- Hube, B. (2006).** Infection-associated genes of *Candida albicans*. *Future Microbiol* **1**, 209-218.
- Huyghe, S., Mannaerts, G. P., Baes, M. & Van Veldhoven, P. P. (2006).** Peroxisomal multifunctional protein-2: the enzyme, the patients and the knockout mouse model. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 973-994.
- Hynes, M. J., Murray, S. L., Duncan, A., Khew, G. S. & Davis, M. A. (2006).** Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **5**, 794-805.
- Hynes, M. J., Szewczyk, E., Murray, S. L., Suzuki, Y., Davis, M. A. & Sealy-Lewis, H. M. (2007).** Transcriptional control of gluconeogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **176**, 139-150.
- Hynes, M. J., Murray, S. L., Khew, G. S. & Davis, M. A. (2008).** Genetic analysis of the role of peroxisomes in the utilization of acetate and fatty acids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **178**, 1355-1369.
- Idnurm, A. & Howlett, B. J. (2002).** Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). *Eukaryotic Cell* **1**, 719-724.
- Ikeda, Y., Hine, D. G., Okamura-Ikeda, K. & Tanaka, K. (1985).** Mechanism of action of short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases. Direct evidence for carbanion formation as an intermediate step using enzyme-catalyzed C-2 proton/deuteron exchange in the absence of C-3 exchange. *J Biol Chem* **260**, 1326-1337.
- International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB) (1968).** Nomenclature of lipids. Commission on Biochemical Nomenclature. *Bull Soc Chim Biol* **50**, 1363-1378.
- International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB) (1978).** The nomenclature of lipids (recommendations 1976). Commission on Biochemical Nomenclature. *J Lipid Res* **19**, 114-128.
- Ishikawa, M., Mikami, Y., Usukura, J., Iwasaki, H., Shinagawa, H. & Morikawa, K. (1997).** Reconstitution, morphology and crystallization of a fatty acid beta-oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas fragi*. *Biochem J* **328** ( Pt 3), 815-820.

- Iwanyshyn, W. M., Han, G.-S. & Carman, G. M. (2004).** Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by Zinc. *J Biol Chem* **279**, 21976-21983.
- Jackson, S., Schaefer, J., Middleton, B. & Turnbull, D. M. (1995).** Characterization of a novel enzyme of human fatty acid  $\beta$ -oxidation: a matrix-associated, mitochondrial 2-enoyl-CoA hydratase. *Biochem Biophys Res Commun* **214**, 247-253.
- Jansen, G. A. & Wanders, R. J. A. (2006).** Alpha-oxidation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1763**, 1403-1412.
- Jenkins, G. M., Richards, A., Wahl, T., Mao, C., Obeid, L. & Hannun, Y. (1997).** Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**, 32566-32572.
- Jiang, Z. & Thorpe, C. (1983).** Acyl-CoA oxidase from *Candida tropicalis*. *Biochemistry* **22**, 3752-3758.
- Johnson DR, Knoll LJ, Levin DE & Gordon JI. (1994).** *Saccharomyces cerevisiae* contains four fatty acid activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. *J Cell Biol* **127**, 751-762.
- Kamiryo, T., Abe, M., Okazaki, K., Kato, S. & Shimamoto, N. (1982).** Absence of DNA in peroxisomes of *Candida tropicalis*. *J Bacteriol* **152**, 269-274.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M. & Kozik, A. (2009).** Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* **56**, 211-224.
- Katz, M. E. & Hynes, M. J. (1989).** Isolation and analysis of the acetate regulatory gene, *facB*, from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **9**, 5696-5701.
- Kennedy, E. P. & Lehninger, A. L. (1950).** The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **185**, 275-285.
- Kiel, J. A. K. ., Veenhuis, M. & Van Der Klei, I. J. (2006).** *PEX* genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic* **7**, 1291-1303.
- Kiema, T.-R., Taskinen, J. P., Pirilä, P. L., Koivuranta, K. T., Wierenga, R. K. & Hiltunen, J. K. (2002).** Organization of the multifunctional enzyme type 1: interaction between N- and C-terminal domains is required for the hydratase-1/isomerase activity. *Biochem J* **367**, 433-441.
- Kim, J. & Sudbery, P. (2011).** *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* **49**, 171-177.
- Kim, J. P. & Miura, R. (2004).** Acyl - CoA dehydrogenases and acyl - CoA oxidases. *Eur J Biochem* **271**, 483-493.
- Kim, M. C., Kim, T. H., Park, J. H., Moon, B. Y., Lee, C.-H. & Cho, S. H. (2007).** Expression of rice acyl-CoA oxidase isoenzymes in response to wounding. *J Plant Physiol* **164**, 665-668.
- Kimura, C., Mizugaki, M., Yamanaka, H., Fujino, M. & Morishima, T. (2004).** [2,4-Dienoyl-CoA reductases: from discovery toward pathophysiological significance]. *Nippon Rinsho* **62**, 1577-1583.
- Klose, J. & Kronstad, J. W. (2006).** The multifunctional beta-oxidation enzyme is required for full symptom development by the biotrophic maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **5**, 2047-2061.

