



**HAL**  
open science

# Rôle des gènes RIM et VPS dans la signalisation du pH, la virulence et la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida albicans*

Murielle Gigou-Cornet

## ► To cite this version:

Murielle Gigou-Cornet. Rôle des gènes RIM et VPS dans la signalisation du pH, la virulence et la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida albicans*. Biochimie [q-bio.BM]. INAPG (AgroParis-Tech), 2006. Français. NNT : 2006INAP0037 . tel-00143611

**HAL Id: tel-00143611**

**<https://pastel.hal.science/tel-00143611>**

Submitted on 26 Apr 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

présentée et soutenue publiquement

par

**MURIELLE GIGOU-CORNET**

le jeudi 21 décembre 2006

Titre :

**Rôle des gènes *RIM* et *VPS* dans la signalisation du pH, la virulence et la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida albicans***

---

Directeur de thèse : Pr. Claude Gaillardin

---

JURY

Pr. Dominique Sanglard, président du jury et rapporteur

Pr. Stéphane Bretagne, rapporteur

Dr. Françoise Dromer, examinateur

Pr. Claude Gaillardin, examinateur

Dr. Mathias Lavie-Richard, examinateur

*À Dominique,  
Julie, Marie et Valentin, nos enfants, pour l'amour qu'ils me donnent chaque jour.*

*À mes parents, pour leur dévouement sans faille, qu'ils trouvent ici le témoignage de mon affection  
et de ma reconnaissance.*

*À ma soeur, à mon frère, pour leur soutien.*

*À Sophie et Nicolas, pour la place qu'ils m'ont faite dans leur vie.*

*À mes amis.*

## Remerciements

Je remercie vivement M. le Pr. Claude Gaillardin pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger cette thèse. Ses connaissances scientifiques, la qualité de son enseignement et sa disponibilité m'ont beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail. Qu'il trouve dans ce manuscrit le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

Je remercie M. le Pr. Stéphane Bretagne d'avoir accepté de juger mon travail et du soutien qu'il m'a toujours apporté. Qu'il trouve dans cette thèse le témoignage de ma reconnaissance.

Je remercie également vivement M. le Pr. Dominique Sanglard d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Madame le Dr. Françoise Dromer d'avoir bien voulu participer au jury de ma thèse et d'avoir contribué à la réalisation d'une partie de ce travail. Je la remercie pour son expérience et son enseignement dont elle m'a fait profiter.

Je remercie M. Mathias Lavie-Richard d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je le remercie de son aide précieuse dans l'encadrement de mon travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je tiens à remercier vivement Madame le Pr. Anne Bouvet, chef du service de microbiologie de l'Hôtel-Dieu, pour son soutien et sa compréhension sans lesquels cette thèse n'aurait pas été possible. Qu'elle trouve dans ce travail le témoignage de mon respect.

Un grand merci à Patrice qui m'a secondé fidèlement dans mes fonctions hospitalières et permis de réaliser ce travail en toute sérénité. Qu'il soit assuré de mon amitié.

Un grand merci également à Frédérique qui m'a fait faire mes premiers pas dans le laboratoire de Grignon et dans la recherche, à Sylvie qui a pris le relais, à Armël pour les multiples coups de mains et tuyaux qu'elle m'a donnés et à Grégory pour son aide dans les « manips ».

Merci à toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie et génétique moléculaire de Grignon qui m'a chaleureusement accueillie.

## Liste des abréviations et des gènes les plus couramment cités dans ce travail

*ALS* : Agglutinin Like sequence

*BCK1* : MAP kinase kinase of cell integrity pathway

*CDR* : Candida Drug Resistance

*CFW* : Calcofluor White

*CHS* : Chitine Synthase

*CRZI* : Calcineurin Responsive Zinc finger

*ERG* : Ergosterol biosynthesis

*ESCRT* : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

*FKS* : FK506 Sensitivity

*GPI* : GlycosylPhosphatidylInositol

*MAT* : Mating type

*MDR* : Multidrug Resistance

*MKK1* : Mitogen-activated Kinase Kinase

*MTL* : Mating type Locus

*MVB* : Multi Vesicular Body

*PHR* : pH Responsive

*PKC* : Proteine Kinase C

*RHO* : Ras Homologous

*RIM* : Regulation of Initiation of Meiose

*RLM1* : Resistance to Lethality of MKK1P

*SDS* : Sodium Dodecyl Sulfate

*SLT2* : Serine/threonine MAP kinase of cell integrity pathway

*TAC1* : Transcriptional Activator of CDR genes

*VPS* : Vacuolar Protein Sorting

# Sommaire

Résumé.....	1
Introduction.....	2
<i>Généralités sur Candida albicans</i> .....	3
Caractères généraux de la levure <i>Candida albicans</i> .....	3
La paroi : structure et biosynthèse.....	5
Les mannoprotéines.....	6
Les glucanes.....	7
(1) <i>les <math>\beta</math> 1,3 glucanes</i>	
(2) <i>les <math>\beta</math> 1,6 glucanes</i>	
La chitine.....	8
Les lipides.....	9
Les infections.....	9
Épidémiologie.....	9
Physiopathologie et « facteurs de virulence ».....	10
<i>Morphogenèse</i> .....	12
<i>Autres facteurs de virulence</i> .....	14
Aspects cliniques.....	16
(1) <i>Candidoses superficielles</i>	
(2) <i>Candidoses profondes</i>	
Traitement : Mode d'action des antifongiques et mécanismes de résistance chez <i>C. albicans</i> 18	
<i>Mécanismes moléculaires et cellulaires de la résistance</i> .....	19
<i>Les principales classes d'antifongiques</i> .....	20
Les polyènes : amphotéricine B et nystatine.....	20

	La 5-Flucytosine.....	21
	Les azolés.....	21
	Les échinocandines.....	24
	Régulations globales des résistances.....	26
	<i>La voie de signalisation du pH chez les champignons.....</i>	<i>28</i>
	Voie conservée.....	28
	Activation de la voie Pal/Rim.....	28
	(1)Transmission du signal	
	(2)Protéolyse de PacC/ Rim101p	
	Effecteurs de la voie Pal/Rim.....	33
	Rôle dans la virulence chez <i>C. albicans</i> .....	34
	<i>La voie d'endocytose.....</i>	<i>35</i>
	La voie MVB.....	35
	Activation de la voie MVB.....	37
	<i>Rôle de la voie d'endocytose dans la voie de signalisation du pH.....</i>	<i>40</i>
	Implication des protéines de la voie MVB dans l'activation de Rim101.....	40
	Modèle de la participation de la voie MVB à la signalisation du pH chez <i>C. albicans</i> .....	42
	<i>Implication de la voie d'endocytose dans la constitution de la paroi et la sensibilité aux antifongiques.....</i>	<i>44</i>
	Projet de thèse et résultats.....	46
	Article 1.....	47
	Article 2.....	59
	Article 3.....	64
	Conclusion et Perspectives.....	84
	Bibliographie.....	90







## Résumé

*Candida albicans* est le premier pathogène fongique de l'homme. Cette levure, habituellement commensale, peut être à l'origine d'infections profondes mettant en jeu le pronostic vital. L'incidence des candidoses profondes ne cesse d'augmenter parallèlement à l'augmentation du nombre de patients à risque. La virulence de *C. albicans* s'explique par sa capacité à coloniser puis envahir de nombreux tissus de l'organisme qui constituent autant de microenvironnements différents. Les réponses adaptatives de la cellule aux modifications environnementales sont déterminantes pour sa survie et conditionnent sa virulence. La voie d'endocytose assure la dégradation ou le recyclage des protéines membranaires et joue un rôle important dans la régulation des récepteurs. Elle est également impliquée dans l'activation de la voie de signalisation du pH : la voie Rim.

Au début de ce travail, nous avons montré que la voie d'endocytose jouait un rôle majeur dans la réponse au pH, la morphogenèse et la virulence de *C. albicans*, de façon à la fois dépendante et indépendante de la voie Rim. Nous avons montré que les délétions de deux gènes de la voie d'endocytose, *VPS28* et *VPS32*, produisent non seulement les mêmes effets que les délétions des gènes de la voie Rim, mais les aggravent.

Nous avons également mis en évidence le rôle de la voie Rim et des protéines Vps dans la structure de la paroi et la résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines. Là encore, la voie d'endocytose semble impliquée par son action spécifique dans la voie Rim mais aussi par d'autres mécanismes indépendants de la voie Rim.

Enfin, nous avons caractérisé les mutants *rim9* et *rim21* et montré que les protéines Rim9p et Rim21p sont toutes les deux indispensables à l'activation de la voie Rim chez *C. albicans*. Ce résultat confirme que le mode d'activation de la voie Rim chez *C. albicans* est proche de celui décrit chez *S. cerevisiae* et diffère sensiblement de celui d'*Aspergillus nidulans* ou de *Yarrowia lipolytica*.

Nous avons montré que l'inhibition de la voie d'endocytose induit chez *C. albicans* une réduction majeure de la virulence associée à une augmentation de la sensibilité aux antifongiques azolés et aux échinocandines. En permettant la potentialisation de l'efficacité des molécules existantes cette voie pourrait constituer une cible intéressante pour le développement de nouveaux traitements antifongiques.

## II.Introduction

Depuis 25 ans, l'incidence des infections fongiques profondes ne cesse d'augmenter parallèlement à l'augmentation du nombre de patients à risque et à l'amélioration de la survie de ces patients. Les infections à levures, principalement *Candida albicans*, sont les plus fréquentes. La pathogénie de ces infections est dominée par la séquence colonisation - infection locale - dissémination. Dans des conditions favorables comme la modification de la flore bactérienne, l'existence de matériel étranger, l'immunodépression ou l'altération des barrières épithéliales, la colonisation s'installe et peut évoluer vers l'infection. *C. albicans* est une levure habituellement commensale dotée d'importantes facultés adaptatives lui permettant de survivre dans des microenvironnements différents et ainsi de coloniser ou d'infecter de nombreux tissus de l'organisme. La réponse de la levure à différents signaux environnementaux tels que la quantité de nutriments, la température ou le pH est un des éléments essentiels de la pathogénie de *C. albicans*. Cette réponse est régulée par différentes voies de signalisation plus ou moins intriquées. Il semble de plus en plus évident que la voie d'endocytose, connue jusqu'ici pour assurer la dégradation et le recyclage des protéines membranaires, joue un rôle dans la transduction des signaux et donc dans la physiologie de la cellule.

Le but de ce travail est d'étudier l'implication du mécanisme d'endocytose dans la physiologie de *C. albicans* en précisant son rôle dans la réponse au pH, la virulence et la résistance aux agents antifongiques.

## A. Généralités sur *Candida albicans*

### 1. Caractères généraux de la levure *Candida albicans*

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires se multipliant par bourgeonnement. Le genre *Candida* regroupe environ plus de 300 espèces dont une faible proportion seulement est potentiellement pathogène. Sur le plan taxonomique, les *Candida* sont classés parmi les Ascomycètes. Les *Candida* sont des levures non pigmentées, non capsulées, ovoïdes dont la taille varie de 3 à 15 µm. Les levures asexuées présentant ce phénotype ont été classées historiquement dans le genre *Candida*. Ce genre est clairement polyphylétique car il comprend des espèces appartenant à deux groupes ayant divergé il y a plus de 150 millions d'années (Dujon 2004, Galagan 2005). *C. glabrata* est plus proche de *Saccharomyces cerevisiae* que de *C. albicans* qui est plus proche de *Debaryomyces hansenii* (Figure 1).

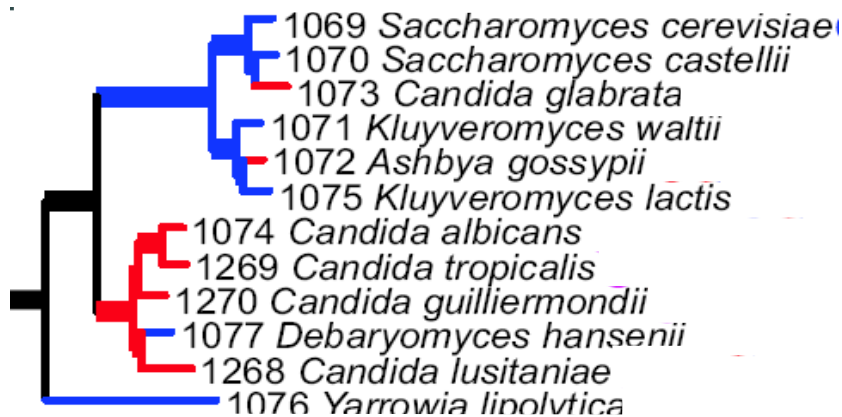
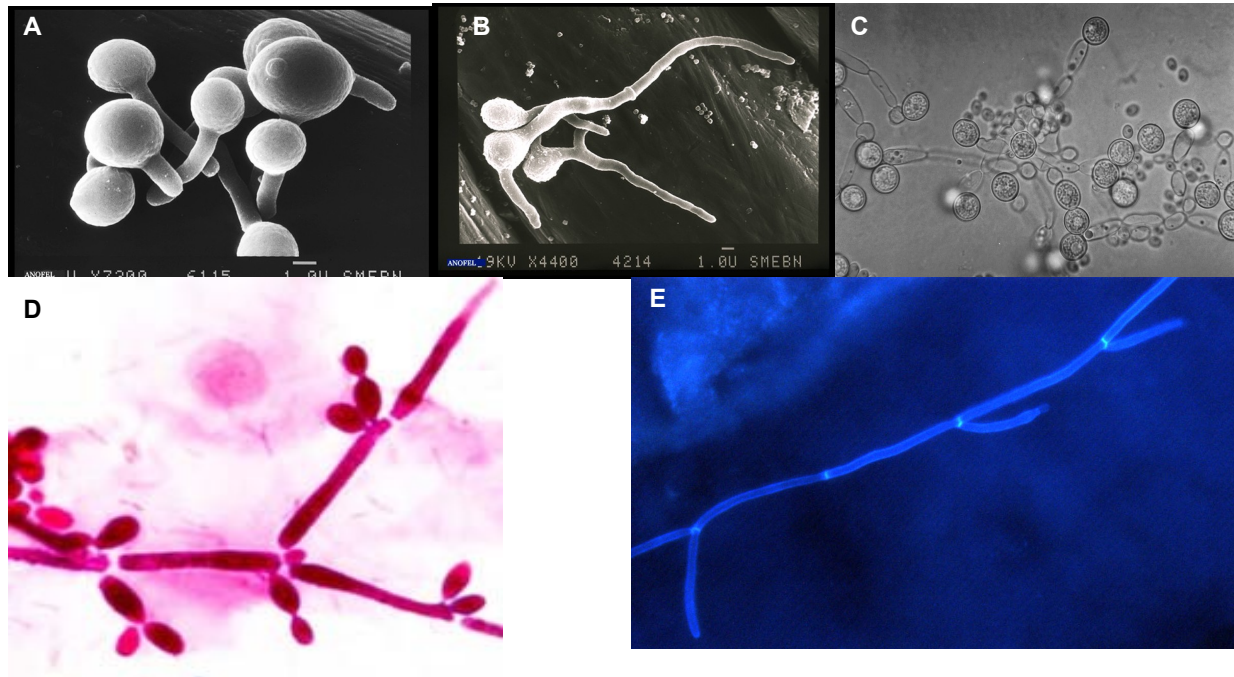


Figure 1 : Arbre phylogénétique des principales levures (d'après James 2006)

Morphologiquement, *C. albicans* se caractérise par sa capacité à former des filaments vrais ou hyphes qui jouent un rôle important dans sa virulence. Les hyphes sont formés à partir des tubes germinatifs par croissance apicale et sont définis par leur mode de division. Lorsqu'il a atteint une taille suffisante, l'article terminal se clive par scissiparité. Des septa percés de micropores permettent une continuité cytoplasmique et séparent les cellules mères des cellules filles en formant parfois des branchements (Figure 2). Ces hyphes « vrais » sont à distinguer des pseudohyphes formés par la plupart des espèces de *Candida*. Ceux-ci résultent d'un processus de bourgeonnement polaire. Le bourgeon s'allonge et les cellules mère et fille restent solidaires mais il n'y a pas de continuité cytoplasmique (Moore 1998, Calderone

2002) (Figure 2). La formation de chlamydo-spores est également une caractéristique morphologique de *C. albicans*. Ce sont des cellules rondes, à paroi épaisse, réfringentes qui apparaissent au bout des hyphes ou des pseudohyphes de *C. albicans* sous certaines conditions de culture (milieu pauvre et micro-aérobie) (Figure 2). Le rôle de ces chlamydo-spores n'est pas bien établi mais semble peu important dans la physiopathologie des infections, cette forme n'étant que très rarement retrouvée dans les tissus pathologiques (Chabasse 1988).



**Figure 2 : Caractéristiques morphologiques de *Candida albicans***

A : Blastospores et tubes germinatifs ; B : Hyphes ; C : Chlamydo-spores ; D : Blastospores et hyphes (coloration de gram) ; E : Hyphes (coloration au Calcofluor White).

Sources : ANOFEL et collection personnelle.

Le génome de *C. albicans* est aujourd'hui entièrement séquencé et disponible sur <http://candida.bri.nrc.ca/candida/index.cfm?page=Ca20assembly> (Jones 2004). Il a été déterminé à partir de la souche type SC5314, issue d'un isolat clinique. Ses dérivées (CAI-4, BWP17) sont utilisées comme références dans la plupart des analyses moléculaires et des études de virulence sur modèle animal. Le génome de 16 Mbases environ, comprend entre 6000 et 7000 gènes répartis sur 8 chromosomes : le chromosome R (le plus grand) et les chromosomes de 1 à 7 par ordre de taille décroissante. Ce génome diploïde présente deux caractéristiques principales : un très grand polymorphisme allélique, qui concerne 30 % des

gènes, et un code génétique alternatif traduisant le codon CUG en sérine au lieu de leucine. Ce codon alternatif est retrouvé dans deux tiers des gènes (Jones 2004). Pour certains, le polymorphisme allélique, qui est supérieur à celui observé dans le génome humain, permet d'augmenter la diversité génétique et pourrait contribuer aux capacités adaptatives de *C. albicans* ainsi qu'à l'acquisition des résistances aux antifongiques (Yesland 2000, Cowen 2002). La génomique comparative a permis de mettre en évidence chez *C. albicans* : d'une part des gènes qui n'existent pas dans les levures non pathogènes comme par exemple *Saccharomyces cerevisiae* et d'autre part des gènes retrouvés dans des organismes beaucoup plus éloignés. Ces gènes présentent un intérêt majeur dans l'étude de la pathogénicité de *C. albicans* (Jones 2004). La mise en évidence d'un locus sexuel *MTL* (Mating Type Locus), découvert par homologie à certains gènes des loci sexuels *MATa* et *MAT $\alpha$*  de *S. cerevisiae*, et la réalisation de conjugaisons aboutissant à des souches tétraploïdes a remis en cause le caractère asexué de *C. albicans*. Cependant, une méiose complète permettant le retour à l'état diploïde n'a jamais pu être observée (Hull 2000, Magee 2000, Bennett 2005). Seul un cycle dit « parasexuel », assurant le retour à l'état diploïde par perte chromosomique au cours des mitoses a été obtenu (Bennett 2003). Le caractère diploïde de *C. albicans*, le code génétique alternatif et l'absence de cycle sexué complet associés à un faible taux de transformation de l'ADN limitent les possibilités de manipulations génétiques et réduisent le nombre de mutants disponibles pour l'analyse fonctionnelle des gènes.

## **2.La paroi : structure et biosynthèse**

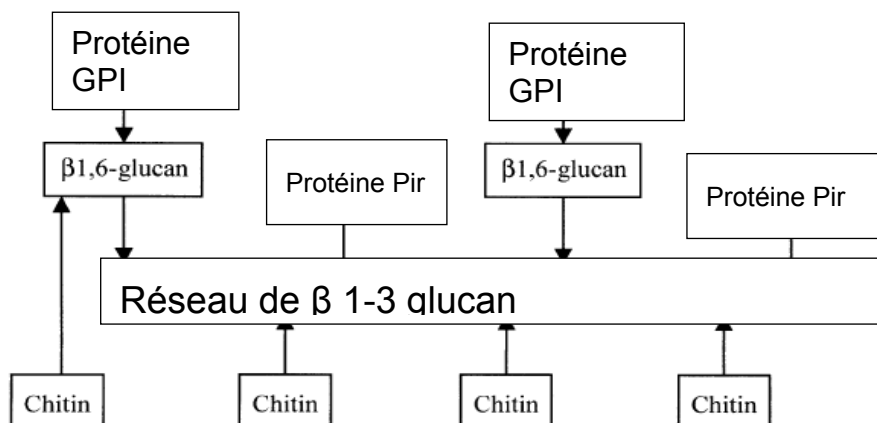
La paroi des champignons est indispensable à leur survie car elle assure le maintien de leur intégrité, de leur forme cellulaire et les protège des agressions mécaniques et chimiques. Elle joue un rôle essentiel dans les interactions avec les cellules de l'hôte et est donc déterminante pour la virulence (Ruiz-Herrera 2006). Elle est composée majoritairement de polysaccharides (90%) associés à des protéines et des lipides. Les polysaccharides regroupent des mannoprotéines (polymères de mannose liés covalamment à des protéines), des glucanes (polymères de glucose) et, pour la plupart des champignons, de la chitine (polymère de N-acétylglucosamine).

Chez *C. albicans*, la paroi représente environ 30 % du poids sec de la levure et est constituée de 35-40 % de mannoprotéines, 60 % de glucanes, 1 à 3 % de chitine et 1 à 7 % de lipides (Kapteyn 2000, Chauhan 2002). Sa composition varie avec la morphologie de la cellule : la forme filamenteuse comprenant plus de chitine, plus de  $\beta$  1,6 glucanes et moins de

mannoprotéines que la forme levure. Les glucanes sont séparés en 3 fractions représentant chacune respectivement 25 %, 5 % et 35 % (Chauhan 2002) :

- une soluble à pH alcalin comprenant principalement des  $\beta$  1,3 glucanes,
- une insoluble à pH alcalin mais soluble dans l'acide acétique et comprenant surtout des  $\beta$  1,6 glucanes,
- une insoluble à pH alcalin ainsi que dans l'acide acétique comprenant surtout des  $\beta$  1,3 glucanes liés à la chitine.

La paroi est organisée en plusieurs couches. Les mannoprotéines constituent l'élément principal de cette architecture en formant des blocs avec les glucanes et la chitine et reliant l'ensemble à la membrane plasmique (couche interne) grâce aux protéines à ancre GPI (voir plus loin). Un autre modèle place les  $\beta$  1,3 glucanes au centre de la structure (Figure 3)



**Figure 3 : Architecture de la paroi de *C. albicans* (d'après Kapteyn 2000)**

### **a) Les mannoprotéines**

Les mannanes constituent les marqueurs antigéniques de *C. albicans*. Ils sont liés covalamment aux protéines de la paroi par N-glycosylation et O-glycosylation. Au cours de la N-glycosylation, de nombreux résidus mannoses sont ajoutés en formant des chaînes latérales dont la composition (longueur, branchement, phosphorylation) détermine la spécificité antigénique et permet de distinguer les différents sérotypes de *C. albicans*. La N- et O-glycosylation ont été impliquées toutes deux dans la transition levure-hyphes et dans la virulence de *C. albicans*, la O-glycosylation semblant avoir un rôle spécifique dans l'adhésion aux tissus (Timpel 1998, Southard 1999). Au contraire de *S. cerevisiae*, les mannoprotéines de *C. albicans* et de *C. glabrata* portent un type de mannanes particuliers, les  $\beta$  1,2 mannanes qui ont été impliqués dans les interactions avec l'hôte (récepteur galectine-1) (Poulain 2002).

Les protéines pariétales dont les fonctions sont connues sont des enzymes, des récepteurs ou des adhésines. Elles sont liées de façon covalente aux  $\beta$  1,3 glucanes soit directement, ce sont les protéines Pir (proteins with internal repeats), soit par l'intermédiaire d'un  $\beta$  1,6 glucane et d'une GPI (Kapteyn 2000, Chauhan 2002). Les protéines à ancre GPI regroupent des protéines aux fonctions importantes : les adhésines de la famille Als, Hw1p qui joue également un rôle dans l'adhésion et dans la filamentation, Phr1p et Phr2p (homologues de Gas1p de *S. cerevisiae* et Gel1p d'*Aspergillus fumigatus*) qui sont impliquées dans l'assemblage de la paroi et la filamentation pH dépendantes (voir plus loin) (Hoyer 1999, Fonzi 1999, Staab 1999, Mouyna 2000). Seules 10 % de la centaine de protéines à ancre GPI, prédites sur la base de la séquence génomique, ont pu être caractérisées et plus de 60 % ont encore une fonction inconnue (de Groot 2003, Eisenhaber 2004). La fonction des protéines Pir est encore mal définie.

## **b) Les glucanes**

Avec la chitine, ils forment un réseau qui confère sa rigidité à la paroi et détermine la forme cellulaire.

### ***(1) les $\beta$ 1,3 glucanes***

Ils constituent quantitativement l'élément prédominant de la paroi (50 à 60 % du poids sec). Par leurs nombreuses extrémités non réduites ils se lient aux  $\beta$  1,6 glucanes, à la chitine et aux mannoprotéines (Kapteyn 2000). Les  $\beta$  1,3 glucanes sont synthétisés au niveau de la membrane plasmique par un complexe enzymatique hétérodimérique composé d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. Les gènes impliqués dans leur synthèse chez *C. albicans* sont *FKS1/GSCI* et *FKS3/GSL1* qui codent pour la sous-unité catalytique Fks1p et *RHO1* pour la sous-unité régulatrice Rho1p (Mio 1997a, Kondoh 1997). *RHO1* est également impliqué dans le maintien de l'intégrité cellulaire, la morphogénèse et la virulence (Ruiz-Herrera 2006). Une autre enzyme présente également dans la paroi (Bgl2p) participe à l'élongation des  $\beta$  1,3 glucanes (Sarthy 1997). Les chaînes linéaires de  $\beta$  1,3 glucanes sont ensuite remodelées par ajout de branchements, élongation et liaison à la chitine et aux  $\beta$  1,6 glucanes. Ces dernières étapes sont contrôlées par les protéines Phr1p et Phr2p.

### ***(2) les $\beta$ 1,6 glucanes***

Ils jouent un rôle majeur dans l'interconnexion des différents constituants de la paroi, notamment dans les liaisons mannoprotéines- $\beta$  1,3 glucanes-chitine. En comparaison



avec *S. cerevisiae*, les  $\beta$  1,6 glucanes de *C. albicans* sont plus importants quantitativement, moins branchés et comportent moins de liaisons avec les  $\beta$  1,3 glucanes.

Leur synthèse semble se répartir dans les différents compartiments de la voie de sécrétion, débutant au niveau du réticulum endoplasmique. Cette première étape est catalysée par quatre enzymes codées par les gènes *BIG1*, *KRE5*, *KRE6* et *SKN1* (Mio 1997b, Herreiro 2004, Umeyama 2006). Ensuite, la synthèse se poursuit au niveau de la membrane plasmique.

### **c)La chitine**

Malgré sa présence en très faible quantité (0,6 à 3 %), elle est indispensable à la survie de la cellule et à sa morphogénèse. Elle donne à la paroi sa rigidité, joue un rôle dans le bourgeonnement, la séparation des cellules et dans la formation des septa des hyphes. Elle est à la base d'un mécanisme de réparation de la paroi qui permet de corriger les anomalies de structure des autres constituants. Ainsi des défauts touchant soit la synthèse et l'assemblage des  $\beta$  1,3 glucanes, soit les liaisons entre les  $\beta$  1,6 glucanes et les protéines à ancre GPI entraînent une augmentation massive de la quantité de chitine (Kapteyn 2000, Albrecht 2006).

Ce polymère linéaire de  $\beta$  1,4-N-acetylglucosamine est synthétisé dans la paroi par les chitine synthases. Chs1p et Chs3p sont les plus importantes pour le maintien de l'intégrité cellulaire et sont impliquées respectivement dans la formation des septa et la synthèse de la chitine de l'anneau de bourgeonnement. Elles jouent également un rôle dans la virulence (Bulawa 1995, Munro 2001). Chs7p est impliquée dans la filamentation et la virulence (Sanz 2005). Chs2p et Chs8p reconstituent l'activité chitine synthase *in vitro* mais leurs mutants ne présentent pas d'anomalies de structure de la paroi *in vivo* (Chen-Wu 1992, Gow 1994, Munro 2003). A la différence de *S. cerevisiae*, Chs2p ne semble pas impliquée dans la viabilité et la morphogénèse de *C. albicans* (Gow 1994).

### **d)Les lipides**

Ils ont un rôle important dans la signalisation et dans la réponse immunitaire. Le phospholipidomannane (PLM) est composé d'une chaîne de  $\beta$  1,2 oligomanosides pouvant contenir jusqu'à 19 mannoses, d'un céramide et d'un phosphoinositol. Il est sécrété en dehors de la cellule et induit la production à la fois de cytokines telles que le TNF $\alpha$  et d'anticorps

protecteurs (Han 1995, Jouault 1998, Trinel 1999, 2002). Il est impliqué également dans la virulence et la résistance à la lyse par les macrophages (Mille 2004).

### **3. Les infections**

*Candida albicans* peut être à l'origine d'infections aussi bien superficielles et le plus souvent bénignes que profondes, mettant en jeu le pronostic vital.

#### **a) Épidémiologie**

L'épidémiologie des candidoses, aussi bien superficielles que profondes, a été marquée par une augmentation majeure de leur fréquence durant les 25 dernières années, liée en grande partie à l'accroissement du nombre des patients à risque. L'utilisation de plus en plus importante de procédés invasifs, d'antibiotiques à large spectre, de traitements immunosuppresseurs ou de traitements anticancéreux de plus en plus lourds a multiplié les risques d'infection fongique. Toutefois, grâce à une meilleure prévention, la tendance actuelle va vers une stabilisation du nombre des candidoses (Eggiman 2003, Patterson 2005, Morgan 2005, Tortorano 2004, 2006).

Les candidoses superficielles (candidoses buccales, œsophagiennes ou candidoses vaginales) ont vu leur incidence exploser au début des années 80 marquant le début de l'épidémie de SIDA. L'infection par le VIH constitue un des principaux facteurs de risque de candidoses superficielles, les lymphocytes CD4 jouant un rôle majeur dans l'immunité développée au niveau des muqueuses (Fidel 1994). Les candidoses superficielles s'observent chez 40 à 60 % des patients porteurs du VIH et 50 à 90 % des patients atteints de SIDA avéré. Elles constituent l'infection opportuniste la plus fréquente au cours du SIDA. En dehors du SIDA, les candidoses superficielles peuvent survenir chez des patients immunocompétents sous antibiothérapie, les nouveaux-nés ou les diabétiques. *C. albicans* est responsable de presque tous les cas de candidoses buccales et œsophagiennes et de plus de 80 % des candidoses vaginales (Ruhnke 2002).

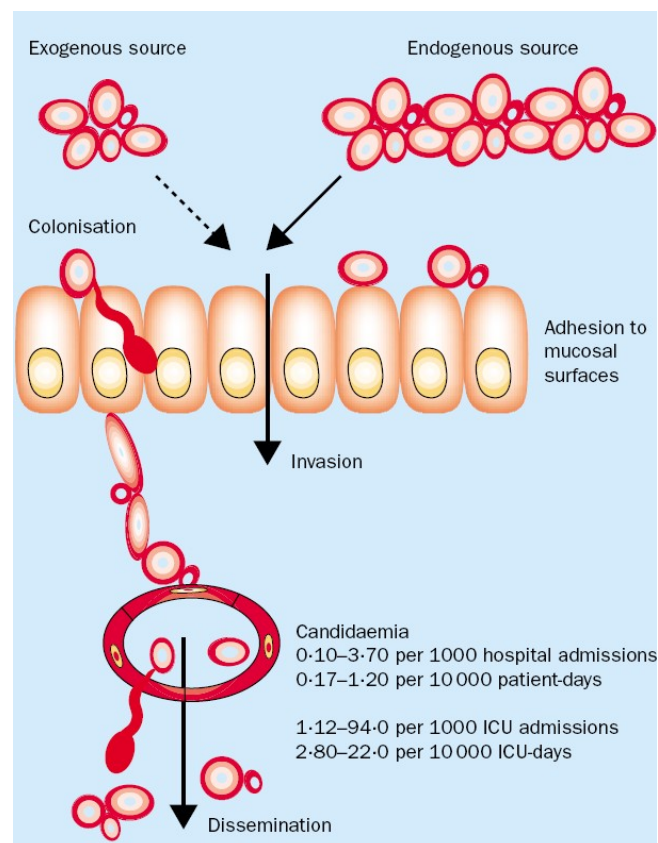
Le nombre de candidoses profondes telles que les septicémies à *Candida* (candidémies) a été multiplié par 12 entre 1981 et 1992, et elles occupent le quatrième rang des septicémies nosocomiales aux USA (Pittet 1995, Edmond 1999, NNIS 2002). Du fait de leur survenue au cours des traitements des pathologies lourdes chez des patients fragiles ou immunodéprimés, les candidoses profondes se déclarent le plus souvent à l'hôpital et sont donc considérées comme des infections nosocomiales. Cependant, dans la très grande majori-

té des cas, elles ne sont pas liées à une contamination à partir de l'environnement ou du personnel hospitalier et se développent à partir de la flore endogène du patient (voir physiopathologie). Actuellement, la fréquence des candidémies dans les hôpitaux européens semble moins alarmante (densité d'incidence de 0,31 à 0,44/10 000 patients jours) que celle rapportée aux USA (1,64/10 000 patients jours) (Hajjeh 2004, Tortorano 2006). La mortalité globale varie entre 30 % et 50 % selon les séries et la mortalité attribuable, difficile à évaluer compte tenu de la gravité des pathologies associées, a été estimée entre 31 et 38 % (Dannaoui 2004, Tortorano 2004, 2006, Kullberg 2005, Zaoutis 2005). *C. albicans* est responsable d'environ 50 % des candidoses profondes devant *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*. La proportion des espèces non-*albicans* varie en fonction des pathologies à risque, de l'âge des patients et des zones géographiques. Certains auteurs rapportent une tendance à la diminution de la proportion de *C. albicans*, habituellement très sensible aux antifongiques, au profit de *C. glabrata* ou *C. krusei* espèces respectivement moins sensible et intrinsèquement résistante aux antifongiques azolés utilisés en prophylaxie, suggérant une sélection (Eggiman 2003). Les conséquences de ce « shift » entre les espèces *albicans* et non-*albicans* semblent encore limitées et ne doivent pas, pour l'instant, remettre en cause les indications de la prophylaxie par les azolés (Abi-Said 1997, Van Burik 1998, Tortorano 2006, Vardakas 2006). Cette prophylaxie a montré son efficacité en réduisant significativement le nombre de candidoses profondes et la mortalité associée chez les patients de réanimation et d'onco-hématologie (Marr 2000, Bow 2002, Vardakas 2006).

### **b) Physiopathologie et « facteurs de virulence »**

La physiopathologie des infections à *C. albicans* repose sur la séquence colonisation - infection locale - dissémination. *C. albicans* est un saprophyte des tractus digestif et génito-urinaire et est retrouvé temporairement ou de façon permanente dans la flore normale de 50 à 70 % de la population. La colonisation est préalable à toute infection et résulte déjà d'une modification des conditions locales favorisant la croissance des levures au niveau des muqueuses ou de la peau (Eggimann 2003). Le maintien de ces circonstances favorables à la colonisation et l'association à d'autres facteurs facilitant l'invasion peuvent aboutir à une infection profonde et disséminée. Ainsi la très grande majorité des infections profondes à *C. albicans* (candidémies, candidoses hépatospléniques) sont d'origine endogène et se développent à partir des levures présentes dans le tube digestif qui traversent la muqueuse par

translocation (Figure 4). Les facteurs favorisants ou facteurs de risque sont principalement : l'administration prolongée d'antibiotiques qui déséquilibrent la flore bactérienne au profit des levures, les déficits immunitaires ou les traitements immunosuppresseurs, la chirurgie du tube digestif, l'utilisation des chimiothérapies anticancéreuses altérant la muqueuse digestive, la prématurité. Une faible proportion des candidoses profondes est d'origine exogène, la contamination se faisant à partir d'une colonisation cutanée. L'existence de matériel étranger intravasculaire (cathéters) et la toxicomanie par voie intraveineuse en sont les principaux facteurs favorisants (Eggiman 2003).



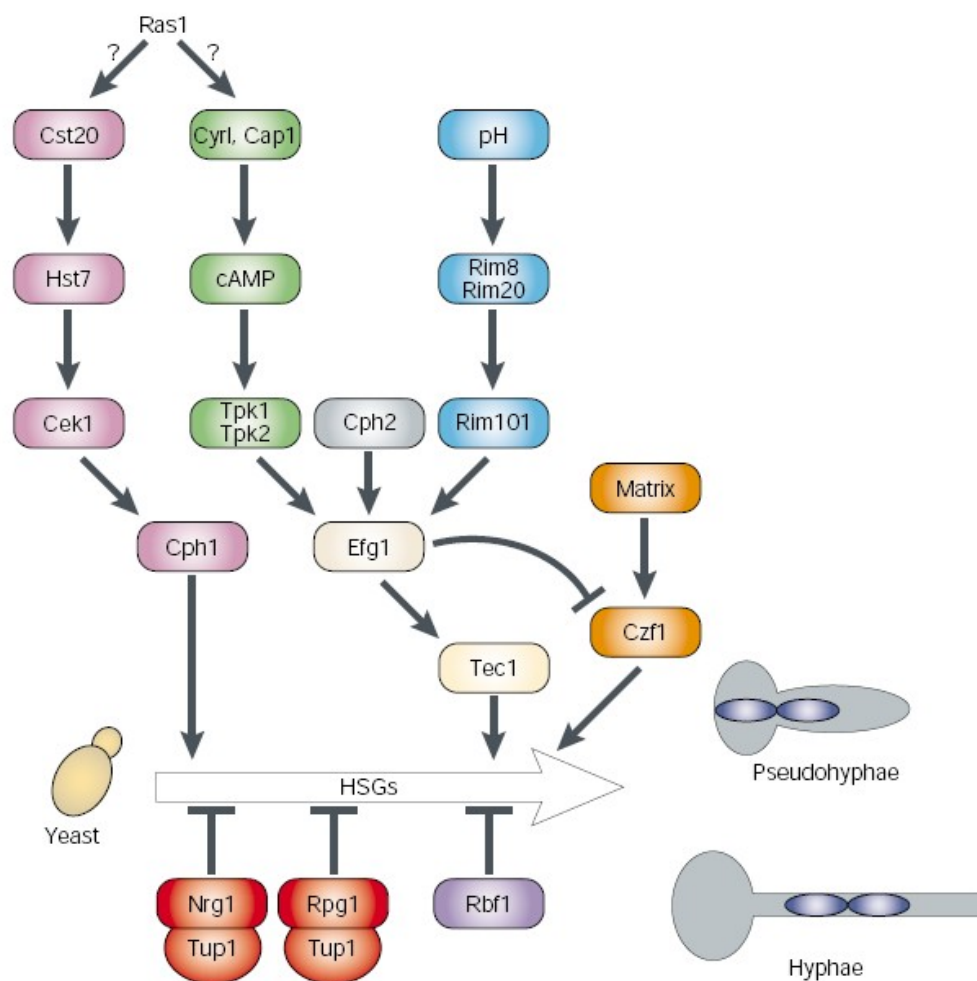
**Figure 4 : Schéma de la physiopathologie des infections invasives à *Candida sp.* (d'après Eggimann 2003)**

*Candida albicans* est donc un pathogène opportuniste profitant des faiblesses de son hôte. Sa virulence s'explique surtout par sa capacité à adhérer, à survivre, à se développer, puis à pénétrer dans les différents tissus de l'organisme. Les différentes voies de signalisation lui permettant de s'adapter à des modifications de son environnement, les mécanismes assurant son adhésion aux tissus et ceux lui permettant d'échapper aux défenses de l'hôte constituent des facteurs de virulence importants. Son aptitude à former des filaments est éga-

lement considérée comme essentielle pour sa virulence même s'il n'existe pas de règle générale simple pouvant s'appliquer à tous les champignons, associant morphogenèse et virulence.

