

Université de Montréal

Étude structure-fonction des transporteurs ABC de *Candida albicans* impliqués dans la
résistance aux agents antifongiques

par
Christian Gauthier

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D. en biologie moléculaire

Janvier, 2007

©, Christian Gauthier, 2007



QH

506

U54

2007

v. 007

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude structure-fonction des transporteurs ABC de *Candida albicans* impliqués dans la
résistance aux agents antifongiques

présentée par :
Christian Gauthier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Claude Labbé, Ph.D.

président-rapporteur

Martine Raymond, Ph.D.

directrice de recherche

Mathieu Cellier, Ph.D.

membre du jury

John W. Hanrahan, Ph.D.

examineur externe

Jean Barbeau, Ph.D.

représentant du doyen de la F.É.S.

RESUMÉ

Chez *Candida albicans*, une levure pathogène opportuniste, les gènes *CDR1* et *CDR2* codent pour des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) très similaires formés de deux moitiés contenant chacune un site de liaison à l'ATP (NBD: nucleotide binding domain) suivi de six segments transmembranaires. Leur surexpression cause la résistance aux antifongiques azolés utilisés pour le traitement des candidoses. L'objectif de mon projet est de comprendre les propriétés structurales et fonctionnelles des transporteurs Cdr1p et Cdr2p de *C. albicans*. Dans un premier volet, j'ai développé un système d'expression qui m'a permis de caractériser les similitudes et différences entre Cdr1p et Cdr2p. Les deux protéines sont correctement exprimées et fonctionnelles chez une souche de *Saccharomyces cerevisiae* hypersensible aux drogues, tel qu'évalué par immunobuvardage, par des tests de résistance aux antifongiques, ainsi que par un test de transport de la rhodamine, un substrat cytotoxique fluorescent. Des expériences de marquage avec le dérivé photoactivable [¹²⁵I]iodoaryl azido-rhodamine123 (IAARh123) ont démontré que les deux protéines lient la rhodamine et que cette liaison s'effectue autant par les moitiés N- ou C-terminales de Cdr2p, d'une manière indépendante l'une de l'autre. Cependant, la co-expression des deux moitiés est nécessaire afin de reconstituer un transporteur fonctionnel. J'ai également démontré qu'en présence de composés antifongiques, la molécule immunosuppressive FK520 inhibe la résistance causée par Cdr1p, mais n'affecte pas l'activité de Cdr2p. De plus, l'expression de Cdr1p entraîne une hypersensibilité au FK520, alors que les levures exprimant Cdr2p sont résistantes à ce composé.

Dans un deuxième volet, j'ai étudié les propriétés des NBD de Cdr2p. Les transporteurs Cdrp présentent dans le NBD N-terminal (NBD1) une modification surprenante dans un motif essentiel à la liaison et à l'hydrolyse de l'ATP (GX₄GCS/T au lieu de GX₄GKS/T). Afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles de cette substitution, j'ai muté la C191 atypique pour K ou A, K899 pour C ou A et j'ai construit un double mutant (C191K/K899C). Ces protéines mutantes sont correctement exprimées à la surface de la cellule et peuvent lier un dérivé photoactivable de l'ATP ([α -³²P]8-azido-ATP). Alors

que les mutations C191A et K899A réduisent légèrement la capacité de Cdr2p à lier l'ATP, la mutation C191K l'augmente clairement. Les niveaux d'activité de ces mutants ont été comparés à celui du Cdr2p sauvage dans des tests de résistance aux antifongiques et d'accumulation intracellulaire de rhodamine. Mes résultats indiquent que C191 dans le NBD1 contribue minimalement au transport des antifongiques, alors que l'intégrité du motif dans le NBD2 (K899) est essentielle au fonctionnement de Cdr2p. Cette constatation est également supportée par les résultats d'un test d'hydrolyse de l'ATP effectué à partir de fractions membranaires enrichies en Cdr2p. Le photomarquage des moitiés N- et C-terminales de Cdr2p révèle également une forte asymétrie des NBD de Cdr2p dans leur capacité à lier le $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]8\text{-azido-ATP}$.

Mes résultats démontrent que, malgré un haut niveau d'homologie, Cdr1p et Cdr2p présentent d'importantes différences fonctionnelles, suggérant des rôles biologiques distincts. Les NBD de ces transporteurs sont fortement asymétriques et contribuent positivement, mais d'une façon inégale au mécanisme de transport.

Mots clés : *Candida albicans*, résistance multiple aux antifongiques, transporteur ABC, *CDR1*, *CDR2*, pompe à efflux, domaine de liaison à l'ATP.

SUMMARY

In the opportunistic yeast pathogen *Candida albicans*, the *CDR1* and *CDR2* genes encode highly homologous ATP-binding cassette (ABC) transporters which are overexpressed in antifungal-resistant clinical isolates. These transporters are formed by two homologous halves, each containing an intracellular nucleotide-binding domain (NBD) followed by a membrane-associated domain. The objective of my project is to investigate the structural and functional properties of Cdr1p and Cdr2p. In the first part, I developed a heterologous expression system to characterize the similarities and differences between Cdr1p and Cdr2p. Both proteins were properly expressed and functional in a hypersensitive *Saccharomyces cerevisiae* strain, as determined by Western blotting, drug susceptibility assays, and efflux of rhodamine, a fluorescent cytotoxic substrate. I showed that Cdr1p and Cdr2p can bind the photoreactive analogue [¹²⁵I]iodoaryl-azido-rhodamine 123 (IAARh123) and that both halves of Cdr2p can bind rhodamine independently. However, co-expression of both halves is necessary to reconstitute a functional transporter. Interestingly, Cdr1p was found to confer hypersusceptibility to FK520, an immunosuppressive agent, whereas Cdr2p conferred resistance to this compound, uncovering a major functional difference between the two transporters. Furthermore, when administered in combination with antifungal drugs, FK520 sensitized cells expressing Cdr1p but not those expressing Cdr2p. Finally, we showed that Cdr2p confers hypersusceptibility to hydrogen peroxide and resistance to diamide, while Cdr1p has no effect against these oxidative agents.

The second part of my project consisted of studying the properties of the Cdr2p NBDs. The Cdrp transporters have a surprising modification in the Walker A motif of the N-terminal NBD (NBD1; GX₄GCS/T instead of GX₄GKS/T). The highly conserved lysine residue is known to be important for ATP interaction. To determine the functional consequences of this substitution, I mutated the atypical C191 to K or A, the conserved K899 to C or A, and I also constructed a double mutant (C191K/K899C). The mutants were correctly expressed at the cell surface and could bind the ATP analog [α -³²P]8-azido-

ATP. While the C191A and K899A mutations slightly reduced ATP binding, the C191K mutation clearly increased ATP binding by the Cdr2p NBD1. The activity levels of these mutants were compared to the wild-type protein in antifungal resistance assays and intracellular accumulation of rhodamine. My results indicate that C191 of NBD1 contributes minimally to antifungal transport, while the integrity of the Walker A motif in NBD2 (K899) is essential to Cdr2p function. This observation is also supported by ATP hydrolysis measurement with Cdr2p-enriched membrane fractions. Photolabeling of the N- and C- halves also revealed important differences in [α - 32 P]8-azido-ATP binding, which underline structural and functional asymmetry between the Cdr2p NBDs.

My results have shown that despite a high level of homology, Cdr1p and Cdr2p possess important functional differences, thus suggesting distinct biological roles. The NBD domains of these transporters are highly asymmetric and contribute positively, but unequally to the transport process.

Key words : *Candida albicans*, antifungal resistance, ABC transporter, *CDR1*, *CDR2*, multidrug efflux pump, ATP binding.