- Knoll, L. J., Schall, O. F., Suzuki, I., Gokel, G. W. & Gordon, J. I. (1995).** Comparison of the reactivity of tetradecenoic acids, a triacsin, and unsaturated oximes with four purified *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid activation proteins. *J Biol Chem* **270**, 20090-20097.
- Kock, J. L. F., Sebolai, O. M., Pohl, C. H., van Wyk, P. W. J. & Lodolo, E. J. (2007).** Oxylipin studies expose aspirin as antifungal. *FEMS Yeast Res* **7**, 1207-1217.
- Koski, M. K., Haapalainen, A. M., Hiltunen, J. K. & Glumoff, T. (2004).** A two-domain structure of one subunit explains unique features of eukaryotic hydratase 2. *J Biol Chem* **279**, 24666-24672.
- Krcmery, V. & Barnes, A. J. (2002).** Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hospit Infect* **50**, 243-260.
- Kristian Koski, M., Haapalainen, A. M., Hiltunen, J. K. & Glumoff, T. (2005).** Crystal structure of 2-enoyl-CoA hydratase 2 from human peroxisomal multifunctional enzyme type 2. *J Mol Biol* **345**, 1157-1169.
- Kunau, W. H. & Dommes, P. (1978).** Degradation of unsaturated fatty acids. Identification of intermediates in the degradation of cis-4-decenoyl-CoA by extracts of beef-liver mitochondria. *Eur J Biochem* **91**, 533-544.
- Kunau, W. H., Böhne, S., de la Garza, M., Kionka, C., Mateblowski, M., Schultz-Borchard, U. & Thieringer, R. (1988).** Comparative enzymology of beta-oxidation. *Biochem Soc Trans* **16**, 418-420.
- Kunau, W.-H., Dommes, V. & Schulz, H. (1995).**  $\beta$ -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Progr Lipid Res* **34**, 267-342.
- Kunze, M., Kragler, F., Binder, M., Hartig, A. & Gurvitz, A. (2002).** Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *Eur J Biochem* **269**, 915-922.
- Kurihara, T., Ueda, M., Okada, H., Kamasawa, N., Naito, N., Osumi, M. & Tanaka, A. (1992).** Beta-oxidation of butyrate, the short-chain-length fatty acid, occurs in peroxisomes in the yeast *Candida tropicalis*. *J Biochem* **111**, 783-787.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lazarow, P. B. & De Duve, C. (1976).** A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 2043-2046.
- Lewis, R. E. (2009).** Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin* **25**, 1732-1740.
- Liang, W.-C. & Nishino, I. (2010).** State of the art in muscle lipid diseases. *Acta Myol* **29**, 351-356.
- Li, X. & Gould, S. J. (2002).** *PEX11* promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol* **156**, 643-651.
- Lorenz, M. C. & Fink, G. R. (2001).** The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* **412**, 83-86.
- Lorenz, M. C. & Fink, G. R. (2002).** Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell* **1**, 657-662.
- Lorenz, M. C., Bender, J. A. & Fink, G. R. (2004).** Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell* **3**, 1076-1087.

- Luberto, C., Toffaletti, D. L., Wills, E. A., Tucker, S. C., Casadevall, A., Perfect, J. R., Hannun, Y. A. & Del Poeta, M. (2001).** Roles for inositol-phosphoryl ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of *Cr. neoformans*. *Genes Dev* **15**, 201-212.
- Luo, M. J., Mao, L. F. & Schulz, H. (1995).** Short-chain 3-hydroxy-2-methylacyl-CoA dehydrogenase from rat liver: purification and characterization of a novel enzyme of isoleucine metabolism. *Arch Biochem Biophys* **321**, 214-220.
- Maggio-Hall, L. A. & Keller, N. P. (2004).** Mitochondrial  $\beta$ -oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **54**, 1173-1185.
- Maggio-Hall, L. A., Lyne, P., Wolff, J. A. & Keller, N. P. (2008).** A single acyl-CoA dehydrogenase is required for catabolism of isoleucine, valine and short-chain fatty acids in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **45**, 180-189.
- Manon, S. & Guérin, M. (1998).** Investigation of the yeast mitochondrial unselective channel in intact and permeabilized spheroplasts. *Biochem Mol Biol Int* **44**, 565-575.
- Martin, R., Wächtler, B., Schaller, M., Wilson, D. & Hube, B. (2011).** Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol* **301**, 417-422.
- Martin, S. W. & Konopka, J. B. (2004).** Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **3**, 675-684.
- Maruyama, J.-ichi, Juvvadi, P. R., Ishi, K. & 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**, 1081-1088.
- Masterson C, Blackburn A & Wood C. (2000).** Acyl-CoA dehydrogenase activity in pea cotyledon tissue during germination and initial growth. *Biochem Soc Trans* **28**: 760-2
- Masterson, C. & Wood, C. (2001).** Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation capacities of organs from a non-oilseed plant. *Proc Biol Sci* **268**, 1949-1953.
- Masterson, C. & Wood, C. (2009).** Influence of mitochondrial  $\beta$ -oxidation on early pea seedling development. *New Phytol* **181**, 832-842.