### ***(1)Morphogenèse***

Les filaments facilitent l'adhésion aux tissus et la pénétration à travers la peau, les barrières épithéliales des muqueuses et l'endothélium vasculaire. Ils favorisent donc l'invasion. Ils permettent également à *C. albicans* d'échapper à la phagocytose. (Odds 1997, Berman 2002, Kumamoto 2005). De nombreux facteurs environnementaux comme la température  $> 35^{\circ} \text{C}$ , le pH neutre ou alcalin, l'anaérobiose, la présence de sérum, la carence en nutriments, induisent la transition levure-filament et reflètent les différentes conditions de survie de *C. albicans in vivo* (Brown 2002). Au moins 7 voies de signalisation contrôlant la filamentation ont été décrites (Figure 5 page suivante). Les voies inductrices sont la voie de la MAP kinase activant la protéine Cph1p (en rose sur la figure 5), la voie Czf1p, qui est activée en microaérobie ou après inclusion dans l'agar (orange), et les voies cAMP (verte), Cph2p (grise) et Rim (bleue), activant toutes la synthèse de Efg1p. Ras1p active les voies de la MAP kinase et du cAMP mais peut également induire la filamentation indépendamment de ces deux voies (Chen 2000, Leberer 2001). La voie Rim est activée par le pH alcalin ou neutre, la voie Czf1p par l'existence d'une matrice solide et les voies de la MAP kinase et cAMP répondent à la carence nutritionnelle (Davis 2000a, Brown 1999, Gow 2002). Les voies inhibitrices (rouge et violette) impliquent les protéines Tup1p, Nrg1p, Rpg1p et Rbf1p (Berman 2002).



**Figure 5 : Facteurs impliqués dans la morphogénèse (d'après Berman 2002)**

Les interactions complexes entre ces différentes voies permettent une adaptation de la réponse aux variations des conditions environnementales. Ainsi, le double mutant *cph1/efg1* s'est révélé incapable de filenter dans la plupart des conditions inductrices *in vitro* et s'est montré avirulent *in vivo* malgré la présence de nombreux filaments dans les tissus infectés (Lo 1997, Riggle 1999).

En milieu solide (après inclusion dans l'agar), *EFG1* se comporte à l'inverse comme un répresseur de la filamentation qui est lui-même inhibé par Czf1p, aboutissant au final à une induction de la filamentation. Cet antagonisme de Czf1p sur Efg1p en milieu solide pourrait expliquer la transition entre une filamentation de surface et une filamentation invasive, d'autant plus qu'il n'a pas été décrit d'homologue de Czf1p chez *S. cerevisiae* ou chez les autres levures (Giusani 2002).

## **(2)Autres facteurs de virulence**

### **(a)Adhésines**

Elles permettent à *C. albicans* de se fixer à de nombreuses cellules comme les cellules épithéliales, les plaquettes ou les leucocytes ; à des protéines comme le complément, le fibrinogène, le collagène ou l'hémoglobine ou à des corps étrangers en formant des biofilms. Ces protéines sont essentiellement des mannoprotéines pariétales à ancre GPI : protéines Als, Hwp1p (voir paragraphe sur la paroi) (Calderone 2002).

### **(b)Enzymes hydrolytiques : protéases, phospholipases et lipases**

Les enzymes lytiques sécrétées par *C. albicans* contribuent à la virulence en facilitant l'adhésion aux cellules hôtes, l'hydrolyse des membranes et la résistance aux mécanismes de défense (Monod 2002).

La famille des protéines Sap (secreted aspartic proteinase) regroupe 10 protéines (Sap1p-Sap10p) responsables de l'activité protéolytique de *C. albicans*. Leur expression est soit constitutive (Sap9p et Sap10p) soit variable en fonction des conditions environnementales, de la morphogénèse et du type d'infection (Sap1p-Sap6p). Cela suggère l'existence de mécanismes de corégulation entre les différents facteurs impliqués dans la virulence. Des taux élevés d'anticorps anti-Sap ont été détectés chez des patients atteints de candidose profonde, confirmant l'expression des ces protéines *in vivo* (Hube 2002). Le rôle protecteur de ces anticorps reste à déterminer.

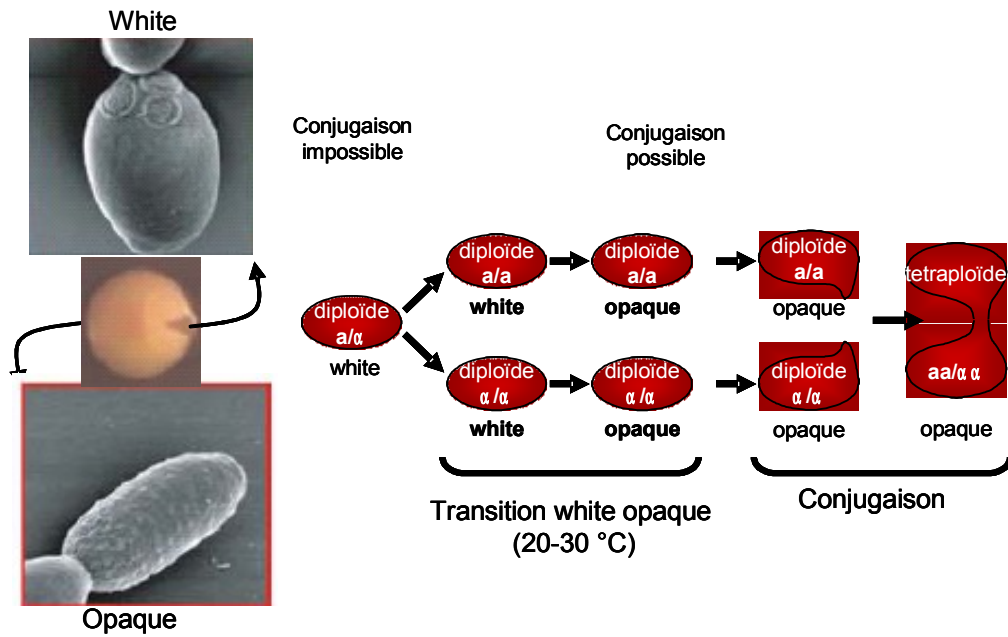
Les phospholipases permettent de lyser les membranes et sont sécrétées au bout des filaments en croissance (Leidich 1998, Ghannoum 2000).

La famille des lipases regroupe 10 protéines (Lip1p-Lip10p) dont l'expression varie en fonction du stade de l'infection (Hube 2000, Stehr 2004).

### **(c)La variabilité phénotypique ou « switching »**

Certaines souches de *C. albicans* présentent une variabilité morphologique supplémentaire qui entraîne une modification spontanée et réversible de l'aspect des colonies. La transition « White-Opaque » induit la transformation de colonies typiques, blanches et bombées, en colonies grises, aplaties, constituées de levures allongées à paroi rugueuse (Figure 6). Certains gènes impliqués dans la morphogénèse comme *EFG1* et *TUPI* seraient exprimés différemment dans les deux phénotypes et les souches isolées au cours d'infections

présentent plus souvent cette variabilité phénotypique que les souches commensales (Soll 1992, Sonneborn 1999, Zhao 2002). Il existe un lien avec le « mating » car seules les cellules « White » homozygotes  $a/a$  ou  $\alpha/\alpha$  peuvent effectuer la transition vers la forme « Opaque » (Figure 6). Une fois « Opaque » les cellules peuvent conjuguer car elles sont devenues plus compétentes pour la conjugaison (Miller 2002). Elles sont également plus résistantes aux antifongiques (Ghannoum 1990).



**Figure 6 : Transition « White-opaque » et conséquences sur la conjugaison (d'après Soll 2003 et Bennett 2005)**



## c) Aspects cliniques

### (1) Candidoses superficielles :

Ce sont les candidoses buccales, ou muguet, qui atteignent la langue et de la face interne des joues et la perlèche au niveau des commissures labiales (Photo 1) ou les candidoses œsophagiennes qui se manifestent par des brûlures rétrosternales. Les candidoses cutanées touchent préférentiellement les plis : ce sont les intertrigos. Les ongles et leur périphérie peuvent également être atteints : ce sont les onyxis et périonyxis favorisés par l'humidité (Photo 2). Les candidoses génitales sont plus fréquentes chez les femmes et se présentent sous forme de vulvo-vaginites, favorisées par les œstro-progestatifs et la grossesse.



**Photo 1 : Candidose buccale avec perlèche ; Photo 2 : Onyxis et périonyxis candidosique**

Source : ANOFEL

### (2) Candidoses profondes :

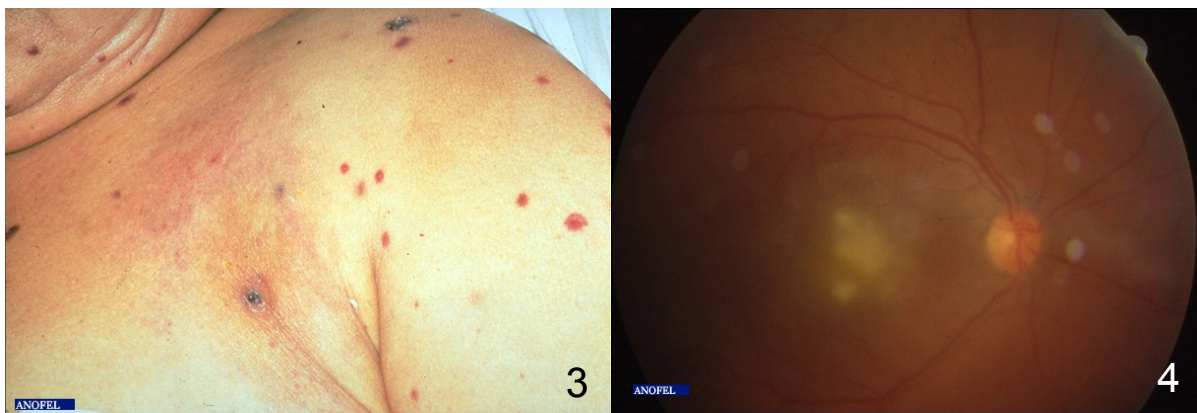
Elles désignent le développement de levures du genre *Candida* dans les organes profonds après dissémination par voie hématogène. On emploie également le terme de candidoses disséminées. Le terme de candidoses systémiques est plus général et désigne à la fois les candidémies (dissémination hématogène objectivée par une hémoculture positive) et les candidoses viscérales profondes.

Le diagnostic des candidoses profondes reste difficile en l'absence d'hémoculture positive ce qui représente environ la moitié des cas. Les localisations secondaires sont parfois au premier plan. Les plus fréquentes et les plus spécifiques sont les atteintes cutanées : prédominant au niveau du tronc et des membres (Photo 3 page suivante), les atteintes oculaires (chorio-rétinites ; Photo 4 page suivante), les atteintes musculaires et ostéoarticulaires, les atteintes des valves cardiaques (endocardite), les atteintes rénales et les abcès péri-rénaux.

Les candidoses chroniques disséminées ou candidoses hépatospléniques sont une particularité des patients atteints de leucémie, qui développent de multiples abcès à *Candida* dans le foie, la rate ou les reins.

Les péritonites à *Candida* sont des complications des perforations et de la chirurgie du tube digestif, particulièrement difficiles à traiter et qui peuvent disséminer secondairement.

Les candiduries peuvent être le témoin d'une candidose profonde avec localisation rénale ou plus simplement d'une colonisation ascendante des voies urinaires basses, fréquente chez les patients porteurs d'une sonde urinaire.



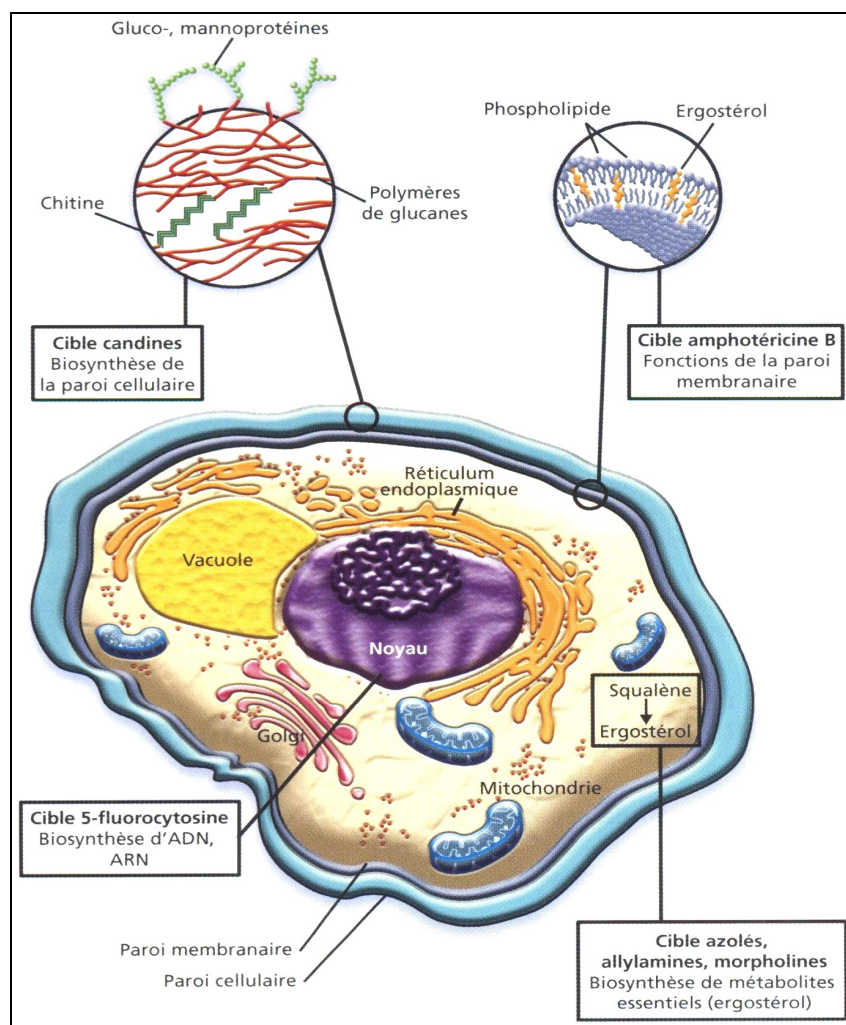
**Photo 3 : Localisation cutanée secondaire d'une candidémie**

**Photo 4 : Localisation oculaire secondaire (tâche maculaire d'une chorio-rétinite) d'une candidose profonde**

Source : ANOFEL

### **d) Traitement : mode d'action des antifongiques et résistances chez *C. albicans***

Comparativement aux antibactériens, le nombre de médicaments antifongiques disponibles est resté limité. Les champignons étant plus proches des cellules humaines que les bactéries, la possibilité de trouver des cibles spécifiques est réduite. Les cibles des antifongiques sont essentiellement l'ergostérol de la membrane plasmique pour les polyènes et les azolés, les acides nucléiques pour la 5-flucytosine et la paroi pour les échinocandines (Figure 7).



**Figure 7 : Cibles des principaux antifongiques (d'après Lortholary 2002)**

Le nombre restreint d'antifongiques rend l'émergence de résistances d'autant plus préoccupante. Les notions de résistances clinique et mycologique sont très importantes à distinguer. La résistance clinique se traduit par la persistance des signes d'infection malgré un traitement antifongique adapté. Elle peut être liée à la résistance du champignon mais aussi aux facteurs de l'hôte comme le déficit immunitaire, le maintien d'un matériel étranger colonisé

ou la formation d'un biofilm. Elle peut être également liée aux caractéristiques de l'antifongique, fongicide ou fongistatique, à ses propriétés pharmacocinétiques conditionnant sa diffusion jusqu'au site de l'infection et à ses interactions avec les autres médicaments.

La résistance mycologique se mesure *in vitro* par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). La mise au point d'une méthode de référence a permis une meilleure standardisation mais cette méthode présente certaines limites. Elle détecte mal les résistances à l'amphotéricine B, la lecture des résultats est gênée par l'existence d'un phénomène de traîne lié au caractère fongistatique des azolés et la reproductibilité interlaboratoire est décevante (CLSI 1997, Law 1997, Marr 1999). Les valeurs seuils au delà desquelles une souche est considérée comme résistante sont difficiles à établir. Dans les candidoses oro-pharyngées chez les patients atteints de SIDA des valeurs élevées de CMI au fluconazole ont été associées à des échecs cliniques (Cameron 1993). En dehors de cette situation particulière, il existe très peu de corrélation entre une valeur de CMI et l'évolution clinique. Ainsi, une CMI basse ne garantit pas un succès thérapeutique et inversement (Ghannoum 1996, Revankar 1996). La règle des 90-60, établie initialement pour les bactéries, résume bien cette situation équivoque en prédisant que 90 % des isolats sensibles vont être traités avec succès tout comme 60 % des isolats résistants (Rex 2002). Cette absence de corrélation clinico-mycologique systématique constitue une difficulté supplémentaire dans le traitement des infections fongiques et est liée aux facteurs de l'hôte, qui restent déterminant pour l'évolution de l'infection.

Le développement de résistances chez *C. albicans* a été un problème majeur dans le traitement des candidoses superficielles récidivantes chez les patients atteints de SIDA. Depuis l'utilisation des antiprotéases dans les traitements antirétroviraux, ces résistances sont devenues beaucoup plus rares (Law 1994, Martins 1998). Même si l'isolement de souches résistantes dans les candidoses profondes est exceptionnelle, l'émergence de ces souches doit être surveillée (Dannaoui 2004, Tortorano 2006).

### ***(1) Mécanismes moléculaires et cellulaires de la résistance***

La résistance peut être intrinsèque ou primaire, c'est-à-dire préalable à toute exposition, ou acquise, c'est-à-dire sélectionnée par un traitement (White 1998, Rogers 2006). La résistance primaire caractérise une espèce donnée et concerne toutes les souches de cette espèce. La résistance acquise concerne seulement certaines souches dans une espèce considérée habituellement sensible. Ces souches devenues résistances vont être sélectionnées par l'expo-

sition à l'antifongique et vont remplacer les souches sensibles. L'acquisition de mécanismes de résistance se fait par mutations ou par des modifications de l'expression des gènes codant la cible ou le transport de l'antifongique.

On distingue également la résistance stable, qui persiste même en l'absence de l'antifongique, et la résistance transitoire, épigénétique, liée à la modification transitoire de l'expression d'un gène. La résistance épigénétique a été observée après de courtes périodes de traitement antifongique (Marr 1998).

D'autres mécanismes cellulaires, comme le switching « White-Opaque » (voir paragraphe sur la variabilité phénotypique) ou la filamentation, sont impliqués dans la résistance (White 1998).

Les mécanismes cellulaires aboutissant à la résistance à différents antifongiques sont principalement : le défaut de pénétration de l'antifongique dans la cellule, l'inhibition de la transformation de l'antifongique en forme active, l'altération de la cible (surproduction, modification voire disparition de la cible), l'altération d'autres enzymes de la même voie métabolique, et l'évacuation de l'antifongique en dehors de la cellule par un système d'efflux (White 1998).

## ***(2) Les principales classes d'antifongiques***

### **(a) Les polyènes : amphotéricine B et nystatine**

Les polyènes, principalement représentés par l'amphotéricine B, sont fongicides et présentent le spectre d'activité le plus large de tous les antifongiques. L'amphotéricine B a été le premier antifongique développé dans les années 50 et pratiquement le seul utilisé pendant 30 ans. Cependant, son mode d'action reste en partie méconnu. Elle agit mécaniquement sur le principal stérol membranaire des champignons : l'ergostérol. Elle s'y fixe grâce à des liaisons hydrophobes et forme des pores dans la membrane (Holz 1974). La membrane devient perméable, notamment aux cations comme le potassium, et cette fuite ionique entraîne la mort de la cellule. Même si les polyènes se fixent préférentiellement à l'ergostérol des cellules fongiques, ils ont également une action sur le cholestérol des membranes des cellules humaines, conduisant à une toxicité importante, notamment rénale. La vectorisation des molécules avec des liposomes ou des composés lipidiques limite la toxicité liée à la forme libre d'amphotéricine B ou de nystatine (Walsh 1998, Walsh 1999).

De rares résistances de *C. albicans* à l'amphotéricine B ont été décrites (Chiu 2006, Yang 2005). L'émergence de ces souches serait plus fréquente chez les patients atteints

de cancer ou d'hémopathie, ayant été préalablement traités par des azolés ou par l'amphotéricine B (Nolte 1997, White 1998). La résistance à l'amphotéricine B est associée à des mutations sur la voie de synthèse de l'ergostérol affectant, entre autres, le gène *ERG3* (Vanden Bosche 1994, Haynes 1996, Nolte 1997, Young 2003). Cette mutation sur le gène *ERG3* induirait également une résistance aux azolés même si cette résistance croisée n'a pas été mise en évidence dans un mutant nul *erg3* de *C. albicans* (Nolte 1997, Sanglard 2003a). L'ergostérol de la membrane serait remplacé par du méthyl fécostérol qui permettrait la survie de la cellule (Figure 8) (Accoceberry 2006). Il existe également des souches de *C. albicans* intrinsèquement résistantes à l'amphotéricine B (Blignaut 2005).

### **(b) La 5-Flucytosine**

Ce médicament a été développé initialement comme anticancéreux. La 5-fluorocytosine (5-FC) entre dans la cellule grâce à la cytosine perméase et est ensuite désaminée en sa forme toxique le 5-Fluorouracile (5-FU). Les métabolites du 5-FU inhibent la thymidylate synthase et donc la synthèse de l'ADN. Ils entrent également en compétition avec l'UTP, sont incorporés à l'ARN et bloquent la synthèse protéique. La cytosine désaminase est spécifique des microorganismes, champignons et bactéries. Cependant, l'utilisation de la 5-FC dans les traitements antifongiques est limitée par sa toxicité médullaire et la fréquence des résistances à la fois primaires et secondaires. Les résistances sont liées à des mutations des gènes de la cytosine perméase (*FCY2*), de la cytosine désaminase (*FCY1*) ou de l'UPRT (*FUR1*) qui est l'enzyme qui transforme le 5-FU en 5-FUMP inhibiteur de la thymidylate synthase (Hope 2004). Chez *C. lusitaniae*, les mutations *fcy1* et *fcy2* sont responsables de résistances croisées entre la 5-FC et le fluconazole (Papon 2006).

### **(c) Les azolés**

Ils sont, avec l'amphotéricine B et les échinocandines, les antifongiques les plus utilisés aujourd'hui. Les imidazolés (kétoconazole, miconazole, econazole) ont été les premiers développés à la fin des années soixante et ont permis des progrès majeurs dans le traitement des candidoses cutanéomuqueuses associées au SIDA. Ensuite, les triazolés ont permis d'élargir le spectre aux champignons filamenteux pour l'itraconazole et de diminuer la toxicité avec le fluconazole. Récemment, de nouveaux triazolés, le voriconazole et le posaconazole, dérivés respectivement du fluconazole et de l'itraconazole, ont été validés et présentent l'avantage d'associer un large spectre d'activité (comparable à celui de l'amphotéricine B) et une toxicité



1. Surproduction de la cible CYP51 par la surexpression de *ERG11* liée à une augmentation de la transcription ou à une duplication génique résultant d'aneuploïdie et de la formation d'isochromosome (Perea 2001, Song 2004, Semelcki 2006).
2. Mutations sur le gène *ERG11* entraînant une baisse d'affinité de CYP51 pour les azolés (Sanglard 1998). Les effets de ces mutations sur la structure tridimensionnelle de la protéine ont été analysés grâce à la cristallisation de l'homologue de CYP51 de *Mycobacterium tuberculosis* (Podust 2001).
3. Rejet à l'extérieur de la cellule par surproduction de transporteurs (ou pompes) tels que les ABC (ATP-binding cassette) transporteurs codés par les gènes *CDR1* (Candida drug resistance) et *CDR2* et les transporteurs MFS (Major facilitator Superfamily) codés par les gènes *MDR1* et *FLU1*. Les ABC transporteurs ne sont pas spécifiques et peuvent transporter tous les azolés mais aussi d'autres antifongiques et d'autres composés toxiques (Sanglard 1997, Calabrese 2000). Le transporteur de type MFS est spécifique du fluconazole. La surexpression des gènes *CDR* codant pour les ABC transporteurs est sous le contrôle de facteurs transcriptionnels récemment identifiés. *TAC1* est une protéine en « doigt de zinc » du type Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> qui se lie à la région promotrice des gènes *CDR1* et *CDR2* pour les activer (Coste 2004). *TAC1* étant proche du locus *MTL* sur le chromosome 5, l'homozygotie du locus *MTL* peut, en associant l'homozygotie du locus *TAC1*, augmenter l'expression d'un allèle *TAC1* codominant. Ceci expliquerait pourquoi les souches résistantes aux azolés sont le plus souvent homozygotes au locus *MTL* (Rustad 2002, Coste 2004). La recombinaison et la duplication d'une partie du chromosome 5 sont également responsables de la perte de l'hétérozygotie au locus *TAC1* (Coste 2006). De plus, la résistance aux azolés a été associée à la trisomie du chromosome 5 et à la formation d'un isochromosome par duplication de son bras gauche, qui contient des informations génétiques telles que *ERG11*, *TAC1* et d'autres gènes codant pour des transporteurs. L'expression de ces gènes est augmentée dans les souches trisomiques (Semelcki 2006). *CaNDT80* est un activateur de *CDR1* dont l'activité serait compensée par deux répresseurs NRE et *REP1* (Gaur 2005, Wang 2006, Chen 2006). Lorsque ces répresseurs ne sont plus actifs *CDR1* est surexprimé. Le facteur transcriptionnel qui régule *MDR1* n'a pas encore été identifié même si une séquence consensus AP1-like a été mise en évidence dans le promoteur du gène (Sanglard 2002).

Le mécanisme d'efflux par la surproduction des transporteurs concerne 85 % des isolats résistants et les ABC transporteurs codés par *CDR1* et *CDR2* sont deux fois plus souvent surproduits que les transporteurs de type MFS. Les mutations et la surexpression du gène



*ERG11* concernent respectivement 75 % et 35 % des isolats résistants. Différents mécanismes de résistances sont associés dans 75 % des cas (Perea 2001).

D'autres mécanismes plus rares sont impliqués dans la résistance aux azolés comme les mutations sur le gène *ERG3* (voir plus haut résistance à l'amphotéricine B) (Sanglard 2003a).

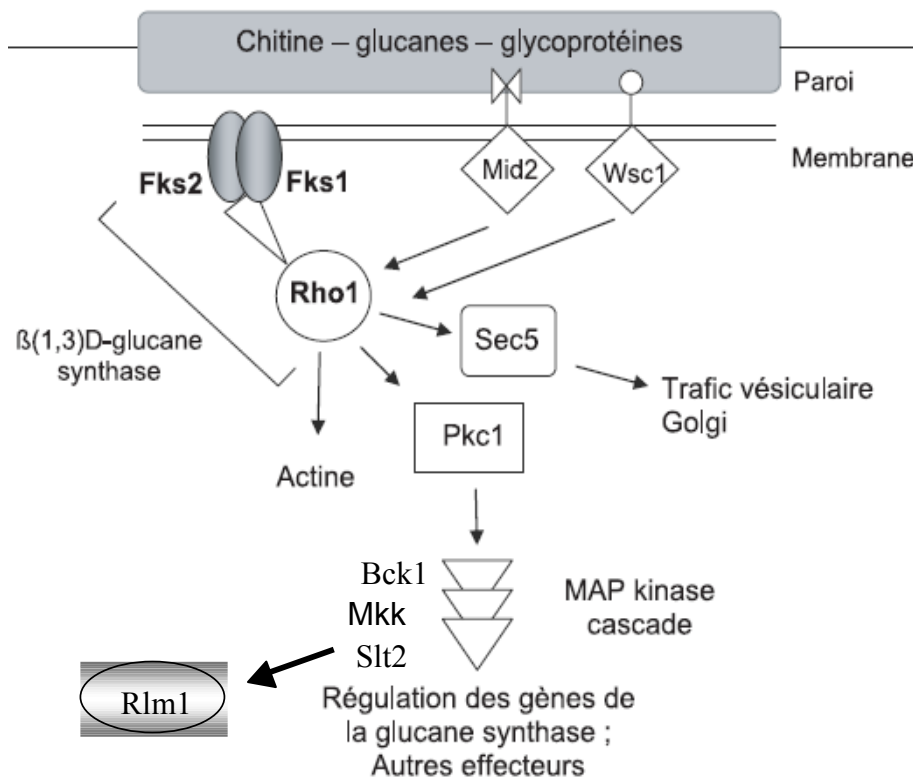
#### (d) Les échinocandines

Ces antifongiques ont un mécanisme d'action complètement innovant car ils ciblent la paroi. Ils agissent sur les levures du genre *Candida* et les champignons filamenteux du genre *Aspergillus* et ont donc un spectre plus étroit que l'amphotéricine B ou les derniers triazolés développés. Cependant, ils sont de plus en plus utilisés car ils sont très bien tolérés et ils peuvent être associés favorablement aux autres antifongiques qui n'ont pas la même cible. La caspofungine et la micafungine sont actuellement disponibles, l'anidulafungine est en cours de développement. Les échinocandines inhibent la synthèse des glucanes de la paroi en bloquant l'enzyme  $\beta$  1-3 D-glucane synthase. Chez *C. albicans*, cette enzyme hétérodimérique est constituée d'une sous-unité catalytique codée par *FKS1/GSC1* et *FKS3/GLS1* et d'une sous-unité régulatrice codée par *RHO1*. Les échinocandines inhibent la sous-unité catalytique Fks1p (Mio 1997a, Douglas 1997).

Malgré l'utilisation croissante des échinocandines, le développement de résistances reste exceptionnel. De très rares souches cliniques de *C. albicans* de sensibilité diminuée aux échinocandines ont été isolées. Ces résistances étaient associées à des mutations du gène *FKS1* (Katiyar 2006, Laverdière 2006).

Des mutants résistants de *S. cerevisiae* ont pu être obtenus *in vitro* et ont permis d'identifier plusieurs mécanismes de résistance qui impliquent les protéines de la voie de la Pkc1-MAP kinase (Markovitch 2004). Cette voie contrôle l'intégrité cellulaire et est activée par Rho1p qui active en cascade Pkc1p puis Bck1p, Mkk1p et Slt2p (Figure 9). Slt2p induit ensuite le facteur transcriptionnel Rlm1p impliqué dans le mécanisme compensateur de réparation cellulaire par augmentation de la chitine (Garcia 2004, Levin 2005). Cette accumulation de chitine pourrait être liée à la mobilisation vers la membrane de la chitine synthase Ch3p contenue dans des vésicules appelées chitosomes. Ces chitosomes sont des compartiments issus de l'endosome précoce et leur activité est régulée par Rho1p et Pkc1p (Valdivia 2003). Rho1p perçoit le signal de modification de la paroi par les senseurs Wsc1p et Mid2p (Monge 2006).

Par ailleurs, la surexpression du gène codant pour la protéine Sbe2p impliquée dans le transport des composants de la paroi induit également la résistance à la caspofungine (Oshe-rov 2002).



**Figure 9 : Modèle de régulation de la β(1,3) D-glucane synthase chez *S. cerevisiae* (d'après Accoceberry 2006).**

(Chez *C. albicans* seule la sous-unité catalytique Fks1p a été mise en évidence)

L'implication de la surexpression des transporteurs type MDR et CDR dans la résistance aux échinocandines est controversée et les résultats semblent varier en fonction des méthodes employées et de la molécule. La surexpression de *CDR1* induit une baisse de sensibilité à la micafungine, alors que la surexpression de *CDR2* induit une baisse de sensibilité à la caspofungine et une hypersensibilité à la micafungine en milieux solides. Ces résultats n'ont pas pu être confirmés par des tests en milieu liquide (Bachmann 2002, Schuetzer-Muehlbauer 2003, Niimi 2006).

Certains auteurs ont décrit un « effet paradoxal » *in vitro* correspondant à la croissance de souches sensibles de *C. albicans* à des concentrations élevées de caspofungine (Stevens 2005). Ce phénomène pourrait être lié à une augmentation de la synthèse de la chitine (Ste-

vens 2006). Les conséquences *in vivo* sur l'efficacité d'un traitement semblent négligeables (Clemons 2006).

#### (e) Régulations globales des résistances

La protéine Hsp90p semble jouer un rôle dans l'apparition des résistances de *C. albicans* à l'amphotéricine B et aux azolés. C'est une protéine chaperon indispensable à l'activation et à la régulation des protéines de la signalisation chez les eucaryotes. Elle agit principalement en activant les protéines kinases et les facteurs de transcription et favorise l'expression des mutations. C'est une cible de choix pour le développement des agents anti-tumoraux. Ces anticancéreux pourraient en même temps prévenir l'acquisition de résistances aux antifongiques, en particulier l'acquisition rapide transitoire par mutation du gène *ERG3*, impliquant Hsp90p (Cowen 2005).

La calcineurine est une protéine impliquée dans la tolérance aux azolés et est potentiellement activée par Hsp90p (Cowen 2005). Les inhibiteurs de la calcineurine comme la cyclosporine A et le FK506 augmentent l'activité des azolés en les rendant fongicides. Leur association avec les azolés est synergique mais l'intérêt clinique d'une telle association est limité par l'action immunosuppressive des anti-calcineurine (Marchetti 2000). Le mécanisme de cette synergie n'est pas connu mais semble indépendant des pompes à efflux (Marchetti 2003). Les inhibiteurs de la calcineurine augmentent également l'activité fongicide de la caspofungine vis-à-vis de *C. albicans*. La calcineurine est impliquée dans la tolérance de *S. cerevisiae* à la caspofungine par le facteur transcriptionnel calcineurine-dépendant Crz1p, qui induit *FKS2* et la synthèse des  $\beta$  1,3 D glucanes (Levin 2005). Chez *S. cerevisiae*, la synthèse des  $\beta$  1,3 D glucanes est régulée par les gènes *FKS1*, *FKS2* et *FKS3* (Douglas 1994, Mazur 1995). La calcineurine est également impliquée dans la résistance aux inhibiteurs métaboliques et aux agents déstabilisants la paroi comme le SDS, le Calcofluor White (CFW) et le rouge Congo. Elle joue un rôle important dans la filamentation et la virulence. La voie de la calcineurine est activée par le  $Ca^{2+}$  et le pH alcalin (Sanglard 2003b). Les effecteurs de cette voie chez *C. albicans* ne sont pas encore identifiés. Crz1p, identifié initialement chez *S. cerevisiae*, est également régulé par la calcineurine chez *C. albicans* mais ne semble impliqué ni dans la tolérance aux azolés ni dans la virulence, suggérant l'existence d'autres cibles de la calcineurine chez *C. albicans* (Karababa 2006).

Hsp90p présente un effet facilitateur sur l'apparition des résistances des levures aux azolés et à l'amphotéricine B et le développement des résistances des *Aspergillus* à la caspo-

fungine (Cowen 2005). La calcineurine est impliquée dans la tolérance des levures aux azolés et dans la baisse d'activité de la caspofungine (Sanglard 2003b). Ces protéines semblent agir toutes les deux en favorisant les réponses de la cellule aux modifications de la membrane ou de la paroi induites par les antifongiques (Cowen 2005).

## **B. La voie de signalisation du pH chez les champignons**

La réponse au pH est une réponse adaptative déterminante pour les champignons, conditionnant leur survie dans l'organisme et leur virulence. La voie de signalisation du pH est spécifique des champignons et peut donc constituer une cible importante pour les traitements antifongiques. Cette réponse est également importante pour certaines propriétés métaboliques majeures des champignons comme la production d'antibiotiques par les filamenteux. La synthèse de pénicilline par *A. nidulans* et *Penicillium chrysogenum* et de céphalosporine par *Acremonium chrysogenum* est augmentée à pH alcalin (Penalva 2002, Schmitt 2001). De même, la sécrétion de la protéine antifongique (AFP : AntiFungal Protein) par *A. giganteus*, propriété utilisée pour protéger les productions agricoles des champignons phytopathogènes, est induite par cette voie en milieu alcalin (Meyer 2005). La réponse au pH est en grande partie contrôlée par la voie de signalisation nommée Pal chez les champignons filamenteux et Rim chez les levures.

### **1. Voie conservée**

La voie Pal/Rim, a été décrite initialement chez *A. nidulans* (Caddick 1986) et retrouvée ensuite chez d'autres ascomycètes comme *Yarrowia lipolytica* (Lambert 1997), *C. albicans* (Ramon 1999), *S. cerevisiae* (Lamb 2001), *Fusarium oxysporum* (Caracuel 2003) et chez des basidiomycètes comme *Ustilago maydis* (Aréchiga-Carvajal 2005).

#### **a) Activation de la voie Pal/Rim**

La voie Pal/Rim est constituée par une série de protéines qui transmet le signal pH à un facteur transcriptionnel nommé PacC chez les filamenteux et Rim101p chez les levures. Cette protéine est caractérisée par l'existence dans sa partie N-terminale de 3 doigts de Zinc (Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>) qui comprennent des domaines d'interaction avec l'ADN. Chez *C. albicans*, il existe trois types de séquences consensus reconnues par Rim101p sur les gènes cibles : une identique à celle de Rim101p/PacC de *S. cerevisiae* et d'*A. nidulans* (GCCAAG), une différente (CCAAGAA), la troisième étant la combinaison des deux premières (GCCAAGAA) (Ramon 2003, Lamb 2003, Baeck 2006). L'activation de la voie à pH alcalin ou neutre se fait par protéolyse du domaine C terminal de PacC/Rim101p (dans la suite de ce travail, les conditions neutres qui ont les mêmes conséquences sur la voie seront assimilées aux conditions alcalines). La forme longue complète de PacC/Rim101p prédominante à pH acide n'a pas de fonction connue (Penalva 2004). La protéolyse intervient après activation en cascade de 6

protéines Pal et 5 protéines Rim (voir tableau I ci-dessous). La protéine PalC, dont la fonction est inconnue, existe chez les champignons filamenteux et n'a pas été retrouvée chez les levures, en dehors de *Y. lipolytica*. Sur le plan taxonomique, cette levure est assez éloignée des autres levures suggérant la suppression de ce facteur au cours de l'évolution (Figure 1) (Dujon 2004, Penalva 2002 et 2004, Tilburn 2005).