TABLE DES MATIÈRES

Page titre.....	i
Présentation du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Summary.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvi
Dédicace.....	xvii

Chapitre 1 : Introduction

I. LA LEVURE <i>CANDIDA ALBICANS</i>, LES CANDIDOSES ET LEURS TRAITEMENTS.....	2
A. INTRODUCTION AUX CHAMPIGNONS, LEVURES ET MOISSISSURES.....	2
1. <i>Biologie et classification</i>	2
2. <i>Écologie et utilisations</i>	3
B. LES INFECTIONS FONGIQUES CHEZ L'HUMAIN	5
1. <i>L'épidémiologie des infections fongiques</i>	5
2. <i>Les mycètes pathogènes et les différentes formes de mycoses</i>	6
3. <i>Candida albicans</i>	9
4. <i>Les pathologies associées aux candidoses</i>	13
a. Les candidoses mucocutanées.....	13
b. Les candidoses invasives	15
c. Les autres formes de candidoses.....	16
C. LES TRAITEMENTS ANTIFONGIQUES	17
1. <i>Les médicaments antifongiques et leurs modes d'action</i>	18
a. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ergostérol	18
b. Médicaments qui perturbent la membrane plasmique	24
c. Médicaments qui affectent la synthèse du glucane.....	26
d. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ADN et l'ARN.....	26

e.	Autres médicaments antifongiques	27
2.	<i>Les échecs des thérapies antifongiques</i>	27
D.	LES MECANISMES DE RESISTANCE AUX AGENTS ANTIFONGIQUES.....	28
1.	<i>Définitions de la résistance</i>	28
a.	Résistance clinique versus résistance microbienne.....	28
b.	Résistance primaire versus résistance secondaire.....	28
c.	Méthodes de quantification de la résistance aux antifongiques.....	30
2.	<i>Les mécanismes de résistance aux agents antifongiques chez C. albicans</i>	32
a.	Principes généraux	32
b.	Résistance aux azoles et autres inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol.....	34
c.	Résistance aux polyènes	38
d.	Résistance à la flucytosine	38
e.	Résistance aux échinocandines	39
3.	<i>La formation de biofilm par C. albicans</i>	40
4.	<i>L'impact clinique de la résistance aux azoles</i>	41
II.	LES TRANSPORTEURS DE TYPE ABC (ATP-BINDING CASSETTE) ET LEUR RÔLE DANS LA RÉSISTANCE AUX MÉDICAMENTS.....	42
A.	CARACTERISTIQUES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DES TRANSPORTEURS ABC	42
1.	<i>La superfamille des transporteurs ABC et leurs rôles biologiques</i>	42
2.	<i>La structure des transporteurs ABC</i>	47
a.	Structure des NBD et des TMD	47
b.	Structure des transporteurs ABC complets	55
3.	<i>Les modèles de cycles catalytiques des transporteurs ABC</i>	57
B.	L'IMPLICATION DES TRANSPORTEURS ABC DANS LA RESISTANCE MULTIPLE AUX MEDICAMENTS	63
1.	<i>La résistance multiple aux médicaments chez les cellules cancéreuses</i>	63
2.	<i>L'étude de la résistance pléiotropique aux drogues (PDR) chez la levure modèle Saccharomyces cerevisiae</i>	65
3.	<i>Le réseau PDR/CDR chez C. albicans</i>	71
C.	LES TRANSPORTEURS CDR DE C. ALBICANS.....	74
1.	<i>L'identification et la caractérisation des gènes CDR</i>	75
2.	<i>La caractérisation fonctionnelle des transporteurs CDR</i>	80
III.	LES OBJECTIFS DE MON PROJET.....	83

Chapitre 2 : Functional Similarities and Differences between *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p Transporters

I. ABSTRACT	87
II. INTRODUCTION	88
III. MATERIALS AND METHODS	90
IV. RESULTS	97
V. DISCUSSION	110
VI. ACKNOWLEDGEMENTS	117

Chapitre 3 : Characterization of the nucleotide-binding domains of *Candida albicans* Cdr2p, an ATP-binding cassette multidrug transporter containing a divergent Walker A motif

I. ABSTRACT	121
II. INTRODUCTION	122
III. EXPERIMENTAL	125
IV. RESULTS	131
V. DISCUSSION	142
VI. ACKNOWLEDGEMENTS	146

Chapitre 4 : Discussion et perspectives

I. LA CARACTÉRISATION DU FONCTIONNEMENT DES TRANSPORTEURS ABC CDR1P ET CDR2P DE <i>C. ALBICANS</i>	148
A. LA SPECIFICITE DES TRANSPORTEURS CDRP POUR LES AGENTS ANTIFONGIQUES, TEL QUE DEFINIE PAR LA RESISTANCE CELLULAIRE	148
B. CARACTERISATION DES SITES DE LIAISON AUX SUBSTRATS CHEZ LES TRANSPORTEURS CDRP ET CONSIDERATIONS STRUCTURALES	156
C. L'INTERACTION DES TRANSPORTEURS CDRP AVEC LES LIPIDES	161

D. L'INTERACTION DES TRANSPORTEURS CDRP AVEC LES AGENTS IMMUNOSUPPESSEURS ET LA VOIE DE SIGNALISATION DU CALCIUM.....	164
E. AUTRES CARACTERISTIQUES ET ROLES BIOLOGIQUES POTENTIELS DES TRANSPORTEURS CDRP DE <i>C. ALBICANS</i>	168
II. LA CARACTÉRISATION DES NBD DE CDR1P ET CDR2P ET LES CONSÉQUENCES DE LA DIVERGENCE DE LEURS MOTIFS DE LIAISON À L'ATP	172
A. ORIGINE EVOLUTIVE DES GENES <i>CDR</i> ET DE LA CYSTEINE ATYPIQUE	174
B. ASYMETRIE FONCTIONNELLE DES NBD	175
C. PURIFICATION DU NBD1 DE CDR1P ET MUTAGENESE CYS/LYS CHEZ CDR1P	183
D. MODELISATION MOLECULAIRE	186
E. MECANISME CATALYTIQUE POTENTIEL	190
III. IMPLICATION CLINIQUE ET CONCLUSION GÉNÉRALE	194
IV. ADDENDA.....	196
V. RÉFÉRENCES.....	197

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 : Liste des espèces pathogènes de <i>Candida</i> spp., leur distribution, les maladies causées et sous-jacentes à l'infection	8
Tableau 1-2 : Médicaments antifongiques	21
Tableau 1-3 : Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la résistance secondaire chez les mycètes pathogènes	33
Tableau 1-4 : La famille des gènes <i>CDR</i> de <i>C. albicans</i>	76

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1-1 : Les différentes formes de <i>Candida albicans</i>	10
Figure 1-2 : Observations macroscopiques et microscopique du <i>C. albicans</i>	11
Figure 1-3 : La voie de biosynthèse de l'ergostérol chez <i>C. albicans</i>	20
Figure 1-4 : Topologie des domaines et motifs formant les transporteurs ABC	45
Figure 1-5 : Structure des domaines de liaison aux nucléotides (NBD)	50
Figure 1-6 : Arrangement dimérique des NBD et interactions avec l'ATP	54
Figure 1-7 : Structures tridimensionnelles de transporteurs ABC complets	56
Figure 1-8 : Schémas simplifiés des différents modèles de cycles catalytiques pour les transporteurs ABC agissant comme pompe à efflux MDR	59
Figure 1-9 : Le modèle général du « ATP switch » pour le fonctionnement des transporteurs ABC de type « exporteurs »	62
Figure 1-10 : Le réseau PDR chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>C. albicans</i>	67
Figure 1-11 : Motifs conservés dans les NBD des transporteurs Cdrp	80