- Mathieu, M., Zeelen, J. P., Pauptit, R. A., Erdmann, R., Kunau, W. H. & Wierenga, R. K. (1994).** The 2.8 Å crystal structure of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: a five-layered alpha beta alpha beta alpha structure constructed from two core domains of identical topology. *Structure* **2**, 797-808.
- Mathieu, M., Modis, Y., Zeelen, J. P., Engel, C. K., Abagyan, R. A., Ahlberg, A., Rasmussen, B., Lamzin, V. S., Kunau, W. H. & Wierenga, R. K. (1997).** The 1.8 Å crystal structure of the dimeric peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for substrate binding and reaction mechanism. *J Mol Biol* **273**, 714-728.
- Matsubara, Y., Indo, Y., Naito, E., Ozasa, H., Glassberg, R., Vockley, J., Ikeda, Y., Kraus, J. & Tanaka, K. (1989).** Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the precursors of rat long chain acyl-coenzyme A, short chain acyl-coenzyme A, and isovaleryl-coenzyme A dehydrogenases. Sequence homology of four enzymes of the acyl-CoA dehydrogenase family. *J Biol Chem* **264**, 16321 -16331.
- McAlester, G., O’Gara, F. & Morrissey, J. P. (2008).** Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Med Microbiol* **57**, 563-569.
- McCammon, M. T., Veenhuis, M., Trapp, S. B. & Goodman, J. M. (1990).** Association of glyoxylate and beta-oxidation enzymes with peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **172**, 5816-5827.

- McDonough, M. A., Kavanagh, K. L., Butler, D., Searls, T., Oppermann, U. & Schofield, C. J. (2005).** Structure of human phytanoyl-CoA 2-hydroxylase identifies molecular mechanisms of Refsum disease. *J Biol Chem* **280**, 41101-41110.
- McGill, K. A. & Busse, W. W. (1996).** Zileuton. *Lancet* **348**, 519-524.
- McKinney, J. D., Höner zu Bentrup, K., Muñoz-Elías, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., Swenson, D., Sacchetti, J. C., Jacobs, W. R. & Russell, D. G. (2000).** Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**, 735-738.
- Miceli, M. H., Díaz, J. A. & Lee, S. A. (2011).** Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* **11**, 142-151.
- Michel, R. G., Kinasewitz, G. T., Drevets, D. A., Levin, J. H. & Warden, D. W. (2009).** Prosthetic valve endocarditis caused by *Candida lusitanae*, an uncommon pathogen: a case report. *J Med Case Reports* **3**, 7611.
- Miyata, N., Hosoi, K.-ichiro, Mukai, S. & Fujiki, Y. (2009).** In vitro import of peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) receptor Pex7p into peroxisomes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1793**, 860-870.
- Modis, Y., Filppula, S. A., Novikov, D. K., Norledge, B., Hiltunen, J. K. & Wierenga, R. K. (1998).** The crystal structure of dienoyl-CoA isomerase at 1.5 Å resolution reveals the importance of aspartate and glutamate sidechains for catalysis. *Structure* **6**, 957-970.
- Moreno de la Garza, M., Schultz-Borchard, U., Crabb, J. W. & Kunau, W.-H. (1985).** Peroxisomal beta-oxidation system of *Candida tropicalis*. *Eur J Biochem* **148**, 285-291.
- Morrow, J. D., Awad, J. A., Wu, A., Zackert, W. E., Daniel, V. C. & Roberts, L. J., 2nd. (1996).** Nonenzymatic free radical-catalyzed generation of thromboxane-like compounds (isothromboxanes) *in vivo*. *J Biol Chem* **271**, 23185-23190.
- Mursula, A. M., Hiltunen, J. K. & Wierenga, R. K. (2004).** Structural studies on delta(3)-delta(2)-enoyl-CoA isomerase: the variable mode of assembly of the trimeric disks of the crotonase superfamily. *FEBS Lett* **557**, 81-87.
- Mysyakina, I. S. & Feofilova, E. P. (2011).** The role of lipids in the morphogenetic processes of mycelial fungi. *Microbiology* **80**, 297-306.
- Navarathna, D. H. M. L. P., Hornby, J. M., Hoerrmann, N., Parkhurst, A. M., Duhamel, G. E. & Nickerson, K. W. (2005).** Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. *J Antimicrob Chemother* **56**, 1156-1159.
- Navarathna, D. H. M. L. P., Hornby, J. M., Krishnan, N., Parkhurst, A., Duhamel, G. E. & Nickerson, K. W. (2007).** Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**, 1609-1618.
- Navarro-García, F., Sánchez, M., Nombela, C. & Pla, J. (2001).** Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 245-268.
- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A. & Eisenhaber, F. (2003).** Prediction of Peroxisomal Targeting Signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol* **328**, 581-592.
- Nguyen, L. N., Gacser, A. & Nosanchuk, J. D. (2011).** The stearoyl-coenzyme A desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in *Candida parapsilosis* through unsaturated fatty acid production. *Infect Immun* **79**, 136-145.

- Nicola, A. M., Casadevall, A. & Goldman, D. L. (2008).** Fungal killing by mammalian phagocytic cells. *Curr Opin Microbiol* **11**, 313-317.