**Tableau I : Conservation des protéines de la voie Pal/Rim**

<i>A. nidulans</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>S. cerevisiae</i> et <i>C. albicans</i>
PalA	Rim20p	Rim20p
PalB	Rim13p	Rim13p
PalC	Rim23p*	-
PalF	Rim8p	Rim8p
PalH	Rim21p	Rim21p
		Dfg16p
Pall	Rim9p	Rim9p

\* (Blanchin-Roland, communication personnelle)

La protéolyse de PacC/Rim101p libère l'accès au domaine de liaison avec l'ADN et permet son interaction avec les gènes cibles. Les gènes exprimés préférentiellement à pH alcalin sont alors activés et ceux exprimés préférentiellement à pH acide sont réprimés. Chez *C. albicans*, un autre mécanisme pourrait activer la voie Rim à pH alcalin et s'ajouter à la protéolyse de Rim101p (Baek 2006).

### **(1) Transmission du signal**

Pall/Rim9p et PalH/Rim21p présentent respectivement 4 et 7 domaines transmembranaires et sont pressenties pour être des senseurs du signal pH.

La boucle formée par les segments transmembranaires 1 et 2 de Pall/Rim9p et située entre la membrane plasmique et la paroi pourrait jouer un rôle important dans la perception de ce signal. Cependant, le phénotype des mutants *pall/rim9* chez *A. nidulans* et *Y. lipolytica* est moins marqué que le phénotype des autres mutants de la voie, suggérant que le signal peut être transmis en l'absence de Pall/Rim9p (Denison 1998, 2001, Gonzalez-Lopez 2002). Rim9p de *S. cerevisiae* et *C. albicans*, est beaucoup plus courte que Rim9p de *Y. lipolytica* et de son homologue Pall car elle ne contient pas de queue hydrophile. Il a été suggéré que la queue hydrophile de Rim9p/Pall pourrait interagir avec PalC mais cette interaction n'a pas été démontrée. Cette modification de structure de la protéine Rim9p pourrait avoir un effet sur sa fonction et son efficacité (Penalva 2002) (Figure 10 page suivante).

Chez *A. nidulans*, la partie C terminale hydrophile de PalH est située dans le cytoplasme et est fortement liée à deux domaines de PalF. Cette interaction entre PalH et PalF est indispensable à la transmission du signal pH. PalF est une protéine de la famille des arrestines, protéines impliquées dans la régulation des récepteurs transmembranaires. Elle est phosphorylée et ubiquitinylée à pH alcalin. Ces modifications de PalF semblent partiellement dépendantes de PalI mais indépendantes de PalA, PalB et PalC. (Penalva 2004, Herranz 2005) (Figure 10). Chez *C. albicans*, les rôles de Rim21p et de Rim8p (homologue de PalF) dans la transduction du signal n'ont pas été établis, même si les domaines arrestines sont conservés chez Rim8p (Herranz 2005). Dans un mutant nul *rim8*, l'expression d'un gène codant pour une protéine Rim101p tronquée, rendue active constitutivement, a permis de restaurer la réponse au pH, suggérant que Rim8p comme PalF agit en amont de la protéolyse de Rim101p (Davis 2000b).

Récemment, une troisième protéine, Dfg16p, potentiellement impliquée dans la transmission du signal a été caractérisée chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Dfg16p possède 7 domaines transmembranaires, une queue hydrophile et est nécessaire à l'activation de Rim101p. Comme Rim21p et Dfg16p sont toutes les deux des homologues de PalH, ces protéines pourraient former un récepteur hétérodimérique. Il a été également suggéré que Dfg16p pourrait interagir avec Rim8p (Barwell 2005) (Figure 11).

## (2) Protéolyse de PacC/ Rim101p

La protéolyse de PacC chez *A. nidulans* se fait à pH alcalin en deux étapes. La première, dépendante du signal pH, est induite par la protéase PalB qui clive la partie C-terminale de PacC. La protéolyse de PacC par PalB se fait par l'intermédiaire de PalA qui interagit avec la partie C terminale de PacC et cette interaction est indispensable à la protéolyse de PacC (Figure 10). Cette première protéolyse a lieu dans le cytoplasme et la protéine clivée se localise ensuite préférentiellement dans le noyau où a lieu la deuxième protéolyse, formant une protéine tronquée des 2/3 (Mingot 2001). La deuxième protéolyse est indépendante du pH, peut avoir lieu également dans le cytoplasme et pourrait être effectuée par le protéasome, mais cette dernière hypothèse n'a pas été démontrée (Arst 2003).

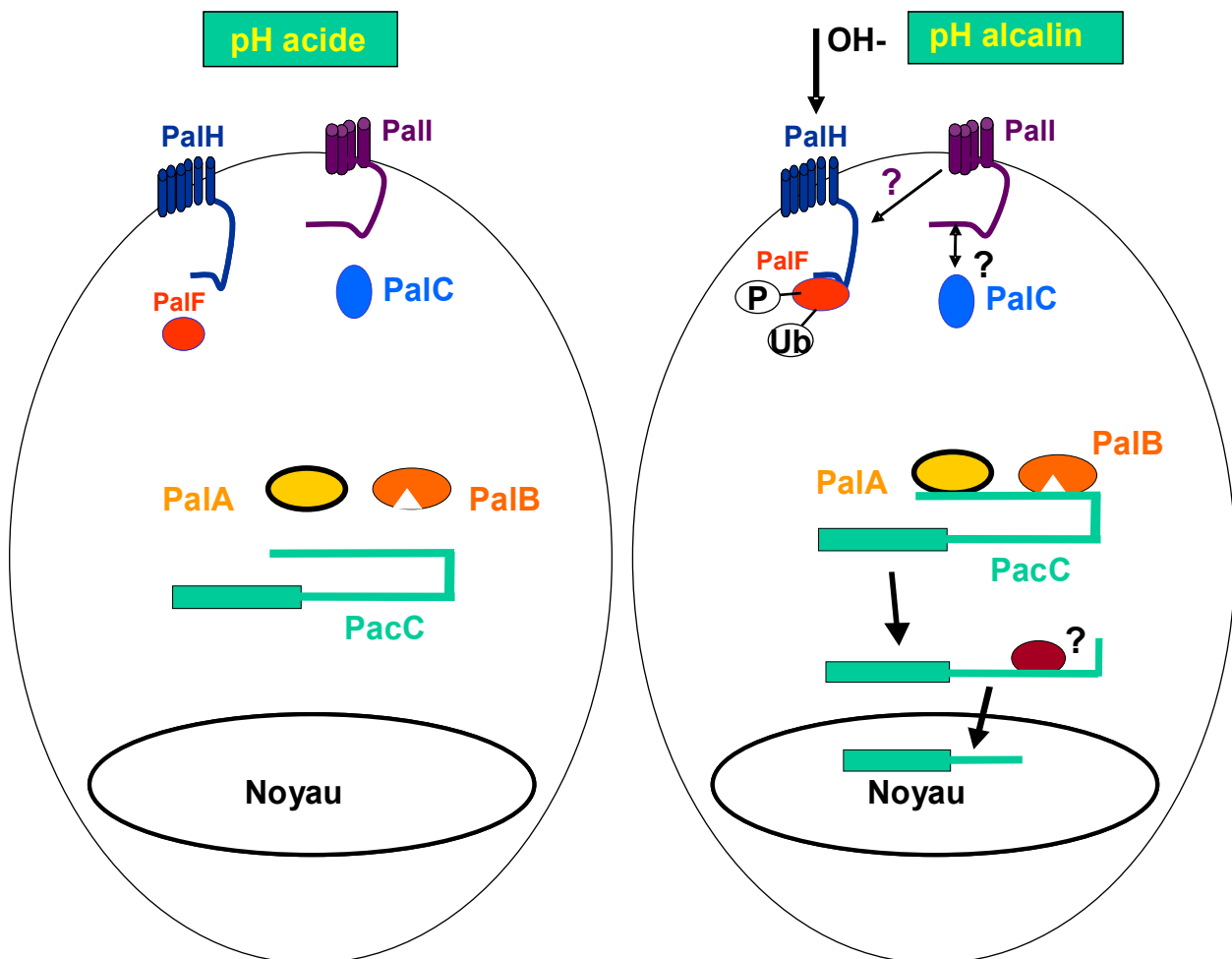


Figure 10 : Schéma de la voie Pal chez *A. nidulans*



La protéolyse de Rim101p chez *S. cerevisiae*, se fait à pH alcalin en une seule étape induite par la protéase Rim13p et est équivalente à la première protéolyse de PacC.

Chez *C. albicans*, Rim101p est protéolysée à la fois à pH acide et à pH alcalin. La protéolyse à pH acide pourrait se faire en deux étapes dont la première serait dépendante de Rim13p. Il semble que la forme obtenue après protéolyse à pH acide se lie à l'ADN des gènes cibles mais cette activité reste négligeable. La fonction de la forme tronquée obtenue à pH acide n'est pas connue (Li 2004). À pH alcalin, Rim101p est protéolysée en une seule étape comme chez *S. cerevisiae* et la forme tronquée obtenue est plus longue et est beaucoup plus active que celle obtenue à pH acide (Figure 11). Rim20p est indispensable à la protéolyse de Rim101p à pH alcalin car elle permet aussi le recrutement de la protéase Rim13p. Rim20p et PalA sont des protéines qui possèdent un domaine Bro1 et appartiennent à la famille qui comprend Bro1p chez *S. cerevisiae* et Alix chez les cellules mammifères.

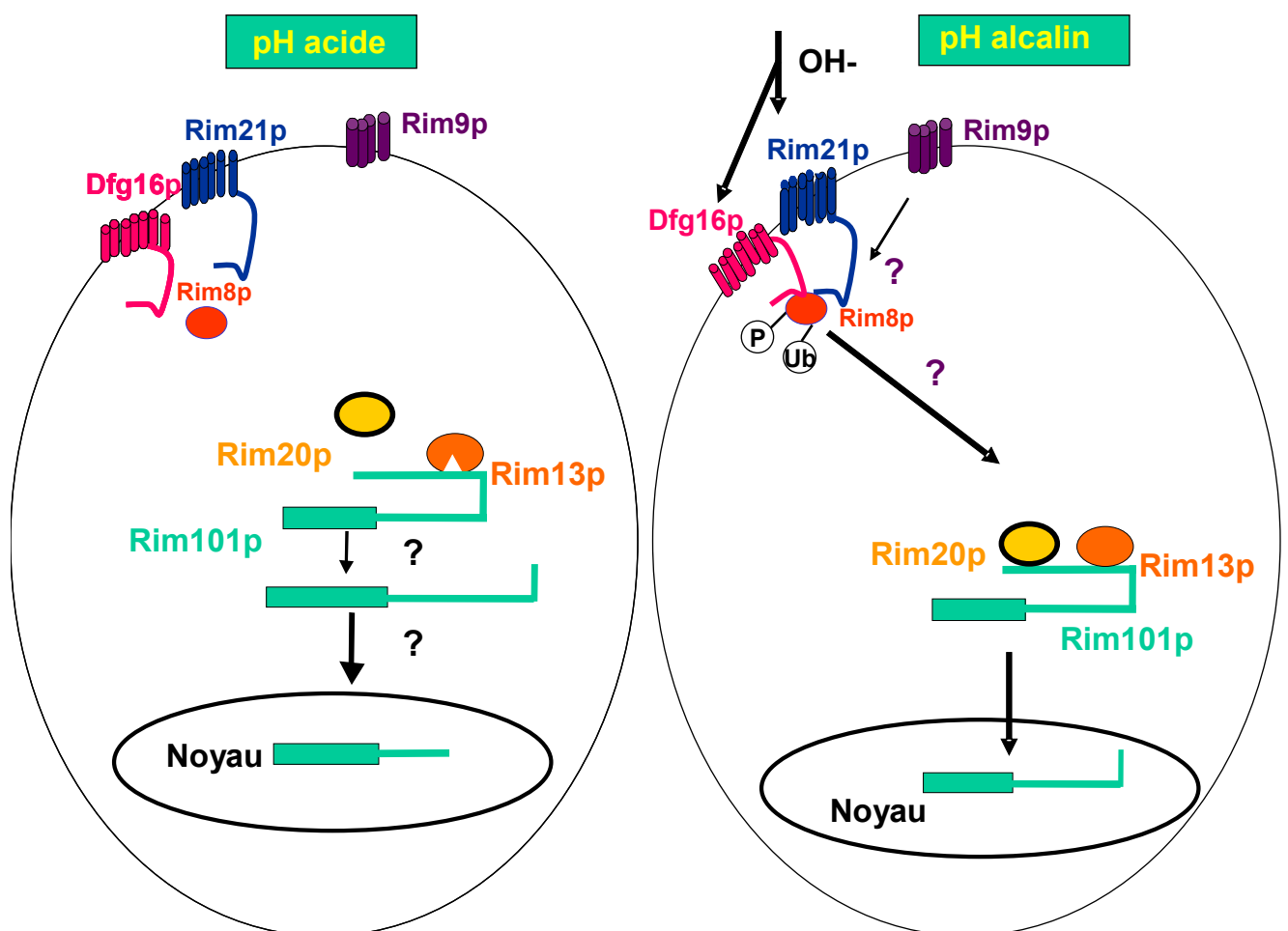


Figure 11 : Schéma de la voie Rim chez *C. albicans*

En dehors des relations directes démontrées entre PalA/Rim20p, PacC/Rim101p et PalB/Rim13p, qui interviennent à la fin du processus d'activation, très peu d'interactions reliant les facteurs situés en amont de PacC/Rim101 ont été mises en évidence. Les mécanismes de transmission du signal pH des protéines pressenties comme récepteurs jusqu'au complexe d'activation de PacC/Rim101p restent méconnus et pourraient, en l'absence d'interactions directes évidentes, faire intervenir d'autres facteurs.

### **b) Effecteurs de la voie Pal/Rim**

Chez *A. nidulans*, *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* et *C. albicans* la voie Pal/Rim n'est active qu'à pH alcalin, où elle induit les gènes alcalins et réprime les gènes acides (Tilburn 1995, Penalva 2002). Même si, chez *C. albicans*, Rim101p est protéolysée à pH acide aucune activité de la voie à pH acide n'a été démontrée (Li 2004).

Chez *S. cerevisiae* la fonction essentielle de Rim101p est de réprimer Nrg1p et Smp1p qui sont eux-mêmes des répresseurs de la réponse alcaline (Penalva 2002, Davis 2003, Lamb 2003). La voie Rim est également impliquée dans la sensibilité aux antifongiques azolés. Les mutants *rim* sont hypersensibles au fluconazole et des interactions génétiques entre *RIM20* et *ERG11* ont été mises en évidence (Parsons 2004) (voir plus haut le mécanisme d'action des azolés).

Chez *C. albicans*, Rim101p agit directement pour activer les gènes alcalins et réprimer les gènes acides. *PHR1* et *PHR2* codent les protéines Phr1p et Phr2p qui sont des protéines paralogues impliquées dans la synthèse des  $\beta$  1,3 glucanes de la paroi (voir plus haut). *PHR1* est directement induit par Rim101p à un pH > 5,5 et est nécessaire à la croissance de la levure et à la filamentation à pH alcalin, alors que *PHR2* est directement réprimé et est nécessaire à la croissance en milieu acide (Porta 1999, Davis 2000a, Baek 2006). Cependant il a été montré que certains gènes acides réprimés par Rim101p à pH alcalin ne comportent aucune séquence consensus reconnue par Rim101p, ce qui pourrait signifier que Rim101p agit également par l'intermédiaire d'un ou plusieurs autres facteurs. Un modèle plus complexe faisant intervenir un autre facteur transcriptionnel a été proposé et permettrait notamment d'expliquer la surexpression de *PHR2* à pH alcalin dans les mutants *rim* (Baek 2006).

L'interruption de la voie Rim abolit la filamentation à pH alcalin mais la surexpression de *PHR1* dans un mutant *rim* ne suffit pas à rétablir un phénotype sauvage, suggérant l'existence d'autres gènes Rim-dépendants impliqués dans la filamentation à pH alcalin. Rim101p contribue également à l'induction des gènes *HWPI* et *RBT1* impliqués dans la formation des hyphes (voir plus haut paragraphe sur la morphogenèse) et réprime *RBRI* qui s'ex-

prime à pH acide et est nécessaire à la filamentation à pH acide (Lotz 2004). *PRAI* est également induit à pH alcalin par Rim101p mais sa fonction est inconnue. L'analyse transcriptionnelle d'un mutant nul *rim101* a montré que certains gènes impliqués dans le transport ionique sont régulés par Rim101p et induits à pH alcalin. Le transport du zinc, du sodium et surtout du fer sont contrôlés par Rim101p à pH alcalin (Bensen 2004). Rim101p est aussi un régulateur de la croissance en présence de lithium et les mutants *rim* sont hypersensibles au LiCl (Davis 2002, Bowers 2004).

En conclusion, la voie Rim est impliquée chez *C. albicans* dans la réponse au pH, la filamentation, la structure de la paroi et dans le transport ionique.

## **2.Rôle dans la virulence chez *C. albicans***

La réponse au pH, permet à *C. albicans* de survivre et de se développer aussi bien dans les muqueuses digestive et vaginale, où le pH est plutôt acide, que dans la cavité buccale et le sang qui sont des milieux neutres voire alcalins. Des mutants de la voie Rim (*rim101* et *rim8*) se sont montrés moins virulents dans un modèle de candidose disséminée chez la souris. Par rapport au contrôle, la mortalité des souris et la charge fongique dans les reins étaient diminuées et les lésions induites sur l'endothélium vasculaire étaient atténuées (Davis 2000b). Dans ce modèle et avec ces mutants, l'expression constitutive de *PHR2* ne suffit pas à conserver la virulence à pH neutre ou alcalin, suggérant que d'autres facteurs en plus de Phr1p/Phr2p sont nécessaires à la virulence. Les délétions du gène *PHR1* conduisent à un défaut de virulence dans un modèle d'infection systémique (Ghannoum 1995). À l'inverse, *PHR2* est indispensable dans des modèles d'infection vaginale ou gastrique (De Bernadis 1998). Même si certains ont proposé un rôle de Rim101/PacC dans la réponse de *Y. lipolytica* à pH acide, un effet similaire de Rim101p chez *C. albicans* reste hypothétique (Tilburn 1995, Gonzalez-lopez 2002). De plus, les mutants *rim* de *C. albicans* n'ont pas été étudiés dans un modèle d'infection en milieu acide.

## C. La voie d'endocytose

La voie d'endocytose a un rôle physiologique majeur dans toutes les cellules eucaryotes car elle assure le transport et l'internalisation de matériel extracellulaire et des protéines membranaires dans des vésicules appelées endosomes. Elle permet le maintien de la composition de la membrane en assurant le recyclage ou la dégradation des protéines membranaires. Elle joue donc un rôle important dans la régulation des récepteurs membranaires. Cette fonction est assurée par les Multi Vesicular Bodies (MVBs) formés à partir de l'endosome (Figure 12). Dans la suite de ce travail et pour plus de clarté, la voie d'endocytose sera incorrectement restreinte à la voie MVB.

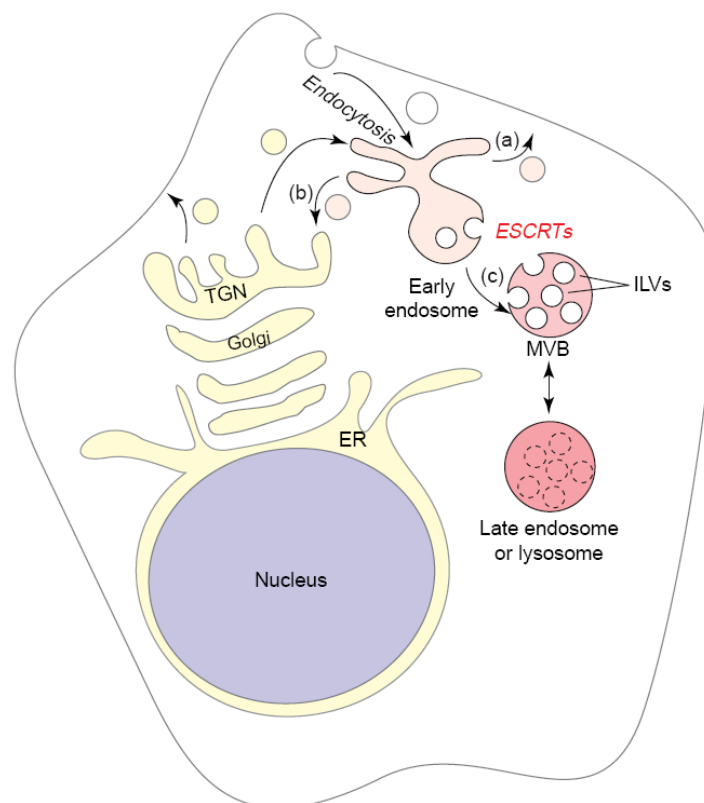


Figure 12 : Schéma de la voie MVB (d'après Slagsvold 2006)

### 1. La voie MVB

Les protéines membranaires destinées à être dégradées ou recyclées sont internalisées dans l'endosome précoce puis triées au niveau des MVBs qui sont des composants de l'endosome tardif (flèche c de la figure 12) (Babst 2005). Les protéines à dégrader sont incluses dans des vésicules formées par l'invagination de la membrane des MVBs. Les MVBs vont ensuite fusionner avec le lysosome, ou la vacuole chez les levures, et y libérer les vésicules.

Lors de cette fusion, certaines protéines sont dirigées vers la membrane du lysosome et contribuent au fonctionnement de celui-ci. Celles qui n'ont pas été intégrées aux vésicules des MVBs sont dirigées vers le *trans*-Golgi (TGN) ou recyclées vers la membrane plasmique (flèches a et b de la figure 12) (Babst 2002).

C'est le processus d'ubiquitination qui est à l'origine du tri en permettant le repérage des protéines à dégrader (Katzmann 2001). L'ubiquitine est un petit polypeptide lié covalamment aux domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires. Les protéines polyubiquitinylées ( $\geq 4$  molécules) sont dégradées par le protéasome, alors que la vacuole se charge des autres via la voie MVB (Hicke 2001). La formation des MVBs, ainsi que le tri des protéines ubiquitinylées, dépendent d'une famille de protéines identifiées chez *S. cerevisiae* : les Vacuolar Protein Sorting (VPS) de classe E. Ces protéines sont hautement conservées chez tous les eucaryotes, y compris chez l'homme (Katzmann 2002). Ainsi Tsg101, l'homologue humain de Vps23p, se lie à la protéine Gag du virus HIV-1 pour permettre le bourgeonnement du virus et l'infection d'autres cellules (Garrus 2001). La délétion des gènes codant pour les facteurs Vps de classe E conduit à une accumulation des protéines dans de volumineuses structures adjacentes à la vacuole, appelées compartiments de classe E (Rieder 1996). La majorité des protéines Vps de classe E est répartie dans les 3 complexes Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT). (Voir Tableau II page suivante)

**Tableau II : Conservation des protéines Vps de classe E, d'après Babst 2005**

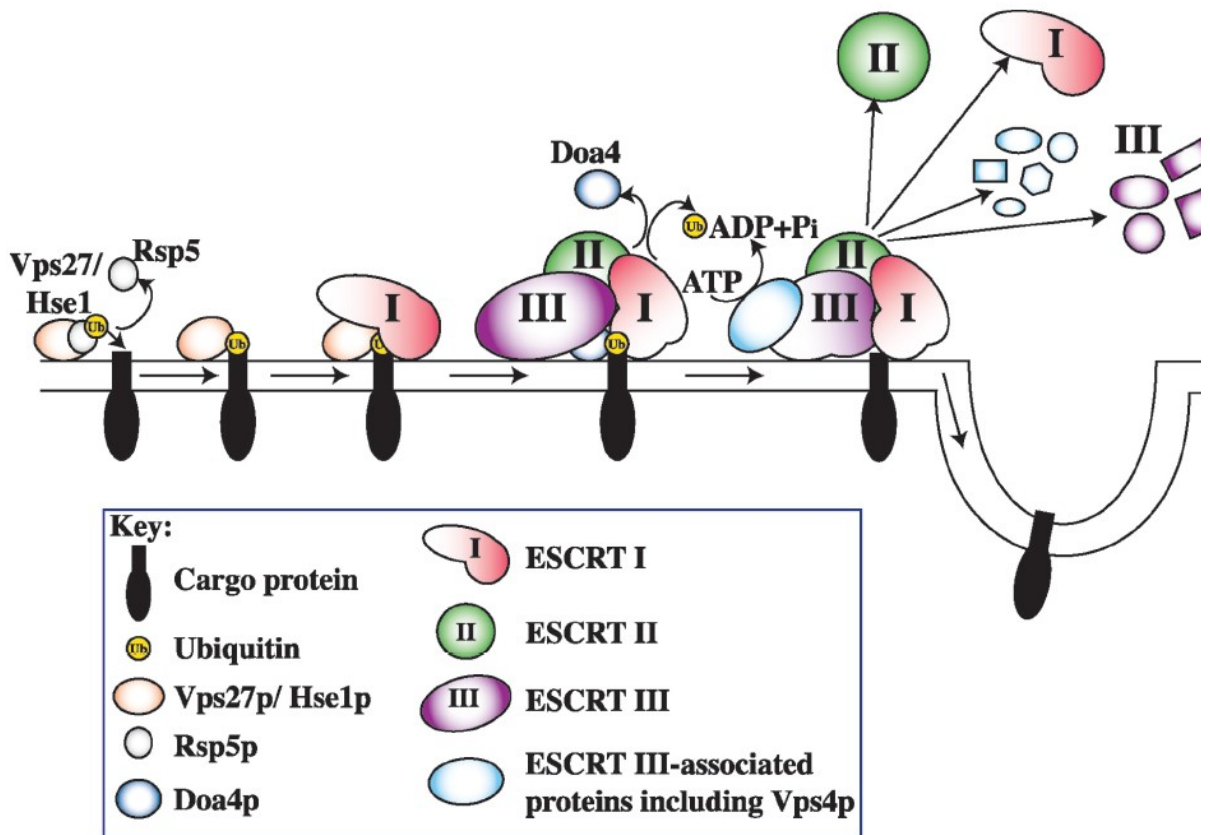
<b>Complexe ESCRT</b>	<b>Protéine chez les levures</b>	<b>Protéine chez les mammifères</b>	<b>Ubiquitination</b>
Vps27p/Hse1p	Vps27p	HRS	Oui
	Hse1p	STAM1,2	Oui
ESCRT I	Vps23p	TSG101	Oui
	Vps28p	VPS28	-
	Vps37p	VPS37A, B, C, D	-
ESCRT II	Vps22p	EAP30	-
	Vps25p	EAP20	-
	Vps36p	EAP45	-
ESCRT III	Vps2p	CHMP2A, B	-
	Vps20p	CHMP6	-
	Vps24p	CHMP3	-
	Vps32p/Snf7	CHMP4A, B, C	-
	Vps4p	VPS4A, B	-
	Bro1p	Alix	-
	Vps60p	CHMP5	-
	Vta1p	SBP1	-
	Fti1p/Did2p	CHMP1A, B	-

Les complexes ESCRT I et ESCRT II sont déjà formés dans le cytoplasme et leur activation les associe à la face cytoplasmique de la membrane de l'endosome précoce ou des MVBs. Les quatre protéines du complexe ESCRT III sont libres dans le cytoplasme et sont associées ensuite.

## **2.Activation de la voie MVB**

La protéine Vps27p, qui se trouve en amont des trois complexes, est à l'origine de l'activation de la voie MVB. Le complexe qu'elle forme avec Hse1p recrute l'ubiquitine ligase, Rsp5p. Le complexe Vps27p/Hse1p reconnaît à la fois le phosphatidylinositol-3P, présent dans la membrane de l'endosome, l'ubiquitine associée aux protéines à dégrader et la protéine Vps23p du complexe ESCRT I. Elle permet ainsi le rattachement du complexe ES-

CRT I et des protéines ubiquitinylées à la membrane de l'endosome (Figure 13) (Bilodeau 2002, Swanson 2003, Bowers 2004, Babst 2005).



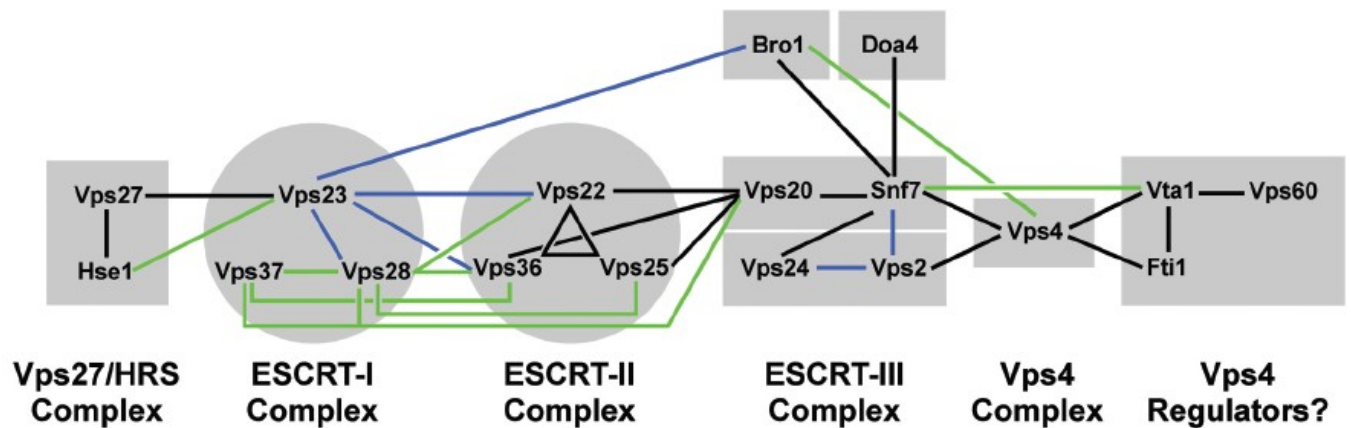
**Figure 13: Modèle de l'activation de la voie MVB chez *S. cerevisiae* (d'après Bowers 2004)**

Ensuite, les mécanismes qui induisent l'activation et le recrutement des complexes ESCRT II et ESCRT III à la membrane de l'endosome par le complexe ESCRT I sont encore mal connus. Le complexe ESCRT I semble relié au complexe ESCRT III à la fois par l'intermédiaire du complexe ESCRT II mais aussi directement par des liaisons entre les deux protéines Vps28p et Vps37p (ESCRT I) avec Vps20p (ESCRT III) (Bowers 2004). Le complexe ESCRT III, qui pourrait être l'élément capital du dispositif, est constitué de deux sous-complexes (Babst 2002). Le premier à s'associer à la membrane de l'endosome comprend Vps32p/Snf7p et Vps20p. Vps20p est nécessaire à la mobilisation de Vps32p (Babst 2002). Le deuxième sous-complexe s'associe au premier et comprend Vps2p et Vps24p. Ces deux sous-complexes sont indispensables à la constitution du complexe ESCRT III et à son association à la membrane de l'endosome.

Vps32p présente trois types d'interactions (Figure 14 page suivante) :

- Vps32p s'associe à Bro1p. Cependant on ne retrouve pas chez les levures la liaison par l'intermédiaire de Bro1p qui existe chez les mammifères entre Vps23p de ESCRT I et Vps32p de ESCRT III. En effet, chez les mammifères, Vps32p (ESCRT III) et TSG101 (homologue de Vps23p de ESCRT I) sont reliés par l'intermédiaire d'Alix (homologue de Bro1p et Rim20p) (Bowers 2004, Babst 2005). Cette liaison ESCRT I-ESCRT III par Alix a fait émettre l'hypothèse que le complexe ESCRT II chez les mammifères n'est pas indispensable au fonctionnement de la voie MVB (Slagsvold 2006, Bowers 2006).
- Une des fonctions de Vps32p, démontrée grâce à des interactions double-hybride (Figure 14 page suivante), est de recruter Doa4p qui permet le recyclage de l'ubiquitine en la séparant des protéines avant leur inclusion dans les vésicules (Bowers 2004). Ce résultat contredit l'hypothèse évoquée par d'autres auteurs selon laquelle Doa4p est recrutée par le sous-complexe Vps2p-Vps24p (Babst 2002). Bro1p semble également impliquée dans le recrutement de Doa4p. La surexpression de Doa4p permet de supprimer la délétion *bro1* suggérant que Doa4p agit en aval de Bro1p (Luthala 2004, Babst 2005). Il semblerait donc que Vps32p interagisse avec Doa4p à la fois directement mais aussi par l'intermédiaire de Bro1p (Bowers 2004, Babst 2005, Luthala 2004).
- Vps32p se lie également à Vps4p qui dissocie les 4 constituants du complexe ESCRT III de la membrane et les libère dans le cytoplasme avec les autres complexes (Figure 13) (Odorizzi 2003). Vps32p interagit avec Doa4p et Vps4p même en l'absence du subcomplexe Vps2p-Vps24p. L'interaction de Vps4p avec le subcomplexe Vps2p-Vps24p est nécessaire à la fonction de dissociation du complexe ESCRT III de Vps4p (Babst 1998, Babst 2002).





**Figure 14 : Interactions double –hybride entre les protéines Vps de classe E de la voie MVB (d’après Babst 2005)**

- Interactions retrouvées uniquement chez les levures.
- Interactions retrouvées uniquement chez les cellules mammifères.
- Interactions retrouvées chez les deux.

Les protéines sont ensuite incluses dans les vésicules formées par l’invagination de la membrane de l’endosome et vont être dégradées dans la vacuole. Les mécanismes par lesquels les complexes ESCRT induisent l’invagination de la membrane de l’endosome pour former les vésicules sont encore inconnus.

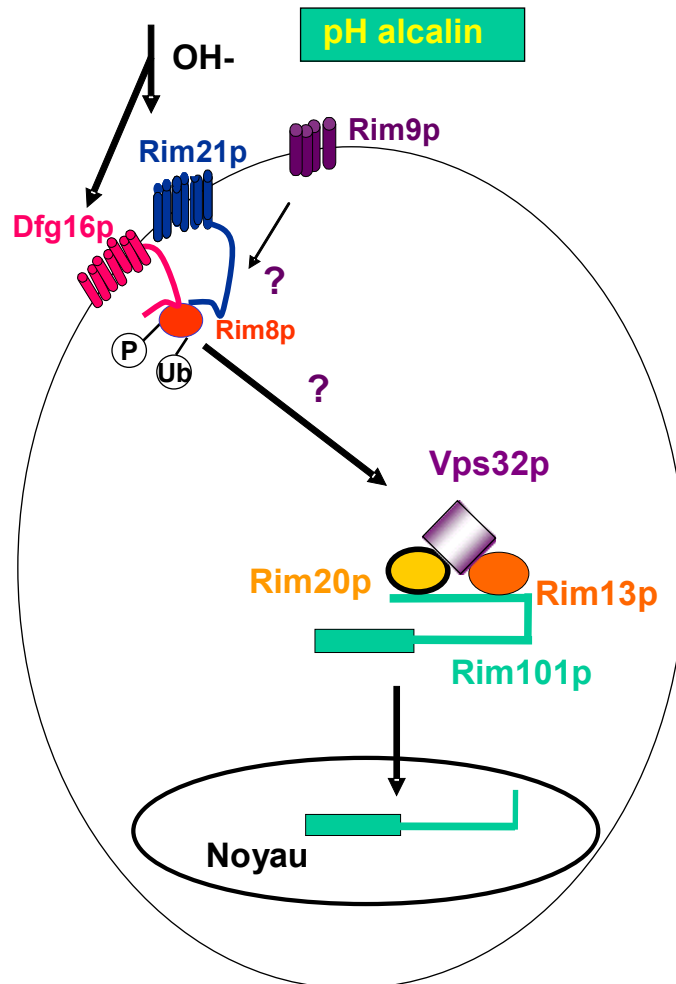
### ***D.Rôle de la voie d’endocytose dans la voie de signalisation du pH***

#### **1.Implication des protéines de la voie MVB dans l’activation de Rim101p**

Récemment, plusieurs études ont montré l’implication de la voie d’endocytose dans l’activation de la voie Rim.

- Le criblage d’une banque de mutants chez la levure modèle *Y. lipolytica* a permis d’impliquer Vps28p du complexe ESCRT I dans la réponse au pH (Gonzalez-Lopez 2002).
- Chez *S. cerevisiae*, le domaine Bro1 de Rim20p situé dans sa région N-terminale lui permet d’interagir (en double-hybride) avec Vps32p, qui elle-même interagit avec la protéase Rim13p (Ito 2001, Xu 2001, Vincent 2003, Xu 2004). Rim20p est également lié par

sa région C terminale à la région C terminale de Rim101p (Xu 2001). Selon un modèle établi chez *S. cerevisiae*, la protéine Vps32p servirait de pièce d'assemblage entre Rim20p, le domaine C terminal de Rim101p et Rim13p, et permettrait ainsi le rapprochement de Rim13p du site de protéolyse sur Rim101p (Figure 15 ) (Ito 2001, Tilburn 2005).



**Figure 15 : Schéma des interactions de Vps32p (ESCRT III de la voie MVB) avec les protéines de la voie Rim**

L'interaction de Rim20p avec Vps32p est indispensable à la liaison entre Rim20p et Rim101p et donc à l'activation de la voie Rim. Cette interaction est inhibée par une mutation dans le domaine Bro1 de Rim20p (Xu 2004). Ces résultats ont été confirmés avec les homologues de Rim20p, Rim101p et Vps32p chez *A. nidulans* et chez l'homme (Vincent 2003, Katoh 2003). Même si Rim20p présente un domaine Bro1p et se lie à Vps32p, toute implication de Rim20p dans la voie MVB a été écartée (Bowers 2004). Curieusement, Rim23p/PalC de *Y. lipolytica* et d'*A. nidulans* possède également un domaine Bro1 et interagit avec Vps32p chez *Y. lipolyti-*

*ca* (Tilburn 2005, Blanchin-Roland résultats non publiés). Cependant, l'implication de PalC dans les interactions avec la voie MVB demeure hypothétique.

- Rim20p et Bro1p sont reliées toutes les deux à la fois à Vps32p et Vps4p (Bowers 2004).
- Vps32p et Vps20p du complexe ESCRT III, ainsi que tous les facteurs Vps des complexes ESCRT I et II, ont été impliqués dans la réponse au pH chez *S. cerevisiae*. Les protéines Vps de classe E non incluses dans les complexes ESCRT comme Vps27p, Doa4p, Vps60p et Bro1p ne jouent aucun rôle dans l'activation de la voie Rim (Xu 2004). Des mutants de la voie MVB se sont montrés également hypersensibles au LiCl et NaCl, phénotype associé aux mutants *rim* (Bowers 2004). Ces résultats ont été en partie confirmés chez *C. albicans* avec des mutants *vps23*, *vps28* (ESCRT I), *vps36* (ESCRT II) et *vps32* (ESCRT III) qui se sont révélés incapables de filamenter à pH alcalin. Ce défaut de filamentation a été supprimé par l'intégration dans les mutants de la forme tronquée constitutivement active du gène *RIM101*, montrant que ces facteurs Vps agissent en amont de Rim101p. Les mutants *vps4* et *bro1* ne présentent pas de phénotype *rim* (Xu 2004, Kullas 2004).

Tous ces travaux ont montré que la grande majorité des protéines Vps de classe E des complexes ESCRT étaient indispensables à la réponse au pH par leur implication dans la voie de signalisation Pal/Rim chez *A. nidulans*, *Y. lipolytica*, *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Les facteurs Vps de classe E de la voie MVB pourraient agir dans la transmission du signal pH et/ou dans l'activation du facteur transcriptionnel PacC/Rim101. Ils pourraient constituer les éléments intermédiaires reliant les protéines Pal/Rim entre elles en l'absence d'interactions directes et ainsi assurer la continuité de la voie de signalisation du pH.