Chapitre 2

Figure 2-1 : Expression of Cdr1p and Cdr2p in <i>S. cerevisiae</i> TY310	99
Figure 2-2 : Rh transport and binding by Cdr1p and Cdr2p	101
Figure 2-3 : Photoaffinity labeling of the N- and C-terminal halves of Cdr2p by IAARh123	103
Figure 2-4 : Differential susceptibilities of TY310 cells expressing Cdr1p and Cdr2p in the presence of FK520	105
Figure 2-5 : Effects of the combination of azoles with FK520 on the viability of <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> TY310 cells expressing <i>CDR1</i> or <i>CDR2</i>	107
Figure 2-6 : Functional consequences of <i>CDR1</i> and <i>CDR2</i> expression on cellular responses to oxidants	109

Chapitre 3

Figure 3-1 : Expression of wild-type (WT) and mutant <i>C. albicans CDR2</i> in <i>S. cerevisiae</i> and evaluation of Cdr2p activity in the transformed yeast cells	132
Figure 3-2 : ATP binding by WT and mutant Cdr2p	135
Figure 3-3 : Expression levels and drug resistance profiles of WT and mutant <i>CDR2</i> expressed as two half-proteins	137
Figure 3-4 : ATP binding by the Cdr2p half-proteins	139
Figure 3-5 : ATPase activities of WT and Cdr2p mutant proteins in enriched membrane fractions	141

Chapitre 4

Figure 4-1 : Compétition de la liaison du IAARh123 par Cdr1p et Cdr2p avec différents composés	157
Figure 4-2 : Conservation de la structure tertiaire des NBD	173
Figure 4-3 : Blocage des nucléotides di-phosphates par le béryllium fluoride (BeFx-trapping)	181
Figure 4-4 : Modélisation moléculaire des deux NBD de Cdr2p	187
Figure 4-5 : Les interactions moléculaires aux sites actifs du NBD1 et NBD2 et l'impact des mutations C191K et K899C	188

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4-NQO :	4-nitroquinoline- <i>N</i> -oxyde
a.a. :	acide(s) aminé(s)
ABC :	ATP-binding cassette
ADN :	acide désoxyribonucléique
AmB :	amphotéricine B
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ATP :	adénosine tri-phosphate
bZip :	basic leucine zipper
CDR :	<i>Candida</i> drug resistance
CsA :	cyclosporine A
DRE :	drug/steroid responsive element
EtBr :	bromure d'éthidium
FLC :	fluconazole
GFP :	green fluorescent protein
ITC :	itraconazole
Kb :	kilobase (1000 nucléotides)
kDa :	kiloDalton
KTC :	kétoconazole
Mb :	mégabase (1 million de nucléotides)
MDR :	multidrug resistance
MFS :	major facilitator
MIC :	minimal inhibitory concentration
NBD :	nucleotide-binding domain
OPC :	oropharyngal candidiasis
ORF :	openreading frame
PDR :	pleiotropic drug resistance
PC / PE / PS :	phosphatidylcholine, -éthanolamine, -sérine
Rh123 :	rhodamine 123

Rh6G :	rhodamine 6G
SIDA :	syndrome de l'immunodéficience acquise
TM :	transmembrane segment
T°P :	température de la pièce
TMD :	transmembrane domain
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
WT :	wild-type

Nomenclature des gènes et protéines chez les levures :

Les noms complets de gènes ne sont pas contrôlés par le système de nomenclature. Par contre, les symboles de gènes, allèles et protéines le sont. Ces symboles sont stylisés selon le phénotype de la mutation qui identifie le gène ou selon la fonction du gène sauvage. Un nom de gène sera ainsi abrégé par trois lettres en italiques, suivies d'un chiffre. Ces lettres sont en caractères majuscules dans le cas d'un gène dominant (ex : *PDR5*) et en minuscules pour un gène récessif (*pdr5*). Un allèle est désigné par le symbole du gène suivi d'un trait et d'un chiffre, le tout en italique (*pdr5-1*). Une protéine est désignée par le symbole du gène dont elle est issue, sans caractère italique, avec la première lettre en majuscule et terminée par la lettre « p » (Pdr5p). Les allèles créés par génie génétique sont identifiés par le symbole du gène en question, suivi d'un autre symbole indiquant le type de modification effectuée; soit l'interruption (*pdr5::URA3*), la délétion (*pdr5-Δ1*) ou le remplacement (*pdr5Δ::URA3*). Les règles complètes de la nomenclature génétique pour les levures se trouvent à l'adresse internet suivante :

http://www.yeastgenome.org/sgdpub/Saccharomyces_cerevisiae.pdf

Dans le cadre de cette thèse, le symbole d'un gène inactivé sera abrégé par la désignation de la forme récessive de ce gène (ex : *pdr5*). De plus, lorsqu'une confusion est possible entre différents organismes pour un même gène ou protéine, les initiales du nom latin de l'espèce chez laquelle provient le gène ou la protéine sont ajoutées avant le symbole.

Ex : ScPdr5p pour la protéine Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae* et KIPdr5p pour la protéine homologue de *Kluyveromyces lactis*.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dr Martine Raymond, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour le support constant qu'elle m'a apporté durant mon doctorat. Je suis reconnaissant pour tout ce qu'elle m'a enseigné, notamment le souci du détail et l'intégrité.

Je remercie également tout les membres du laboratoire que j'ai côtoyés, pour les discussions stimulantes et l'entraide. Un merci spécial à Sandra Weber et Sarah Tsao pour leurs implications dans mon projet et à Anne-Marie Alarco pour ses conseils. J'aimerais aussi souligner la collaboration des Drs Elias Georges et Philippe Gros (Université McGill), ainsi que Brian Wilkes (IRCM).

Je tiens à remercier les organismes suivants pour leur support technique et financier : l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), l'Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRO), les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), le fonds FCAR-FRSQ-Santé et la Faculté des études supérieures (UdeM).

Finalement, je remercie mes parents, Lise et Richard, ainsi que ma famille et mes amis pour leur soutien indéfectible, leur générosité et tout l'amour qu'ils m'ont donné durant ces années difficiles. À Erika, mon épouse, le mot « merci » n'est pas suffisant pour exprimer ma gratitude. Cet ouvrage est en grande partie le fruit de ta confiance en moi, ta patience et ton courage.

À mon grand-père, Jean-Marie Gauthier, que j'aurais tant aimé avoir connu.

À ma fille Catherine, le but de ma vie.

« Vous arrivez devant la nature avec des théories, la nature flanque tout par terre. »

Auguste Renoir (1841 – 1919)

« La science a fait de nous des dieux avant que nous ne méritions d'être des hommes. »

Jean Rostand (1894-1977)

« Un homme n'est jamais si grand que lorsqu'il est à genoux pour aider un enfant. »

Pythagore (580 – 490 av. J-C)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

I. La levure *Candida albicans*, les candidoses et leurs traitements

A. Introduction aux champignons, levures et moisissures

1. Biologie et classification

Les champignons, les levures et les moisissures sont des organismes eucaryotes regroupés en un seul règne, celui des Mycètes (*Fungi*, en anglais). Longtemps considérés comme appartenant aux végétaux, les Mycètes se distinguent de ceux-ci principalement par l'absence de chlorophylle permettant la photosynthèse ainsi qu'une paroi cellulaire formée de chitine, tandis que celle des organismes végétaux est formée de cellulose. Le règne des Mycètes est en fait plus apparenté au règne des Animaux qu'aux règnes des Plantes et des Bactéries. Les protistes flagellés sont évoqués comme ancêtres communs des Mycètes et des Animaux (Baldauf et Palmer, 1993).