- Nigam, S., Ciccoli, R., Ivanov, I., Szczepanski, M. & Deva, R. (2011).** On mechanism of quorum sensing in *Candida albicans* by 3(R)-hydroxy-tetradecaenoic acid. *Curr Microbiol* **62**, 55-63.
- Noble, S. M., French, S., Kohn, L. A., Chen, V. & Johnson, A. D. (2010).** Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat Genet* **42**, 590-598.
- Noverr, M. C., Phare, S. M., Toews, G. B., Coffey, M. J. & Huffnagle, G. B. (2001).** Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun* **69**, 2957-2963.
- Noverr, M. C., Toews, G. B. & Huffnagle, G. B. (2002).** Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. *Infect Immun* **70**, 400-402.
- Noverr, M. C., Erb-Downward, J. R. & Huffnagle, G. B. (2003).** Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev* **16**, 517-533.
- Noverr, M. C. & Huffnagle, G. B. (2004a).** Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infect Immun* **72**, 6206-6210.
- Noverr, M. C. & Huffnagle, G. B. (2004b).** Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol* **12**, 562-568.
- Noyes, B. E. & Bradshaw, R. A. (1973).** L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase from pig heart muscle. II. Subunit structure. *J Biol Chem* **248**, 3061-3066.
- Nucci, M. & Anaissie, E. (2001).** Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis* **33**, 1959-1967.
- O'Connell, M., Henry, S. & Shapiro, L. (1986).** Fatty acid degradation in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **168**, 49-54.
- Ohkuma, M., Zimmer, T., Iida, T., Schunck, W. H., Ohta, A. & Takagi, M. (1998).** Isozyme function of n-alkane-inducible cytochromes P450 in *Candida maltosa* revealed by sequential gene disruption. *J Biol Chem* **273**, 3948-3953.
- Okazaki, K., Takechi, T., Kambara, N., Fukui, S., Kubota, I. & Kamiryo, T. (1986).** Two acyl-coenzyme A oxidases in peroxisomes of the yeast *Candida tropicalis*: primary structures deduced from genomic DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 1232-1236.
- Okazaki, K., Tan, H., Fukui, S., Kubota, I. & Kamiryo, T. (1987).** Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase multigene family of the yeast *Candida tropicalis*; nucleotide sequence of a third gene and its protein product. *Gene* **58**, 37-44.
- Olivas, I., Royuela, M., Romero, B., Monteiro, M. C., Mínguez, J. M., Laborda, F. & Lucas, J. R. D. (2008).** Ability to grow on lipids accounts for the fully virulent phenotype in neutropenic mice of *Aspergillus fumigatus* null mutants in the key glyoxylate cycle enzymes. *Fungal Genet Biol* **45**, 45-60.
- Osumi, T. & Hashimoto, T. (1979).** Peroxisomal beta oxidation system of rat liver. Copurification of enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* **89**, 580-584.
- Osumi, T., Tsukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S. & Hashimoto, T. (1991).** Amino-terminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 947-954.

- Oura, T. & Kajiwara, S. (2008).** Disruption of the sphingolipid Delta8-desaturase gene causes a delay in morphological changes in *Candida albicans*. *Microbiology* **154**, 3795-3803.
- Oura, T. & Kajiwara, S. (2010).** *Candida albicans* sphingolipid C9-methyltransferase is involved in hyphal elongation. *Microbiology* **156**, 1234-1243.
- Palosaari, P. M. & Hiltunen, J. K. (1990).** Peroxisomal bifunctional protein from rat liver is a trifunctional enzyme possessing 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and delta 3, delta 2-enoyl-CoA isomerase activities. *J Biol Chem* **265**, 2446-2449.
- Pappagianis, D., Collins, M. S., Hector, R. & Remington, J. (1979).** Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. *Antimicrob Agents Chemother* **16**, 123-126.
- Partanen, S. T., Novikov, D. K., Popov, A. N., Mursula, A. M., Hiltunen, J. K. & Wierenga, R. K. (2004).** The 1.3 Å crystal structure of human mitochondrial Delta3-Delta2-enoyl-CoA isomerase shows a novel mode of binding for the fatty acyl group. *J Mol Biol* **342**, 1197-1208.
- Patton, J. L., Srinivasan, B., Dickson, R. C. & Lester, R. L. (1992).** Phenotypes of sphingolipid-dependent strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **174**, 7180-7184.
- Pawar, S. & Schulz, H. (1981).** The structure of the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **256**, 3894-3899.
- Peyron, F., Favel, A., Michel-Nguyen, A., Gilly, M., Regli, P. & Bolmström, A. (2001).** Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. *J Clin Microbiol* **39**, 339-342.
- Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. (2007).** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133-163.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ellis, D., Tullio, V., Rodloff, A., Fu, W. & Ling, T. A. (2010a).** Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* **48**, 1366-1377.
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Messer, S. A., Moet, G. J. & Jones, R. N. (2010b).** Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* **68**, 278-283.
- Picataggio, S., Deanda, K. & Mielenz, J. (1991).** Determination of *Candida tropicalis* acyl coenzyme A oxidase isozyme function by sequential gene disruption. *Mol Cell Biol* **11**, 4333-4339.
- Picataggio, S., Rohrer, T., Deanda, K., Lanning, D., Reynolds, R., Mielenz, J. & Eirich, L. D. (1992).** Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Biotechnology* **10**, 894-898.