## **2. Modèle de la participation de la voie MVB à la signalisation du pH chez *C. albicans***

Le modèle actuel d'activation de la voie Rim chez les levures repose sur la mise en évidence de modifications dépendantes du pH à deux niveaux. Tout d'abord, Rim8p subit des modifications à pH alcalin. Ensuite, Rim20p se répartit différemment dans la cellule en fonction du pH. Alors qu'il est réparti uniformément dans le cytoplasme à pH acide, il se concentre en foyers ponctiformes à pH alcalin. Cette focalisation de Rim20p à pH alcalin pourrait correspondre à son association aux endosomes (Herranz 2005, Boysen 2006).

Il a été suggéré que le pH extracellulaire pouvait induire la voie Rim par l'activation de Rim8p qui lierait Dfg16p soit directement soit par l'intermédiaire de Rim21p et/ou Rim9p (Barwell 2005, Boysen 2006). Rim8p étant phosphorylée et ubiquitinylée à pH alcalin induirait l'endocytose de Dfg16p. Dans cet état, ce dernier faciliterait l'association de Vps32p et

des autres facteurs des complexes ESCRT, qui à leur tour, recruteraient Rim20p et Rim13p et activeraient la protéolyse de Rim101p. Dfg16p, par des mécanismes encore inconnus, favoriserait les interactions entre Rim20p-Vps32p-Rim13p et Rim101p et les autres facteurs des complexes ESCRT (Herranz 2005, Barwell 2005, Boysen 2006) (Figure 16 page suivante).

Par ailleurs les mutations *vps4*, *vps24* et *vps2*, en empêchant la dissociation des complexes ESCRT entraînent une accumulation de Rim20p et de Vps32p dans les foyers décrits plus haut de manière indépendante du pH et induirait une activation constitutive de la voie Rim (Hayashi 2005). Le fait que les mutations *vps4*, *vps24* et *vps2* accumulent Rim20p et Vps32p dans les mutants *dfg16*, *rim21*, *rim9*, *rim8* confirme que Vps32p et Rim20p agissent en aval de Dfg16p, Rim21p, Rim9p et Rim8p. Par contre, les mutations *vps4*, *vps24* et *vps2* n'ont aucun effet sur des mutants *vps32*, *rim13* et *rim20*, confirmant que chacun de ces trois facteurs est indispensable à la protéolyse de Rim101p (Boysen 2006, Hayashi 2005).

Le lien entre endocytose et signalisation du pH se situe probablement au niveau de la transmission du signal pH par la voie d'endocytose :

- Par l'internalisation via l'endosome d'un senseur pH modifié (Dfg16p et Rim8p), qui active ensuite la voie Rim par le recrutement de Rim20p et Rim13p (Boysen 2006) et/ou
- Par la modification du gradient de pH entre l'endosome et le cytoplasme nécessaire au fonctionnement de la voie MVB. L'alcalinisation de l'endosome inhibe la voie MVB (Klionsky 1992). Si cette inhibition intervient après le recrutement du complexe ESCRT III et empêche la dissociation de la même façon que les mutations *vps4*, *vps24* et *vps2*, on a une activation de la voie Rim (Hayashi 2005).

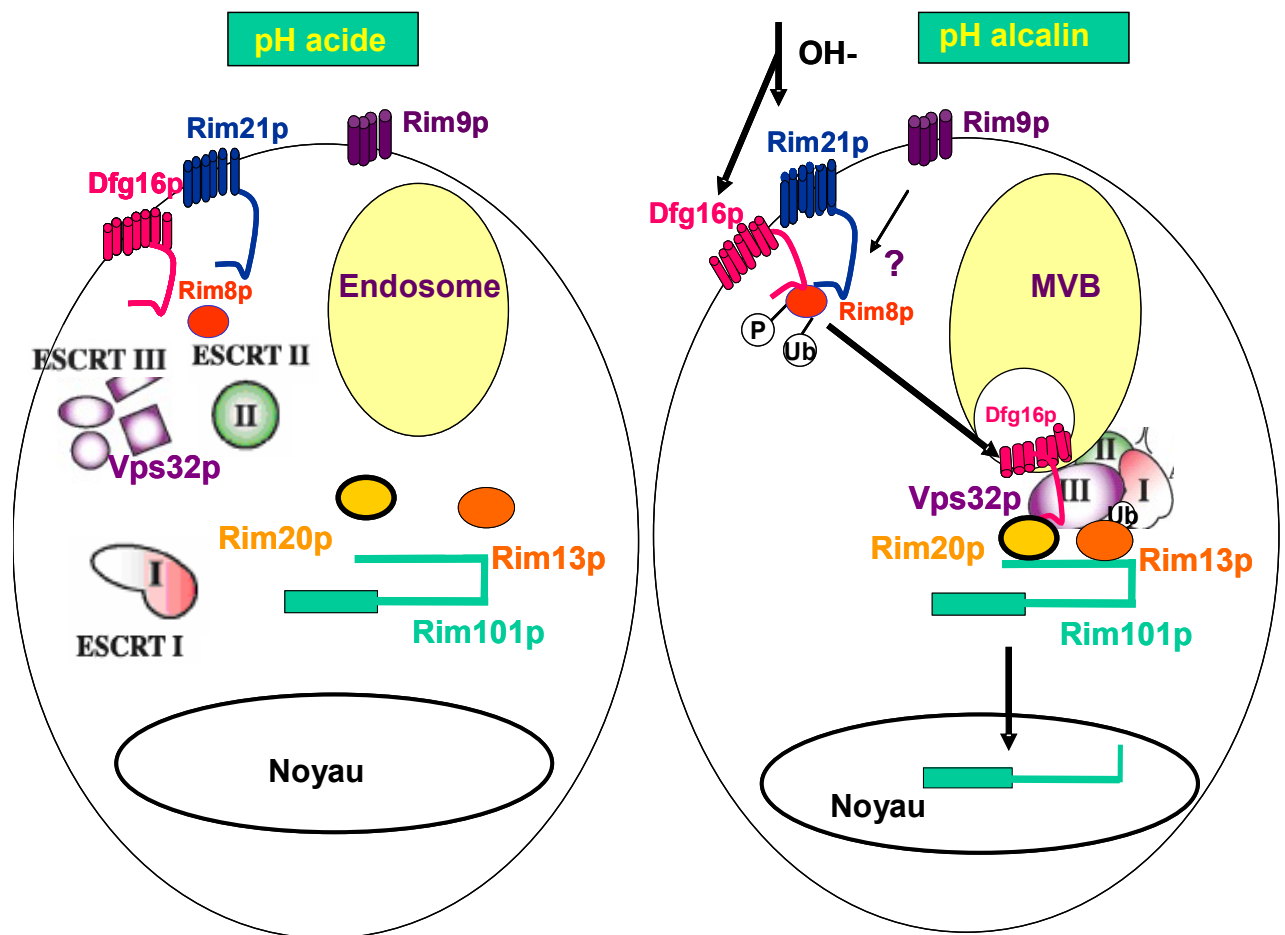


Figure 16 : Modèle d'implication de la voie d'endocytose ou voie MVB dans la voie Rim chez *C. albicans*

### ***E. Implication de la voie d'endocytose dans la constitution de la paroi et la sensibilité aux antifongiques***

En plus de leur implication dans la voie de dégradation des protéines membranaires et dans l'activation de la voie de signalisation du pH, les protéines Vps de classe E jouent un rôle dans la constitution de la paroi des levures et le maintien de l'intégrité cellulaire.

Chez *S. cerevisiae*, les mutations affectant la synthèse des protéines Vps ont entraîné des variations dans la sensibilité au CFW, définissant ainsi un nouveau phénotype pour ces mutants. La plupart des mutants *vps* agissant précocement dans la voie MVB (à l'exception de *vps37* du complexe ESCRT I) sont résistants au CFW : *vps23* et *vps28* du complexe ESCRT I, *vps22*, *vps25* et *vps36* du complexe ESCRT II, *vps20* et *vps32* du complexe ESCRT

III. Les autres, agissant plus tardivement dans la voie sont hypersensibles : *vps24* du complexe ESCRT III, *vta1*, *vps60*, *vps44*, *vps4*, *bro1*, *vps46* (Shifflet 2004). Le CFW est un colorant fluorescent qui déstabilise la paroi en se liant à la chitine et en empêchant sa polymérisation. L'hypersensibilité au CFW est associée à une augmentation des besoins de la cellule en chitine afin de compenser un défaut de paroi (Lussier 1997).

La protéine Bro1p associée au complexe ESCRT III par Vps32p et impliquée dans le recrutement de Doa4p a été décrite initialement chez *S. cerevisiae* dans l'activation d'une des voies MAP-kinase (voie Pkc1-MAP) qui contrôle l'intégrité cellulaire. Le mutant *bro1* présente le même phénotype qu'un mutant *bck1* de cette voie. De plus, des interactions génétiques entre des mutants *vps24*, *vps28* et *vps36* et le mutant *bck1* ont été mises en évidence (Nickas 1996, Odorizzi 2003). Les mutants *vps22*, *vps25*, et *vps32* sont hypersensibles à la caspofungine (Markovitch 2004, Osherov 2003). Chez *C. albicans*, même si la voie Pkc1 semble également impliquée dans le maintien de l'intégrité cellulaire et dans la virulence, le rôle de Bro1p en amont de cette voie et les interactions génétiques avec les mutants *vps* n'ont pas été confirmés (Monge 2006).

### III. Projet de thèse et résultats :

Ce projet, débuté en mai 2003, reposait sur les travaux réalisés dans le laboratoire sur la réponse au pH chez *Yarrowia lipolytica*. Le criblage d'une banque de mutants de *Y. lipolytica* avait permis d'impliquer Vps28p et Vps23p, protéines Vps de classe E du complexe ESCRT I, dans la réponse au pH (Gonzales-Lopez 2002, Blanchin-Roland 2005). L'objectif principal était de montrer la conservation, chez *C. albicans*, des interactions entre la voie d'endocytose, explorée à travers les protéines Vps, et la voie Rim et d'en mesurer l'impact sur la virulence. Le projet comportait donc :

**1. La construction des mutants nuls chez *C. albicans* de 2 gènes de la voie d'endocytose, *VPS28* et *VPS32* :**

Le choix de *VPS28* et *VPS32* découlait directement des résultats obtenus chez *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae*.

**2. L'étude des phénotypes des mutants *vps28* et *vps32* vis-à-vis de la réponse au pH :**

Les mutants *vps28* et *vps32* présentent le même phénotype que le mutant *rim101* pour la réponse aux variations de pH. Ils ont une sensibilité augmentée à pH alcalin et ce phénotype est même aggravé par rapport au mutant *rim101*. L'expression des gènes impliqués dans la réponse au pH a été évaluée par PCR en temps réel après transcription inverse (Reverse Transcription-PCR) et a montré le même profil qu'avec les mutants de la voie Rim. La filamentation à pH alcalin est inhibée par les délétions *vps*. La filamentation est également altérée sur tous les milieux inducteurs (sérum, milieu de Lee) indépendamment du pH.

**3. La suppression des mutants *vps28* et *vps32* par un gène *RIM101* muté codant pour une protéine constitutivement active :**

La restauration de la réponse au pH par l'intégration d'un gène codant pour une protéine Rim101 tronquée et constitutivement active confirme les interactions entre les 2 voies et prouve que celles-ci se situent en amont de l'activation du facteur transcriptionnel Rim101p.

**4. L'étude de la virulence des mutants *vps28* et *vps32* dans un modèle animal de candidose disséminée :**

La survie des souris infectées par les souches *vps* délétées est significativement augmentée par rapport à la survie des souris infectées par une souche sauvage. Elle est aussi supérieure à la survie des souris infectées par une souche délétée du gène *RIM101*. Ces résultats suggèrent

que la voie d'endocytose est impliquée dans la virulence de *C. albicans* et que son rôle dans la virulence n'est pas uniquement lié à la voie Rim.

Ces résultats ainsi que les méthodes ayant permis de les obtenir sont décrits dans le premier article publié suivant :

**A.Article 1 :**

“Deletions of the endocytic components *VPS28* and *VPS32* affect growth at alkaline pH and virulence both through *RIM101*-dependent and *RIM101*-independent pathways in *Candida albicans*” *Infection and Immunity*. 2005; 73: 7977-7987.



## Deletions of Endocytic Components *VPS28* and *VPS32* Affect Growth at Alkaline pH and Virulence through both *RIM101*-Dependent and *RIM101*-Independent Pathways in *Candida albicans*

Muriel Cornet,<sup>1,2†</sup> Frédérique Bidard,<sup>1†</sup> Patrick Schwarz,<sup>3</sup> Grégory Da Costa,<sup>1</sup>  
Sylvie Blanchin-Roland,<sup>1</sup> Françoise Dromer,<sup>3</sup> and Claude Gaillardin<sup>1\*</sup>

Microbiologie et Génétique Moléculaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon and Institut National de la Recherche Agronomique UMR1238, Centre National de la Recherche Scientifique UMR2585, 78850 Thiverval-Grignon, France<sup>1</sup>; Microbiologie, Hôtel-Dieu, 1 place du parvis Notre-Dame, 75181 Paris Cedex 04, France<sup>2</sup>; and Unité de Mycologie Moléculaire, CNRS FRE2849, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France<sup>3</sup>

Received 26 April 2005/Returned for modification 31 May 2005/Accepted 7 September 2005

Ambient pH signaling involves a cascade of conserved Rim or Pal products in ascomycetous yeasts or filamentous fungi, respectively. Recent evidences in the fungi *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, and *Candida albicans* suggested that components of endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) involved in endocytic trafficking were needed for signal transduction along the Rim pathway. In this study, we confirm these findings with *C. albicans* and show that Vps28p (ESCRT-I) and Vps32p/Snf7p (ESCRT-III) are required for the transcriptional regulation of known targets of the Rim pathway, such as the *PHR1* and *PHR2* genes encoding cell surface proteins, which are expressed at alkaline and acidic pH, respectively. We additionally show that deletion of these two *VPS* genes, particularly *VPS32*, has a more drastic effect than a *RIM101* deletion on growth at alkaline pH and that this effect is only partially suppressed by expression of a constitutively active form of Rim101p. Finally, in an in vivo mouse model, both *vps* null mutants were significantly less virulent than a *rim101* mutant, suggesting that *VPS28* and *VPS32* gene products affect virulence both through Rim-dependent and Rim-independent pathways.

*Candida albicans* is an opportunistic fungal pathogen that causes infections ranging from mucocutaneous illnesses to invasive processes that may involve any organ. The development of new therapies such as intensive chemotherapy for cancer or immunosuppressive regimens for transplantations, the increasing use of indwelling catheters and prosthetic devices, and progress in the treatment of bacterial infections have led to an increase in susceptible patients and cases of invasive *Candida* infections (12). The ability of *C. albicans* to colonize a wide range of tissues requires its adaptation to various environmental conditions, involving detection by the fungus of a variety of ambient signals. Extracellular pH is one of the environmental factors that modifies the physiology and morphology of the cell, and mutations in genes responding to external pH have been shown to result in less-virulent strains. For example, the cell wall protein Phr1p is expressed at a pH of  $\geq 5.5$  and is required for systemic candidiasis (blood pH is near neutrality), whereas its paralogue Phr2p is expressed only at acidic pH (pH  $\leq 5$ ) and is required for vaginal candidiasis (vaginal pH is around 4.5) (11, 19, 34).

A conserved fungal ambient pH signal transduction pathway was initially described for *Aspergillus* and was later extended to several ascomycetes, including *C. albicans* (9, 10, 13, 16, 30, 31). At alkaline pH, a cascade of six *Pal* genes in *Aspergillus nidulans* or five *RIM* genes in *Saccharomyces cerevisiae* acti-

vates the zinc finger transcriptional factor PacC/Rim101p through a C-terminal proteolytic processing event. This PacC/Rim101p short active form is able to activate alkaline pH-responsive genes and to repress acidic genes (15, 29, 35). Defects in this pathway lead to reduced virulence in *C. albicans*, *A. nidulans*, and other pathogenic fungi (5, 7–9, 17).

Recent observations made by several groups pointed out a possible contribution of vacuolar protein sorting (*VPS*) genes, encoding class E factors of the endocytic pathway, to the Rim-dependent pathway of pH signaling. In *S. cerevisiae*, genome-wide two-hybrid screens revealed that Rim13p and Rim20p interacted with Snf7p/Vps32p (named Vps32p in this paper) and that Rim20p interacted with Vps4p (6, 21). Vps32p forms part of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III (2), which acts downstream of ESCRT-I and ESCRT-II complexes in the multivesicular body (MVB) pathway, whereas the Vps4p AAA ATPase acts at the end of the endocytic cycle to dissociate ESCRT complexes from the endosomal membrane (3). In addition, both Vps32p and Vps4p were shown to interact with Bro1p/Vps31p (18), another soluble class E factor associated with endosomes and required for carboxypeptidase S sorting by the MVB pathway (28). The MVB pathway is conserved from yeast to higher eukaryotes and is required for a growing list of cellular functions that includes cell surface receptors and transporters degradation, regulation of the immune response, and even budding of certain viruses like human immunodeficiency virus (for reviews, see references 1 and 23).

Direct evidence for MVB class E factor involvement in ambient pH signaling was recently obtained for *Yarrowia lipolytica* (20; S. Blanchin-Roland et al., unpublished data), *S. cerevisiae*,

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, CBAI, 78850 Thiverval-Grignon, France. Phone: 33 1 30 81 54 52. Fax: 33 1 30 81 54 57. E-mail: claudc@grignon.inra.fr.

† Both authors contributed equally to this work.

TABLE 1. Strains used in this study

<i>Candida albicans</i> strain	Genotype				Reference or source
BWP17	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>		38
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>		
DAY5	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>rim101::ARG4</i>	38
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>rim101::URA3</i>	
DAY25	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>pHIS1::his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>rim101::ARG4</i>	9
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>rim101::URA3</i>	
DAY185	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>pHIS1::his1::hisG</i>	<i>pARG4::URA3::arg4::hisG</i>		9
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>		
MC1	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps28Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>VPS28</i>	
MC2	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps28Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps28Δ::URA3</i>	
MC3	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps32Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>VPS32</i>	
MC4	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps32Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps32Δ::URA3</i>	
MC2H	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>pHIS1::his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps28Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps28Δ::URA3</i>	
MC4H	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>pHIS1::his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps32Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps32Δ::URA3</i>	
MC5	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>pVPS28::HIS1::his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps28Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps28Δ::URA3</i>	
MC6	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>pVPS32::HIS1::his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps32Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>his1::hisG</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps32Δ::URA3</i>	
MC13	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>pRIM101SL::HIS1'rim101</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>rim101::ARG4</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>RIM101</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>rim101::URA3</i>	
MC14	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>pRIM101SL::HIS1'rim101</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps28Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>RIM101</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps28Δ::URA3</i>	
MC15	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>pRIM101SL::HIS1'rim101</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps32Δ::UAU1</i>	This study
	<i>ura3Δ::λimm434</i>	<i>RIM101</i>	<i>arg4::hisG</i>	<i>vps32Δ::URA3</i>	

and *C. albicans* (24, 39). Current models suggest that ESCRT complexes, mainly through their Vps32p moiety, function at neutral and/or alkaline pH as an assembly platform for the recruitment of Rim components leading to Rim101p activation (24, 29, 39). In this paper, we confirm the above conclusions and show that *VPS* genes may play additional roles in the control of the alkaline response and that *vps* deletions result in more pronounced defects in pathogenesis than would be expected with a simple interruption of the Rim pathway.

#### MATERIALS AND METHODS

**Strains and sequence data.** The bacterial strain used for transformation and amplification of recombinant DNA was *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . *C. albicans* strains are described in Table 1. All *C. albicans* sequence data were obtained from <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>.

**Culture media and phenotypic tests.** For gene expression experiments, synthetic complete medium (SC) was used, consisting of a 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, and 0.77-g/liter complete amino acid supplement mixture without arginine and histidine, supplemented when required with uridine (Uri; 80  $\mu$ g/ml), arginine (20  $\mu$ g/ml), and histidine (20  $\mu$ g/ml). Growth experiments at various pHs were carried out in SC (pH 5.3) and in SC buffered with 50 mM glycine-NaOH at either pH 9.0 or pH 10.0 and with 0.2 M citrate phosphate at

pH 3.0. Droplets of serial dilutions of an exponential-phase culture in yeast extract-peptone-glucose (YPD) medium were spotted on SC, SC (pH 3.0), SC (pH 9.0), or SC (pH 10.0) and incubated at 30°C. For the filamentation assays, we used M199 medium (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) buffered at pH 4.0 or pH 7.5 with 150 mM HEPES as previously described (10). Data were averaged from three independent experiments. As the reference strain cells produce hyphae extensively at 37°C and pH 7.5, growth rates under these conditions in both SC and M199 media were determined by dry weight measurements as follows. Cells were grown overnight in SC medium, diluted in 100 ml SC or M199 (pH 7.5) to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of about 0.1, and grown at 37°C. Every 2 h, 5 ml of the culture was filtered through glass microfiber filters (Whatman, Maidstone, United Kingdom) that were predried at 80°C overnight and preweighed. Then the filters were dried at 80°C overnight, and dry weights were calculated.

**DNA and RNA techniques.** Standard recombinant DNA techniques were performed as previously described (32). All transformation events were checked by colony PCR using puRE *Taq* Ready-To-Go PCR Beads (Amersham, Piscataway, NJ) and confirmed by Southern blot analysis. Sequences were obtained from the DNA sequencing department of Eurogentec (Ivoz-Ramet, Belgium). They were assembled and annotated with the Genetics Computer Group package (Madison, WI).

Gene expression was determined by quantitative real-time PCR using a light cycler (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). Cells were grown in SC buffered at pH 4.0 or pH 7.5 with 150 mM HEPES at 30°C and harvested in the exponential phase (OD<sub>600</sub>, ~0.6). Cells were pelleted, frozen in liquid nitrogen,

TABLE 2. List of primers used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')
OFB3.....	.....GTTTATCCTTAGTCATAGAACAACTCAACTTTGATTTATTGCCATTATGACGCTCTCGCCCTGTGGAATTGTGAGCG
OFB4.....	.....CGAATCCATCGTATAAGCAAGAAACAGAGTATCCAACCAAACAGATAAATTGTTATTGTGTTTTCCAGTCCAGT
OFB5.....	.....CTTTAGTTGACTGAATAAACTTGAATAGTAAACATGTGGGGATATTTTTTTGGAGGAAATGTGGAATTGTGAGCG
OFB6.....	.....TTCTATACAAAGCTTTCGTTATTCCTCGTATTCGGTATTTCAAACACATCATAATCCCATTTGTTTCCAGTCCAGCA
OFB8.....	.....AATTCACACATCGTAAAATCGAAC
OFB9.....	.....ACCAATGTTGATAACCAATCGGT
OFB10.....	.....CATCATCCCGAAATACATCCA
OFB11.....	.....TACGTTATTTGAATGTGTGTATCA
OFB16.....	.....TGTGACGACCATGTTGGTAGAAAGT
OFB17.....	.....CTTGAGGTCTCTGAACGATTTGGG
OFB22.....	.....GCAGTGCTTCAATCAATAGCAAGGC
OFB23.....	.....AGAGCTTGAGCTGGACCCAGA
OFB32.....	.....AGTGTGACATGGATGTTAGAAAAGAATTATACGG
OFB33.....	.....ACAGAGTATTTCTTTCTGGTGGAGCA
OFB40.....	.....ACACTGACGCTTCTGCTTTCG
OFB41.....	.....GCAGCTTCGTCTTCATACCACA
OFB48.....	.....ACTCTAGCCCGGTACCAAG
OFB50.....	.....ACATAGGCTCTCCGTATAGAC
OFB57.....	.....CCACAAGAAATGTCCGATGC
OFB58.....	.....TCCATGTTCCACTGCCTCAG
OFB59.....	.....GCCACTATGGTGAGCGAACA
OFB60.....	.....GACACTTCTGTTGCAAGGTG
OMC15.....	.....GCTACTAGGGTCACTGCAAAATCG
OMC16.....	.....CTAGAAGCGCTAGATGAACTGAC
OMC7.....	.....GGTGGTGTTCGCTATTAAC
OMC8.....	.....CCAGTTGCAATGCTTGACCG
OMC9.....	.....CTCTCGTCTATCTGTCAGTGG
OMC10.....	.....GTGTAGTATCCGTTGGTTCGCTCT
OMC11.....	.....GCGTTTGGCTCTTGCTTTTC
OMC12.....	.....CCAAC TTGGCCATAAGGCCTC

and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA isolation. Total RNA was extracted with the RNeasy Mini-kit (QIAGEN, Courtabouff, France) and then treated with DNase I (QIAGEN). The Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) was used for a reverse transcriptase assay from 1  $\mu\text{g}$  of total RNA. The real-time PCR assay was performed using the following primer pairs: OFB16-OFB17 for *RIM101*, OFB22-OFB23 for *PHR1*, OFB32-OFB33 for *ACT1*, and OFB40-OFB41 for *PHR2* (primer sequences are shown in Table 2). PCR parameters were  $95^{\circ}\text{C}$  for 8 min, followed by 45 cycles, each consisting of  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 s,  $55^{\circ}\text{C}$  for 7 s, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 s. A negative control with sterile water was performed for each primer set. The threshold cycle was determined as the cycle above which the fluorescence signal, produced by the SYBRgreen I dye, reached a baseline level. The expression levels of the genes were determined relative to the expression of the *ACT1* gene. For each gene, experiments were carried out four times, using two cDNA samples from two independent cultures.

**Construction of strains.** Complete deletions of *VPS28* (*vps28<sup>-/-</sup>*; strain MC2) and *VPS32* (*vps32<sup>-/-</sup>*; strain MC4) were constructed by the UAU1 method (14) with the BWP17 strain (38). The UAU1 cassette was amplified from plasmid pBME101 (14) with primers OFB3-OFB4 for the *VPS28* gene and OFB5-OFB6 for the *VPS32* gene, using the Expand High Fidelity PCR System kit (Roche Molecular Biochemicals). These primers allow amplification of the UAU1 cassette with 60- and 61-nucleotide (nt)-long flanking sequence homologues to *VPS28* and *VPS32*, respectively. Transformants of the BWP17 strain obtained with the UAU1 cassette were screened by colony PCR: wild-type *VPS28* and *VPS32* alleles were detected using primers OFB8-OFB9 and OFB10-OFB11, respectively; mutant *vps28::UAU1* and *vps32::UAU1* alleles were detected using primer OFB8 or OFB10, respectively, with Arg4det (14). Among the nearly 100 transformants obtained for each gene, 5 of 16 (31%) and 3 of 74 (4%) tested by PCR were heterozygous clones *VPS28<sup>+/-</sup>* (MC1) and *VPS32<sup>+/-</sup>* (MC3), respectively. Five *vps28<sup>-/-</sup>* (MC2) and two *vps32<sup>-/-</sup>* (MC4) homozygotes were obtained from independent heterozygotes by mitotic recombination after growth on YPD medium at  $30^{\circ}\text{C}$  for 48 h and selected by replication onto SC medium without arginine and without Uri. Arg<sup>+</sup> Uri<sup>+</sup> colonies were screened by colony PCR, and integration was confirmed by Southern blot analysis.

To differentiate haplotypes in the *VPS28* and *VPS32* regions, we used the SC5314 genome assembly (<http://www.candidagenome.org/>). We aligned contig 9-10045 and contig 19-20045 on chromosome 2 for *CaVPS28*, and contigs 19-10237 and 19-20237 on chromosome 1 for *CaVPS32*. Both alleles of *CaVPS28*

and *CaVPS32* lie in 100% identical regions, flanked by regions where numerous insertions and deletions differentiate both haplotypes. Two oligonucleotides (Table 2) hybridizing in conserved regions were designed to amplify the right border of the *CaVPS28* haplotypes: OMC15 (nt 26453-26475 in contigs 19-10045 and 19-20045) and OMC16 (nt 29069 to 29047 in contig 19-10045 and nt 28363 to 28385 in contig 19-20045). Amplicons of 2,616 and 1,932 bp were predicted for each haplotype. Similarly, two primers, OMC7 (nt 53278 to 53299 in contig 19-10045 and nt 52589 to 52610 in contig 19-20045) and OMC8 (nt 53678 to 53658 in contig 19-10045 and nt 53106 to 53086 in contig 19-20045), were used to amplify the *CaVPS28* left border. Amplicon sizes of 400 and 520 bp were expected. In the case of *CaVPS32*, primers OMC9 (nt 57459 to 57480 in contig 19-10237 and nt 57512 to 57533 in contig 19-20237) and OMC10 (nt 58440 to 58419 in contig 19-10237 and nt 58435 to 58414 in contig 19-20237) were used for the left border; amplicons of 980 and 922 bp were expected. Primers OMC11 (nt 153337 to 153356 in contig 19-10237 and nt 153348 to 153367 in contig 19-20237) and OMC12 (nt 157452 to 157431 in contig 19-10237 and nt 153477 to 153456 in contig 19-20237) were used for the right border. Amplicons of 4,116 and 130 bp were expected.

Finally, pINA1337 (F. Bidard, unpublished data), a derivative of pFLAG-MET3 (36) and carrying the *HIS1* cassette and the *MET3* promoter, was linearized by *SwaI* and targeted into MC2 and MC4 at the *HIS1* locus to yield prototrophic strains MC2H and MC4H, respectively.

For complementation, the wild-type *VPS28* and *VPS32* genes were amplified from BWP17 genomic DNA with primers OFB57-OFB58 and OFB59-OFB60, respectively. For the *VPS28* gene, the resulting PCR product was inserted into pDDB78 carrying the *HIS1* cassette and digested with *SmaI* to construct pDO14 (26). The *VPS32* gene was first inserted into pGEM-T-Easy (Promega, Charbonnières, France) and then into pDDB78 digested with *NotI* to give pDO15. The absence of mutation in each open reading frame was checked by DNA sequencing. *NruI*-digested pDO14 and pDO15 were targeted to the *HIS1* locus of MC2 and MC4, respectively, to construct the *vps28<sup>-/-</sup>+VPS28* (MC5) and *vps32<sup>-/-</sup>+VPS32* (MC6) strains. Correct integration was confirmed by Southern blot analysis for both complemented strains.

A C-terminal truncated form of *RIM101*, encoding a 415-residue protein, constitutively active, called Rim101SLp, was created by a G-to-T substitution at position 1246, thus creating an in frame amber codon (D. Onesime, unpublished data); all coordinates start at the ATG of the full-length open reading frame as

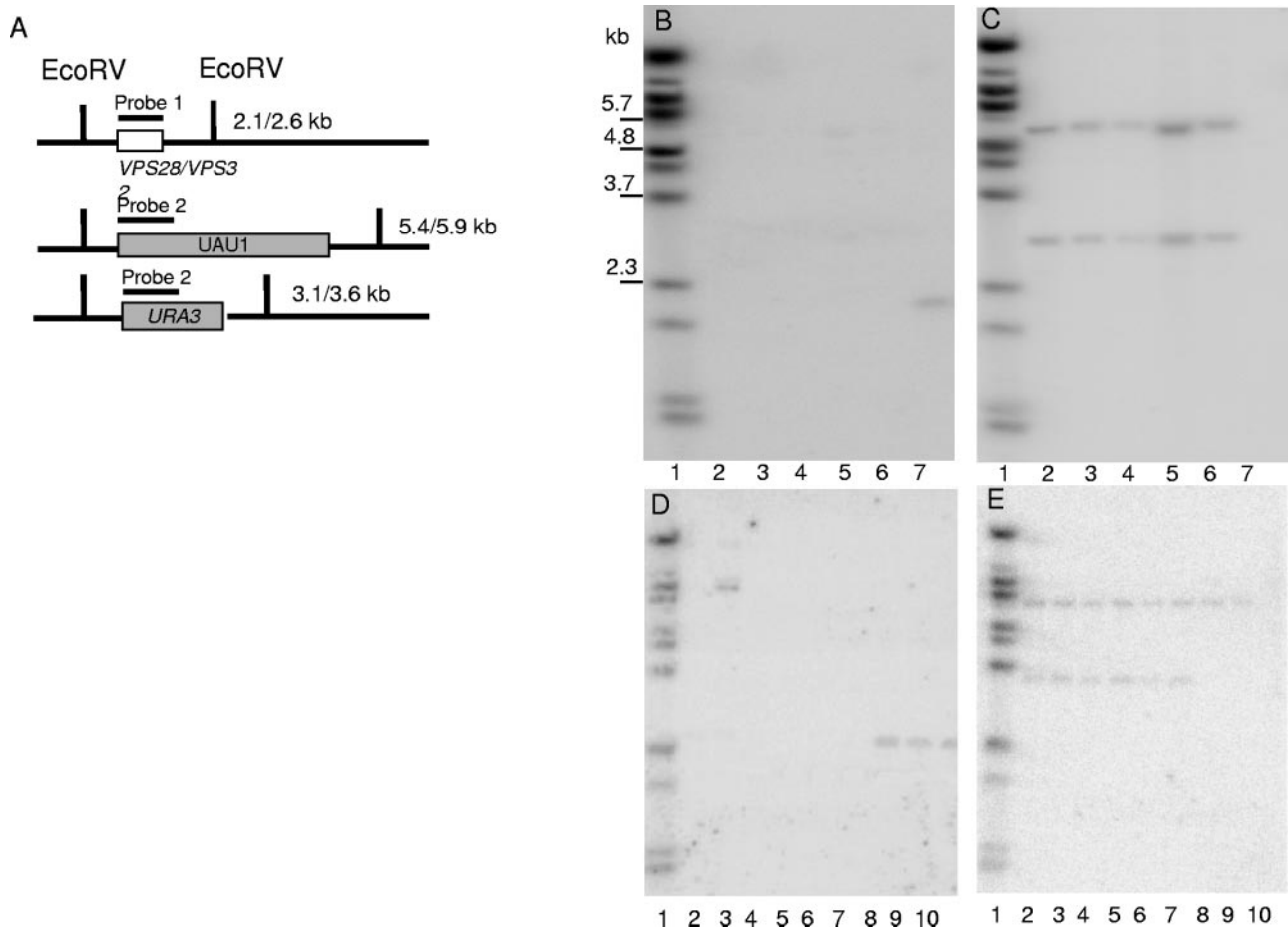


FIG. 1. Confirmation of the *vps* deletions by Southern analysis. (A) Schematic restriction map of the *VPS28* and *VPS32* wild-type and deleted alleles. Vertical bars denote *EcoRV* restriction sites, and numbers on their right indicate predicted sizes obtained with the *VPS28* or the *VPS32* probe (probe1) for the wild-type alleles and the *URA3* probe (probe 2 is a 0.8-kb *URA3* fragment obtained by *XhoI* and *PvuII* digestion of pBME101 (14) for the deleted alleles. (B and C) Southern blot analysis of *EcoRV*-digested genomic DNA from the five *vps28*<sup>-/-</sup> deleted strains (lanes 2 to 6) and the BWP17 parent strain (lane 7), using the *VPS28* probe (B) or the *URA3* probe (C). (D and E) Southern blot analysis of *EcoRV*-digested genomic DNA from six *vps32*<sup>-/-</sup> deleted strains (lanes 2 to 7), two heterozygote-deleted strains (lanes 8 and 9), and the BWP17 parent strain (lane 10), using the *VPS32* probe (D) or the *URA3* probe (E). Lanes 2 to 5 are double deletants obtained from the lane 8 heterozygote, whereas lanes 6 and 7 show double deletants obtained from the other heterozygote (lane 9). Lane 1 is a lambda DNA-BstEII digest marker for all panels.

defined previously (13). The truncation site was determined by hydrophobic cluster analysis as for the *YRIM101-1119* allele (25). Plasmid pINA1353 was generated from plasmid pINA1341 (Bidard, unpublished), carrying *RIM101SL* under the control of the *MET3* promoter, by digestion with *StuI* and *HpaI* to remove the *MET3* promoter. PpuMI-digested pINA1353 was targeted to the *RIM101* locus of strains DAY5, MC2, and MC4, generating a tandem structure of *RIM101* genes which restored the wild-type 5' upstream sequence in front of *RIM101SL* and deleted the promoter of the resident *RIM101* copy. This resulted in strains MC13, MC14, and MC15, respectively. Integration was confirmed by colony PCR using primers OFB48-OFB50 and Southern blot analysis.

**Staining with FM4-64.** To analyze yeast vacuolar morphology and dynamics, FM4-64 localization experiments were performed with a protocol derived from Vida and Emr (37). Yeast cells were grown in YPD to an OD<sub>600</sub> of 0.5 to 0.7. Three OD units of cells were harvested, incubated in 150  $\mu$ l of YPD containing 40  $\mu$ M FM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR) for 30 min at 0°C, washed three times in phosphate-buffered saline at 0°C, and further incubated in 200  $\mu$ l of YPD for 20 min at 18°C. Cells were centrifuged, resuspended in water, and visualized by differential interference contrast (DIC) optics and by fluorescence microscopy using an Olympus U-RFL-T microscope equipped with a CoolSNAP camera.

**Virulence assay.** All strains were grown on Sabouraud agar and subcultured on YPD medium at 30°C for 24 h. Cells were harvested, washed twice in sterile

physiological saline, counted with a hemocytometer, and adjusted to  $2 \times 10^6$  or  $2 \times 10^7$  CFU/ml in sterile physiological saline. BALB/c male mice, 7 weeks old (Charles River, Les Oncins, France), were housed in groups of seven mice per cage and were inoculated by injection of 100  $\mu$ l with one of the above yeast suspensions into the lateral tail vein (final amount,  $2 \times 10^5$  or  $2 \times 10^6$  CFU per mouse). Dilutions of the suspensions were plated on Sabouraud agar to confirm the inoculum size. Survival was monitored twice daily until day 30 postinfection. The log rank test was used to determine significant differences in survival time between groups using GraphPad Prism 3.0 software (GraphPad, San Diego, CA). A *P* value of <0.05 was considered significant.

**Fungal burden and morphological analysis.** To assess fungal burden and morphology in infected tissues, a less acute infection was required. We therefore used an inoculum of  $5 \times 10^5$  CFU per mouse. Fungal cells were prepared and injected as described above. Five mice were infected with each strain and euthanized at day 4 postinfection. The kidneys being the target organs in this model (27), the left kidney was aseptically removed, weighed, and homogenized in 2 ml of sterile physiological saline; serial dilutions were plated on Sabouraud chloramphenicol agar for determination of the CFU per g of kidney. Statistical analysis was performed using the nonparametric Dunn's test for multiple comparisons. A *P* value of <0.05 was considered significant. Morphology of *C. albicans* cells recovered from infected kidneys was assessed using calcofluor white (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) that stains chitin within the cell wall.