Alors qu'environ 100 000 espèces appartenant au règne des Mycètes ont été identifiées à ce jour, le nombre total d'espèces est estimé à environ 1.5 millions (Ainsworth *et al.*, 2001). Ces organismes se présentent sous une multitude de formes et de tailles. Ainsi, la plupart des Mycètes sont multicellulaires et filamenteux, tandis que certains sont des organismes unicellulaires peu complexes n'ayant que quelques microns de diamètre. Ces derniers sont connus sous le nom de « levures ». Les levures sont des cellules sphériques, se divisant principalement par bourgeonnement ou par fission binaire. Les Mycètes que l'on nomme « moisissures » sont formés de cellules filamenteuses à embranchements multiples qui s'allongent aux extrémités. Ces filaments (ou « hyphes ») sont uni- ou multi-nucléés et peuvent être cloisonnés par des structures appelées « septa » (« septum » au singulier). Un amas d'hyphes s'appelle « mycélium ». Un mycélium de moisissure aura généralement l'aspect d'un réseau lâche et diffus, alors que celui d'un champignon sera compact et structuré. Un mycélium peut être végétatif ou reproducteur. Ainsi, au bout des hyphes d'un mycélium reproducteur se trouvent des fructifications contenant des formes arrondies que l'on nomme « spores ». Certaines spores résultent d'une reproduction sexuée, après la fusion de deux cellules-mères appartenant à des organismes différents, alors que d'autres spores résultent d'une reproduction asexuée, qui

est beaucoup plus fréquente et qui produit un plus grand nombre de spores. Ces spores sont presque inactives métaboliquement, très résistantes aux stress environnementaux et contiennent le matériel génétique de l'espèce en question. Leur rôle est d'assurer la dispersion et/ou la survie de l'organisme. La germination des spores produit un nouveau mycélium. Les cycles de reproduction des Mycètes sont très variés et peuvent être fort complexes, utilisant non seulement des phases haploïdes et diploïdes, mais également une phase dicaryotique. Les méthodes de reproduction des Mycètes ne seront donc pas discutées dans cet ouvrage.

Certains mycètes sont dimorphes, c'est-à-dire qu'on peut les retrouver, selon les conditions, sous la forme de levure (unicellulaire) ou sous la forme d'hyphes (multicellulaire). Il serait donc difficile de classifier les différentes espèces de mycètes selon la morphologie générale de l'organisme. La plupart des mycètes, y compris les levures, produisent des spores. On utilise donc les différentes formes de spores, le type de fructification ainsi que la capacité d'un mycète à utiliser une phase sexuée durant son cycle de reproduction comme caractéristiques fondamentales déterminant les différents phyla du règne des Mycètes. Bien que plusieurs détails de la classification des Mycètes demeurent nébuleux et même sujets à la controverse parmi les mycologues, on reconnaît quatre grands phylums : les Oomycètes, les Zygomycètes, les Ascomycètes et les Basidiomycètes. De plus, un phylum artificiel, celui des deutéromycètes (avec un « d » minuscule, ou mycètes imparfaits) a été créé afin de regrouper les mycètes pour lesquels aucune phase sexuée n'a été démontrée (Guarro *et al.*, 1999). La plupart des organismes appartenant aux deutéromycètes peuvent être néanmoins classés parmi les Ascomycètes ou les Basidiomycètes d'après leur structure génétique.

2. Écologie et utilisations

À l'instar des plantes vertes, les Mycètes, dépourvus de chlorophylle, sont des organismes hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils ont besoin de composés organiques pour se nourrir, tout comme les Animaux. La vaste majorité nécessite de l'oxygène pour se développer, tandis que certaines espèces sont des anaérobiques facultatifs. Les Mycètes

possèdent une multitude de niches écologiques, dont le sol, l'eau, les plantes, les insectes et les animaux (Ulloa et Hanlin, 2000). Ils sont en grande majorité des organismes saprophytes, se nourrissant de matière en décomposition, mais on retrouve également les modes de vie suivants chez les Mycètes :

- Commensalisme : L'organisme commensal habite sur ou dans un autre organisme et se nourrit ou dépend de celui-ci, mais sans lui causer de tort (ex : la levure *Candida albicans* qu'on trouve sur les muqueuses et la peau des mammifères);
- Symbiose : Association de deux ou plusieurs organismes différents, qui leur permet de vivre avec des avantages pour chacun. Une symbiose peut être obligatoire pour certains organismes (ex : les champignons et les algues ou bactéries photosynthétiques formant les différents types de lichens) ou facultative (ex : les mycorrhizes, qui sont l'association de champignons avec les racines de différents végétaux);
- Parasitisme : Le parasite se nourrit ou dépend d'un autre organisme (l'hôte) en lui causant du tort, pouvant même mener à la destruction de l'hôte (ex : le mildiou de la pomme de terre, causé par le *Phytophthora infestans*).

Les Mycètes ont développé des adaptations très diverses, de telle sorte qu'on les trouve dans pratiquement tous les écosystèmes. Cependant, la plupart des Mycètes ont besoin d'humidité pour se développer. De rares espèces se sont adaptées à la sécheresse, alors que plusieurs types de levures vivent directement dans les eaux douces, les océans et même les eaux polluées. Certains Mycètes peuvent tolérer de très fortes pressions osmotiques (milieux très salés ou sucrés). Étant dépourvus de chlorophylle, les Mycètes poussent aisément dans l'obscurité totale. Que ce soit par l'action du vent ou de l'eau, la formation de spores assure aux Mycètes une dispersion sur de très grandes distances, tandis que le contact entre organismes hôtes peut également assurer le transfert d'espèces parasitiques.

Les Mycètes jouent un rôle primordial dans la formation de l'humus (en tant que décomposeurs de la matière organique morte). Ils assurent entre autres la décomposition de nos déchets domestiques. Également, les Mycètes sont un maillon important de la chaîne alimentaire, non seulement en favorisant la croissance des plantes, mais aussi en étant eux-mêmes source de nourriture pour une multitude de protozoaires, d'insectes et d'animaux, incluant l'homme, qui exploite les champignons, les levures et les moisissures depuis des millénaires pour diverses utilisations agro-alimentaires. Plus récemment, ces organismes sont utilisés dans des applications industrielles et médicales.

Malheureusement pour l'homme, plusieurs champignons sont toxiques, alors que plusieurs levures et moisissures sont des pathogènes, causant des infections fongiques associées globalement sous le terme « mycoses ». La grande majorité des Mycètes parasitant l'homme appartient au groupe des deutéromycètes.