- Piekarska, K., Mol, E., van den Berg, M., Hardy, G., van den Burg, J., van Roermund, C., MacCallum, D., Odds, F. & Distel, B. (2006).** Peroxisomal fatty acid  $\beta$ -Oxidation is not essential for virulence of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **5**, 1847-1856.
- Plesofsky, N. S., Levery, S. B., Castle, S. A. & Brambl, R. (2008).** Stress-induced cell death is mediated by ceramide synthesis in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **7**, 2147-2159.

- Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T. & Hiltunen, J. K. (2006).** Peroxisomal  $\beta$ -oxidation--A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1763**, 1413-1426.
- Polakis, E. S., Bartley, W. & Meek, G. A. (1964).** Changes in the structure and enzyme activity of *Saccharomyces cerevisiae* in response to changes in the environment. *Biochem J* **90**, 369-374.
- Poulos, A., Sharp, P., Singh, H., Johnson, D. W., Carey, W. F. & Easton, C. (1993).** Formic acid is a product of the alpha-oxidation of fatty acids by human skin fibroblasts: deficiency of formic acid production in peroxisome-deficient fibroblasts. *Biochem J* **292** ( Pt 2), 457-461.
- Preisig-Müller, R., Gühneemann-Schäfer, K. & Kindl, H. (1994).** Domains of the tetrafunctional protein acting in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. Demonstration of epimerase and isomerase activities on a peptide lacking hydratase activity. *J Biol Chem* **269**, 20475-20481.
- Prigitano, A., Biraghi, E., Pozzi, C., Viviani, M. A. & Tortorano, A. M. (2010).** In vitro activity of amphotericin B against *Candida lusitanae* clinical isolates. *J Chemother* **22**, 71-72.
- Prigneau, O., Porta, A., Poudrier, J. A., Colonna-Romano, S., Noël, T. & Maresca, B. (2003).** Genes involved in beta-oxidation, energy metabolism and glyoxylate cycle are induced by *Candida albicans* during macrophage infection. *Yeast* **20**, 723-730.
- Pye, V. E., Christensen, C. E., Dyer, J. H., Arent, S. & Henriksen, A. (2010).** Peroxisomal plant 3-ketoacyl-CoA thiolase structure and activity are regulated by a sensitive redox switch. *J Biol Chem* **285**, 24078-24088.
- Qi, C., Zhu, Y., Pan, J., Usuda, N., Maeda, N., Yeldandi, A. V., Rao, M. S., Hashimoto, T. & Reddy, J. K. (1999).** Absence of spontaneous peroxisome proliferation in enoyl-CoA Hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse liver. Further support for the role of fatty acyl CoA oxidase in PPARalpha ligand metabolism. *J Biol Chem* **274**, 15775-15780.
- Qin, Y.-M., Marttila, M. S., Haapalainen, A. M., Siivari, K. M., Glumoff, T. & Hiltunen, J. K. (1999).** Yeast peroxisomal multifunctional enzyme: (3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase domains A and B are required for optimal growth on oleic acid. *J Biol Chem* **274**, 28619 -28625.
- Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L. & López-Ribot, J. L. (2002a).** Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5459-5463.
- Ramage, G., VandeWalle, K., López-Ribot, J. L. & Wickes, B. L. (2002b).** The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **214**, 95-100.
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P. & López-Ribot, J. L. (2005).** *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell* **4**, 633-638.
- Ramamoorthy, V., Cahoon, E. B., Thokala, M., Kaur, J., Li, J. & Shah, D. M. (2009).** Sphingolipid C-9 methyltransferases are important for growth and virulence but not for sensitivity to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. *Eukaryotic Cell* **8**, 217-229.
- Ramírez, M. A. & Lorenz, M. C. (2007).** Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryotic Cell* **6**, 280-290.

- Ramirez, M. A. & Lorenz, M. C. (2009).** The transcription factor homolog CTF1 regulates  $\beta$ -oxidation in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **8**, 1604-1614.
- Refsum, S. (1947).** Heredopathia atactica polyneuritiformis: a familial syndrome not hitherto described. A contribution to the clinical study of the hereditary diseases of the nervous system. *J Am Med Assoc* **133**, 1319.
- Reiser, K., Davis, M. A. & Hynes, M. J. (2009).** AoxA is a major peroxisomal long chain fatty acyl-CoA oxidase required for beta-oxidation in *A. nidulans*. *Curr Genet*.
- Reiser, K., Davis, M. A. & Hynes, M. J. (2010).** *Aspergillus nidulans* contains six possible fatty acyl-CoA synthetases with FaaB being the major synthetase for fatty acid degradation. *Arch Microbiol* **192**, 373-382.
- Rheme, R. & Del Poeta, M. (2009).** Lipid Signaling in Pathogenic Fungi. *Annu Rev Microbiol* **63**, 119-131.
- Ricciotti, E. & FitzGerald, G. A. (2011).** Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 986 -1000.
- Richmond, T. A. & Bleecker, A. B. (1999).** A defect in beta-oxidation causes abnormal inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 1911-1924.