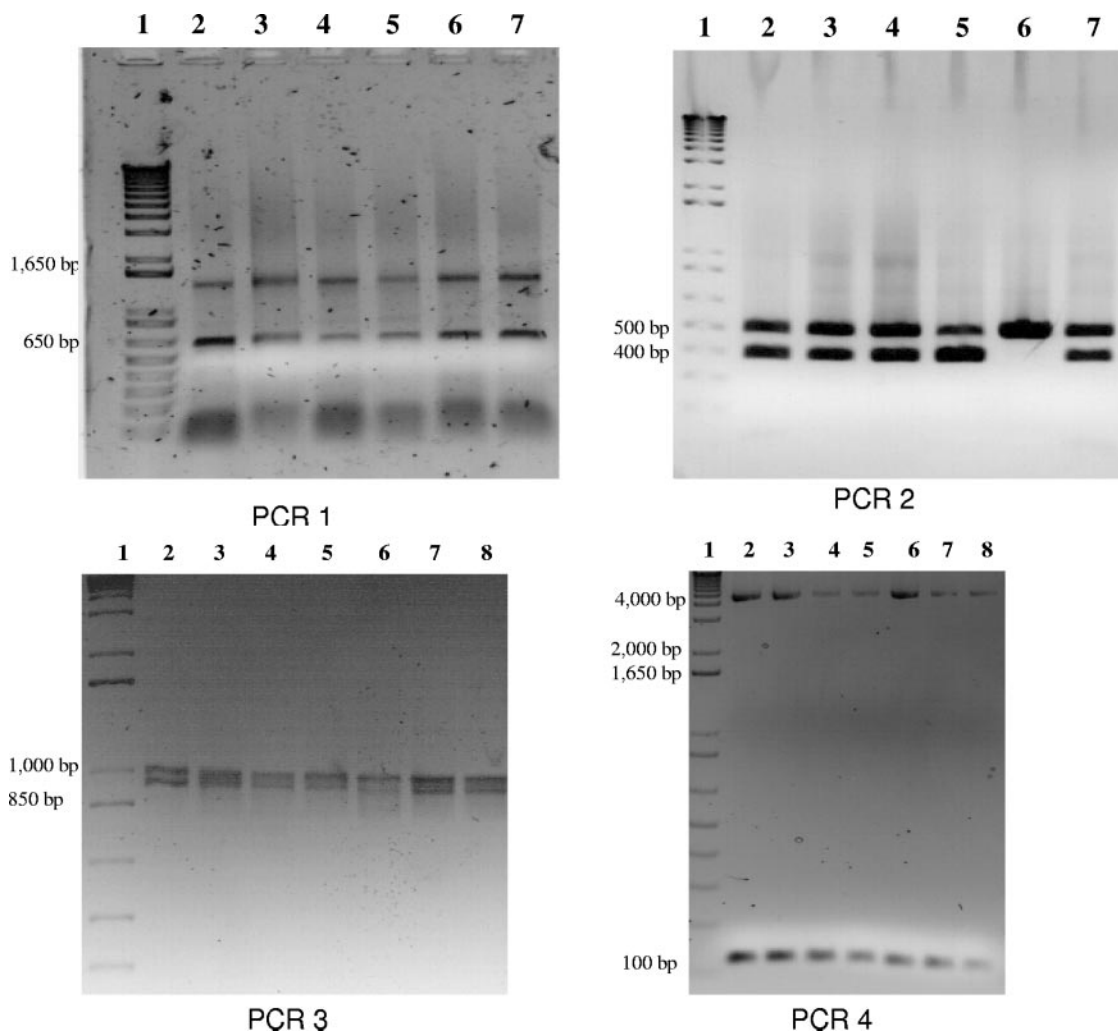


FIG. 2. PCR amplifications of the two haplotypes in heterozygous regions flanking *VPS28* and *VPS32*. (Top) Right and left borders of *VPS28* (PCR1 and PCR2, respectively). Lane 1, 1-kb Plus DNA ladder; lane 2, BWP17; lanes 3 and 4, two *VPS28*<sup>+/-</sup> single disruptants; lanes 5 to 7, three independent *vps28*<sup>-/-</sup> double disruptants. (Bottom) Left and right borders of *VPS32* (PCR3 and PCR4, respectively). Lane 1, 1-kb Plus DNA ladder; lane 2, BWP17; lanes 3 and 4, two *VPS32*<sup>+/-</sup> single disruptants; lanes 5 to 8, *vps32*<sup>-/-</sup> double disruptants (strains lanes 5 and 6 were obtained from the lane 3 single disruptant, and strains 7 and 8 were obtained from the other single disruptant).

Thus, 50  $\mu$ l of each kidney homogenate was stained with 10  $\mu$ l of a solution of 0.1% calcofluor white and 1% KOH. Slides were observed by fluorescence microscopy with a 340- to 380-nm filter and the same microscope as for FM4-64 staining. To quantitate the morphogenesis defects, we used the morphological index (MI) described previously by Odds et al. (27): cells were categorized as yeasts showing a spherical shape (MI score = 1), elongated yeasts showing ovoid shape and a length up to twice the diameter of the cell (MI score = 2), pseudohyphae (MI score = 3), or true hyphae (MI score = 4). For each stained homogenate, 50 cells were scored; data are the average of five mice infected with each strain. The nonparametric Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Isolation of *vps* mutants.** Recently and while this work was in progress, studies with *S. cerevisiae* established that Rim101p processing was dependent on class E VPS factors belonging to the three ESCRT complexes required for sorting membrane proteins into the MVB pathway (39). Conservation of this process in *C. albicans* was assumed following the observations that class E *vps* mutants inhibit alkaline-induced filamentation

and that this inhibition is relieved by expression of a constitutively active form of Rim101p (39). A direct requirement of Vps32p for Rim101p processing in *C. albicans* was shown independently (24). To confirm this link in *C. albicans*, we checked the effects of the deletion of two *VPS* genes on the expression of alkaline and acidic genes and on the growth and hyphal development at various pHs.

The *VPS28* and *VPS32* genes were chosen as components of the ESCRT-I and ESCRT-III complexes, respectively (2, 22) and strains carrying heterozygous and homozygous null mutations in the BWP17 background were generated by the UAU1 method (14) (see Materials and Methods and Table 1). Confirmation of the *vps28* and *vps32* deletions by Southern analysis is shown in Fig. 1. The *vps32* homozygous mutant that exhibited an unexpected hybridization with the *VPS32* probe was not considered in this study (Fig. 1D, lane 3). This method involves spontaneous transfer of the disruption cassette from one chromosome to its homologue. We thus checked whether homog-

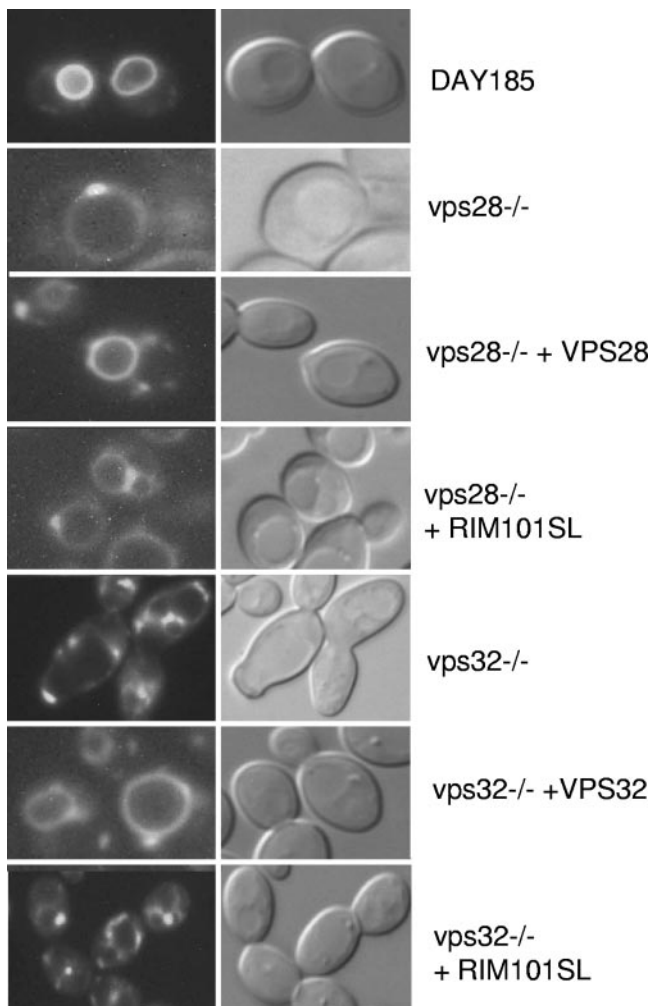


FIG. 3. FM4-64 staining in the *C. albicans* mutants. The strains were DAY185 (reference strain), MC2H (*vps28*<sup>-/-</sup>), MC5 (*vps28*<sup>-/-</sup> + *VPS28*), MC14 (*vps28*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL*), MC4H (*vps32*<sup>-/-</sup>), MC6 (*vps32*<sup>-/-</sup> + *VPS32*), and MC15 (*vps32*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL*). They were incubated with 40  $\mu$ M FM4-64 as described in Materials and Methods and visualized by fluorescence microscopy. The left side of each panel is FM4-64 fluorescence, while the right side of each panel shows differential interference contrast optics.

enotization of a large chromosomal segment occurred simultaneously. According to sequence data available for SC5314, the ancestor of the BWP17 strain used here (38), the *CaVPS28* and *CaVPS32* alleles lie in 24-kb and 96-kb homozygous regions of chromosome 2 and 1, respectively, flanked by heterozygous regions. The status of the flanking regions in the parental strain was checked by PCR (see Materials and Methods), as well as in the single and double disruptants. As shown on Fig. 2, lanes 2 to 4, and as expected, heterozygosity of the *VPS28* and *VPS32* flanking regions was conserved in BWP17 and in all single disruptants checked. Expected sizes of amplicons were observed, except in the case of the *VPS28* right border; this may reflect genomic variations between BWP17 and SC5314 generated during the successive transformations that lead to this strain (38). All double *CaVPS32* disruptants retained the chromosomal structure of the parental strain,

whereas one of the *CaVPS28* double disruptants lost heterozygosity at the left border (Fig. 2, panel PCR2, lane 6). This strain was discarded. Haplotypes initially present on chromosomes 1 and 2 were thus conserved, except for the 24- and 96-kb regions separating the heterozygous markers where extensive homogenization may have occurred. We therefore cannot rule out that some of the phenotypes displayed by our mutants may result from unmasking of preexisting or transformation-induced mutations in these regions. The fact that most phenotypes could be completely complemented by insertion of an ectopic copy of the wild type argues against such a hypothesis (see below).

FM4-64 localization experiments indicated that double disruptants for *CaVPS28* or *CaVPS32* displayed defects in endocytosis (24). Twenty minutes after being stained, FM4-64 dye could clearly be seen on the vacuole membrane in the reference strain (DAY185) cells, while it remained in small compartments adjacent to the vacuole in the two *vps* mutant cells (Fig. 3). These structures were highly reminiscent of class E compartments, which accumulate proteins destined for the vacuole in class E *vps* mutants in *S. cerevisiae* (33, 37). This phenotype was lost upon introduction of a wild-type copy of the disrupted alleles (Fig. 3).

**Role of the *VPS28* and *VPS32* genes in alkaline and acidic genes regulation.** The effects of *vps28* and *vps32* deletions on the transcription of the alkaline-induced genes (*RIM101* and *PHR1*) and of the acid-induced and alkaline-repressed gene *PHR2* were estimated by quantitative real-time PCR of transcripts extracted from cells grown at pH 4.0 and pH 7.5, using actin transcripts as a reference (Fig. 4).

In heterozygous *vps*-deleted strains *vps28*<sup>+/-</sup> and *vps32*<sup>+/-</sup> at pH 4.0 and pH 7.5, *RIM101*, *PHR1*, and *PHR2* expression levels were comparable to those observed for the reference strain (data not shown). In the *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> homozygous backgrounds and at pH 4.0, the *RIM101*, *PHR1*, and *PHR2* mRNA levels were not significantly affected (Fig. 4). At pH 7.5, both homozygous deletions of *VPS28* and *VPS32* significantly decreased *RIM101* expression and abolished *PHR1* expression, whereas *PHR2* expression derepressed up to twice its level at acidic pH in the reference strain. These effects are completely similar to those observed with the *rim101* homozygous deletion (Fig. 4). Complementation of the *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> homozygous deleted strains with one copy of their corresponding wild-type allele completely restored a wild-type phenotype.

These results confirm that Vps28p and Vps32p are required at alkaline pH for *PHR1* and *RIM101* induction and for *PHR2* repression, two processes known to require Rim101p activation. To further confirm this hypothesis, we checked whether expression of a constitutively active form of Rim101p was able to bypass the *vps* defects. To this end, we integrated a plasmid carrying *RIM101SL*, encoding a 415-residue C-terminally truncated form of Rim101p, in the various mutants at the *RIM101* locus (see Materials and Methods). Transcript levels of *RIM101SL* made under these conditions were similar to those driven by the native *RIM101* gene (compare *RIM101* expression in the reference strain and in the *rim101*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL* backgrounds at pH 7.5) (Fig. 4). On the contrary, and as shown in Fig. 4, expression of *RIM101SL* in *vps* null mutants led to partial derepression

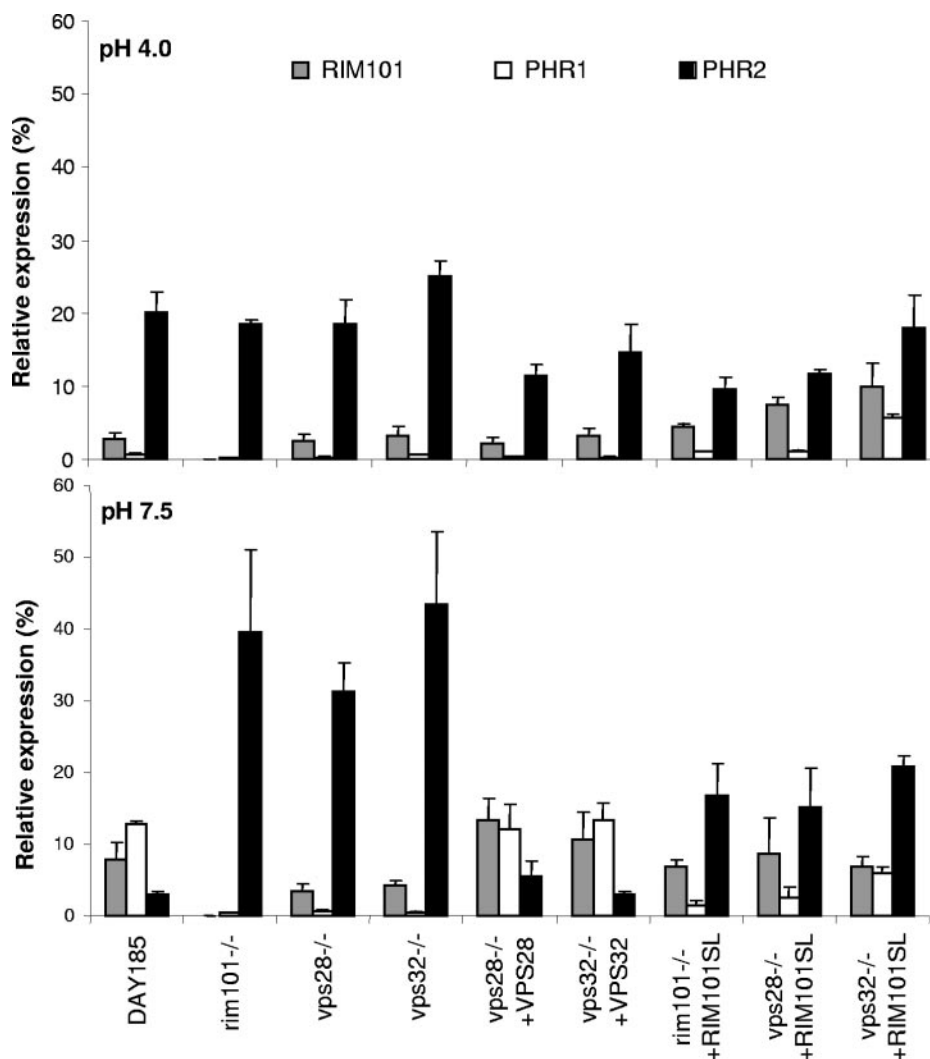


FIG. 4. Expression patterns of alkaline-induced genes (*RIM101* and *PHR1*) and acid-induced gene (*PHR2*) in *C. albicans* strains at pH 4.0 and pH 7.5. The strains were (from left to right) DAY185 (reference strain), DAY25 (*rim101*<sup>-/-</sup>), MC2H (*vps28*<sup>-/-</sup>), MC4H (*vps32*<sup>-/-</sup>), MC5 (*vps28*<sup>-/-</sup> + *VPS28*), MC6 (*vps32*<sup>-/-</sup> + *VPS32*), MC13 (*rim101*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL*), MC14 (*vps28*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL*), and MC15 (*vps32*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL*). Expression levels were calculated relative to the expression of the *ACT1* reference gene. Data are the average of four experiments.

of *PHR1* and partial repression of *PHR2* at both pHs. These effects are qualitatively similar to those observed after the suppression of a *rim101* homozygous deletion (*rim101*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL*) (Fig. 4); they suggest that our truncated allele does not perfectly mimic the physiologically active form of Rim101p and show that regulation of *PHR1* and *PHR2* is restored at alkaline pH in *vps* mutants to the same extent as it would be in a *rim* mutant. However, the suppression induced by the *RIM101SL* truncated form in the *vps* mutants, even partial, suggests that Vps28p and Vps32p act in the Rim pathway upstream from the processing of Rim101p. As the expression of this *RIM101SL* truncated allele has no effect on the endocytic phenotype (Fig. 3), the role of the two Vps factors in the Rim pathway appears separate from their role in the MVB transport machinery.

**Role of *VPS28* and *VPS32* on growth and morphology at acidic and alkaline pH.** On solid SC medium, two independent clones of each *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> homozygous deletion grew as well as the reference strain at pHs 3.0 and 5.3 (Fig. 5). At pH

9.0, the *vps32*<sup>-/-</sup> strain was affected more drastically than the *vps28*<sup>-/-</sup> and the *rim101*<sup>-/-</sup> null homozygotes that still showed a growth pattern near the reference strain. At pH 10.0, the *vps32*<sup>-/-</sup> strain was unable to form colonies, whereas both *vps28*<sup>-/-</sup> and *rim101*<sup>-/-</sup> were severely affected, with *vps28*<sup>-/-</sup> being slightly more sensitive than *rim101*<sup>-/-</sup>. Growth inhibition at alkaline pH was totally repaired after integration of one copy of the corresponding wild-type allele at the *HIS1* locus (*vps28*<sup>-/-</sup> + *VPS28* and *vps32*<sup>-/-</sup> + *VPS32*) (Fig. 5). The suppression by the constitutively active *RIM101SL* gene was nearly complete in the case of the *rim101*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL* strain but only partial in strains *vps28*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL* and *vps32*<sup>-/-</sup> + *RIM101SL*. This suppression by the *RIM101SL* gene was confirmed by growth experiments in liquid SC medium buffered at pH 9.0 (data not shown).

These results show that the VPS factors have a significant function in the alkaline response and suggest that this function is not only Rim dependent.

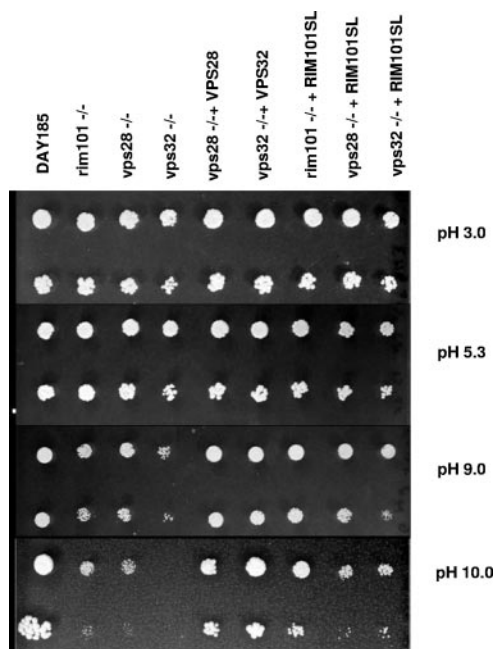


FIG. 5. Sensitivity of *C. albicans* strains to ambient pH. The strains were (from left to right) DAY185 (reference strain), DAY25 (*rim101*<sup>-/-</sup>), MC2H (*vps28*<sup>-/-</sup>), MC4H (*vps32*<sup>-/-</sup>), MC5 (*vps28*<sup>-/-</sup>+*VPS28*), MC6 (*vps32*<sup>-/-</sup>+*VPS32*), MC13 (*rim101*<sup>-/-</sup>+*RIM101SL*), MC14 (*vps28*<sup>-/-</sup>+*RIM101SL*), and MC15 (*vps32*<sup>-/-</sup>+*RIM101SL*). Droplets of two dilutions (10<sup>5</sup> and 10<sup>4</sup> cells/ml) were spotted on SC medium (pH 5.3) and SC medium buffered at pHs 3.0, 9.0, and 10.0. Plates were incubated at 30°C for 48 h except for the plate at pH 10.0, which was incubated for 5 days.

The Rim pathway is required in *C. albicans* on several media for hypha formation, which normally occurs only at neutral and/or alkaline pH (9). Recently, several *vps* mutants were shown to affect hypha formation in *C. albicans* at alkaline pH, and these effects were partially relieved by expressing a Rim101p constitutively active form (39). To confirm the role of the ESCRT complexes in the Rim-dependent induced filamentation, we compared the *vps* mutants to the *rim101* mutant for filamentation at pH 4.0 and pH 7.5.

After 4 h at 37°C in M199 at pH 4.0, cells of all strains were in the yeast form, as were those of the reference strain (Fig. 6A), except for the *RIM101SL* suppressed strains (see below). At pH 7.5, the reference strain showed an average of 92% ± 2% of the cells producing hyphae (Fig. 6E). All deleted *rim101*<sup>-/-</sup>, *vps28*<sup>-/-</sup>, and *vps32*<sup>-/-</sup> strains were defective in filamentation, showing <5% hyphae (Fig. 6F to H) even after 36 h of incubation (data not shown). This filamentation defect was totally suppressed in the *vps28*<sup>-/-</sup>+*VPS28* and *vps32*<sup>-/-</sup>+*VPS32* complemented strains, which exhibited 92% ± 2% and 89% ± 3% of hyphal cells, respectively (Fig. 6I and J).

The introduction of the *RIM101SL* allele into the *rim101*<sup>-/-</sup>, *vps28*<sup>-/-</sup>, and *vps32*<sup>-/-</sup> mutants restored complete hypha production at pH 7.5 in 91% ± 4%, 92% ± 2%, and 92% ± 5% of the cells, respectively (Fig. 6K to M). Filamentation was also induced in these three strains at pH 4.0 with averages of 62% ± 3%, 66% ± 4%, and 76% ± 4% of the cells with hyphae, respectively (Fig. 6B to D).

These results indicate that in *C. albicans*, both *VPS28* and *VPS32* are required for alkaline-induced Rim101p-dependent hypha formation and that the 415-residue truncated form of *RIM101* induces filamentation under both acidic and alkaline conditions. Since the *VPS* deleted strains suppressed by the *RIM101SL* carry both the wild-type and the truncated alleles at the *RIM101* locus, the *RIM101SL* truncated allele appears at least partially dominant.

**Deletions in *VPS28* and *VPS32* affect virulence, kidney fungal burden, and morphogenesis in vivo.** To determine whether the MVB pathway plays a role in *C. albicans* virulence, we analyzed the *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> mutants in the hematogenously disseminated candidiasis model (32). Reference and isogenic strains *rim101*<sup>-/-</sup>, *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup>, as well as complemented strains (*vps28*<sup>-/-</sup>+*VPS28* and *vps32*<sup>-/-</sup>+*VPS32*), were injected into the tail veins of mice at a dose of 2 × 10<sup>6</sup> CFU/mouse. All groups were compared by the log-rank test with highly significant differences in survival time (*P* < 0.0001) (Fig. 7). As previously shown (9), the virulence of the *rim101*<sup>-/-</sup> strain was reduced compared to the reference strain (median survival time of 8 days compared to 2 days; *P* = 0.0003). The deleted strains *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> appeared even more attenuated than the *rim101*<sup>-/-</sup> strain, with >50% of the mice surviving 29 days after inoculation (Fig. 7) (*P* = 0.006 for *vps28*<sup>-/-</sup> and *P* = 0.0008 for *vps32*<sup>-/-</sup>, each compared to *rim101*<sup>-/-</sup>). The dramatic virulence defect of the two *vps* mutants might be related to a growth defect in vivo. We noticed, however, that the growth rate of the *vps28*<sup>-/-</sup> mutant was comparable to that of the reference strain and that the *vps32*<sup>-/-</sup> mutant showed only a slight growth defect when strains were tested on M199 or SC at 37°C and pH 7.5, a pH comparable to the physiological pH of mammalian blood (data not shown). Complementation of the mutants with the wild-type allele repaired virulence, as all mice of the complemented groups died by 6 days for *vps32*<sup>-/-</sup>+*VPS32* and 8 days for *vps28*<sup>-/-</sup>+*VPS28*, a significant difference from their respective null mutants (*P* < 0.001 for both complemented strains). The restored virulence showed by the complemented strains, particularly *vps28*<sup>-/-</sup>+*VPS28*, was not complete, suggesting a gene dosage effect on virulence, due to the restitution of a single copy of the gene (4). However, we cannot exclude the formal possibility that part of the phenotype of the *vps28*<sup>-/-</sup> mutant resulted from additional mutations in the 28-kb region surrounding *VPS28* that may have undergone homogenization during mutant construction (see above). Similar trends in virulence were observed in mice infected with 2 × 10<sup>5</sup> CFU/mouse with each of the above strains (*P* < 0.0001; data not shown).

To assess fungal burden in kidneys, mice infected with 5 × 10<sup>5</sup> CFU/mouse were sacrificed 4 days postinfection. Figure 8 shows that mice challenged by the *C. albicans* reference strain were heavily infected with a fungal burden of 5.6 log<sub>10</sub> CFU/g of kidney, whereas mice infected with the two deleted strains *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> had a reduced fungal burden of 4.4 and 4.1 log<sub>10</sub> CFU/g of organ, respectively (*P* < 0.05 for both strains, each compared to the reference strain). The complemented strains *vps28*<sup>-/-</sup>+*VPS28* and *vps32*<sup>-/-</sup>+*VPS32* colonized kidneys as efficiently as the reference strain (*P* > 0.05 for both strains compared to the reference strain).



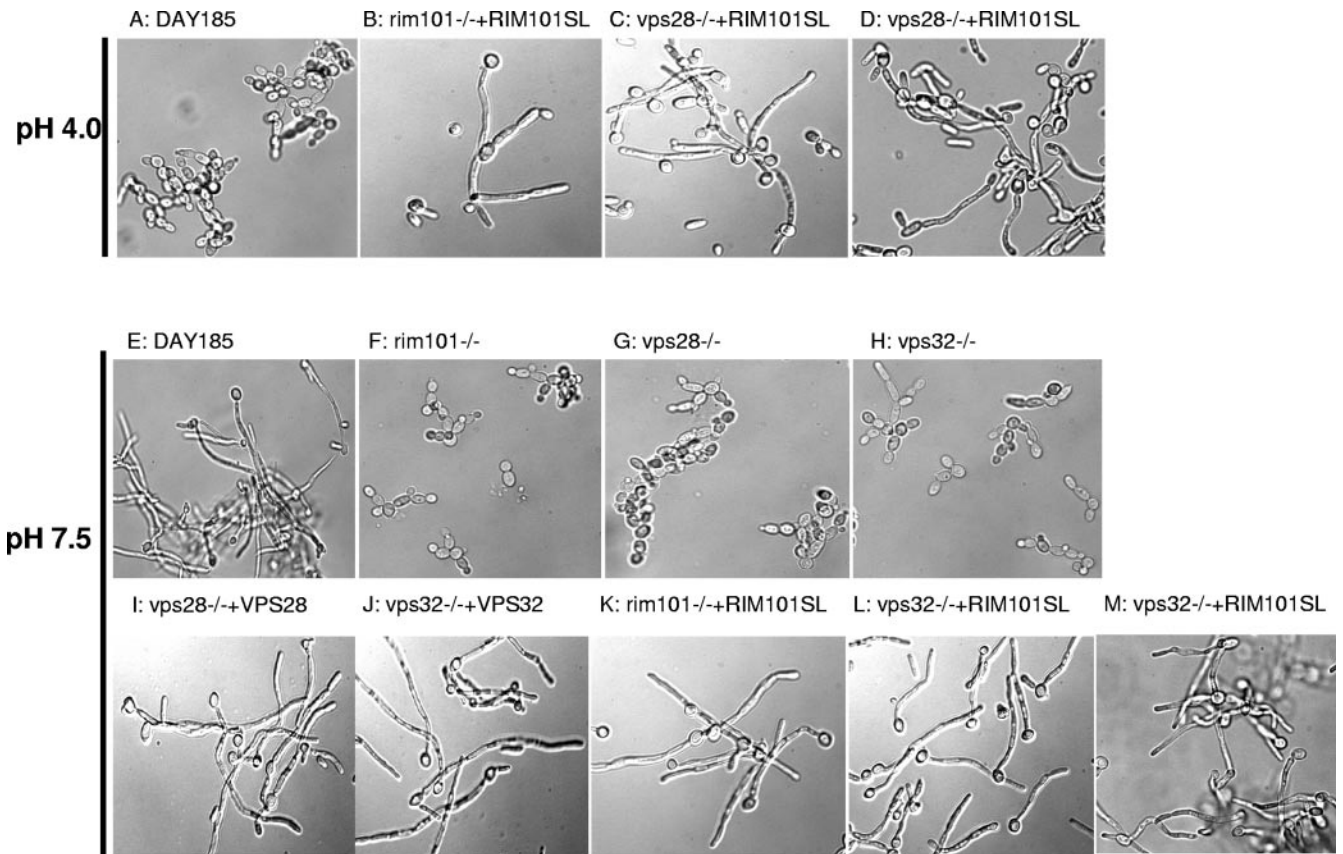


FIG. 6. Morphology of *C. albicans* cells in M199 medium adjusted to pH 4.0 or pH 7.5. The strains were DAY185 (reference strain) at pH 4.0 (A) and pH 7.5 (E); deleted strains DAY25 (*rim101*<sup>-/-</sup>), MC2H (*vps28*<sup>-/-</sup>), and MC4H (*vps32*<sup>-/-</sup>) at pH 7.5 (F to H); complemented strains MC5 (*vps28*<sup>-/-</sup>+*VPS28*) and MC6 (*vps32*<sup>-/-</sup>+*VPS32*) at pH 7.5 (I and J); and suppressed MC13 (*rim101*<sup>-/-</sup>+*RIM101SL*), MC14 (*vps28*<sup>-/-</sup>+*RIM101SL*), and MC15 (*vps32*<sup>-/-</sup>+*RIM101SL*) strains at pH 4.0 (B to D) and at pH 7.5 (K to M).

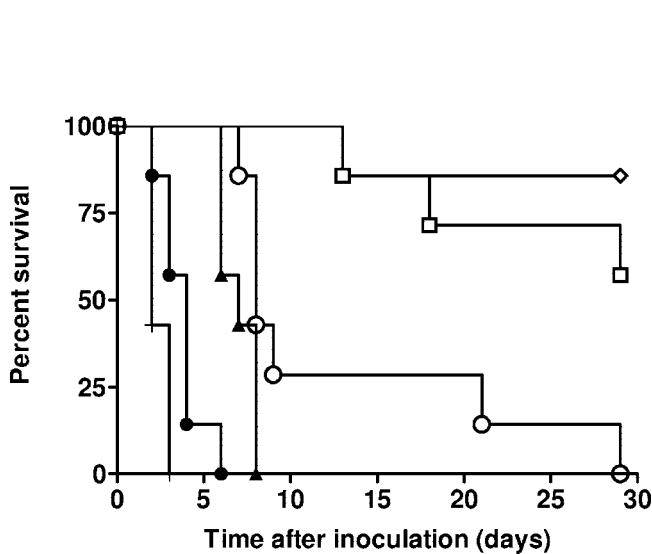


FIG. 7. Survival curves of groups of seven BALB/c male mice infected intravenously with  $2 \times 10^6$  cells of DAY185 reference strain (+); MC2H (*vps28*<sup>-/-</sup>) (□); MC4H (*vps32*<sup>-/-</sup>) (◇); MC5 (*vps28*<sup>-/-</sup>+*VPS28*) (▲); MC6 (*vps32*<sup>-/-</sup>+*VPS32*) (●); and DAY25 (*rim101*<sup>-/-</sup>) (○).

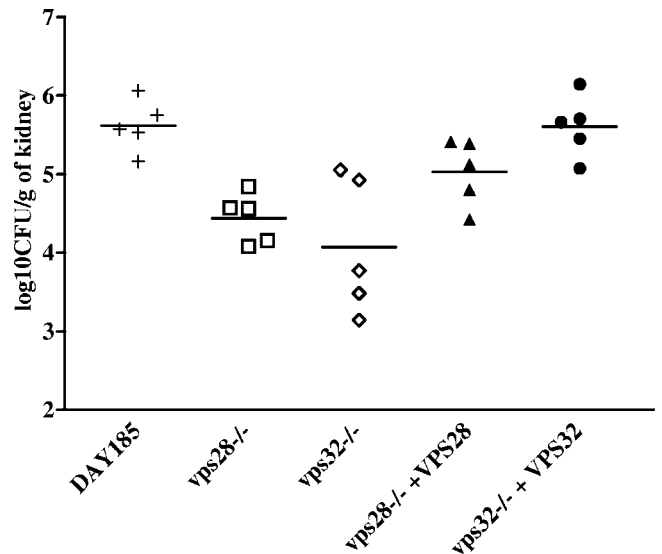


FIG. 8. Fungal burden in the kidney of BALB/c male mice infected intravenously with  $5 \times 10^5$  cells of DAY185 reference strain (+), MC2H (*vps28*<sup>-/-</sup>) (□), MC4H (*vps32*<sup>-/-</sup>) (◇), MC5 (*vps28*<sup>-/-</sup>+*VPS28*) (▲), and MC6 (*vps32*<sup>-/-</sup>+*VPS32*) (●). Each strain was inoculated in five mice.

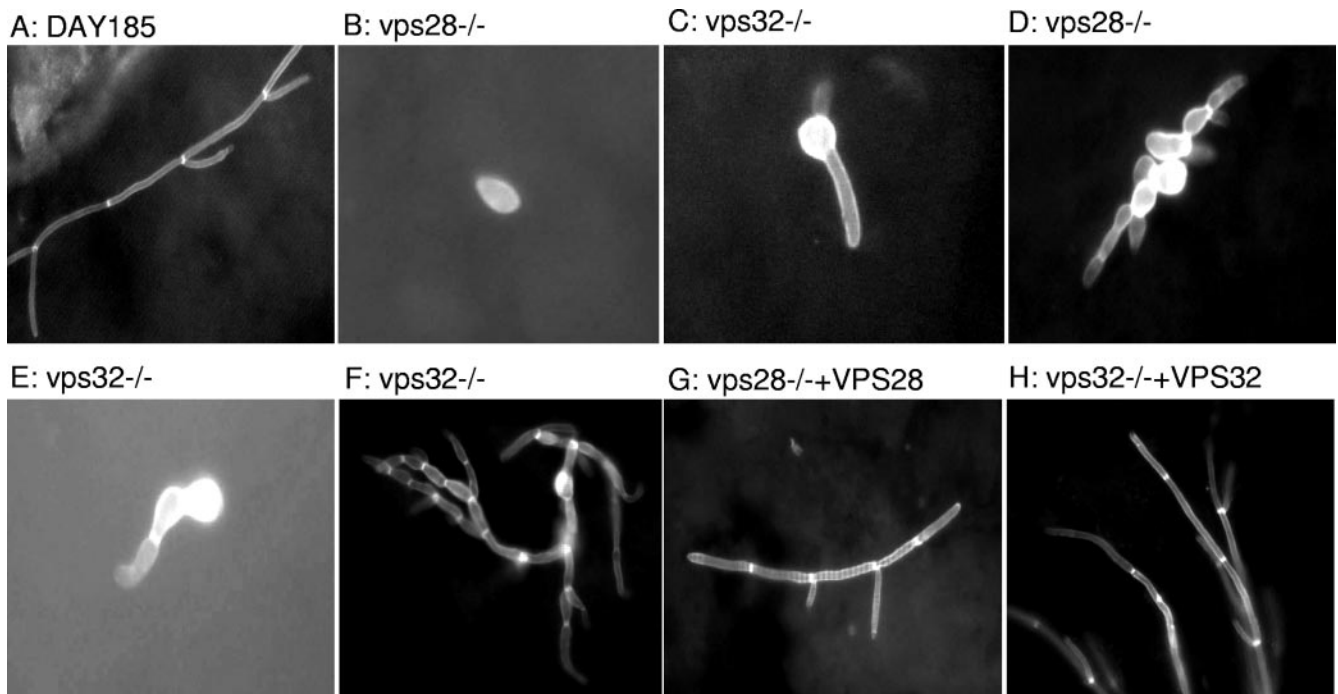


FIG. 9. Morphology of fungal elements present in the kidneys of mice infected intravenously with  $5 \times 10^5$  yeast cells of DAY185 (reference strain) (A), deleted strains MC2H ( $vps28^{-/-}$ ) (B and D), and MC4H ( $vps32^{-/-}$ ) (C, E, and F), and complemented strains MC5 ( $vps28^{-/-}+VPS28$ ) and MC6 ( $vps32^{-/-}+VPS32$ ) (G and H). Kidney homogenates obtained at day 4 postinfection were stained with 0.1% calcofluor white and 1% KOH and examined with an epifluorescence microscope.

We have shown above that the *vps*-deleted strains were defective *in vitro* for hyphal formation. We analyzed, by calcofluor staining, the morphology of the fungal elements present in the kidneys 4 days after infection (Fig. 9), and we used the MI to quantitate defects (Table 3). In mice infected with the reference strain, 91% of the cells had an MI score of 4, showing numerous clusters of long true hyphae (Table 3 and Fig. 9A). Conversely, only 7% and 4% of the cells had an MI score of 4 in mice infected with the  $vps28^{-/-}$  and  $vps32^{-/-}$  mutant strains, respectively (Table 3) ( $P < 0.01$  for both strains, each compared to the reference strain). For the mutant strains, cells were predominantly had an MI score of 3 with pseudohyphal forms (Table 3; Fig. 9D,  $vps28^{-/-}$  and Fig. 9E and F,  $vps32^{-/-}$ ), other shapes had an MI score of 1 or 2 with yeast forms and rare germ tubes (Fig. 9B,  $vps28^{-/-}$ ; Fig. 9C,  $vps32^{-/-}$ ). Each  $vps28^{-/-}+VPS28$  and  $vps32^{-/-}+VPS32$  complemented strain formed comparable rates of cells with an MI score of 4, compared to the reference strain

(Table 3; Fig. 9G,  $vps28^{-/-}+VPS28$ ; Fig. 9H,  $vps32^{-/-}+VPS32$ ) ( $P > 0.05$  for both strains compared to the reference strain).

These results show that both Vps28p and Vps32p factors are required *in vivo* for pathogenesis. The *vps* mutants showed inadequate hyphal development and failed to colonize the kidneys as efficiently as the control strain. Such defects have already been reported for mutants of the Rim pathway (7). We demonstrate here that both *vps28* and *vps32* mutants are significantly less virulent than the *rim101* mutant, suggesting that activity of the ESCRT-I and the ESCRT-III complexes is required for virulence not only through their effect on the Rim pathway.