B. Les infections fongiques chez l'humain

1. L'épidémiologie des infections fongiques

Pendant les années 80 et la première moitié des années 90, les intervenants en milieu hospitalier ont remarqué une forte augmentation de l'incidence des infections fongiques. Notamment, une étude américaine a dévoilé qu'au cours de la décennie 1980 – 1990 les cas de septicémies impliquant champignons et levures ont quintuplé tandis que les infections fongiques urinaires et infections de plaies chirurgicales ont doublé et triplé, respectivement (Beck-Sague et Jarvis, 1993; Fridkin et Jarvis, 1996). Nous avons été témoins durant cette période du perfectionnement et d'une utilisation routinière de technologies médicales avancées, comme la transplantation de moelle osseuse ou autres organes, ainsi que la chimio- et radiothérapie pour le traitement de cancers. Cependant, ces procédés médicaux dits « agressifs » entraînent une importante perte d'efficacité du système immunitaire du patient, qui devient alors extrêmement sensible aux infections microbiennes. L'utilisation grandissante de cathéters, de nutrition par voie parentérale, d'outils chirurgicaux et d'imagerie par voie intraveineuse, ainsi que l'administration d'antibiotiques à large spectre ont certes sauvé un nombre incalculable de patients, mais ont

rapidement été corrélées avec cette augmentation de cas d'infections fongiques (Eggimann *et al.*, 2003a). Plusieurs mycètes préalablement perçus comme non-pathogènes ont subitement changé de statut pour devenir des pathogènes potentiels (ou « opportunistes ») (Bodey, 1988). Il va sans dire que l'apparition du VIH / SIDA durant ces années a considérablement augmenté le bassin de patients immunodéficients. La neutropénie, la prise de corticostéroïdes, les brûlures, la ventilation assistée, la durée du séjour aux soins intensifs, l'hémodialyse ainsi que la malnutrition figurent également comme facteurs de risque pour développer une infection fongique (Fridkin et Jarvis, 1996).

Bien que l'introduction de la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) pour le traitement de patients infectés par le VIH ait eu un impact bénéfique sur les taux de morbidité et de mortalité associés à une infection fongique chez ces personnes (Palella *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 1998), les infections fongiques gagnaient toujours du terrain en milieu hospitalier, au point où les infections à levures (notamment au *Candida* spp.) sont devenues la quatrième cause d'infections nosocomiales aux États-Unis (Jarvis *et al.*, 1991; Berrouane *et al.*, 1999; Edmond *et al.*, 1999). Cette augmentation de l'incidence d'infections dues à des champignons et levures a engendré à cette période un essor de la recherche scientifique visant à comprendre les aspects fondamentaux et cliniques des levures dites « pathogènes ».

Avant de continuer, il est important de faire la distinction entre une « infection » et une « colonisation ». En effet, un microbe colonise l'hôte lorsqu'il est présent et/ou se multiplie dans celui-ci sans causer de dommage apparent (symptôme). L'infection, quant à elle, suppose que le microbe en question cause des dommages à son hôte, tout en proliférant de manière incontrôlée.

2. Les mycètes pathogènes et les différentes formes de mycoses

Moins d'une centaine d'espèces de champignons et levures sont pathogènes pour l'humain. C'est relativement peu, considérant qu'il existerait plus d'un million et demi d'espèces différentes. Il faut dire que l'application du terme « pathogène » à une espèce

microbienne est un processus parfois subjectif, laborieux et difficile à prouver scientifiquement. C'est particulièrement le cas pour les infections à levures qui ne sont pas obligatoirement répertoriées. De plus, les méthodes de culture et d'identification des champignons en milieux hospitaliers étaient relativement grossières dans le passé, ne permettant pas de déterminer l'espèce en question. Lorsqu'un mycète faisant partie de la flore microbienne normale est isolé à partir d'un site d'infection, on peut comprendre la difficulté à lui attribuer hors de tout doute un rôle dans cette infection. Néanmoins, les développements technologiques récents conjugués à un intérêt croissant pour les infections fongiques permettent maintenant une meilleure identification des mycètes en clinique ainsi que de déterminer leur implication dans certaines maladies chez des patients immunodéficients.

Certaines levures produisent des infections de la peau et surtout des muqueuses, notamment dans la région génitale (paroi vaginale), buccale (bouche et gorge) ou dans l'œsophage. On sait depuis longtemps que le *Candida albicans* et une douzaine d'autres espèces du genre *Candida* sont les levures pathogènes les plus fréquemment isolées (Calderone, 2002b; Pappas *et al.*, 2004; Bille *et al.*, 2005). Les levures du genre *Candida* sont capables d'infecter la peau, les muqueuses, le sang et autres organes internes. On qualifie ces infections de mycoses superficielles et systémiques. On appelle « candidoses » les infections causées par l'une ou l'autre des espèces de *Candida*. Le Tableau 1-1 montre la distribution des différentes espèces de *Candida* retrouvées dans des hémocultures, selon une étude internationale déroulée en 1997 en Amérique du Nord, en Amérique du Sud et en Europe (Pfaller *et al.*, 1998a; Pfaller *et al.*, 1999).

Tableau 1-1 : Liste des espèces pathogènes de *Candida* spp., leur distribution, les maladies causées et sous-jacentes à l'infection^a

Espèces d'importance médicale	Distribution de <i>Candida</i> spp. retrouvés dans le sang (% des isolats) ^b				Site infecté ou affecté	Maladie sous-jacente/facteur de risque
	USA (n=203)	Canada (n=170)	Europe (n=61)	Amérique latine (n=42)		
<i>Candida albicans</i>	56	53	53	41	Muqueuses, sang, infection disséminée	HIV+, cancer, chirurgie et nouveaux-nés en soins intensifs, cathéter intraveineux, transpl. moelle os.
<i>Candida parapsilosis</i>	9	21	23	38	Sang, cœur, os et articulations	Enfant prématuré, nutrition parentérale, cathéter intraveineux, cancer, dialyse
<i>Candida glabrata</i>	19	12	11	2	Voie urinaire, muqueuses, sang, infection disséminée	HIV+, tumeurs solides, leucémie, transpl. moelle os.
<i>Candida tropicalis</i>	7	6	8	12	Muqueuse orale, sang, infection disséminée, os et articulations	HIV+, tumeurs solides, leucémie, transpl. moelle os.
<i>Candida guilliermondii</i>	1	4	-	2	Sang	Cancer
<i>Candida krusei</i>	2	1	2	-	Muqueuse orale, sang, infection disséminée	HIV+, transpl. moelle os., leucémie
<i>Candida</i> spp. (incl. les sp. ci-dessous)	6	3	3	5	Sang	
<i>Candida dubliniensis</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Muqueuse orale, sang	HIV+, transpl. moelle osseuse
<i>Candida kefyr</i> (<i>pseudotropicalis</i>)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>Candida lusitanae</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>Candida inconspicua</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>Candida famata</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>Candida utilis</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>Candida viswanathii</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

^a Données combinées de Moran *et al.*, 2002 et Calderone, 2002.

^b Données du programme international de surveillance SENTRY en 1997 (Pfaller *et al.*, 1998; Pfaller *et al.*, 1999)

Cependant, durant la dernière décennie, l'épidémiologie des infections fongiques opportunistes a radicalement changé. Premièrement, il y a eu une nette augmentation des infections dues aux espèces de *Candida* autres que *C. albicans* (Nguyen *et al.*, 1996; Coleman *et al.*, 1998; Moran *et al.*, 2002). Deuxièmement, l'incidence d'infections causées par des levures et champignons autres que *Candida* spp. est aussi en progression (Hazen, 1995; Singh, 2001; Pfaller et Diekema, 2004; Nucci et Marr, 2005). Au Canada, la comparaison de deux études portant sur l'épidémiologie des infections à *Candida* spp., effectuées de 1992 à 1994 (Yamamura *et al.*, 1999) et de 1996 à 1998 (St Germain *et al.*, 2001), nous montre que la proportion d'infections au *C. albicans* a diminué (de 69% à 54%), alors que les infections attribuables au *C. glabrata* ont augmenté (8% à 15%).