- Rittershaus, P. C., Kechichian, T. B., Allegood, J. C., Merrill, A. H., Jr, Hennig, M., Luberto, C. & Del Poeta, M. (2006).** Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest* **116**, 1651-1659.
- van Roermund, C. W., Tabak, H. F., van Den Berg, M., Wanders, R. J. & Hetteema, E. H. (2000).** Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **150**, 489-498.
- van Roermund, C. W. T., Visser, W. F., IJlst, L., Waterham, H. R. & Wanders, R. J. A. (2011).** Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid  $\alpha$ -oxidation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1811**, 148-152.
- Roetzer, A., Gratz, N., Kovarik, P. & Schüller, C. (2010).** Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol* **12**, 199-216.
- Rottensteiner, H., Kal, A. J., Hamilton, B., Ruis, H. & Tabak, H. F. (1997).** A heterodimer of the Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcription factors Pip2p and Oaf1p controls induction of genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **247**, 776-783.
- Rottensteiner, H. & Theodoulou, F. L. (2006).** The ins and outs of peroxisomes: Co-ordination of membrane transport and peroxisomal metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1763**, 1527-1540.
- Roy, P., Lockington, R. A. & Kelly, J. M. (2008).** CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localisation or degradation of CreA. *Fungal Genet Biol* **45**, 657-670.
- Rude, T. H., Toffaletti, D. L., Cox, G. M. & Perfect, J. R. (2002).** Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **70**, 5684-5694.
- Ruijter, G. J. & Visser, J. (1997).** Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol Lett* **151**, 103-114.
- Rylott, E. L., Rogers, C. A., Gilday, A. D., Edgell, T., Larson, T. R. & Graham, I. A. (2003).** *Arabidopsis* mutants in short- and medium-chain acyl-CoA oxidase activities accumulate acyl-CoAs and reveal that fatty acid beta-oxidation is essential for embryo development. *J Biol Chem* **278**, 21370-21377.

- Rylott, E. L., Eastmond, P. J., Gilday, A. D., Slocombe, S. P., Larson, T. R., Baker, A. & Graham, I. A. (2006).** The Arabidopsis thaliana multifunctional protein gene (MFP2) of peroxisomal beta-oxidation is essential for seedling establishment. *Plant J* **45**, 930-941.
- Sabra, A. (2010).** *Caractérisation moléculaire et phénotypique d'un mutant dpp3 déficient pour la farnésyl pyrophosphate phosphatase chez la levure C. lusitaniae.* Rapport de Master 2 Recherche Spécialité Microbiologie-Immunologie, Bordeaux: Université Bordeaux Segalen.
- Sato, S., Hayashi, M., Imamura, S., Ozeki, Y. & Kawaguchi, A. (1992).** Primary structures of the genes, faoA and faoB, from *Pseudomonas fragi* B-0771 which encode the two subunits of the HDT multienzyme complex involved in fatty acid beta-oxidation. *J Biochem* **111**, 8-15.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C. & Hube, B. (2005).** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **48**, 365-377.
- Schillmiller, A. L., Koo, A. J. K. & Howe, G. A. (2007).** Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiol* **143**, 812-824.
- Schmidt, G., Stahmann, K.-P., Kaesler, B. & Sahn, H. (1996).** Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Microbiology* **142**, 419-426.
- Schmitz, W., Albers, C., Fingerhut, R. & Conzelmann, E. (1995).** Purification and characterization of an alpha-methylacyl-CoA racemase from human liver. *Eur J Biochem* **231**, 815-822.
- Schobel, F., Ibrahim-Granet, O., Ave, P., Latge, J.-P., Brakhage, A. A. & Brock, M. (2007).** *Aspergillus fumigatus* does not require fatty acid metabolism via isocitrate lyase for development of invasive aspergillosis. *Infect Immun* **75**, 1237-1244.
- Schrader, M. & Fahimi, H. D. (2008).** The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* **129**, 421-440.
- Schüller, H.-J. (2003).** Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**, 139-160.
- Sebolai, O. M., Pohl, C. H., Botes, P. J., van Wyk, P. W. J. & Kock, J. L. F. (2008).** The influence of acetylsalicylic acid on oxylipin migration in *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* UOFS Y-1378. *Can J Microbiol* **54**, 91-96.
- Seider, K., Brunke, S., Schild, L., Jablonowski, N., Wilson, D., Majer, O., Barz, D., Haas, A., Kuchler, K., & other authors. (2011).** The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation. *The J Immunol* **187**, 3072 -3086.
- Semighini, C. P., Hornby, J. M., Dumitru, R., Nickerson, K. W. & Harris, S. D. (2006).** Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol* **59**, 753-764.
- Semighini, C. P., Murray, N. & Harris, S. D. (2008).** Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS Microbiol Lett* **279**, 259-264.
- Shani, N., Watkins, P. A. & Valle, D. (1995).** *PXA1*, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6012 -6016.
- Sharma, V., Sharma, S., Hoener zu Bentrup, K., McKinney, J. D., Russell, D. G., Jacobs, W. R., Jr & Sacchetti, J. C. (2000).** Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Struct Biol* **7**, 663-668.
- Shea, J. M. & Del Poeta, M. (2006).** Lipid signaling in pathogenic fungi. *Curr Opin Microbiol* **9**, 352-358.