Such an increased effect may be related to the general role of the MWB pathway in cell physiology. The main function of this machinery in *S. cerevisiae* is to sort endosomal transmembrane proteins directed to the lumen of the vacuole away from proteins delivered to the membrane of the vacuole or to be recycled back to the plasma membrane or Golgi complex (1, 5). This control of membrane protein recycling or degradation is essential for the regulation of the cell surface composition and may thus affect various cell sensing and adaptation processes besides external pH sensing. It is thus not unexpected that defects in the MVB pathway may have a more dramatic impact than crippling the Rim pathway on cell adaptation to the extracellular environment and thus on cell survival in the host. Comparison of global changes elicited by Rim and Vps mutations may shed light on these additional processes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Direction de la Recherche Clinique of the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, the Centre National de

TABLE 3. Morphology of the cells recovered from the kidneys of the mice infected intravenously with  $5 \times 10^5$  cells

Strain	Morphological form (% $\pm$ SD) of:			
	Yeasts (MI <sup>a</sup> = 1)	Elongated yeasts (MI = 2)	Pseudohyphae (MI = 3)	True hyphae (MI = 4)
DAY185	0	4 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2	91 $\pm$ 4
$vps28^{-/-}$	18 $\pm$ 4	24 $\pm$ 12	51 $\pm$ 8	7 $\pm$ 4
$vps32^{-/-}$	10 $\pm$ 6	22 $\pm$ 9	64 $\pm$ 15	4 $\pm$ 5
$vps28^{-/-} + VPS28$	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	92 $\pm$ 3
$vps32^{-/-} + VPS32$	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3	90 $\pm$ 5

<sup>a</sup> MI, morphological index score (27).

la Recherche Scientifique, and grants from Merck & Company and Fujisawa, Inc., through funding of M.C.; and by the European Commission (QLK2-2000-00795, Galar Fungail Consortium), through funding of F.B.

Sequence data from *C. albicans* were obtained from the Stanford DNA Sequencing and Technology Center, with the support of the NIDR and the Burroughs Wellcome Fund.

Plasmids carrying the *MET3* promoter (pFLAG-MET3) were kindly donated by Y. Uehara, and strains deleted for *RIM101*, *BWP17*, *pDDB78*, and *UAU1*-carrying plasmids were a generous gift from A. P. Mitchell. Helpful discussions with members of the lab, particularly Mathias Richard, are greatly acknowledged.

#### REFERENCES

- Babst, M. 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic* 6:2–9.
- Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr. 2002. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* 3:271–282.
- Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa, and S. D. Emr. 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17:2982–2993.
- Bates, S., D. M. MacCallum, G. Bertram, C. A. Munro, H. B. Hughes, E. T. Buurman, A. J. Brown, F. C. Odds, and N. A. Gow. 2005. *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J. Biol. Chem.* 280:23408–23415.
- Bignell, E., S. Negrete-Urtasun, A. M. Calcagno, K. Haynes, H. N. Arst, Jr., and T. Rogers. 2005. The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol. Microbiol.* 55:1072–1084.
- Bowers, K., J. Lottridge, S. B. Helliwell, L. M. Goldthwaite, J. P. Luzio, and T. H. Stevens. 2004. Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 5:194–210.
- Calderone, R. A., and W. A. Fonzi. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9:327–335.
- Davis, D. 2003. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr. Genet.* 44:1–7.
- Davis, D., J. E. Edwards, Jr., A. P. Mitchell, and A. S. Ibrahim. 2000. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 68:5953–5959.
- Davis, D., R. B. Wilson, and A. P. Mitchell. 2000. RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20:971–978.
- De Bernardis, F., F. A. Muhlschlegel, A. Cassone, and W. A. Fonzi. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 66:3317–3325.
- Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet. 2003. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect. Dis.* 3:772–785.
- El Barkani, A., O. Kurzai, W. A. Fonzi, A. Ramon, A. Porta, M. Frosch, and F. A. Muhlschlegel. 2000. Dominant active alleles of RIM101 (PRR2) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20:4635–4647.
- Enloe, B., A. Diamond, and A. P. Mitchell. 2000. A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 182:5730–5736.
- Espeso, E. A., J. Tilburn, L. Sanchez-Pulido, C. V. Brown, A. Valencia, H. N. Arst, Jr., and M. A. Penalva. 1997. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* 274:466–480.
- Fonzi, W. A. 1999. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of  $\beta$ -1,3- and  $\beta$ -1,6-glucans. *J. Bacteriol.* 181:7070–7079.
- Fonzi, W. A. 2002. Role of pH response in *Candida albicans* virulence. *Mycoses* 45(Suppl. 1):16–21.
- Gavin, A. C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J. M. Rick, A. M. Michon, C. M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M. A. Heurtier, R. R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, and G. Superti-Furga. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415:141–147.
- Ghannoum, M. A., B. Spellberg, S. M. Saporito-Irwin, and W. A. Fonzi. 1995. Reduced virulence of *Candida albicans* PHR1 mutants. *Infect. Immun.* 63:4528–4530.
- Gonzalez-Lopez, C. I., R. Szabo, S. Blanchin-Roland, and C. Gaillardin. 2002. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics* 160:417–427.
- Ito, T., T. Chiba, R. Ozawa, M. Yoshida, M. Hattori, and Y. Sakaki. 2001. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:4569–4574.
- Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106:145–155.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:893–905.
- Kullas, A. L., M. Li, and D. A. Davis. 2004. Snf7p, a component of the ESCRT-III protein complex, is an upstream member of the RIM101 pathway in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 3:1609–1618.
- Lambert, M., S. Blanchin-Roland, F. Le Louedec, A. Lepingle, and C. Gaillardin. 1997. Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. *Mol. Cell. Biol.* 17:3966–3976.
- Li, M., S. J. Martin, V. M. Bruno, A. P. Mitchell, and D. A. Davis. 2004. *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot. Cell* 3:741–751.
- Odds, F. C., L. Van Nuffel, and N. A. Gow. 2000. Survival in experimental *Candida albicans* infections depends on inoculum growth conditions as well as animal host. *Microbiology* 146:1881–1889.
- Odorizzi, G., D. J. Katzmann, M. Babst, A. Audhya, and S. D. Emr. 2003. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 116:1893–1903.
- Penalva, M. A., and H. N. Arst, Jr. 2004. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:425–451.
- Porta, A., A. M. Ramon, and W. A. Fonzi. 1999. *PRR1*, a homolog of *Aspergillus nidulans* *palF*, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181:7516–7523.
- Ramon, A. M., A. Porta, and W. A. Fonzi. 1999. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J. Bacteriol.* 181:7524–7530.
- Richard, M., S. Ibata-Ombetta, F. Dromer, F. Bordon-Pallier, T. Jouault, and C. Gaillardin. 2002. Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. *Mol. Microbiol.* 44:841–853.
- Rieder, S. E., L. M. Banta, K. Kohrer, J. M. McCaffery, and S. D. Emr. 1996. Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast vps28 vacuolar protein sorting mutant. *Mol. Biol. Cell* 7:985–999.
- Saporito-Irwin, S. M., C. E. Birse, P. S. Sypherd, and W. A. Fonzi. 1995. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15:601–613.
- Tilburn, J., S. Sarkar, D. A. Widdick, E. A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M. A. Penalva, and H. N. Arst, Jr. 1995. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14:779–790.
- Umeyama, T., Y. Nagai, M. Niimi, and Y. Uehara. 2002. Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans*. *Yeast* 19:611–618.
- Vida, T. A., and S. D. Emr. 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* 128:779–792.
- Wilson, R. B., D. Davis, and A. P. Mitchell. 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J. Bacteriol.* 181:1868–1874.
- Xu, W., F. J. Smith, Jr., R. Subaran, and A. P. Mitchell. 2004. Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 15:5528–5537.

Les tests phénotypiques pratiqués sur les mutants *vps28* et *vps32* ont également montré une augmentation de la sensibilité aux agents déstabilisant la paroi (CFW et SDS). Ces résultats suggèrent des modifications de structure de cette paroi. Nous avons recherché si ces modifications avaient des conséquences sur l'activité des antifongiques en particulier ceux qui agissent sur la paroi. Cette partie du projet comportait :

**1. L'étude des phénotypes des mutants *vps28* et *vps32* et *rim101* vis-à-vis des agents déstabilisant la paroi : SDS, CFW ou agissant sur la synthèse de la paroi : Nikkomycine Z**

Les mutants *vps* sont tous les deux hypersensibles au SDS et au CFW avec une réponse différente à la Nikkomycine Z. Le mutant *vps28* est hypersensible à la Nikkomycine Z alors que le mutant *vps32* ne l'est pas. Le mutant *rim101* est hypersensible au SDS mais présente une sensibilité conservée au CFW et à la Nikkomycine Z.

**2. L'étude de la sensibilité des souches délétées aux antifongiques**

Les mutants *vps* et le mutant *rim101* sont hypersensibles aux antifongiques azolés (fluconazole et voriconazole) et aux échinocandines (caspofungine et micafungine). L'expression du gène muté, codant pour la protéine Rim101p tronquée constitutivement active, supprime l'hypersensibilité des mutants aux azolés mais n'a pas d'effet sur leur hypersensibilité aux échinocandines.

Ces résultats ainsi que les méthodes ayant permis de les obtenir ont été publiés dans une note.

**B.Article 2 :**

“Deletions of the endocytic components *VPS28* and *VPS32* in *Candida albicans* lead to echinocandin and azole hypersensitivity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50 :3492-3495.



# Deletions of the Endocytic Components *VPS28* and *VPS32* in *Candida albicans* Lead to Echinocandin and Azole Hypersensitivity

Muriel Cornet,<sup>1,2</sup> Claude Gaillardin,<sup>1\*</sup> and Mathias L. Richard<sup>1</sup>

Microbiologie et Génétique Moléculaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Institut National de la Recherche Agronomique UMR1238, Centre National de la Recherche Scientifique UMR2585, 78850 Thiverval-Grignon, France,<sup>1</sup> and Microbiologie, Hôtel-Dieu, 1 Place du Parvis Notre-Dame, 75181 Paris Cedex 04, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris V, Paris Descartes, Paris, France<sup>2</sup>

Received 30 March 2006/Returned for modification 27 April 2006/Accepted 15 July 2006

**Vps28p and Vps32p act in both the endocytic and the pH signaling pathways in yeasts and are required for *Candida albicans* virulence. Here, we show that deletions of *VPS28* and *VPS32* increase the susceptibility of *C. albicans* to cell wall disruption agents, echinocandin and azole antifungal agents.**

The incidence of invasive fungal infections is rising continuously, and *Candida albicans* is now a major cause of nosocomial infections (11, 15, 17). Although antifungal resistance among invasive *C. albicans* isolates is not common, there is concern about the development of azole resistance due to prophylactic use of fluconazole (13). Thus, in recent years, interest has focused on developing and licensing new agents, such as echinocandins or new triazoles (7, 10, 12, 23).

Vacuolar protein sorting (Vps) factors act in the endosomal sorting complexes required for transmembrane protein recycling and degradation during the last steps of endocytosis (1). Recently, some Vps factors have been documented as required for activation of the Rim pathway, which governs pH sensing in fungi (2, 3, 9, 16, 24). We previously established that Vps28p and Vps32p affect virulence in *C. albicans* through Rim-dependent and -independent pathways (3). Here, we show that, in addition to virulence, these Vps factors affect cell wall maintenance and the susceptibility of *C. albicans* to antifungal agents.

We analyzed strains with *VPS* deleted for sensitivity to two cell wall-perturbing agents: calcofluor white (CFW) and sodium dodecyl sulfate (SDS). Homozygous deletions of *VPS28* (*vps28*<sup>-/-</sup>) and *VPS32* (*vps32*<sup>-/-</sup>) were constructed in the BWP17 strain as previously described (3, 6). Complementation of each mutant was achieved by reintroduction of the wild-type allele at the *HIS1* locus. As controls for any Rim-mediated effect, we analyzed the *rim101*<sup>-/-</sup> null mutant (4) and introduced *RIM101SL*, a truncated constitutively active allele of *RIM101* (3, 5), into the *vps28*<sup>-/-</sup>, *vps32*<sup>-/-</sup>, and *rim101*<sup>-/-</sup> mutants and into the DAY286 control strain at the *HIS1* locus (Table 1).

Both the *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> mutants were hypersensitive to CFW and SDS, with the wild-type phenotype partially restored by complementation (Fig. 1A). This suggests a cell

wall disorder compensated for by chitin accumulation and corroborates previous reports of enhanced CFW binding to the cell walls of *vps* mutants (3). Indeed, SDS hypersensitivity reflects facilitated access of detergents to the mutant membrane, whereas hypersensitivity to CFW, a known inhibitor of chitin incorporation in the wall, results from disruption of the chitin-based compensatory mechanism (18, 19). Nikkomycin Z, a chitin synthase inhibitor, was used to investigate this cell wall defect: an increased sensitivity of the *vps28*<sup>-/-</sup> mutant was observed, whereas no major effect was observed in the case of the *vps32*<sup>-/-</sup> mutant, either on plates (Fig. 1B) or in liquid assays (not shown). This suggests that the compensatory mechanisms elicited by the two *vps* mutations (e.g., chitin overproduction versus chitin deposition) may differ. In *Saccharomyces cerevisiae*, deletions of *VPS28* and *VPS32* led to CFW hyperresistance, unlike other *vps* mutations affecting the same complexes, which also suggests subtle differences in the precise compensatory mechanisms triggered by *vps* mutations (22).

Mutations in the *VPS* genes affect Rim101p activation (3).

TABLE 1. *Candida albicans* susceptibilities<sup>a</sup>

Strain	Geometric mean MIC (μg/ml) <sup>b</sup>			
	Fluconazole	Voriconazole	Caspofungin	Micafungin
ATCC 90028	0.96	0.03	0.05	0.06
DAY185	0.62	0.02	0.06	0.03
(control strain)				
<i>vps28</i> <sup>-/-</sup>	0.39	0.01	0.02	0.01
<i>vps32</i> <sup>-/-</sup>	0.32	0.01	0.02	0.01
<i>vps28</i> <sup>-/-</sup> + <i>VPS28</i>	0.62	0.03	0.03	0.04
<i>vps32</i> <sup>-/-</sup> + <i>VPS32</i>	0.68	0.02	0.03	0.04
DAY286+ <i>RIM101SL</i>	0.75	0.03	0.04	0.02
<i>vps28</i> <sup>-/-</sup> + <i>RIM101SL</i>	0.75	0.02	0.007	0.001
<i>vps32</i> <sup>-/-</sup> + <i>RIM101SL</i>	0.62	0.01	0.005	0.001
<i>rim101</i> <sup>-/-</sup>	0.11	0.002	0.005	0.001
<i>rim101</i> <sup>-/-</sup> + <i>RIM101SL</i>	0.42	0.01	0.03	0.03

<sup>a</sup> Calculated from at least 10 independent experiments. All strains derive directly from BWP17 (His<sup>-</sup> Ura<sup>-</sup> Arg<sup>-</sup>) (4) and are prototrophic. Double disruptions restored a Ura<sup>+</sup> Arg<sup>+</sup> phenotype. The His<sup>+</sup> information was brought by the plasmids carrying *VPS28*, *VPS32*, or *RIM101SL* or by an empty vector, all integrated at *HIS1*. DAY286 is an Arg<sup>+</sup> Ura<sup>+</sup> derivative of DAY185.

<sup>b</sup> Results are MIC minus 2 (prominent growth reduction or a 50% reduction in optical density) at 24 h for CAS and MCF and at 48 h for FLC and VRC.

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, CBAI, 78850 Thiverval-Grignon, France. Phone: 33 1 30 81 54 53. Fax: 33 1 30 81 54 57. E-mail: claude.gaillardin@grignon.inra.fr.

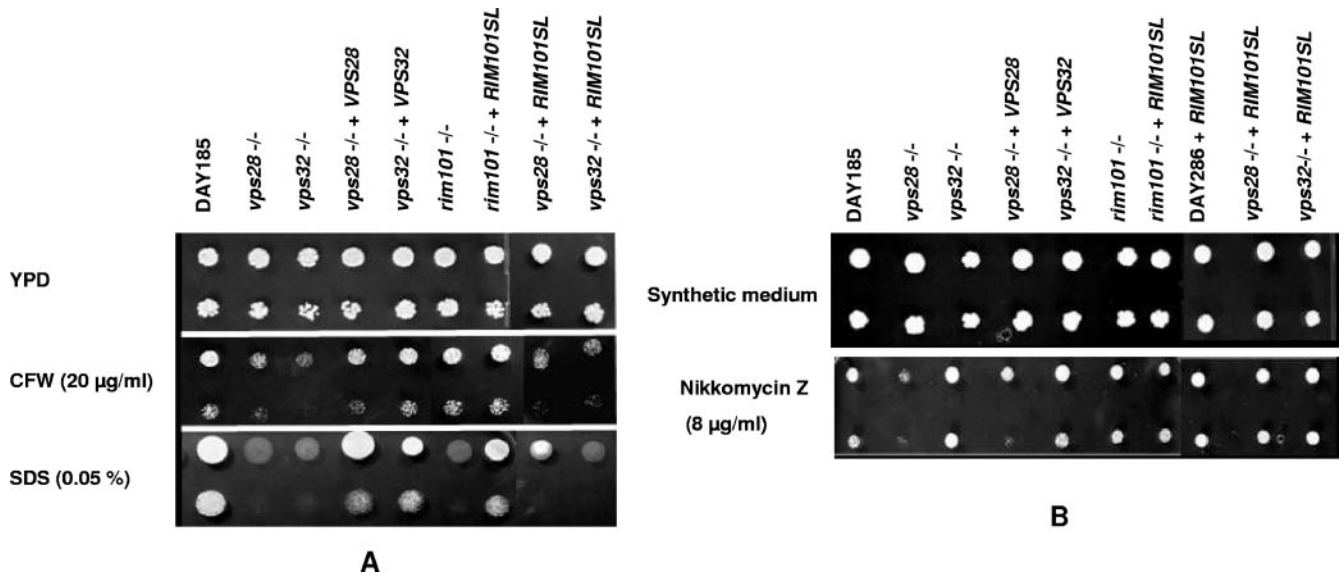


FIG. 1. Sensitivities of *C. albicans* strains to CFW, SDS, and nikkomycin Z. The strains are indicated above the lanes. All strains are prototrophic derivatives of the Arg<sup>-</sup> Ura<sup>-</sup> His<sup>-</sup> strain BWP17 (4). DAY286 is a Ura<sup>+</sup> Arg<sup>+</sup> derivative of BWP17 that was transformed by a plasmid carrying *RIM101SL* and *HIS1*. (A) Droplets (3.5 µl) at two dilutions (10<sup>5</sup> and 10<sup>4</sup> cells/ml) were spotted on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium and YPD medium supplemented with 20 µg/ml CFW (Sigma; fluorescent brightener 28) or 0.05% SDS. The plates were incubated at 30°C for 48 h, except for the plates with 0.05% SDS, which were incubated for 5 days. (B) Droplets (3.5 µl) at two dilutions (10<sup>5</sup> and 10<sup>4</sup> cells/ml) were spotted on synthetic complete medium (3) and synthetic medium supplemented with 8 µg/ml of nikkomycin Z (Sigma). The plates were incubated at 30°C for 48 h.

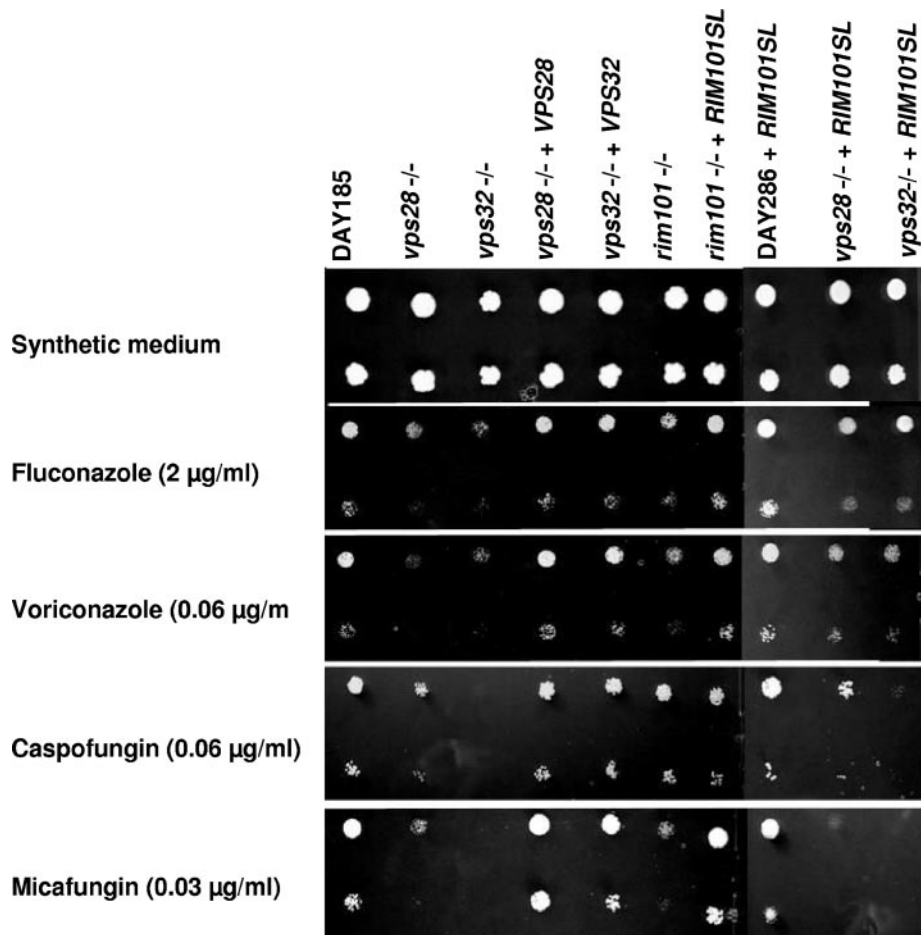


FIG. 2. Sensitivities of *C. albicans* strains to antifungal agents. The strains are indicated above the lanes. All strains are prototrophic derivatives of the Arg<sup>-</sup> Ura<sup>-</sup> His<sup>-</sup> strain BWP17 (4). Droplets (3.5 µl) at two dilutions (10<sup>5</sup> and 10<sup>4</sup> cells/ml) were spotted on synthetic complete medium (3) and synthetic complete medium buffered at pH 7.0 with 150 mM HEPES and supplemented with antifungal agents. The plates were incubated at 37°C for 48 h.

Inactivation of *RIM101* resulted in SDS, but not CFW or nikkomycin Z, susceptibility (Fig. 1, *rim101*<sup>-/-</sup>). SDS sensitivity elicited by *vps* mutations, however, is independent of Rim101p activation, since expression of *RIM101SL*, while suppressing the SDS sensitivity of the *rim101*<sup>-/-</sup> mutant, had no effect on *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> mutant susceptibilities (Fig. 1A). Similarly, the CFW sensitivities of *vps* mutants, which were not bypassed by *RIM101SL* and were not displayed by the *rim101*<sup>-/-</sup> mutant, appeared to be independent of an effect of *vps* genes on the Rim pathway. Expression of *RIM101SL*, surprisingly, increased the nikkomycin Z tolerance of the control strain (DAY286+*RIM101SL*) and of the *vps28*<sup>-/-</sup> mutant (Fig. 1B). This shows that, although inactivation of the Rim pathway has no effect on nikkomycin Z tolerance, constitutive activation of the pathway increases tolerance for unknown reasons.

The yeast cell wall is constructed around large, intricate glucan molecules (8). Since *VPS* genes affect cell wall integrity, we tested them for a possible effect on susceptibility to antifungal drugs, like echinocandins, which specifically target  $\beta$ -1,3-glucan synthesis.

The MICs of the echinocandins caspofungin (CAS) and micafungin (MCF) and of the azoles fluconazole (FLC) and voriconazole (VRC) were determined using the CLSI (formerly NCCLS) broth microdilution method (12a). We discarded experiments showing reduced growth of the strains with deletions compared to the DAY185 control (4). Both *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> null mutants showed MICs different from that of DAY185 (Table 1), but the results were not consistently reproducible.

Indeed, although the CLSI protocol is recommended for clinical MIC testing, agar plate assays seem to be more reliable for mutant analysis (20, 21). Agar plate assays, carried out on synthetic complete medium containing semi-inhibitory drug concentrations, confirmed that both *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> null mutants were more susceptible to FLC, VRC, CAS, and MCF than the isogenic DAY185 control strain (Fig. 2). Growth inhibitions in these assays were clear, thus validating MIC observations (Fig. 2 shows one example). Growth inhibition of the strains with *VPS* deleted was observed over the following concentration ranges (in  $\mu\text{g/ml}$ ): 1 to 4 for FLC, 0.03 to 0.12 for VRC and CAS, and 0.015 to 0.06 for MCF. The slight growth defect observed for the *vps32*<sup>-/-</sup> mutant on the no-drug control plates was confirmed by growth rate measurements (3) but was not significant enough (2.3 h versus 1.7 h) to account for the hypersensitivity of the strain. The susceptibilities of the strains with *VPS* deleted to amphotericin B and flucytosine were not affected (data not shown). Complementation restored the susceptibility of the control strain to all drugs tested (Fig. 2 and Table 1). The *rim101*<sup>-/-</sup> deletion strain was also hypersensitive to FLC, VRC, CAS, and MCF, and introduction of the constitutive allele *RIM101SL* restored wild-type susceptibility (the *rim101*<sup>-/-</sup> strain is hypersensitive to 0.12  $\mu\text{g/ml}$  of CAS on agar plates [data not shown]). *RIM101SL* also restored normal resistance levels to azoles in *VPS* mutants (Fig. 2 and Table 1), confirming direct involvement of the Rim pathway in azole sensitivity, as in *S. cerevisiae* (14). The echinocandin hypersensitivity of the *vps* null mutants appeared to be independent of the Rim pathway, since the *RIM101SL* allele had no suppressive effect on the echinocandin hypersensitivity of *vps28*<sup>-/-</sup> and *vps32*<sup>-/-</sup> mutants.

In conclusion, our data show that deletions of *VPS28* and *VPS32* increase *C. albicans* susceptibility to drugs that directly interfere with cell wall assembly at the level of chitin synthesis and/or deposition (nikkomycin Z and CFW) or at the level of  $\beta$ -1,3-glucan network construction (echinocandins) independently of the Rim pathway. These data suggest that *vps* mutations perturb localization and/or recycling of surface proteins involved in cell wall maintenance. They also lead to azole hypersensitivity, but the latter phenotype seems to result directly from their effect on the Rim pathway.

This work was supported by the Direction de la Recherche Clinique of the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, by the Centre National de la Recherche Scientifique, and by grants from Merck & Company and Fujisawa, Inc., through funding of M.C.

Strains with *RIM101* deleted, the reference strain BWP17, and UAU1 carrying a plasmid were generous gifts from A. P. Mitchell.

#### REFERENCES

- Babst, M. 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**:2–9.
- Blanchin-Roland, S., G. D. Costa, and C. Gaillardin. 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* **151**:3627–3637.
- Cornet, M., F. Bidard, P. Schwarz, G. Da Costa, S. Blanchin-Roland, F. Dromer, and C. Gaillardin. 2005. Deletions of endocytic components *VPS28* and *VPS32* affect growth at alkaline pH and virulence through both *RIM101*-dependent and *RIM101*-independent pathways in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **73**:7977–7987.
- Davis, D., J. E. Edwards, Jr., A. P. Mitchell, and A. S. Ibrahim. 2000. *Candida albicans* *RIM101* pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* **68**:5953–5959.
- Davis, D. A., V. M. Bruno, L. Loza, S. G. Filler, and A. P. Mitchell. 2002. *Candida albicans* *Mds3p*, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics* **162**:1573–1581.
- Enloe, B., A. Diamond, and A. P. Mitchell. 2000. A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **182**:5730–5736.
- Herbrecht, R., D. W. Denning, T. F. Patterson, J. E. Bennett, R. E. Greene, J. W. Oestmann, W. V. Kern, K. A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R. H. Rubin, J. R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillet, E. Thiel, P. H. Chandrasekar, M. R. Hodges, H. T. Schlam, P. F. Troke, and B. de Pauw. 2002. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* **347**:408–415.
- Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf. 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **39**(Suppl. 1):1–8.
- Kullas, A. L., M. Li, and D. A. Davis. 2004. *Snf7p*, a component of the ESCRT-III protein complex, is an upstream member of the *RIM101* pathway in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* **3**:1609–1618.
- Kullberg, B. J., J. D. Sobel, M. Ruhnke, P. G. Pappas, C. Viscoli, J. H. Rex, J. D. Cleary, E. Rubinstein, L. W. Church, J. M. Brown, H. T. Schlam, I. T. Oborska, F. Hilton, and M. R. Hodges. 2005. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* **366**:1435–1442.
- Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**:1546–1554.
- Mora-Duarte, J., R. Betts, C. Rotstein, A. L. Colombo, L. Thompson-Moya, J. Smietana, R. Lupinacci, C. Sable, N. Kartsonis, and J. Perfect. 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **347**:2020–2029.
- NCCLS. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, 2nd ed. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Ostrosky-Zeichner, L., J. H. Rex, P. G. Pappas, R. J. Hamill, R. A. Larsen, H. W. Horowitz, W. G. Powderly, N. Hyslop, C. A. Kauffman, J. Cleary, J. E. Mangino, and J. Lee. 2003. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3149–3154.
- Parsons, A. B., R. L. Brost, H. Ding, Z. Li, C. Zhang, B. Sheikh, G. W. Brown, P. M. Kane, T. R. Hughes, and C. Boone. 2004. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.* **22**:62–69.
- Patterson, T. F. 2005. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* **366**:1013–1025.
- Penalva, M. A., and H. N. Arst, Jr. 2004. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:425–451.

17. **Pfaller, M. A., R. N. Jones, S. A. Messer, M. B. Edmond, and R. P. Wenzel.** 1998. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **31**:327–332.
18. **Popolo, L., and M. Vai.** 1998. Defects in assembly of the extracellular matrix are responsible for altered morphogenesis of a *Candida albicans phr1* mutant. *J. Bacteriol.* **180**:163–166.
19. **Richard, M., P. De Groot, O. Courtin, D. Poulain, F. Klis, and C. Gaillardin.** 2002. GPI7 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Microbiology* **148**:2125–2133.
20. **Sanglard, D., F. Ischer, O. Marchetti, J. Entenza, and J. Bille.** 2003. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol. Microbiol.* **48**:959–976.
21. **Schuetzler-Muehlbauer, M., B. Willinger, G. Krapf, S. Enzinger, E. Presterl, and K. Kuchler.** 2003. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol. Microbiol.* **48**:225–235.
22. **Shiflett, S. L., D. M. Ward, D. Huynh, M. B. Vaughn, J. C. Simmons, and J. Kaplan.** 2004. Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**:10982–10990.
23. **Walsh, T. J., H. Tepler, G. R. Donowitz, J. A. Maertens, L. R. Baden, A. Dmoszynska, O. A. Cornely, M. R. Bourque, R. J. Lupinacci, C. A. Sable, and B. E. dePauw.** 2004. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N. Engl. J. Med.* **351**:1391–1402.
24. **Xu, W., F. J. Smith, Jr., R. Subaran, and A. P. Mitchell.** 2004. Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **15**:5528–5537.



La troisième partie du projet avait pour but de préciser la fonction des protéines Rim9p et Rim21p dans la voie Rim chez *C. albicans*. Il était prévu également de préciser à quel niveau de la voie Rim les facteurs de la voie d'endocytose Vps28p et Vps32p interagissaient. L'hypothèse de travail était que les protéines Vps agissaient dans la transmission du signal pH en aval des protéines Rim9p et/ou Rim21p que l'on suppose être les récepteurs membranaires de ce signal. Pour vérifier cette hypothèse le projet comportait :

**1. La construction des mutants nuls chez *C. albicans* des gènes *RIM9* et *RIM21* :**

Nous avons utilisé deux méthodes de disruption différentes de celle utilisée pour déléter les gènes *VPS28* et *VPS32*.

**2. L'étude des phénotypes des mutants *rim9* et *rim21* vis-à-vis de la réponse au pH :**

Le phénotype de ces mutants n'avait pas été décrit chez *C. albicans*. Les mutants nuls *rim9* et *rim21* présentent un phénotype *rim* typique et le phénotype du mutant *rim9* n'est pas atténué comme les mutants des gènes homologues décrits chez *A. nidulans* et *Y. lipolytica*.

**3. Tester la suppression du phénotype pH et l'induction de la voie Rim par la surexpression de *VPS32***

La surexpression du gène *VPS32* dans les mutants *rim8*, *rim9* et *rim21* a été obtenue en intégrant ce gène sous contrôle du promoteur inductible *MET3*. Cette surexpression ne permet pas de restaurer l'activation de la voie Rim dans ces mutants.

Ces résultats vont faire l'objet d'un troisième article à soumettre.

**C.Article 3 :**

“Homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *RIM9* and *RIM21* genes are required for ambient pH signalling in *Candida albicans*”.

**Homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* *RIM9* and *RIM21* genes are required for ambient pH signalling in *Candida albicans***

Muriel Cornet<sup>1,2</sup>, Mathias L. Richard<sup>1</sup> and Claude Gaillardin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microbiologie et Génétique Moléculaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Institut National de la Recherche Agronomique UMR1238, Centre National de la Recherche Scientifique UMR2585, 78850 Thiverval-Grignon, France.

<sup>2</sup> Microbiologie, Hôtel-Dieu, 1 place du parvis Notre-Dame, 75181 Paris Cedex 04, France.

\* Corresponding author: Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA, CBAI, 78850 Thiverval-Grignon, France. Tel.: 33 1 30 81 54 52. Fax: 33 1 30 81 54 57. E-mail: [claud.gaiillardin@grignon.inra.fr](mailto:claud.gaiillardin@grignon.inra.fr)

Running title: *RIM9* and *RIM21* in *Candida albicans*

## **Abstract**

In fungi, ambient pH sensing is governed by the conserved Rim101 signalling pathway. Most of the components of the pathway have been analyzed and found to be functionally conserved in the pathogenic yeast *Candida albicans*, except for the postulated sensors Rim9p and Rim21p. Here we report that homologues of both *RIM9* and *RIM21* are required for Rim-dependent signalling in *C. albicans*. Like in *S. cerevisiae*, Rim9p exists in *C. albicans* as a short form which is essential for signal transduction, contrary to the longer version observed in *Aspergillus nidulans* and *Yarrowia lipolytica* which appears partially dispensable.

## Introduction

Adaptation to ambient pH is a key factor of *Candida albicans* virulence in mice models . Responses to ambient pH are mediated by a conserved fungal signal transduction pathway named Pal in filamentous fungi and Rim in yeasts . The pathway involves a protein cascade that activates a transcriptional factor, called PacC and Rim101, in fungi and yeasts respectively. At acidic pH, PacC/Rim101p exists in an inactive full-length form that is cleaved and thus activated at neutral-alkaline pH . Studies in *Aspergillus nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae* indicate that external pH sensing involves Rim21p/PalH, Dfg16p, Rim9p/PalI and Rim8p/PalF. Rim21p/PalH and Dfg16p display seven trans-membrane domains and are thought to form a heterodimeric pH sensing receptor, possibly in cooperation with Rim9p/PalI, a four-transmembrane domain protein . PalF is an arrestin that in *A. nidulans* binds PalH and becomes phosphorylated and ubiquitinated at neutral-alkaline pH in a partially PalI dependent way . Vacuolar protein sorting (Vps) factors, that form the ESCRT complexes required for endosomal-sorting of membrane receptors, have recently been recognized as members of the Rim pathway . The current model suggests that the pathway is activated at neutral-alkaline pH through endocytosis of Rim8p bound to Dfg16p and Rim21p, possibly with the cooperation of Rim9p. Endocytosed Rim8p then triggers association of Vps32p/Snf7p (referred as Vps32p hereafter) and other ESCRT factors to the endosome membrane . Vps32p is then able to recruit Rim20p, Rim101p and Rim13p, the latter being the protease that cleaves Rim101p .

Interestingly, mutants of *Pall/RIM9* have been reported to be leaky in two fungal species, *A. nidulans* and *Yarrowia lipolytica* (11, 12, 14). On the contrary, *rim9* mutants of *S. cerevisiae* exhibited a tight defect in Rim101p processing, ion tolerance or entry into meiosis, three responses that are mediated by the Rim pathway in this organism . In this study, we characterize homozygous deletions of both *RIM9* and *RIM21* in *C. albicans* and show that both Rim9p and Rim21p are strictly required for Rim-dependent signalling in *C. albicans*. In

addition, we show that overexpression of *VPS32* cannot bypass the *rim8*, *rim9*, and *rim21* deletions.

## Materials and Methods

### *Culture media and phenotypic tests*

All media have been previously described (7). Growth phenotypes were checked on SC (pH 5.3), SC buffered with 50 mM glycine-NaOH at pH 10.0, YPD and YPD containing 200mM LiCl. For filamentation assays, we used the M199 medium (Invitrogen, Paisley, UK) or SC liquid medium without methionine and cysteine when induction of the *MET3* promoter was necessary ; media were buffered at pH 4.0 and pH 7.5 with 150 mM HEPES. Data were averaged from three independent experiments.

### *DNA and RNA techniques*

Standard recombinant DNA techniques were performed as previously described . Gene expression was determined by quantitative Real-Time PCR using a Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) as previously described (7). The following primer-pairs were used: OFB16-OFB17 for *RIM101*, OFB22-OFB23 for *PHR1*, OFB32-OFB33 for *ACT1*, and OFB40-OFB41 for *PHR2* , OFB61 ACATGGGGAATACGA TGTAGACAAAGT OFB62 GGTTGTGGTTTTGCCTTTTGAGCTG for *VPS32*. For each gene, experiments were carried out four times, using two cDNA samples from two independent cultures.

### *Construction of strains*

All *C. albicans* strains were derived from BWP17 (*ura3Δ ::λimm434/ura3Δ ::λimm434 his1::hisG /his1::hisG arg4::hisG/arg4::hisG*) . Complete homozygous deletion of *RIM9* Orf 19.101 (*rim9Δ ::URA3/ rim9Δ ::ARG4*; strain MC23) was constructed using two consecutive rounds of transformation using two gene-disruption products amplified from pGEM-*URA3*

and pRS-*ARG4* with the primers OMC21 ACTCAGATAAAGCCTTAATGTTGT-TAATAATCTCTGCTTTGTCTCTACAAAGAATCACGCTAGTAAGTACCATGTAAGT-TAATGCATCTCAATAACCAGTGGAATTGTGAGCGGATA and OMC22 TTATACTG-GTCGTAAATTTTGTAAATTCTATGAACTCATGTGGACTGCTTCCACGTCTAGAAT-CATCAGTGTCAAGGAAAGTTCTTGGTTCTACGATGCTGATTTCCCAGTCAC-GACGTT .

Three *rim9* *-/-* homozygotes obtained from two independent heterozygotes were verified by Southern blot analysis.

Disruption of *RIM21* (*rim21::URA3/rim21::URA3*; strain MC21) was obtained using the *hisG-CaURA3-hisG* cassette as previously described . *RIM21* open reading frame (ORF) was amplified from BWP17 with OMC1 CAAGTAGTTACAGTAAGTCTCC and OMC2 CATTCTTCGTCTGTGGTTGCTG and then ligated to pGEM-T-easy (Promega, Charbonnières, France) to generate pMC1. The *hisG-CaURA3-hisG* cassette was inserted into *HpaI* digested pMC1 to replace a 483 bp fragment of the 1590bp-*RIM21* ORF to generate pMC2. BWP17 was then transformed by pMC2 digested by *NotI* to release the *RIM21-hisG-CaURA3-hisG* cassette. Three heterozygous Ura<sup>+</sup> transformants were subjected to 5-fluoro-orotic acid selection to excise the URA<sup>+</sup> cassette as previously described . The three Ura<sup>-</sup> transformants were then used to disrupt the second allele using the same disruption cassette. Two Ura<sup>+</sup> *rim21* *-/-* homozygotes obtained from two Ura<sup>-</sup> independent heterozygotes were verified by Southern blot analysis.

pINA1337 (F. Bidard, unpublished), a derivative of pFLAG-*MET3* carrying the *HIS1* cassette was used to revert all deleted strains MC23, MC21, *rim8* *-/-* (DAY61) to histidine prototrophy after linearization by *SwaI* and targeting to the *HIS1* locus.