3. *Candida albicans*

La levure qui est la plus souvent isolée dans les mycoses profondes et superficielles est le *Candida albicans*; voir Tableau 1-1 et (Calderone, 2002a; Bille *et al.*, 2005). Cette levure polymorphe était autrefois classée dans le phylum des deutéromycètes, car sa phase sexuée n'a jamais été observée en milieu naturel. Des phases sexuelles (formes téléomorphes) ont pourtant été identifiées chez d'autres espèces de *Candida* et elles s'apparentent toutes au phylum des Ascomycètes. Par ailleurs, une analyse de séquence de la petite sous-unité d'ARN ribosomal du *C. albicans* dévoile sans ambiguïté son appartenance à la classe des Hémiascomycètes, qui comprend entre autres la famille des Saccharomycètacées (Calderone, 2002b). Ainsi, la famille des Candidacées regroupe maintenant les 154 espèces connues du genre *Candida* spp.

Au niveau microscopique, le *C. albicans* peut se présenter sous trois formes différentes, soit la forme de levures, de pseudohyphes ou de vrais hyphes (Figure 1-1 et Figure 1-2). La forme levure réfère aux cellules uniques ovoïdes (de 2 à 6 microns de diamètre) à paroi mince et qui se reproduisent par bourgeonnement. La distinction entre une pseudohyphe et une hyphe provient de la manière dont elles sont formées. Les pseudohyphes se développent par bourgeonnement à partir d'une levure ou d'une hyphe, mais la cellule fille reste attachée à la cellule mère et s'allonge, ce qui produit un filament ayant une constriction à la jonction des deux cellules. Les vrais hyphes se développent à partir de levures ou en tant qu'embranchement d'une hyphe existante (Sudbery *et al.*, 2004). La croissance de l'hyphe (aussi appelé « tube germinal ») s'effectue par extension apicale et des cloisons internes (septa) se forment dans l'hyphe. Certaines espèces de *Candida* ont des capacités variables à former des pseudohyphes et/ou des hyphes. En fait, à part *C. albicans*, seul *C. dubliniensis* peut former de vrais hyphes pouvant comporter des chlamydospores, qui sont un type de fructification observé surtout *in vitro* (Calderone, 2002b). Les chlamydospores sont des cellules sphériques à paroi épaisse, qui apparaissent au bout des hyphes lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu pauvre en nutriments.

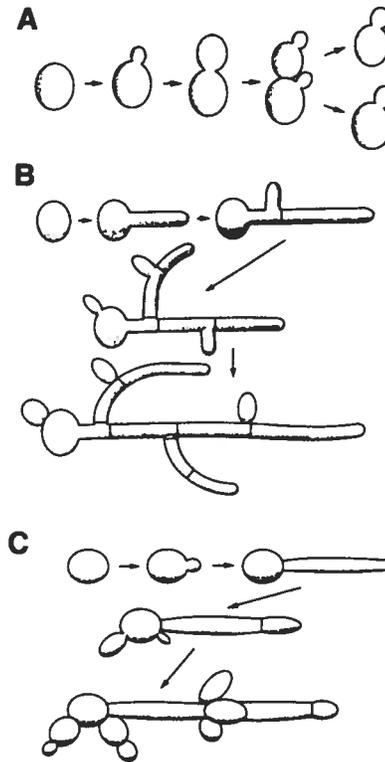


Figure 1-1 : Les différentes formes de *Candida albicans*. A, la forme levure (cellule unique ovoïde) observée principalement en milieu liquide à des températures inférieures à 35 °C, avec formation de cellules filles par bourgeonnement. B, la formation de vrais hyphes, initiée par l'apparition d'une extension apicale (le tube germinal). L'embranchement des nouvelles hyphes se situe derrière les septa (cloisons). C, la formation de pseudohyphes (voir texte). Reproduit de (Calderone, 2002b).

Bien qu'on puisse retrouver le *C. albicans* dans l'environnement, ce sont les muqueuses et le tractus digestif des mammifères qui constituent la niche écologique principale de cette levure. Ce fait sous-entend que les hominidés et le *C. albicans* ont évolués ensemble depuis des millions d'années (Lott *et al.*, 2005). Notre système immunitaire s'est donc très bien adapté pour contrer la prolifération de cette levure. Parallèlement, le *C. albicans* est adapté à survive dans notre corps malgré les attaques constantes provenant de nos lymphocytes et des autres microbes vivants sur nos muqueuses. Par contre, comme mentionné précédemment, lorsque notre immunité fait défaut ou quand notre flore microbienne résidente est perturbée, le *C. albicans* aura la voie

libre pour se multiplier et former des hyphes qui l'aident à pénétrer à travers les tissus et vaisseaux sanguins. Un large éventail de facteurs de virulence aide aussi le *C. albicans* à se multiplier hors du contrôle de notre système immunitaire (van Burik et Magee, 2001).

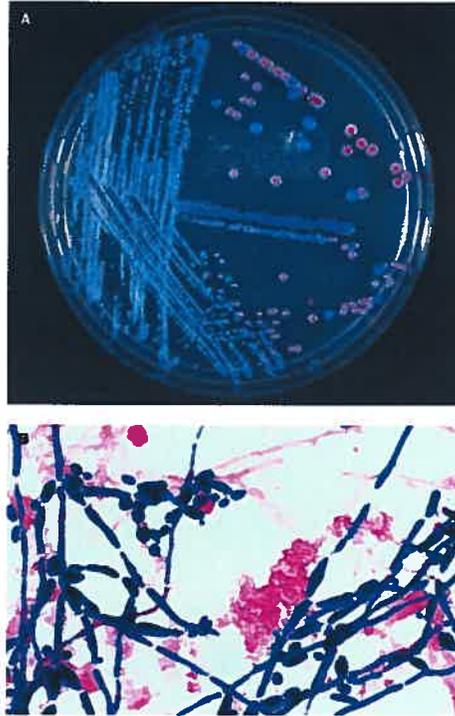


Figure 1-2 : Observation macroscopique et microscopique du *C. albicans*. **A**, colonies de *C. albicans* (bleu) et *C. glabrata* (rouge) sur gélose ChromAgar, un milieu synthétique semi-solide facilitant l'identification de ces deux espèces de *Candida*. **B**, coloration Gram d'un échantillon clinique montrant le *C. albicans* en forme levure (2-4 μm) et en forme d'hyphes (15-30 μm). Grossissement : 1000x. Reproduit de (Eggimann *et al.*, 2003a).

Au niveau moléculaire, cette levure diploïde possède 8 paires de chromosomes totalisant 32 millions de nucléotides (16 Mb pour son génome haploïde) et 6419 cadres de lectures ouverts (ORF). Le séquençage complet du génome de *C. albicans* a été entrepris par le Stanford Genome Technology Center et représente une percée importante dans l'étude de cette levure et des candidoses (Jones *et al.*, 2004). L'assemblage le plus récent est disponible à cette adresse : <http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/> L'annotation du génome a été complétée récemment (Braun *et al.*, 2005).