- Shen, J., Guo, W. & Kohler, J. R. (2005).** CaNAT1, a heterologous dominant selectable marker for transformation of *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species. *Infect Immun* **73**, 1239-1242.
- Shen, Y.-Q. & Burger, G. (2009).** Plasticity of a key metabolic pathway in fungi. *Funct Integr Genomics* **9**, 145-151.
- Shimizu, S., Yasui, K., Tani, Y. & Yamada, H. (1979).** Acyl-CoA oxidase from *Candida tropicalis*. *Biochem Biophys Res Commun* **91**, 108-113.
- Singh, A. & Del Poeta, M. (2011).** Lipid signalling in pathogenic fungi. *Cell Microbiol* **13**, 177-185.
- Smeland, T. E., Nada, M., Cuebas, D. & Schulz, H. (1992).** NADPH-dependent beta-oxidation of unsaturated fatty acids with double bonds extending from odd-numbered carbon atoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6673 -6677.
- Smith, J. J., Brown, T. W., Eitzen, G. A. & Rachubinski, R. A. (2000).** Regulation of peroxisome size and number by fatty acid beta -oxidation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* **275**, 20168-20178.
- Smith, J. J., Ramsey, S. A., Marelli, M., Marzolf, B., Hwang, D., Saleem, R. A., Rachubinski, R. A. & Aitchison, J. D. (2007).** Transcriptional responses to fatty acid are coordinated by combinatorial control. *Mol Syst Biol* **3**, 115.
- Smith, S., Witkowski, A. & Joshi, A. K. (2003).** Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progr Lipid Res* **42**, 289-317.
- Smit, M. S., Mokgoro, M. M., Setati, E. & Nicaud, J.-M. (2005).**  $\alpha,\omega$ -Dicarboxylic acid accumulation by acyl-CoA oxidase deficient mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* **27**, 859-864.
- Steinberg, S. J., Wang, S. J., Kim, D. G., Mihalik, S. J. & Watkins, P. A. (1999).** Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 615-621.
- Steinman, H. M. & Hill, R. L. (1975).** Bovine liver crotonase (enoyl coenzyme A hydratase). EC 4.2.1.17 L-3-hydroxyacyl-CoA hydrolyase. *Meth Enzymol* **35**, 136-151.
- Stolowich, N. J., Petrescu, A. D., Huang, H., Martin, G. G., Scott, A. I. & Schroeder, F. (2002).** Sterol carrier protein-2: structure reveals function. *Cell Mol Life Sci* **59**, 193-212.
- Strijbis, K. & Distel, B. (2010).** Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryotic Cell* **9**, 1809-1815.
- Subczynski, W. K., Wisniewska, A., Yin, J. J., Hyde, J. S. & Kusumi, A. (1994).** Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol. *Biochemistry* **33**, 7670-7681.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A. & Subramani, S. (1991).** A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J* **10**, 3255-3262.
- Tavares, P. M., Thevissen, K., Cammue, B. P. A., Francois, I. E. J. A., Barreto-Bergter, E., Tabora, C. P., Marques, A. F., Rodrigues, M. L. & Nimrichter, L. (2008).** *In vitro* activity of the antifungal plant defensin RsAFP2 against *Candida* isolates and its *in vivo* efficacy in prophylactic murine models of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 4522-4525.
- Thewes, S., Kretschmar, M., Park, H., Schaller, M., Filler, S. G. & Hube, B. (2007).** *In vivo* and *ex vivo* comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida*

- albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Mol Microbiol* **63**, 1606-1628.
- Thieringer, R. & Kunau, W. H. (1991).** Beta-oxidation system of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Structural characterization of the trifunctional protein. *J Biol Chem* **266**, 13118 -13123.
- Todd, R. B., Murphy, R. L., Martin, H. M., Sharp, J. A., Davis, M. A., Katz, M. E. & Hynes, M. J. (1997).** The acetate regulatory gene *facB* of *Aspergillus nidulans* encodes a Zn(II)2Cys6 transcriptional activator. *Mol Gen Genet* **254**, 495-504.
- Tommasino, N., Villani, M., Qureshi, A., Henry, J., Luberto, C. & Del Poeta, M. (2008).** Atf2 transcription factor binds to the APP1 promoter in *Cryptococcus neoformans*: stimulatory effect of diacylglycerol. *Eukaryotic Cell* **7**, 294-301.
- Tortorano, A. M., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Kibbler, C. C., Faure, O., Biraghi, E., Canton, E., Zimmermann, K., Seaton, S., Grillot, R. (2004).** Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**, 317-322.
- Trzcinska-Danielewicz, J., Ishikawa, T., Micialkiewicz, A. & Fronk, J. (2008).** Yeast transcription factor Oaf1 forms homodimer and induces some oleate-responsive genes in absence of Pip2. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 763-766.
- Tsitsigiannis, D. I., Bok, J.-W., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C. & Keller, N. P. (2005).** *Aspergillus* cyclooxygenase-like enzymes are associated with prostaglandin production and virulence. *Infect Immun* **73**, 4548-4559.
- Tsitsigiannis, D. I. & Keller, N. P. (2007).** Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol* **15**, 109-118.