For complementation studies *RIM9* and *RIM21* genes were amplified from BWP17 genomic DNA with primer pairs OMC28 AGGTTTTCACTTCAAGAAGTC / OMC29 AGATTTGGC

GGAGATCTGTA and OMC30 GGAAAGCTAAAAAACGGT / OMC31 GAGATGTCC TTATATTTTA, respectively. Accuracy of amplified products was checked by DNA sequencing. The two genes were first inserted in pGEM-T-easy (Promega) and then in pDDB78 carrying the *HIS1* cassette digested with *NotI* to give pMC3 and pMC4, respectively. pMC3 and pMC4 were linearized by *NruI* and targeted to the *HIS1* locus of MC23 and MC21 to construct *rim9*<sup>-/+</sup>*RIM9* and *rim21*<sup>-/+</sup>*RIM21*, respectively.

To determine whether overexpression of *VPS32* suppressed the Rim phenotype, we used pINA1352 a derivative of pINA1337 which carries *VPS32* under the control of the *MET3* promoter inducible by methionine and cysteine starvation. pINA1352 was linearized by *SwaI* and targeted to the *HIS1* locus of MC21, MC23, DAY61, DAY5 (*rim101*<sup>-/-</sup>), and of the DAY286 control strain to generate *rim21*<sup>-/+</sup>*VPS32*, *rim9*<sup>-/+</sup>*VPS32*, *rim8*<sup>-/+</sup>*VPS32*, *rim101*<sup>-/+</sup>*VPS32* and DAY286-*VPS32*, respectively. The *rim8*<sup>-/+</sup>*VPS32*, *rim101*<sup>-/+</sup>*VPS32* and DAY286-*VPS32* strains were verified by Southern blot analysis.

## Results

### Requirement for Rim9p and Rim21p in Rim pathway function in *Candida albicans*

Rim9p/PalI and Rim21p/PalH are predicted to be sensors of the Rim pathway in filamentous fungi and yeasts . However, they have not been characterized in *C. albicans*. We created homozygous disruptions of *RIM9* and *RIM21* in BWP17 and checked them for associated phenotypic traits characteristic of *rim* mutants in *C. albicans*.

Growth under alkaline conditions of two independent homozygous clones for each *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim21*<sup>-/-</sup> strains was compared on solid SC medium to that of a *rim101*<sup>-/-</sup> clone and of *RIM*<sup>+</sup> control strains DAY185 and BWP17 which are prototrophic or auxotrophic for arginine, histidine and uracil, respectively. As shown in Fig.1, *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim21*<sup>-/-</sup> mutants grew as well as the reference strains on non-buffered SC medium (pH 5.3). At pH 10.0, the *rim21*<sup>-/-</sup> strain was unable to form colonies and both *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim101*<sup>-/-</sup> were severely affected with *rim9*<sup>-/-</sup> being slightly less affected than *rim101*<sup>-/-</sup>. No growth defect could be evidenced at pH 9.0 on solid Sc medium for any of these strains (not shown). Both *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim21*<sup>-/-</sup> strains showed a growth defect on YPD medium with 200mM LiCl and we noted that the *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim101*<sup>-/-</sup> LiCl phenotypes were comparable (Fig. 1). Growth at alkaline pH and on LiCl medium was totally restored after integration of one copy of the corresponding wild-type allele at the *HIS1* locus (Fig. 1). These results show that Rim9p and Rim21p are required for alkaline response and ion homeostasis, both of which are controlled by the Rim pathway .

The Rim pathway is required for alkaline pH-induced filamentation . We assayed the *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim21*<sup>-/-</sup> mutants for their ability to form hyphae in M199 buffered at pH 7.5. As shown in Fig. 2, the reference strains BWP17 and DAY185 formed an average of 92% ± 10% and 94% ± 4% hyphae at pH 7.5, respectively (Fig. 2 A and B). The *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim21*<sup>-/-</sup> mutants produced hyphae less than 5% hyphae at pH 7.5, similarly to the *rim101*<sup>-/-</sup> mutant (Fig2



D, F and C, respectively). This filamentation defect was totally suppressed in the complemented strains which exhibited  $93\% \pm 7\%$  and  $87\% \pm 8\%$  of hyphal cells, respectively (Fig 2 E and G). At pH 4.0, cells of all strains were in the yeasts form (data not shown). These results indicate that in *C. albicans* both *RIM9* and *RIM21* are required for alkaline induced hyphae formation.

The effects of *RIM9* and *RIM21* deletions on the transcription of the alkaline-induced genes (*RIM101* and *PHR1*) and of the alkaline-repressed gene *PHR2* were estimated by quantitative Real-Time PCR on transcripts extracted from cells grown at pH 4.0 and pH 7.5, using actin transcripts as a reference (Fig. 3).

In the *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim21*<sup>-/-</sup> backgrounds and at pH 4.0, the *RIM101*, *PHR1* and *PHR2* mRNA levels were not significantly affected (Fig. 3). At pH 7.5, both homozygous deletions of *RIM9* and *RIM21* significantly decreased *RIM101* expression and abolished *PHR1* expression, whereas *PHR2* expression derepressed up to its level at acidic pH in the respective reference strain. These effects are completely similar to those observed with the *RIM101* homozygous deletion (Fig. 3). Complementation of the *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim21*<sup>-/-</sup> homozygous deleted strains with one copy of their corresponding wild-type allele restored a wild-type phenotype.

These results confirm that Rim9p and Rim21p are required at alkaline pH for *PHR1* and *RIM101* induction and for *PHR2* repression, two processes known to require Rim101p activation.

### ***VPS32* overexpression does not bypass defects in upstream Rim components**

Current models present Vps32p as an essential factor for the assembly of the Rim20p, Rim13p and Rim101p components which are needed for Rim101p proteolysis. We wondered if overexpression of *VPS32* could bypass defects of upstream Rim components, like Rim8p, Rim9p and Rim21p. Overexpression of *VPS32* was driven by inducing a *MET3:VPS32* gene fusion. We checked for alkaline pH-induced filamentation in a SC liquid medium without

methionine and cysteine buffered at pH 4.0 and pH 7.5 and at 37°C. At pH 4.0 all the strains were in the yeast form. As expected, at pH 7.5, both the wild type DAY185 and the DAY286+*VPS32* strains showed an average of  $90 \pm 2$  % and  $92 \pm 2$  % of hyphae, respectively, whereas the *rim8*<sup>-/-</sup>, *rim101*<sup>-/-</sup>, *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim21*<sup>-/-</sup> mutants produced less than 5% hyphae (data not shown).

Overexpression of the *VPS32* gene in the *rim21*<sup>-/-</sup>+*VPS32*, *rim9*<sup>-/-</sup>+*VPS32*, *rim8*<sup>-/-</sup>+ *VPS32* and *rim101*<sup>-/-</sup>+ *VPS32* strains was unable to restore alkaline pH-induced filamentation, resulting in less than 5% hyphae (data not shown). We confirmed *VPS32* overexpression in these strains by quantitative Real-Time PCR. The *VPS32* transcription level in strains carrying the inducible extra-copy of *VPS32* was significantly higher ( $P < 0.05$ ) using the non-parametric Kruskal-Wallis test) than in the control without extra copy of *VPS32*, except for strain *rim8*<sup>-/-</sup> +*VPS32* at pH 4.0 ( $P = 0.4$ ) (Fig. 4). These results suggest that overexpression of *VPS32* alone was not sufficient to restore the Rim pathway in *rim8*, *rim9* and *rim21* mutants.

## Discussion

Our results show that, in *C. albicans*, both Rim9p and Rim21p are essential for growth in alkaline conditions and for LiCl tolerance. The growth defect at pH10 was slightly less pronounced for the *rim9* mutant than for the *rim101* mutant, but still remained very significant as compared to the DAY185 reference strain. Both *RIM9* and *RIM21* are required for alkaline pH-induced filamentation and for the regulation of alkaline-induced and alkaline-repressed genes. In conclusion, both genes seem equally required for activation of the Rim pathway. This is in stark contrast to the situation reported for *A. nidulans* and *Y. lipolytica*, where *PALI/RIM9* deletions led to less extreme phenotype than other mutants of the pathway . In *S. cerevisiae*, the *RIM9* deletion is not leaky and leads to defects very similar to those displayed by *rim101*, *rim8* or *rim13* mutants . Thus, Rim9p appears essential for the Rim pathway activation in *S. cerevisiae* and *C. albicans* but not in *A. nidulans* or *Y. lipolytica*. We notice that Rim9p from *S. cerevisiae* and *C. albicans* diverges from its homologues in *A. nidulans* or *Y. lipolytica* by the loss of a ~300 aa C-terminal hydrophilic tail . As short forms of Rim9p are encoded by all hemiascomycetous genomes sequenced so far (not shown), a strong requirement for Rim9p is predicted for all those yeasts.

In *S. cerevisiae*, Rim101p processing by Rim13p occurs in a complex associating Rim20p and Vps32p . Here we show that *VPS32* overexpression alone is not sufficient to bypass the deletion of upstream components and thus probably to assemble this complex.

## Acknowledgements

We are grateful to Alistair J.P. Brown for generously providing pMB7. Plasmids carrying the *MET3* promoter were kindly donated by Y. Uehara, and strains deleted for *RIM101*, *RIM8* and BWP17, pDDB71 and pDDB78 were a generous gift from A.P. Mitchel.

## Figure legends:

Fig. 1. Sensitivity of *C. albicans* strains to ambient pH and LiCl. The strains were (from left to the right): BWP17 (control strain for *rim21*<sup>-/-</sup>), DAY185 (control strain for *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim101*<sup>-/-</sup>), DAY25 (*rim101*<sup>-/-</sup>), *rim9*<sup>-/-</sup>, *rim9*<sup>-/-</sup>+*RIM9*, *rim21*<sup>-/-</sup>, *rim21*<sup>-/-</sup>+*RIM21*. Droplets of two dilutions ( $10^5$  and  $10^4$  cells/ml) were spotted on SC medium (pH 5.3) and SC medium buffered at pH 10.0 and on YPD medium and YPD plus LiCl 200mM. Plates were incubated at 30°C for 48h except for the plate at pH 10.0 which was incubated for 4 days.

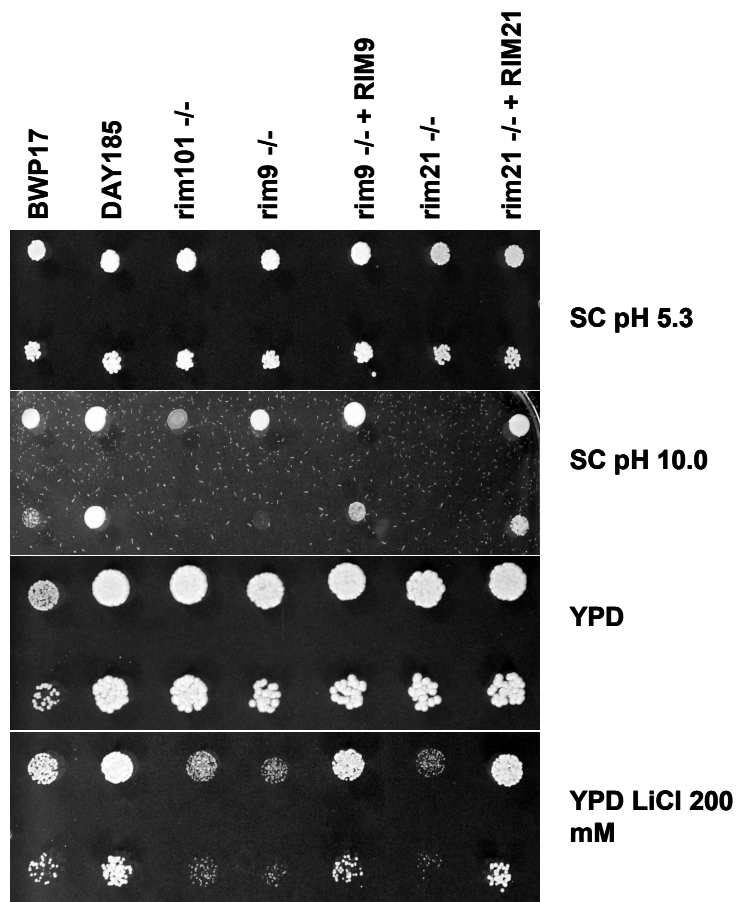
Fig. 2. Morphology of *C. albicans* cells in M199 medium adjusted to pH 7.5. The strains were: A: BWP17 (control strain for *rim21*<sup>-/-</sup>), B: DAY185 (control strain for *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim101*<sup>-/-</sup>), C: DAY25 (*rim101*<sup>-/-</sup>), D: *rim9*<sup>-/-</sup>, E: *rim9*<sup>-/-</sup>+*RIM9*, F: *rim21*<sup>-/-</sup>, G: *rim21*<sup>-/-</sup>+*RIM21*.

Fig. 3. Expression patterns of alkaline-induced genes (*RIM101*, *PHR1*) and acid-induced gene (*PHR2*) in *C. albicans* strains at pH 4.0 and pH 7.5. The strains were (from left to the right) BWP17 (control strain for *rim21*<sup>-/-</sup>), DAY185 (control strain for *rim9*<sup>-/-</sup> and *rim101*<sup>-/-</sup>), DAY25 (*rim101*<sup>-/-</sup>), *rim9*<sup>-/-</sup>, *rim9*<sup>-/-</sup>+*RIM9*, *rim21*<sup>-/-</sup>, *rim21*<sup>-/-</sup>+*RIM21*. Expression levels were calculated relative to the expression of the *ACT1* reference gene. Data are average of four experiments.

Fig. 4. Expression patterns of *VPS32* in *C. albicans* strains at pH 4.0 and pH 7.5. The strains were (from left to the right). DAY185 (control strain), DAY286+*VPS32*, DAY25 (*rim101*<sup>-/-</sup>), DAY25+*VPS32*, *rim8*<sup>-/-</sup>, *rim8*<sup>-/-</sup>+*VPS32*, *rim9*<sup>-/-</sup>, *rim9*<sup>-/-</sup>+*VPS32*, *rim21*<sup>-/-</sup>, *rim21*<sup>-/-</sup>+*VPS32*. Expression levels were calculated relative to the expression of the *ACT1* reference gene. Data are average of four experiments.



Fig. 1



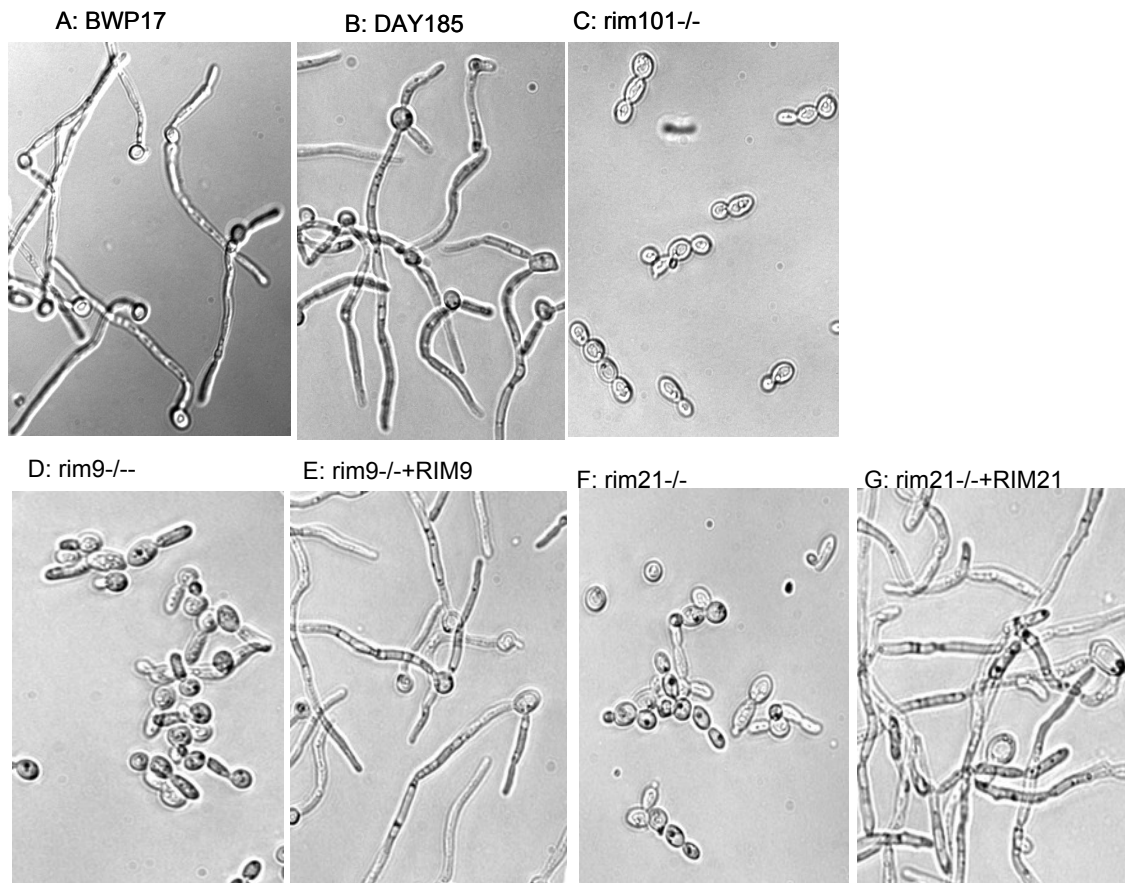


Fig. 2

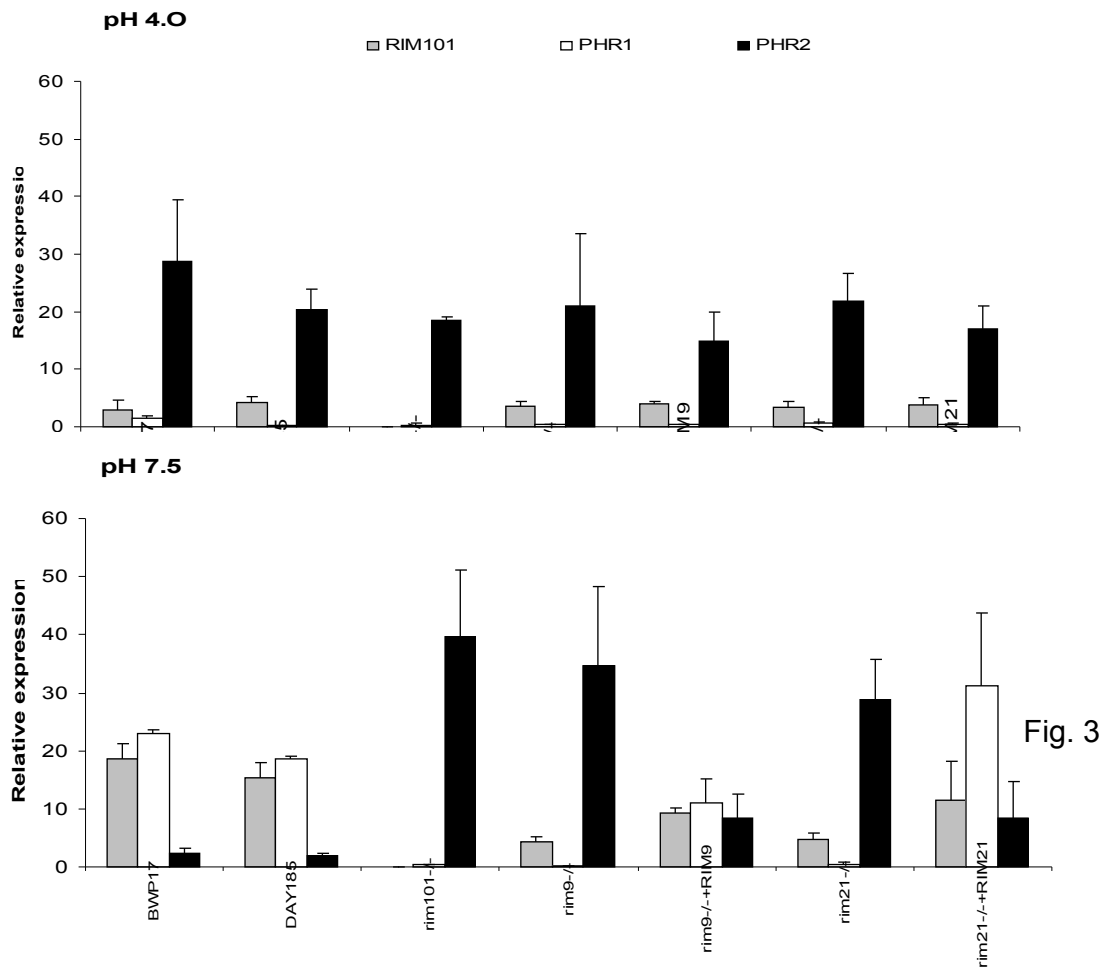
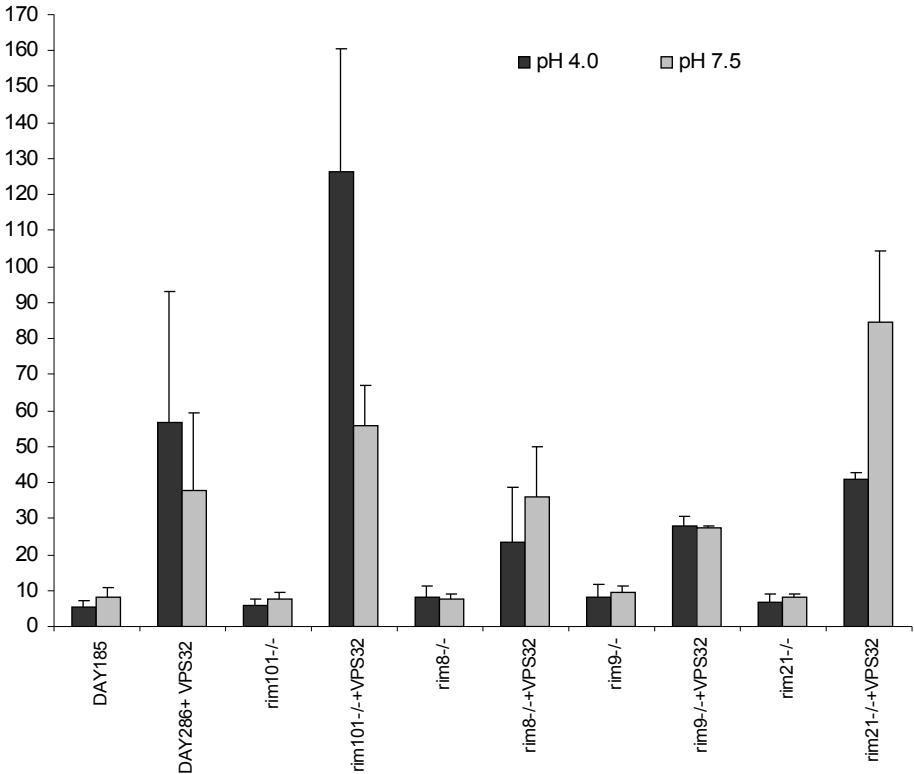




Fig. 4



## IV. Conclusion et perspectives

Nous avons montré que les protéines Vps28p et Vps32p étaient impliquées dans la morphogénèse, la structure de la paroi et la résistance aux antifongiques de façon à la fois dépendante et indépendante de la voie Rim. Ces résultats suggèrent que le rôle de la voie d'endocytose dans la régulation des réponses de la cellule et son adaptation à des modifications de son environnement est probablement majeur ce qui pourrait expliquer l'implication de ces protéines dans la virulence de *C. albicans*. Les mécanismes mis en jeu peuvent être directs et spécifiques comme lors de l'activation de la voie de signalisation du pH. Ils peuvent également être non spécifiques, la voie MVB intervenant globalement dans les réponses de la cellule.

### ***Mécanismes spécifiques des effets de l'inhibition de la voie d'endocytose ou de la voie Rim***

La voie MVB assure l'internalisation des récepteurs membranaires, leur recyclage et leur dégradation. Le rôle de cette voie dans l'activation de la voie Rim est probablement de transmettre le signal pH, soit par l'endocytose d'un récepteur transformé, soit par la modification du pH de l'endosome lui-même (Boysen 2006, Hayashi 2005). La voie MVB pourrait contribuer à l'activation d'une autre voie essentielle : la voie Pkc1-MAP kinase qui participe au maintien de l'intégrité cellulaire, à la morphogénèse et à la virulence (Diez-Orejas 1997, Levin 2005, Kumamoto 2005, Monge 2006). Cette activation pourrait se faire, de la même façon que l'activation de la voie Rim, par la transmission d'un signal correspondant à l'altération de la paroi ou à la perception d'agressions extérieures.

Chez *S. cerevisiae*, Wsc1p et Mid2p sont les senseurs membranaires de la voie PKC. L'inhibition de la voie PKC chez *S. cerevisiae* entraîne une abolition du mécanisme compensateur initié par Rlmp. Ce mécanisme induit une augmentation de la quantité de chitine en réparation d'un défaut de paroi et se traduit par une hypersensibilité des cellules au CFW (Figure 9) (Ketela 1999, Garcia 2004, Levin 2005). Les mutants *vps* chez *S. cerevisiae* présentent un phénotype au CFW différent selon que les facteurs Vps délétés agissent précocement ou tardivement dans la MVB. Ainsi, les mutants « tardifs », impliquant les protéines du complexe de dissociation comme Vps4p et Vps60p (ainsi que Vps24p, Bro1p, Vta1p, Did2p et Vps44p) sont hypersensibles et accumulent la chitine. À l'inverse, les mutants des gènes situés en amont (tels Vps32p/Snf7p et la plupart des gènes codant les composants des com-

plexes ESCRT-I, -II, -III) sont résistants au CFW et présentent le même phénotype qu'un mutant *mid2* (Ketela 1999, Shiflett 2004). La voie MVB pourrait intervenir dans la voie PKC dans la transmission des signaux. Elle pourrait intervenir également dans le mécanisme compensateur au niveau de la mobilisation de la chitine synthase Chs3p stockée dans les chitosomes et transportée vers la membrane. Les mutants des facteurs Vps, agissant précocement dans la voie MVB, pourraient inhiber le stockage de Chs3p en empêchant la formation des chitosomes et/ou leur transfert à la membrane plasmique à partir de l'endosome. Par contre, les mutants *vps*, bloquant la dissociation des complexes ESCRT, entraîneraient une accumulation de Chs3p dans les chitosomes et pourraient permettre ensuite la mobilisation massive de l'enzyme vers la paroi. Ainsi, on retrouve probablement les mêmes effets que ceux décrits avec la voie Rim et les mutants *vps* (Hayashi 2005). La voie PKC serait inhibée par les mutants *vps* agissant précocement car ils supprimeraient la transmission du signal et/ou la formation des chitosomes. Elle serait activée par les mutants *vps* qui inhibent la dissociation des complexes ESCRT ou leur transfert constitutif à la membrane. Cette hypothèse pourrait être validée chez *S. cerevisiae* en testant la suppression des mutants de la voie PKC comme *mid2*, *wsc1*, *pkc1*, *bck1*, *slt2* ou *rlm1* par les mutations *vps4* ou *vps24*. Il serait également intéressant de regarder la localisation de Chs3p dans ces mutants.

Par ailleurs, la voie PKC est impliquée dans la tolérance de *S. cerevisiae* à la caspofungine (Reinoso-Martin 2003). Elle induit une augmentation de la chitine dans la paroi par l'activation du mécanisme compensateur en réponse à la diminution des  $\beta$  1,3 D-glucanes. L'inhibition de la voie PKC pourrait expliquer l'hypersensibilité à la caspofungine décrite pour les mutants *vps22*, *vps25*, *vps32* chez *S. cerevisiae* (Markovitch 2004, Oshero 2003).

*S. cerevisiae* est généralement considéré comme un bon modèle pour étudier la paroi de *C. albicans* (Kapteyn 2000). Cependant, chez *C. albicans*, la voie Pkc1-MAP kinase est moins bien connue (Monge 2006). Même si l'existence de senseurs membranaires répondant aux altérations de la paroi n'a pas été confirmée chez *C. albicans*, la voie Pkc1-MAP kinase est activée par les agressions osmotiques, oxydatives et les antifongiques. *MKCl* est un homologue de *SLT2* de *S. cerevisiae*, mais ses gènes cibles n'ont pas été identifiés et l'existence d'un mécanisme de compensation activé par *MKCl* n'a pas été confirmée (Figure 9) (Navarro-Garcia 1995, 2005). Nos résultats mettent en évidence certaines différences dans le contrôle de l'intégrité cellulaire chez *C. albicans*.

Les mutants *vps28* et *vps32* de *C. albicans* sont hypersensibles au CFW alors qu'ils sont résistants chez *S. cerevisiae* (Shiflett 2004). Chez *C. albicans*, le mécanisme compensa-

teur aboutissant à l'augmentation de la chitine dans la paroi n'est donc pas inhibé par ces délétions. Deux hypothèses, non exclusives, pourraient expliquer cette différence.

- La première est que le mécanisme compensateur pourrait être activé indépendamment de la voie Pkc1-MAP kinase ou qu'il existe d'autres mécanismes compensateurs chez *C. albicans* permettant à la cellule de répondre aux agressions en l'absence de la voie Pkc1-MAP kinase. L'augmentation de la chitine dans la paroi du mutant *vps32* échappe à l'activité inhibitrice de la Nikkomycine Z qui agit en bloquant les chitine-synthases Chs1p, Chs2p et Chs3p (Kim 2002). Ce résultat est en faveur de l'existence d'un autre mécanisme compensateur indépendant de ces trois chitines synthase.
- La deuxième hypothèse est que le signal d'altération de la paroi pourrait être transmis à la voie Pkc1-MAP kinase indépendamment de la voie MVB.

L'hypersensibilité des mutants *vps* de *C. albicans* aux échinocandines pourrait être expliquée par l'action spécifique de la voie MVB sur la voie Pkc1-MAP kinase comme chez *S. cerevisiae*. Il a été montré que le mutant *mkl1* de *C. albicans* est hypersensible aux échinocandines, suggérant que la voie Pkc1-MAP kinase est impliquée dans l'activité de ces antifongiques (Navarro-Garcia 1998). Ces résultats sont plutôt en faveur de la première hypothèse : l'interruption de la voie Pkc1-MAP kinase par la voie MVB. L'hypersensibilité des mutants *vps* de *C. albicans* aux échinocandines pourrait être également liée en partie à l'inhibition de la voie Rim, car le mutant *rim101* est lui-même hypersensible. L'implication de la voie Rim dans le maintien de l'intégrité de la paroi a été décrite chez *S. cerevisiae*. Le mécanisme n'est pas clairement établi mais serait indépendant de la voie PKC, sans activation du mécanisme compensateur. Nos résultats concernant le mutant *rim101* de *C. albicans* sont concordants car celui-ci ne présente pas de phénotype particulier au CFW et à la Nikkomycine Z (Castrejon 2006).

Par ailleurs, la calcineurine est impliquée dans la tolérance de *S. cerevisiae* à la caspofungine. Le facteur transcriptionnel calcineurine-dépendant Crz1p active *FKS2* et la synthèse des  $\beta$ 1,3 D glucanes. Crz1p est également régulé par Rho1p (Levin 2005). L'inhibition de la voie de la calcineurine pourrait expliquer l'hypersensibilité à la caspofungine décrite pour des mutants *vps22*, *vps25*, *vps32* chez *S. cerevisiae* (Markovitch 2004, Osherov 2003). Les interactions entre la voie PKC et la voie de la calcineurine, décrites chez *S. cerevisiae*, n'ont pas été retrouvées chez *C. albicans*. Cependant, les deux voies ont été impliquées dans l'effet paradoxal (Wiederhold 2005).

Afin de préciser le mécanisme d'implication de la voie MVB dans le maintien de l'intégrité cellulaire et dans la résistance aux échinocandines, il serait intéressant d'évaluer, dans nos mutants *vps28* et *vps32*, la quantité des trois principaux constituants de la paroi : glucanes, mannoprotéines et chitine. De même, la mesure de l'expression des gènes de la voie Pkc1-MAP kinase *PKC1*, *BCK1*, *MKK1* et *MKCI* ainsi que de ceux impliqués dans la synthèse des  $\beta$ 1,3 D glucanes *RHO1* et *FKS1* et *FKS3* pourrait permettre de préciser ce mécanisme.

L'hypersensibilité des mutants *vps28* et *vps32* aux antifongiques azolés semble liée à l'interruption de la seule voie Rim, puisqu'elle est complètement supprimée par le gène codant pour la forme tronquée constitutivement active de Rim101p. Les interactions entre les gènes *RIM20* et *ERG11*, détectées chez *S. cerevisiae*, semblent donc conservées chez *C. albicans* (Parsons 2004). Il serait intéressant dans un premier temps de confirmer les interactions entre la voie Rim et la voie de biosynthèse de l'ergostérol en comparant la sensibilité de nos mutants *rim9* et *rim21* à celle du mutant *rim101*. Un effet direct de Rim101p sur l'expression des gènes de la voie *ERG* devrait être vérifié. Une répression de *ERG1* et *ERG3* (deux protéines de la membrane du RE) a été observée par M. Weyler après induction d'une forme active de Rim101p (non publié). De même, il n'est pas exclu que la voie Rim soit impliquée dans la résistance et/ou la tolérance aux azolés par d'autres mécanismes, comme les pompes à efflux ou la voie de la calcineurine. L'analyse de l'expression des gènes *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* et *MDR1* dans nos mutants et dans les souches supprimées par la forme tronquée de Rim101p permettrait peut-être de préciser le mécanisme d'implication de la voie Rim dans la résistance aux azolés.

### **Mécanismes non spécifiques des effets de l'inhibition de la voie d'endocytose**

Les effets de la voie MVB sur la morphogénèse, la paroi, la virulence, la résistance aux antifongiques azolés et aux échinocandines peuvent également être non spécifiques. L'altération de la régulation des récepteurs membranaires peut entraîner une altération globale de la réponse de la cellule aux agressions. Nous avons montré que les délétions des gènes *VPS* chez *C. albicans* augmentent la sensibilité au CFW, au SDS, aux antifongiques azolés et aux échinocandines. De plus, elles altèrent la morphogénèse et la virulence. Ces effets sont très comparables aux effets de l'inhibition de la voie de la calcineurine qui agit comme un régulateur global (Sanglard 2003). La calcineurine agit en facilitant les réponses de la cellule aux

agressions ou aux modifications de la paroi ou de la membrane induites par les antifongiques. La voie MVB pourrait agir en amont lors de la transmission des signaux.

Il serait intéressant de déterminer si les protéines Vps jouent un rôle dans la tolérance aux antifongiques, notamment aux azolés. Les tests de sensibilité en milieux solide et liquide que nous avons effectués ne permettent pas de faire la différence entre une augmentation de sensibilité, liée à une inhibition de la croissance, et une diminution de la tolérance, liée à une réduction de la survie des levures (Sanglard 2003). La mesure de l'activité fongicide des azolés vis-à-vis des mutants *vps* et *rim* permettrait de préciser s'il s'agit d'une diminution de la tolérance.

### **Perspectives**

Un des principaux résultats obtenus au cours de ce travail de thèse concerne la potentialisation des effets de l'inhibition de la voie Rim par l'inhibition de la voie MVB chez *C. albicans*. Il a été montré que l'interruption de la voie Rim chez *C. albicans* altère la réponse au pH et réduit sa virulence (Davis 2000a, 2000b). Nous avons montré que les délétions de *VPS28* ou de *VPS32*, non seulement induisent les mêmes déficits, mais les aggravent, grâce à des effets qui sont à la fois dépendants et indépendants de la voie Rim. Ces déficits touchent la filamentation, la structure de la paroi, la résistance aux antifongiques et la virulence. Ainsi les mutants *vps* sont incapables de filamenter dans tous les milieux inducteurs de la filamentation y compris sérum et milieu de Lee (résultats non publiés), alors que la filamentation des mutants *rim* n'est affectée qu'en milieu alcalin (Davis 2000a). L'hypersensibilité aux agents déstabilisant la paroi comme le CFW, qui n'a pas été retrouvée dans un mutant *rim*, traduit une modification de la structure de la paroi. Cette altération de la paroi rend les mutants *vps* encore plus hypersensibles que les mutants *rim* aux antifongiques agissant sur la paroi ou la membrane. L'inhibition de la voie MVB induit une réduction majeure de la virulence de *C. albicans* plus importante que l'inhibition de la seule voie Rim. Ces effets additifs, à la fois sur la virulence et sur la sensibilité aux antifongiques, obtenus par l'interruption des deux voies Rim et MVB grâce à l'inhibition des protéines Vps, pourraient avoir des implications dans la recherche de nouvelles cibles pour les traitements antifongiques. Le choix de la voie MVB dans une stratégie de développement de nouvelles thérapeutiques permettrait d'associer une diminution de la virulence à une augmentation de sensibilité à des antifongiques existants et non toxiques tels que les azolés et les échinocandines.

La voie Rim est spécifique des champignons et donc constitue à elle seule une cible intéressante (Penalva 2002, 2004). La voie MVB, par contre, est conservée chez les eucaryotes et il paraît difficile de l'inhiber sans entraîner une toxicité pour les cellules humaines. Cependant, les derniers résultats sur le fonctionnement de la voie MVB suggèrent que les protéines du complexe ESCRT II ne sont pas indispensables à la voie MVB dans les cellules humaines (la protéine Alix, entre autres), permettant le lien entre les complexes ESCRT I et ESCRT III (Bowers 2004, Bowers 2006). EAP30, EAP20, EAP45 sont les homologues respectifs de Vps22p, Vps25p et Vps36p (complexe ESCRT II) dans les cellules humaines. Elles ont pour fonction de réprimer la protéine ELL qui est un facteur transcriptionnel oncogène à l'origine de translocations fréquemment retrouvées dans les leucémies. ELL est à la fois un activateur et un inhibiteur de l'activité de l'ARN polymérase II (Schmidt 1999, Kamura 2001). Le rôle des protéines EAP30, EAP20 et EAP45 dans la voie MVB n'est pas confirmé et leur inactivation n'a pas eu de conséquence sur la dégradation des protéines membranaires étudiées (Bowers 2006). Ces résultats suggèrent que la voie MVB dans les cellules humaines est plus élaborée que chez les levures et qu'elle comporte des redondances permettant notamment de shunter le complexe ESCRT II. Chez les levures, Bro1p, qui est l'homologue de Alix, ne s'associe pas au complexe ESCRT I et ne permet donc pas de relier ESCRT I et ESCRT III. Les complexes ESCRT I et ESCRT III sont associés directement par des liaisons entre Vps28p et Vps37p du complexe ESCRT I et Vps20p du complexe ESCRT III (Figure 14) (Bowers 2004). Cependant, il a été montré que les trois protéines du complexe ESCRT II chez *S. cerevisiae* et Vps36p chez *C. albicans* sont nécessaires à l'activation de la voie Rim (Vps22p et Vps25p n'ont pas été étudiées chez *C. albicans*) (Xu 2004). Ceci confirme que le complexe ESCRT II est indispensable à la voie MVB chez les levures et que les interactions directes existant entre Vps28p, Vps37p du complexe ESCRT I et Vps20p du complexe ESCRT III ne suffisent pas à compenser l'inactivation du complexe ESCRT II. L'implication des autres facteurs du complexe ESCRT II chez *C. albicans* ainsi que les phénotypes de leurs mutants concernant la virulence et la sensibilité aux antifongiques restent à étudier. Il est probable qu'ils soient comparables à celui de *vps28* et *vps32*, compte tenu du rôle essentiel du complexe ESCRT II chez les levures. Les protéines Vps du complexe ESCRT II, Vps22p, Vps25p ou Vps36p, ainsi que les mécanismes d'activation et de recrutement de ce complexe, pourraient donc être des cibles intéressantes pour les traitements des infections fongiques.