Certains traits biologiques du *C. albicans* sont importants à souligner. En effet, la capacité du *C. albicans* d'adhérer aux tissus de l'hôte par des molécules nommées « adhésines », sa capacité à sécréter des protéases (gènes *SAP*) et des phospholipases, ainsi que sa morphogénèse, c'est-à-dire son habilité à se transformer en hyphes, constituent des déterminants pathogéniques importants (Calderone et Fonzi, 2001). Aussi, des études portant sur les multiples changements phénotypiques de *C. albicans* ont permis de démontrer que la transition « blanche-opaque » (white-opaque switch; (Slutsky *et al.*, 1987)) se produit non seulement chez des souches cliniques, mais aussi que ce processus est essentiel pour le processus de conjugaison, que l'on croyait inactif chez cette espèce (Hull et Johnson, 1999). Deux revues récentes traitent de ce phénomène qui se produirait principalement chez les isolats colonisant la peau (Soll, 2004; Bennett et Johnson, 2005). Durant le processus de conjugaison entre deux cellules diploïdes (MTL a/a avec MTL α/α), une cellule tétraploïde est formée. Le retour au stade diploïde peut se faire soit par méiose ou par une perte chromosomique aléatoire (Bennett et Johnson, 2003). Il est intéressant de noter que des altérations karyotypiques sont liées à l'acquisition de la résistance aux médicaments (Perepnikhatka *et al.*, 1999). En effet, le *C. albicans* possède un génome qui est très instable (Selmecki *et al.*, 2005). Un autre exemple de cette « plasticité » génomique est l'utilisation d'un code génétique alternatif par *C. albicans* dans lequel le codon CUG est décodé en sérine et non pas en leucine (Santos et Tuite, 1995). En forçant l'expression de l'ARNt^{Ser} (CAG) de *C. albicans* chez *S. cerevisiae*, ce groupe de recherche a déterminé que l'impact négatif initial sur la viabilité des cellules est contre-balançé par une meilleure résistance à des conditions environnementales difficiles (ex : chaleur, oxidants), grâce à l'induction de la voie générale de réponse au stress qui est déclenchée par cette réattribution du codon CUG (Santos *et al.*, 1999). Ce mécanisme est apparu il y a environ 272 ± 25 millions d'années et aurait pu faciliter l'adaptation du *C. albicans* à une nouvelle niche écologique (les muqueuses des mammifères) où il doit subir continuellement les attaques du système immunitaire (Santos *et al.*, 2004).

4. Les pathologies associées aux candidoses

Les facteurs qui prédisposent à une infection à *Candida* spp. ont été décrits au paragraphe I.B.1. Notons qu'il n'y a pas uniquement les personnes en état d'immunodéficience qui sont à risque, mais également les patients affectés de maladies sévères, en état critique ou traités aux unités de soins intensifs (Eggimann *et al.*, 2003a). Faisant partie de la flore microbienne normale des humains, une infection à *Candida* est donc acquise le plus souvent par voie endogène. Le *C. albicans* profite souvent de l'insertion de cathéters ou autres appareils prosthétiques pour infiltrer les tissus et le sang d'un patient (Rose, 1978; Band et Maki, 1979). De plus, le *C. albicans* peut adhérer et proliférer directement sur le cathéter en formant un biofilm dense et réfractaire aux traitements antifongiques (Hawser et Douglas, 1994; Chandra *et al.*, 2001). La formation de biofilm par le *C. albicans* et son impact sur la résistance aux médicaments antifongiques sont détaillés plus loin dans ce chapitre. Des voies exogènes de transmission du *C. albicans* ont été observées et comprennent le transfert latéral, c'est-à-dire d'une personne infectée ou porteuse à une personne immunodéficente que ce soit en milieu hospitalier (infection nosocomiale) ou par contact physique intime (infection transmissible sexuellement), et le transfert vertical, de la mère à son nouveau-né (Sangeorzan *et al.*, 1994; Fridkin et Jarvis, 1996; Pfaller, 1996).

La présentation clinique des candidoses est très variée. Presque tous les organes ou systèmes physiologiques peuvent être affectés par le *Candida* spp. Comme mentionné plus haut, une candidose peut être superficielle ou profonde, focalisée ou disséminée. Il est possible de classifier les candidoses en trois grandes catégories : a) les candidoses mucocutanées, b) les candidoses invasives et c) les autres formes de candidoses (Ostrosky-Zeichner, 2005).

a. Les candidoses mucocutanées

Les muqueuses orales (bouche et gorge), l'œsophage et la région génitale (vaginale et périanale) sont des sites où se développe la plupart des cas de candidoses. Un exemple qui montre bien la prépondérance de cette levure est l'estimation que plus de 75% de toutes

les femmes contracteront au cours de leur vie au moins une vaginite à levure (Anon., 2004), le *C. albicans* étant responsable d'environ 85-90% de tous ces cas. Les candidoses vaginales sont éliminées assez facilement chez les patientes VIH-négatives grâce aux médicaments azolés et au système immunitaire qui est fonctionnel chez ces personnes (Sobel, 2002; Anon., 2005b). Par contre, l'émergence du *C. glabrata* peut compliquer une vulvovaginite en la rendant réfractaire aux traitements puisque cette espèce est naturellement plus résistante aux antifongiques azolés (Sobel, 1997; Ruhnke, 2002; Richter *et al.*, 2005). Les taux de colonisation et de vaginites à *Candida* spp. augmentent de façon importante chez les femmes enceintes et celles qui sont VIH-positives (Frerich et Gad, 1977; Burns *et al.*, 1997). Le traitement devient plus compliqué dans ces cas.

Les candidoses orales (oropharynx et œsophage), communément appelés « muguet » (« thrush » en anglais), représentent un problème clinique important compte tenu notamment de l'augmentation du nombre de patients immunodéficients. Les données épidémiologiques concernant la prévalence du *Candida* spp. dans la bouche des personnes saines et malades sont très variables. Il est raisonnable d'affirmer que 35 à 55% des humains portent du *Candida* spp. dans leur bouche et voies digestives supérieures (Ruhnke, 2002). Ces taux augmentent chez les personnes malades, VIH-positives et les personnes âgées. Ainsi, les facteurs qui contribuent au développement d'une candidose oropharyngée (OPC) sont : 1) toute forme d'immunodéficience, principalement les infections au VIH, le SIDA, la candidose mucocutanée chronique, le cancer; 2) des endocrinopathies, tels le diabète et les dysfonctions de la thyroïde et des glandes surrénales; 3) des traitements locaux et systémiques, tels la radiothérapie, le port de dentiers, la prise d'antibiotiques à large spectre, de médicaments antitumoraux, de corticostéroïdes; et 4) des conditions générales, comme l'âge (nouveau-nés, enfants prématurés, personnes âgées), la malnutrition et des problèmes de salivation (Ruhnke, 2002; Bodey *et al.*, 2002; de Repentigny *et al.*, 2004). L'OPC se présente sous trois formes principales. En premier lieu, notons la forme « pseudo-membraneuse », qui peut affecter toutes les parties de la bouche et de la gorge. Elle est caractérisée par l'apparition de plaques blanchâtres crémeuses qui laissent une irritation et des saignements de la muqueuse lorsque grattées. Deuxièmement, on retrouve la forme « érythémateuse » qui affecte le palais et la langue. Elle se présente

comme un érythème diffus. Finalement, le *C. albicans* peut causer une « cheilite angulaire », c'est-à-dire une infection des lèvres au coin de la bouche, causant alors une inflammation et des fissures à cette région. Les symptômes communs à ces candidoses orales sont des sensations de douleur, de brûlure et de perte du goûter. L'OPC érythémateuse est souvent accompagnée d'une OPC pseudo-membraneuse et elle entraîne une dysphagie (difficultés à avaler), d'où l'observation de perte de poids chez les patients affectés (Ruhnke, 2002; de Repentigny *et al.*, 2004).

La peau est habituellement récalcitrante à une infection au *C. albicans*. À part les personnes affectées par une candidose mucocutanée chronique (voir plus bas), le facteur de risque commun prédisposant à une candidose de la peau est la persistance d'humidité et de chaleur au site infecté. L'obésité, le diabète et le manque d'hygiène sont aussi des facteurs de risque. Les plis de la peau deviennent alors affectés par des vésicopustules qui évoluent souvent en lésions érythémateuses (Huang *et al.*, 2004; Ostrosky-Zeichner, 2005). Le *Candida* spp. peut également être la cause d'onychomycoses (infection des ongles).