- Tsuchida, S., Kawamoto, K., Nunome, K., Hamaue, N., Yoshimura, T., Aoki, T. & Kurosawa, T. (2011).** Analysis of enoyl-coenzyme A hydratase activity and its stereospecificity using high-performance liquid chromatography equipped with chiral separation column. *J Oleo Sci* **60**, 221-228.
- Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F. & Soontorngun, N. (2010).** Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res* **10**, 2-13.
- Uchida, Y., Izai, K., Orii, T. & Hashimoto, T. (1992).** Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *J Biol Chem* **267**, 1034 -1041.
- Vane, J. R. & Botting, R. M. (1998).** Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int J Tissue React* **20**, 3-15.
- Waché, Y., Aguedo, M., Choquet, A., Gatfield, I. L., Nicaud, J.-M. & Belin, J.-M. (2001).** Role of  $\beta$ -oxidation enzymes in  $\gamma$ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 5700-5704.
- Waché, Y., Aguedo, M., Nicaud, J.-M. & Belin, J.-M. (2003).** Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 393-404.
- Wanders, R. J. A. & Waterham, H. R. (2006).** Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* **75**, 295-332.
- Wanders, R. J. A., Visser, W. F., Roermund, C. W. T., Kemp, S. & Waterham, H. R. (2006).** The peroxisomal ABC transporter family. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **453**, 719-734.

- Wanders, R. J. A., Ferdinandusse, S., Brites, P. & Kemp, S. (2010).** Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1801**, 272-280.
- Wanders, R. J. A., Komen, J. & Kemp, S. (2011).** Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *FEBS J* **278**, 182-194.
- Wang, H. J., Le Dall, M.-T., Wache, Y., Laroche, C., Belin, J.-M., Gaillardin, C. & Nicaud, J.-M. (1999).** Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* **181**, 5140-5148.
- Wang, Z.-Y., Thornton, C. R., Kershaw, M. J., Debaio, L. & Talbot, N. J. (2003).** The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Microbiol* **47**, 1601-1612.
- Wang, Z.-Y., Soanes, D. M., Kershaw, M. J. & Talbot, N. J. (2007).** Functional analysis of lipid metabolism in *Magnaporthe grisea* reveals a requirement for peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation during appressorium-mediated plant infection. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 475-491.
- Watkins, P. A., Howard, A. E., Gould, S. J., Avigan, J. & Mihalik, S. J. (1996).** Phytanic acid activation in rat liver peroxisomes is catalyzed by long-chain acyl-CoA synthetase. *J Lipid Res* **37**, 2288-2295.
- Weber, K., Schulz, B. & Ruhnke, M. (2010).** The quorum-sensing molecule E,E-farnesol--its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. *Yeast* **27**, 727-739.
- Wells, G. B., Dickson, R. C. & Lester, R. L. (1998).** Heat-induced elevation of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae* via *de novo* synthesis. *J Biol Chem* **273**, 7235-7243.
- Westwater, C., Balish, E. & Schofield, D. A. (2005).** *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryotic Cell* **4**, 1654-1661.
- Yang, S.-Y., He, X.-Y. & Schulz, H. (2005a).** Multiple functions of type 10 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 167-175.
- Yang, S., He, X. & Schulz, H. (2005b).** 3 - Hydroxyacyl - CoA dehydrogenase and short chain 3 - hydroxyacyl - CoA dehydrogenase in human health and disease. *FEBS J* **272**, 4874-4883.
- Yang, S.-Y., He, X.-Y., Olpin, S. E., Sutton, V. R., McMenemy, J., Philipp, M., Denman, R. B. & Malik, M. (2009).** Mental retardation linked to mutations in the HSD17B10 gene interfering with neurosteroid and isoleucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 14820-14824.
- Yang, X., Purdue, P. E. & Lazarow, P. B. (2001).** Eci1p uses a PTS1 to enter peroxisomes: either its own or that of a partner, Dci1p. *Eur J Cell Biol* **80**, 126-138.
- Ylianttila, M. S., Pursiainen, N. V., Haapalainen, A. M., Juffer, A. H., Poirier, Y., Kalervo Hiltunen, J. & Glumoff, T. (2006).** Crystal Structure of Yeast Peroxisomal Multifunctional Enzyme: Structural Basis for Substrate Specificity of (3R)-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Units. *J Mol Biol* **358**, 1286-1295.
- You, K. M., Rosenfield, C.-L. & Knipple, D. C. (2003).** Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1499-1503.
- Zäuner, S., Ternes, P. & Warnecke, D. (2010).** Biosynthesis of sphingolipids in plants (and some of their functions). *Adv Exp Med Biol* **688**, 249-263.

- Zhang, D., Yu, W., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J., Sprecher, H. & Schulz, H. (2002).** Functional characterization of Delta3,Delta2-enoyl-CoA isomerases from rat liver. *J Biol Chem* **277**, 9127-9132.
- Zinser, E., Paltauf, F. & Daum, G. (1993).** Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J Bacteriol* **175**, 2853-2858.
- Zolman, B. K., Silva, I. D. & Bartel, B. (2001).** The *Arabidopsis* pxa1 mutant is defective in an ATP-Binding Cassette Transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Plant Physiol* **127**, 1266 -1278.