## Bibliographie

- 1) Abi-Said, D., E. Anaissie, O. Uzun, I. Raad, H. Pinzcowski, and S. Vartivarian. 1997. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis.* 24:1122-8.
- 2) Accoceberry, I., and T. Noel. 2006. Antifungals cellular targets and mechanisms of resistance. *Therapie.* 61:195-9.
- 3) Albrecht, A., A. Felk, I. Pichova, J. R. Naglik, M. Schaller, P. de Groot, D. Maccallum, F. C. Odds, W. Schafer, F. Klis, M. Monod, and B. Hube. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Proteases of *Candida albicans* Target Proteins Necessary for Both Cellular Processes and Host-Pathogen Interactions. *J Biol Chem* 281:688-694.
- 4) Arechiga-Carvajal, E. T., and J. Ruiz-Herrera. 2005. The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot Cell.* 4:999-1008.
- 5) Arst, H. N., and M. A. Penalva. 2003. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet.* 19:224-31.
- 6) Babst, M. 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic.* 6:2-9.
- 7) Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr. 2002. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell.* 3:271-82.
- 8) Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa, and S. D. Emr. 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *Embo J.* 17:2982-93.
- 9) Bachmann, S. P., T. F. Patterson, and J. L. Lopez-Ribot. 2002. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol.* 40:2228-30.
- 10) Baek, Y. U., S. J. Martin, and D. A. Davis. 2006. Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall beta-glycosidase Phr2. *Eukaryot Cell.* 5:1550-9.
- 11) Barwell, K. J., J. H. Boysen, W. Xu, and A. P. Mitchell. 2005. Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 4:890-9.
- 12) Bennett, R. J., and A. D. Johnson. 2003. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *Embo J* 22:2505-15.
- 13) Bennett, R. J., and A. D. Johnson. 2005. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* 59:233-55.



- 14) Bensen, E. S., S. J. Martin, M. Li, J. Berman, and D. A. Davis. 2004. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol.* 54:1335-51.
- 15) Berman, J., and P. E. Sudbery. 2002. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3:918-30.
- 16) Bilodeau, P. S., J. L. Urbanowski, S. C. Winistorfer, and R. C. Piper. 2002. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol.* 4:534-9.
- 17) Blignaut, E., J. Molepo, C. Pujol, D. R. Soll, and M. A. Pfaller. 2005. Clade-related amphotericin B resistance among South African *Candida albicans* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 53:29-31.
- 18) Bow, E. J., M. Laverdiere, N. Lussier, C. Rotstein, M. S. Cheang, and S. Ioannou. 2002. Antifungal prophylaxis for severely neutropenic chemotherapy recipients: a meta analysis of randomized-controlled clinical trials. *Cancer.* 94:3230-46.
- 19) Bowers, K., J. Lottridge, S. B. Helliwell, L. M. Goldthwaite, J. P. Luzio, and T. H. Stevens. 2004. Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 5:194-210.
- 20) Bowers, K., S. C. Piper, M. A. Edeling, S. R. Gray, D. J. Owen, P. J. Lehner, and J. P. Luzio. 2006. Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII. *J Biol Chem.* 281:5094-105. Epub 2005 Dec 20.
- 21) Boysen, J. H., and A. P. Mitchell. 2006. Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway. *Mol Biol Cell.* 17:1344-53.
- 22) Brown, D. H., Jr., A. D. Giusani, X. Chen, and C. A. Kumamoto. 1999. Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol Microbiol* 34:651-62.
- 23) Bulawa, C. E., D. W. Miller, L. K. Henry, and J. M. Becker. 1995. Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10570-4.
- 24) Caddick, M. X., A. G. Brownlee, and H. N. Arst, Jr. 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet.* 203:346-53.
- 25) Calabrese, D., J. Bille, and D. Sanglard. 2000. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology.* 146:2743-54.
- 26) Calderone, R. and N. Gow. 2002. Host recognition by *Candida* sp. in *Candida* and *Candidiasis*, p67. ASM Press, Washington DC.
- 27) Cameron, M. L., W. A. Schell, S. Bruch, J. A. Bartlett, H. A. Waskin, and J. R. Perfect. 1993. Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to ther-

- apy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:2449-53.
- 28) Caracuel, Z., C. Casanova, M. I. Roncero, A. Di Pietro, and J. Ramos. 2003. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na<sup>+</sup>-ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell.* 2:1246-52.
  - 29) Castrejon, F., A. Gomez, M. Sanz, A. Duran, and C. Roncero. 2006. The RIM101 pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Eukaryot Cell.* 5:507-17.
  - 30) Chabasse, D., J. Bouchara, L. De Gentile, and J. Chennebault. 1988. Chlamydospores de *Candida albicans* observées in vivo chez un patient atteint de SIDA. *Ann. Biol.Clin.* 46:817-818.
  - 31) Chauhan, N., D. Li, P. Singh, R. Calderone, and M. Kruppa. 2002. The cell wall of *Candida* spp. in *Candida* and *Candidiasis*, p159. ASM Press, Washington DC.
  - 32) Chen C, Y. Y., Shih H, Lo H. 2006. REP1 as a negative regulator on fluconazole resistance in *Candida albicans*., 46th Interescience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, CA.
  - 33) Chen, J., S. Zhou, Q. Wang, X. Chen, T. Pan, and H. Liu. 2000. Crk1, a novel Cdc2-related protein kinase, is required for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol.* 20:8696-708.
  - 34) Chen-Wu, J. L., J. Zwicker, A. R. Bowen, and P. W. Robbins. 1992. Expression of chitin synthase genes during yeast and hyphal growth phases of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 6:497-502.
  - 35) Chiu, Y. S., S. C. Chang, P. R. Hsueh, J. L. Wang, H. Y. Sun, and Y. C. Chen. 2006. Survey of amphotericin B susceptibility of *Candida* clinical isolates determined by Etest. *J Microbiol Immunol Infect.* 39:335-41.
  - 36) Clemons, K. V., M. Espiritu, R. Parmar, and D. A. Stevens. 2006. Assessment of the paradoxical effect of caspofungin in therapy of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:1293-7.
  - 37) C. L. S. I. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. M27A. Wayne, PA.
  - 38) Coste, A., V. Turner, F. Ischer, J. Morschhauser, A. Forche, A. Selmecki, J. Berman, J. Bille, and D. Sanglard. 2006. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics.* 172:2139-56.
  - 39) Coste, A. T., M. Karababa, F. Ischer, J. Bille, and D. Sanglard. 2004. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell.* 3:1639-52.
  - 40) Cowen, L. E., J. B. Anderson, and L. M. Kohn. 2002. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 56:139-65.

- 41) Cowen, L. E., and S. Lindquist. 2005. Hsp90p potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science*. 309:2185-9.
- 42) Dannaoui, E. 2004. Initiation of an active surveillance program on yeast-related bloodstream infections in France (ASPYRIF), 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 1-4 May 2004, Prague. Abstract P-986, Prague.
- 43) Davis, D. 2003. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet*. 44:1-7.
- 44) Davis, D., R. B. Wilson, and A. P. Mitchell. 2000a. RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*. 20:971-8.
- 45) Davis, D., J. E. Edwards, Jr., A. P. Mitchell, and A. S. Ibrahim. 2000b. *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun*. 68:5953-9.
- 46) Davis, D. A., V. M. Bruno, L. Loza, S. G. Filler, and A. P. Mitchell. 2002. *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics*. 162:1573-81.
- 47) De Bernardis, F., F. A. Muhlschlegel, A. Cassone, and W. A. Fonzi. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 66:3317-25.
- 48) de Groot, P. W., K. J. Hellingwerf, and F. M. Klis. 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20:781-96.
- 49) Denison, S. H., S. Negrete-Urtasun, J. M. Mingot, J. Tilburn, W. A. Mayer, A. Goel, E. A. Espeso, M. A. Penalva, and H. N. Arst, Jr. 1998. Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol Microbiol*. 30:259-64.
- 50) Denison, S. H., S. Negrete-Urtasun, J. M. Mingot, J. Tilburn, W. A. Mayer, A. Goel, E. A. Espeso, M. A. Penalva, and H. N. Arst. 2001. Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous Addendum. *Mol Microbiol*. 39:211.

- 51) Diez-Orejas, R., G. Molero, F. Navarro-Garcia, J. Pla, C. Nombela, and M. Sanchez-Peréz. 1997. Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun.* 65:833-7.
- 52) Douglas, C. M., J. A. D'Ippolito, G. J. Shei, M. Meinz, J. Onishi, J. A. Marrinan, W. Li, G. K. Abruzzo, A. Flattery, K. Bartizal, A. Mitchell, and M. B. Kurtz. 1997. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:2471-9.
- 53) Douglas, C. M., F. Foor, J. A. Marrinan, N. Morin, J. B. Nielsen, A. M. Dahl, P. Mazur, W. Baginsky, W. Li, M. el-Sherbeini, and et al. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:12907-11.
- 54) Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. De Montigny, C. Marck, C. Neuveglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J. M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. De Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J. M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G. F. Richard, M. L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaiia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J. L. Souciet. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature.* 430:35-44.
- 55) Edmond, M. B., S. E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. N. Jones, and R. P. Wenzel. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis.* 29:239-44.
- 56) Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet. 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 3:685-702.
- 57) Eisenhaber, B., G. Schneider, M. Wildpaner, and F. Eisenhaber. 2004. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* 337:243-53.
- 58) Fidel, P. L., Jr., and J. D. Sobel. 1994. The role of cell-mediated immunity in candidiasis. *Trends Microbiol.* 2:202-6.
- 59) Fonzi, W. A. 1999. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol* 181:7070-9.
- 60) Galagan, J. E., M. R. Henn, L. J. Ma, C. A. Cuomo, and B. Birren. 2005. Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome Res.* 15:1620-31.
- 61) Garcia, R., C. Bermejo, C. Grau, R. Perez, J. M. Rodriguez-Pena, J. Francois, C. Nombela, and J. Arroyo. 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem.* 279:15183-95.

- 62) Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*. 107:55-65.
- 63) Gaur, N. A., R. Manoharlal, P. Saini, T. Prasad, G. Mukhopadhyay, M. Hoefler, J. Morschhauser, and R. Prasad. 2005. Expression of the CDR1 efflux pump in clinical *Candida albicans* isolates is controlled by a negative regulatory element. *Biochem Biophys Res Commun*. 332:206-14.
- 64) Ghannoum, M. A. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 13:122-43.
- 65) Ghannoum, M. A., J. H. Rex, and J. N. Galgiani. 1996. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. *J Clin Microbiol*. 34:489-95.
- 66) Ghannoum, M. A., B. Spellberg, S. M. Saporito-Irwin, and W. A. Fonzi. 1995. Reduced virulence of *Candida albicans* PHR1 mutants. *Infect Immun*. 63:4528-30.
- 67) Ghannoum, M. A., I. Swairjo, and D. R. Soll. 1990. Variation in lipid and sterol contents in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *J Med Vet Mycol*. 28:103-15.
- 68) Giusani, A. D., M. Vinces, and C. A. Kumamoto. 2002. Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics* 160:1749-53.
- 69) Gonzalez-Lopez, C. I., R. Szabo, S. Blanchin-Roland, and C. Gaillardin. 2002. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics*. 160:417-27.
- 70) Gow, N. A., A. J. Brown, and F. C. Odds. 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*. 5:366-71.
- 71) Gow, N. A., P. W. Robbins, J. W. Lester, A. J. Brown, W. A. Fonzi, T. Chapman, and O. S. Kinsman. 1994. A hyphal-specific chitin synthase gene (CHS2) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6216-20.
- 72) Hajjeh, R. A., A. N. Sofair, L. H. Harrison, G. M. Lyon, B. A. Arthington-Skaggs, S. A. Mirza, M. Phelan, J. Morgan, W. Lee-Yang, M. A. Ciblak, L. E. Benjamin, L. T. Sanza, S. Huie, S. F. Yeo, M. E. Brandt, and D. W. Warnock. 2004. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol*. 42:1519-27.
- 73) Han, Y., and J. E. Cutler. 1995. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect Immun* 63:2714-9.
- 74) Hayashi, M., T. Fukuzawa, H. Sorimachi, and T. Maeda. 2005. Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Mol Cell Biol*. 25:9478-90.

- 75) Haynes, M. P., P. L. Chong, H. R. Buckley, and R. A. Pieringer. 1996. Fluorescence studies on the molecular action of amphotericin B on susceptible and resistant fungal cells. *Biochemistry*. 35:7983-92.
- 76) Herranz, S., J. M. Rodriguez, H. J. Bussink, J. C. Sanchez-Ferrero, H. N. Arst, Jr., M. A. Penalva, and O. Vincent. 2005. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:12141-6.
- 77) Herrero, A. B., P. Magnelli, M. K. Mansour, S. M. Levitz, H. Bussey, and C. Abeijon. 2004. KRE5 gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall composition and hypha formation properties. *Eukaryot Cell* 3:1423-32.
- 78) Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:195-201.
- 79) Holz, R. W. 1974. The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes. *Ann N Y Acad Sci*. 235:469-79.
- 80) Hope, W. W., L. Taberero, D. W. Denning, and M. J. Anderson. 2004. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:4377-86.
- 81) Hoyer, L. L., J. Clevenger, J. E. Hecht, E. J. Ehrhart, and F. M. Poulet. 1999. Detection of Als proteins on the cell wall of *Candida albicans* in murine tissues. *Infect Immun* 67:4251-5.
- 82) Hube B and J. Naglik. 2002. Extracellular hydrolases. In *Candida and candidiasis* p 107. ASM Press, Washington DC.
- 83) Hube, B., F. Stehr, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar, and W. Schafer. 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol*. 174:362-74.
- 84) Hull, C. M., R. M. Raisner, and A. D. Johnson. 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289:307-10.
- 85) Ito, T., T. Chiba, R. Ozawa, M. Yoshida, M. Hattori, and Y. Sakaki. 2001. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4569-74.
- 86) James, T. Y., F. Kauff, C. L. Schoch, P. B. Matheny, V. Hofstetter, C. J. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, H. T. Lumbsch, A. Rauhut, V. Reeb, A. E. Arnold, A. Amtoft, J. E. Stajich, K. Hosaka, G. H. Sung, D. Johnson, B. O'Rourke, M. Crockett, M. Binder, J. M. Curtis, J. C. Slot, Z. Wang, A. W. Wilson, A. Schussler, J. E. Longcore, K. O'Donnell, S. Mozley-Standridge, D. Porter, P. M. Letcher, M. J. Powell, J. W. Taylor, M. M. White, G. W. Griffith, D. R. Davies, R. A. Humber, J. B. Morton, J. Sugiyama, A. Y. Rossman, J. D. Rogers, D. H. Pfister, D. Hewitt, K. Hansen, S. Hambleton, R. A. Shoemaker, J. Kohlmeyer, B. Volkmann-Kohlmeyer, R. A. Spotts, M. Serdani, P. W. Crous, K. W. Hughes, K. Matsuura, E. Langer, G. Langer, W. A. Untereiner, R. Lucking, B. Budel, D. M. Geiser, A. Aptroot, P. Diederich, I. Schmitt, M. Schultz, R. Yahr, D. S. Hibbett, F. Lutzoni, D. J. McLaughlin, J. W. Spatafora, and R. Vilgalys. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443:818-22.

- 87) Jones, T., N. A. Federspiel, H. Chibana, J. Dungan, S. Kalman, B. B. Magee, G. Newport, Y. R. Thorstenson, N. Agabian, P. T. Magee, R. W. Davis, and S. Scherer. 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7329-34.
- 88) Jouault, T., C. Fradin, P. A. Trinel, A. Bernigaud, and D. Poulain. 1998. Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. *J Infect Dis* 178:792-802.
- 89) Kamura, T., D. Burian, H. Khalili, S. L. Schmidt, S. Sato, W. J. Liu, M. N. Conrad, R. C. Conaway, J. W. Conaway, and A. Shilatifard. 2001. Cloning and characterization of ELL-associated proteins EAP45 and EAP20. a role for yeast EAP-like proteins in regulation of gene expression by glucose. *J Biol Chem*. 276:16528-33.
- 90) Kapteyn, J. C., L. L. Hoyer, J. E. Hecht, W. H. Muller, A. Andel, A. J. Verkleij, M. Makarow, H. Van Den Ende, and F. M. Klis. 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* 35:601-11.
- 91) Karababa, M., E. Valentino, G. Pardini, A. T. Coste, J. Bille, and D. Sanglard. 2006. CRZ1, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 59:1429-51.
- 92) Katiyar, S., M. Pfaller, and T. Edlind. 2006. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:2892-4.
- 93) Katoh, K., H. Shibata, H. Suzuki, A. Nara, K. Ishidoh, E. Kominami, T. Yoshimori, and M. Maki. 2003. The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J Biol Chem*. 278:39104-13.
- 94) Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*. 106:145-55.
- 95) Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:893-905.
- 96) Ketela, T., R. Green, and H. Bussey. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol*. 181:3330-40.
- 97) Kim, M. K., H. S. Park, C. H. Kim, H. M. Park, and W. Choi. 2002. Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yeast*. 19:341-9.
- 98) Klionsky, D. J., H. Nelson, and N. Nelson. 1992. Compartment acidification is required for efficient sorting of proteins to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 267:3416-22.
- 99) Kondoh, O., Y. Tachibana, Y. Ohya, M. Arisawa, and T. Watanabe. 1997. Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* 179:7734-41.

- 100)Kullas, A. L., M. Li, and D. A. Davis. 2004. Snf7p, a component of the ESCRT-III protein complex, is an upstream member of the RIM101 pathway in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 3:1609-18.
- 101)Kullberg, B. J., J. D. Sobel, M. Ruhnke, P. G. Pappas, C. Viscoli, J. H. Rex, J. D. Cleary, E. Rubinstein, L. W. Church, J. M. Brown, H. T. Schlamm, I. T. Oborska, F. Hilton, and M. R. Hodges. 2005. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by flucanazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 366:1435-42.
- 102)Kumamoto, C. A., and M. D. Vines. 2005. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol* 59:113-33.
- 103)Lamb, T. M., and A. P. Mitchell. 2003. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 23:677-86.
- 104)Lamb, T. M., W. Xu, A. Diamond, and A. P. Mitchell. 2001. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J Biol Chem* 276:1850-6.
- 105)Lambert, M., S. Blanchin-Roland, F. Le Louedec, A. Lepingle, and C. Gaillardin. 1997. Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. *Mol Cell Biol* 17:3966-76.
- 106)Laverdiere, M., R. G. Lalonde, J. G. Baril, D. C. Sheppard, S. Park, and D. S. Perlin. 2006. Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *J Antimicrob Chemother*. 57:705-8. Epub 2006 Feb 7.
- 107)Law, D., C. B. Moore, and D. W. Denning. 1997. Amphotericin B resistance testing of *Candida* spp.: a comparison of methods. *J Antimicrob Chemother*. 40:109-12.
- 108)Law, D., C. B. Moore, H. M. Wardle, L. A. Ganguli, M. G. Keaney, and D. W. Denning. 1994. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. *J Antimicrob Chemother*. 34:659-68.
- 109)Leberer, E., D. Harcus, D. Dignard, L. Johnson, S. Ushinsky, D. Y. Thomas, and K. Schroppel. 2001. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 42:673-87.
- 110)Leidich, S. D., A. S. Ibrahim, Y. Fu, A. Koul, C. Jessup, J. Vitullo, W. Fonzi, F. Mirbod, S. Nakashima, Y. Nozawa, and M. A. Ghannoum. 1998. Cloning and disruption of caPL-B1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 273:26078-86.
- 111)Levin, D. E. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 69:262-91.



- 112) Li, M., S. J. Martin, V. M. Bruno, A. P. Mitchell, and D. A. Davis. 2004. *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot Cell*. 3:741-51.
- 113) Lo, H. J., J. R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G. R. Fink. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 90:939-49.
- 114) Lortholary, O. D., F. Dromer, Dannaoui E. 2002. Associations d'antifongiques.
- 115) Lotz, H., K. Sohn, H. Brunner, F. A. Muhlschlegel, and S. Rupp. 2004. RBR1, a novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by RIM101 and activated by NRG1. *Eukaryot Cell*. 3:776-84.
- 116) Luhtala, N., and G. Odorizzi. 2004. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol*. 166:717-29.
- 117) Lussier, M., A. M. White, J. Sheraton, T. di Paolo, J. Treadwell, S. B. Southard, C. I. Horenstein, J. Chen-Weiner, A. F. Ram, J. C. Kapteyn, T. W. Roemer, D. H. Vo, D. C. Bondoc, J. Hall, W. W. Zhong, A. M. Sdicu, J. Davies, F. M. Klis, P. W. Robbins, and H. Bussey. 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 147:435-50.
- 118) Magee, B. B., and P. T. Magee. 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science* 289:310-3.
- 119) Marchetti, O., J. M. Entenza, D. Sanglard, J. Bille, M. P. Glauser, and P. Moreillon. 2000. Fluconazole plus cyclosporine: a fungicidal combination effective against experimental endocarditis due to *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:2932-8.
- 120) Marchetti, O., P. Moreillon, J. M. Entenza, J. Vouillamoz, M. P. Glauser, J. Bille, and D. Sanglard. 2003. Fungicidal synergism of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans* is not dependent on multidrug efflux transporters encoded by the CDR1, CDR2, CaMDR1, and FLU1 genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:1565-70.
- 121) Markovich, S., A. Yekutieli, I. Shalit, Y. Shadkchan, and N. Osherov. 2004. Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:3871-6.
- 122) Marr, K. A., C. N. Lyons, T. R. Rustad, R. A. Bowden, and T. C. White. 1998. Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. *Antimicrob Agents Chemother*. 42:2584-9.
- 123) Marr, K. A., T. R. Rustad, J. H. Rex, and T. C. White. 1999. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. *Antimicrob Agents Chemother*. 43:1383-6.
- 124) Marr, K. A., K. Seidel, M. A. Slavin, R. A. Bowden, H. G. Schoch, M. E. Flowers, L. Corey, and M. Boeckh. 2000. Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. *Blood*. 96:2055-61.

- 125) Martins, M. D., M. Lozano-Chiu, and J. H. Rex. 1998. Declining rates of oropharyngeal candidiasis and carriage of *Candida albicans* associated with trends toward reduced rates of carriage of fluconazole-resistant *C. albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis.* 27:1291-4.
- 126) Mazur, P., N. Morin, W. Baginsky, M. el-Sherbeini, J. A. Clemas, J. B. Nielsen, and F. Foor. 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol.* 15:5671-81.
- 127) Meyer, V., A. Spielvogel, et al. (2005). "Alkaline pH-induced up-regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein (AFP) of *Aspergillus giganteus* is not mediated by the transcription factor PacC: possible involvement of calcineurin." *Mol Genet Genomics* 274(3): 295-306.
- 128) Mille, C., G. Janbon, F. Delplace, S. Ibata-Ombetta, C. Gaillardin, G. Strecker, T. Jouault, P. A. Trinel, and D. Poulain. 2004. Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem.* 279:47952-60. Epub 2004 Sep 3.
- 129) Miller, M. G., and A. D. Johnson. 2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell.* 110:293-302.
- 130) Mingot, J. M., E. A. Espeso, E. Diez, and M. A. Penalva. 2001. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol Cell Biol.* 21:1688-99.
- 131) Mio, T., M. Adachi-Shimizu, Y. Tachibana, H. Tabuchi, S. B. Inoue, T. Yabe, T. Yamada-Okabe, M. Arisawa, T. Watanabe, and H. Yamada-Okabe. 1997a. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* 179:4096-105.
- 132) Mio, T., T. Yamada-Okabe, T. Yabe, T. Nakajima, M. Arisawa, and H. Yamada-Okabe. 1997b. Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* KRE6 and SKN1: expression and physiological function. *J Bacteriol* 179:2363-72.
- 133) Monge, R. A., E. Roman, C. Nombela, and J. Pla. 2006. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology.* 152:905-12.
- 134) Monod, M., and Z. M. Borg-von. 2002. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biol Chem.* 383:1087-93.
- 135) Moore, R., T. 1998. in "The yeasts : a taxonomic study" Kutzman CP, Fell JW .Ed Elsevier, Amsterdam. p33-44.
- 136) Morgan, J. 2005. Global trends in candidemia: review of reports from 1995-2005. *Curr Infect Dis Rep.* 7:429-39.

- 137) Mouyna, I., T. Fontaine, M. Vai, M. Monod, W. A. Fonzi, M. Diaquin, L. Popolo, R. P. Hartland, and J. P. Latge. 2000. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* 275:14882-9.
- 138) Munro, C. A., R. K. Whitton, H. B. Hughes, M. Rella, S. Selvaggini, and N. A. Gow. 2003. CHS8-a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth. *Fungal Genet Biol* 40:146-58.
- 139) Munro, C. A., K. Winter, A. Buchan, K. Henry, J. M. Becker, A. J. Brown, C. E. Bulawa, and N. A. Gow. 2001. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol* 39:1414-26.
- 140) Navarro-Garcia, F., R. Alonso-Monge, H. Rico, J. Pla, R. Sentandreu, and C. Nombela. 1998. A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology*. 144:411-24.
- 141) Navarro-Garcia, F., B. Eisman, S. M. Fiuza, C. Nombela, and J. Pla. 2005. The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology*. 151:2737-49.
- 142) Navarro-Garcia, F., M. Sanchez, J. Pla, and C. Nombela. 1995. Functional characterization of the MKC1 gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol*. 15:2197-206.
- 143) Nickas, M. E., and M. P. Yaffe. 1996. BRO1, a novel gene that interacts with components of the Pkc1p-mitogen-activated protein kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 16:2585-93.
- 144) Niimi, K., K. Maki, F. Ikeda, A. R. Holmes, E. Lamping, M. Niimi, B. C. Monk, and R. D. Cannon. 2006. Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:1148-55.
- 145) N. N. N. I. S. 2002. Data summary from January 1992-june 2001. *Am J Infect Control* 2002 29:404-421.
- 146) Nolte, F. S., T. Parkinson, D. J. Falconer, S. Dix, J. Williams, C. Gilmore, R. Geller, and J. R. Wingard. 1997. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 41:196-9.
- 147) Odds, E. C. 1997. Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. *Mycoses*. 40:9-12.
- 148) Odorizzi, G., D. J. Katzmann, M. Babst, A. Audhya, and S. D. Emr. 2003. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*. 116:1893-903.
- 149) Osherov, N., Yekutieli A, Markowitz S, Shalit I, Shakhdan Y. 2003. A chemical genomics approach towards identification of mutants affecting resistance to Caspofungin in *Sac-*

charomyces cerevisiae., 43rd Interescience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL.

- 150) Osherov, N., G. S. May, N. D. Albert, and D. P. Kontoyiannis. 2002. Overexpression of Sbe2p, a Golgi protein, results in resistance to caspofungin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:2462-9.
- 151) Papon, N., T. Noel, M. Florent, S. Gibot-Leclerc, D. Jean, C. Chastin, J. Villard, and F. Chapeland-Leclerc. 2006. Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: Contribution of the FCY2, FCY1 and FUR1 genes to 5-fluorouracil and flucanazole cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 23:23.
- 152) Parsons, A. B., R. L. Brost, H. Ding, Z. Li, C. Zhang, B. Sheikh, G. W. Brown, P. M. Kane, T. R. Hughes, and C. Boone. 2004. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat Biotechnol* 22:62-9.
- 153) Patterson, T. F. 2005. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 366:1013-25.
- 154) Penalva, M. A., and H. N. Arst, Jr. 2004. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* 58:425-51.
- 155) Penalva, M. A., and H. N. Arst, Jr. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:426-46.
- 156) Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, R. A. Santillan, M. Martinez, D. Calabrese, D. Sanglard, and T. F. Patterson. 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:2676-84.
- 157) Pittet, D., and R. P. Wenzel. 1995. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. *Arch Intern Med.* 155:1177-84.
- 158) Podust, L. M., T. L. Poulos, and M. R. Waterman. 2001. Crystal structure of cytochrome P450 14alpha -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3068-73.
- 159) Porta, A., A. M. Ramon, and W. A. Fonzi. 1999. PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* palF, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 181:7516-23.
- 160) Poulain, D., C. Slomianny, T. Jouault, J. M. Gomez, and P. A. Trinel. 2002. Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun* 70:4323-8.
- 161) Ramon, A. M., and W. A. Fonzi. 2003. Diverged binding specificity of Rim101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC. *Eukaryot Cell.* 2:718-28.

- 162) Ramon, A. M., A. Porta, and W. A. Fonzi. 1999. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. *J Bacteriol.* 181:7524-30.
- 163) Reinoso-Martin, C., C. Schuller, M. Schuetzer-Muehlbauer, and K. Kuchler. 2003. The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell.* 2:1200-10.
- 164) Revankar, S. G., W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, O. P. Dib, A. W. Fothergill, S. W. Redding, M. G. Rinaldi, and T. F. Patterson. 1996. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis.* 174:821-7.
- 165) Rex, J. H., and M. A. Pfaller. 2002. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis.* 35:982-9.
- 166) Richard, M., S. Iyata-Ombetta, F. Dromer, F. Bordon-Pallier, T. Jouault, and C. Gailardin. 2002. Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. *Mol Microbiol.* 44:841-53.
- 167) Rieder, S. E., L. M. Banta, K. Kohrer, J. M. McCaffery, and S. D. Emr. 1996. Multilamellar endosome-like compartment accumulates in the yeast *vps28* vacuolar protein sorting mutant. *Mol Biol Cell.* 7:985-99.
- 168) Riggle, P. J., K. A. Andrutis, X. Chen, S. R. Tzipori, and C. A. Kumamoto. 1999. Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun* 67:3649-52.
- 169) Rogers, T. R. 2006. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? *Int J Antimicrob Agents.* 27:7-11.
- 170) Ruiz-Herrera, J., M. V. Elorza, E. Valentin, and R. Sentandreu. 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 6:14-29.
- 171) Runkhe, M. 2002. Skin and mucous membrane infections. In *Candida and candidiasis p* 307. ASM Press, Washington DC.
- 172) Rustad, T. R., D. A. Stevens, M. A. Pfaller, and T. C. White. 2002. Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. *Microbiology.* 148:1061-72.
- 173) Sanglard, D. 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol.* 5:379-85.
- 174) Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans, and J. Bille. 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:241-53.

- 175) Sanglard, D., F. Ischer, T. Parkinson, D. Falconer, and J. Bille. 2003a. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:2404-12.
- 176) Sanglard, D., F. Ischer, O. Marchetti, J. Entenza, and J. Bille. 2003b. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol.* 48:959-76.
- 177) Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod, and J. Bille. 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology.* 143:405-16.
- 178) Sanglard, D. and T. White. 2006. *Molecular principles of Antifungal drug resistance.* ASM Press, Washington DC.
- 179) Sanz, M., L. Carrano, C. Jimenez, G. Candiani, J. A. Trilla, A. Duran, and C. Roncero. 2005. *Candida albicans* strains deficient in CHS7, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology* 151:2623-36.
- 180) Sarthy, A. V., T. McGonigal, M. Coen, D. J. Frost, J. A. Meulbroek, and R. C. Goldman. 1997. Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the BGL2 gene encoding a 1,3-beta-glucosyltransferase. *Microbiology* 143 ( Pt 2):367-76.
- 181) Schmidt, A. E., T. Miller, S. L. Schmidt, R. Shiekhattar, and A. Shilatifard. 1999. Cloning and characterization of the EAP30 subunit of the ELL complex that confers derepression of transcription by RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 274:21981-5.
- 182) Schmitt, E. K., R. Kempken, and U. Kuck. 2001. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol Genet Genomics.* 265:508-18.
- 183) Schuetzer-Muehlbauer, M., B. Willinger, G. Krapf, S. Enzinger, E. Presterl, and K. Kuchler. 2003. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol.* 48:225-35.
- 184) Selmecki, A., A. Forche, and J. Berman. 2006. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science.* 313:367-70.
- 185) Shiflett, S. L., D. M. Ward, D. Huynh, M. B. Vaughn, J. C. Simmons, and J. Kaplan. 2004. Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279:10982-90.
- 186) Slagsvold, T., K. Pattni, L. Malerod, and H. Stenmark. 2006. Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol.* 16:317-26.
- 187) Soll, D. R. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 5:183-203.
- 188) Soll, D. R., S. R. Lockhart, and R. Zhao. 2003. Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2:390-7.

- 189) Song, J. L., J. B. Harry, R. T. Eastman, B. G. Oliver, and T. C. White. 2004. The *Candida albicans* lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase (ERG11) gene promoter is maximally induced after prolonged growth with antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:1136-44.
- 190) Sonneborn, A., B. Tebarth, and J. F. Ernst. 1999. Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun.* 67:4655-60.
- 191) Southard, S. B., C. A. Specht, C. Mishra, J. Chen-Weiner, and P. W. Robbins. 1999. Molecular analysis of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* MNN9, required for glycosylation of cell wall mannoproteins. *J Bacteriol* 181:7439-48.
- 192) Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283:1535-8.
- 193) Stehr, F., A. Felk, A. Gacser, M. Kretschmar, B. Mahnss, K. Neuber, B. Hube, and W. Schafer. 2004. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res.* 4:401-8.
- 194) Stevens, D. A., M. Ichinomiya, Y. Koshi, and H. Horiuchi. 2006. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3160-1.
- 195) Stevens, D. A., T. C. White, D. S. Perlin, and C. P. Selitrennikoff. 2005. Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 51:173-8.
- 196) Swanson, K. A., R. S. Kang, S. D. Stamenova, L. Hicke, and I. Radhakrishnan. 2003. Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *Embo J.* 22:4597-606.
- 197) Tilburn, J., J. C. Sanchez-Ferrero, E. Reoyo, H. N. Arst, Jr., and M. A. Penalva. 2005. Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members. *Genetics.* 171:393-401.
- 198) Tilburn, J., S. Sarkar, D. A. Widdick, E. A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M. A. Penalva, and H. N. Arst, Jr. 1995. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *Embo J.* 14:779-90.
- 199) Timpel, C., S. Strahl-Bolsinger, K. Ziegelbauer, and J. F. Ernst. 1998. Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* 273:20837-46.
- 200) Tortorano, A. M., L. Caspani, A. L. Rigoni, E. Biraghi, A. Sicignano, and M. A. Viviani. 2004. Candidosis in the intensive care unit: a 20-year survey. *J Hosp Infect.* 57:8-13.

- 201) Tortorano, A. M., C. Kibbler, J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor, and R. Grillot. 2006. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 27:359-66.
- 202) Trinel, P. A., E. Maes, J. P. Zanetta, F. Delplace, B. Coddeville, T. Jouault, G. Strecker, and D. Poulain. 2002. Candida albicans phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* 277:37260-71.
- 203) Trinel, P. A., Y. Plancke, P. Gerold, T. Jouault, F. Delplace, R. T. Schwarz, G. Strecker, and D. Poulain. 1999. The Candida albicans phospholipomannan is a family of glycolipids presenting phosphoinositolmannosides with long linear chains of beta-1,2-linked mannose residues. *J Biol Chem* 274:30520-6.
- 204) Umeyama, T., A. Kaneko, H. Watanabe, A. Hirai, Y. Uehara, M. Niimi, and M. Azuma. 2006. Deletion of the CaBIG1 gene reduces beta-1,6-glucan synthesis, filamentation, adhesion, and virulence in Candida albicans. *Infect Immun* 74:2373-81.
- 205) Valdivia, R. H., and R. Schekman. 2003. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10287-92.
- 206) van Burik, J. H., W. Leisenring, D. Myerson, R. C. Hackman, H. M. Shulman, G. E. Sale, R. A. Bowden, and G. B. McDonald. 1998. The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients. *Medicine (Baltimore)*. 77:246-54.
- 207) Vanden Bossche, H., P. Marichal, and F. C. Odds. 1994. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol*. 2:393-400.
- 208) Vardakas, K. Z., G. Samonis, A. Michalopoulos, E. S. Soteriades, and M. E. Falagas. 2006. Antifungal prophylaxis with azoles in high-risk, surgical intensive care unit patients: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Crit Care Med*. 34:1216-24.
- 209) Vincent, O., L. Rainbow, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., and M. A. Penalva. 2003. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* 23:1647-55.
- 210) Walsh, T. J., R. W. Finberg, C. Arndt, J. Hiemenz, C. Schwartz, D. Bodensteiner, P. Pappas, N. Seibel, R. N. Greenberg, S. Dummer, M. Schuster, and J. S. Holcenberg. 1999. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. *N Engl J Med*. 340:764-71.
- 211) Walsh, T. J., J. W. Hiemenz, N. L. Seibel, J. R. Perfect, G. Horwith, L. Lee, J. L. Silber, M. J. DiNubile, A. Reboli, E. Bow, J. Lister, and E. J. Anaissie. 1998. Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis*. 26:1383-96.



- 212) Wang, J. S., Y. L. Yang, C. J. Wu, K. J. Ouyang, K. Y. Tseng, C. G. Chen, H. Wang, and H. J. Lo. 2006. The DNA-binding domain of CaNdt80p is required to activate CDR1 involved in drug resistance in *Candida albicans*. *J Med Microbiol*. 55:1403-11.
- 213) White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden. 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 11:382-402.
- 214) Wiederhold, N. P., D. P. Kontoyiannis, R. A. Prince, and R. E. Lewis. 2005. Attenuation of the activity of caspofungin at high concentrations against *Candida albicans*: possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways. *Antimicrob Agents Chemother*. 49:5146-8.
- 215) Xu, W., and A. P. Mitchell. 2001. Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol* 183:6917-23.
- 216) Xu, W., F. J. Smith, Jr., R. Subaran, and A. P. Mitchell. 2004. Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 15:5528-37.
- 217) Yang, Y. L., S. Y. Li, H. H. Cheng, and H. J. Lo. 2005. Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in TSARY 2002. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 51:179-83.
- 218) Yesland, K., and W. A. Fonzi. 2000. Allele-specific gene targeting in *Candida albicans* results from heterology between alleles. *Microbiology*. 146:2097-104.
- 219) Young, L. Y., C. M. Hull, and J. Heitman. 2003. Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:2717-24.
- 220) Zaoutis, T. E., J. Argon, J. Chu, J. A. Berlin, T. J. Walsh, and C. Feudtner. 2005. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis*. 41:1232-9. Epub 2005 Sep 20.
- 221) Zhao, R., S. R. Lockhart, K. Daniels, and D. R. Soll. 2002. Roles of TUP1 in switching, phase maintenance, and phase-specific gene expression in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 1:353-65.