La candidose mucocutanée chronique est une maladie rare qui regroupe un ensemble de symptômes. La peau, les ongles et les muqueuses sont infectés par le *C. albicans* d'une façon persistante et sévère. Les patients affectés auraient une ou plusieurs déficiences génétiques et sont incapables de produire une réponse immune cellulaire face au *C. albicans*. Non seulement cette forme de candidose est complexe, étant subdivisée en plusieurs sous-catégories, mais elle est également associée à plusieurs autres conditions débilitantes (Lilic, 2002; Ruhnke, 2002).

b. Les candidoses invasives

Les termes candidoses invasives, systémiques et disséminées sont synonymes. Ces candidoses affectent le sang, l'urine et presque tous les organes/compartiments du corps humain. Ces infections invasives, contrairement aux candidoses superficielles, impliquent nécessairement une déficience immunitaire chez l'hôte (Ruhnke, 2002). Elles peuvent être initiées à partir d'un foyer d'infection précis et/ou d'une propagation du *C. albicans* dans le

sang (qu'on appelle septicémie à *Candida* ou plus précisément « candidémie ») (Kullberg et Filler, 2002). Il est important de noter que le taux de mortalité associé aux candidémies est de l'ordre de 40 à 50%, soit le taux le plus élevé parmi toutes les septicémies microbiennes (Edmond *et al.*, 1999; Yamamura *et al.*, 1999). Les candidoses invasives sont le résultat de conditions médicales particulières telles la dysfonction rénale et la naissance prématurée ou le résultat de traitements comme la chimiothérapie, la chirurgie abdominale, l'insertion de cathéters, la consommation de drogues par injection, l'hémodialyse, la transplantation de moelle osseuse ou autres organes (Yamamura *et al.*, 1999; Ostrosky-Zeichner, 2005). On subdivise les candidoses invasives en quatre formes qui sont inter-reliées, soit : 1) la candidémie associée aux cathéters, 2) la candidose disséminée aiguë, 3) la candidose disséminée chronique et 4) la candidose profonde, affectant un ou plusieurs organes (Rex *et al.*, 1998; Ostrosky-Zeichner, 2005). Toutes ces formes suivent un épisode de candidémie qui n'est cependant pas toujours détectable. Selon son degré de sévérité, une candidémie se manifestera par une simple fièvre jusqu'au choc septique mortel.

c. Les autres formes de candidoses

Les patients neutropéniques peuvent recevoir un traitement empirique visant à prévenir l'apparition d'une candidose (Winston *et al.*, 2000). Ces patients sont très sensibles à une infection à *Candida* spp. et un traitement antifongique doit être administré dès l'apparition de fièvre persistante malgré la prise d'antibiotiques.

Les candidoses chez les nouveau-nés constituent un problème grave, associé à un taux de mortalité d'environ 20-32% (Kaufman, 2004; Tiffany *et al.*, 2005). Ces candidoses peuvent être cutanées ou invasives et être reliées à l'utilisation de cathéters ou d'origine congénitale (Kaufman, 2004; Smolinski *et al.*, 2005). L'infection peut avoir été transmise de façon verticale (de la mère au bébé) ou nosocomiale. En effet, les femmes enceintes contractent souvent une vaginite à *Candida* dans le dernier trimestre de leur grossesse (Frerich et Gad, 1977) et peuvent donc infecter le bébé au moment de la naissance.

Je ne couvrirai pas les méthodes diagnostiques du *C. albicans* dans cet ouvrage. Globalement, à part pour les candidoses mucocutanées, les symptômes des candidoses invasives sont non-spécifiques et le diagnostic du *C. albicans* doit ainsi reposer sur une analyse rigoureuse des facteurs de risques ainsi que du profil clinique du patient, combinée à des données microbiologiques, sérologiques, histopathologiques ou moléculaires. En effet, l'isolement du *C. albicans* à partir des plaies, de la peau, de l'urine, des sécrétions thoraciques et des échantillons de selles n'est pas une indication claire qu'une infection est en cours, étant donné que ce mycète fait partie de la flore microbienne normale. Par contre, la découverte du *C. albicans* dans des échantillons normalement stériles, comme le sang et le liquide céphalo-rachidien, est presque toujours diagnostique d'une infection (Ostrosky-Zeichner, 2005). J'encourage le lecteur à consulter les revues suivantes concernant les dernières technologies en matière de détection des infections fongiques (Erjavec et Verweij, 2002; Yeo et Wong, 2002).

C. Les traitements antifongiques

La colonisation asymptomatique au *C. albicans* ne nécessite pas de traitement particulier, mais une attention régulière doit y être portée lorsqu'il s'agit d'un patient dont le système immunitaire est affecté (Martino *et al.*, 1994). Par contre, quand des symptômes se manifestent et qu'ils sont clairement associés à une infection fongique, celle-ci doit être traitée. Un traitement antifongique a pour objectif d'éliminer ou d'empêcher la prolifération des mycètes causant l'infection. Parfois, le traitement approprié n'implique que des moyens mécaniques comme par exemple le retrait d'un cathéter infecté (Raad *et al.*, 2004), la stérilisation du dentier chez les patients souffrant d'une OPC ou l'ablation chirurgicale de la zone affectée. La plupart du temps, une substance pharmacologique sera administrée au patient. Dans les sections suivantes, je décrirai les agents antifongiques qui sont approuvés pour le traitement des mycoses chez l'humain, avec une attention particulière à ceux qui sont couramment utilisés pour traiter les candidoses.

1. Les médicaments antifongiques et leurs modes d'action

Avant le début des années 1990, seulement trois médicaments antifongiques étaient approuvés pour administration par voie intraveineuse ou orale en cas de mycose systémique, soit l'amphotéricine B, la flucytosine et le kétoconazole (Dismukes, 2000). Depuis, l'arsenal pharmacologique permettant de contrer les candidoses s'est multiplié, quoique ces médicaments ciblent toujours un nombre restreint de processus et structures cellulaires. En effet, les mycètes sont des organismes eucaryotes, biologiquement très proche des cellules de mammifères, ce qui rend difficile le développement d'agents antifongiques qui présentent une faible toxicité pour l'humain et les animaux. Le Tableau 1-2 résume les caractéristiques des plus importants agents antifongiques prescrits à l'heure actuelle. Je vais maintenant décrire ces médicaments antifongiques en les regroupant selon leur mode d'action.

a. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ergostérol

Cette catégorie regroupe quatre classes de composés : les allylamines, les thiocarbamates, les azoles et les morpholines. Ces médicaments inhibent la synthèse de l'ergostérol à différentes étapes lors de sa biosynthèse (Figure 1-3 et Tableau 1-2). L'ergostérol est très proche chimiquement du cholestérol des animaux. L'ergostérol est une composante lipidique essentielle des levures puisque cette molécule est responsable entre autres de l'intégrité et de la fluidité de la membrane plasmique, en plus d'assurer le bon fonctionnement de certaines enzymes membranaires (Georgopapadakou et Walsh, 1996; Sturley, 2000). Actuellement, il n'existe que deux agents antifongiques de type allylamine, soit le naftifine et le terbinafine. Le butenafine est plutôt un benzylamine. Le tolnaftate est le seul représentant de la classe des thiocarbamates. Ces quatre médicaments sont des inhibiteurs de l'enzyme squalène époxidase (produit du gène *ERG1*) qui agit en amont dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Lees *et al.*, 1995). Cette enzyme est essentielle chez les levures et champignons. Son inhibition provoque un arrêt de croissance, de reproduction et entraîne la mort du mycète. Le terbinafine est fongistatique (empêche la prolifération) pour les différentes espèces de *Candida*, mais est fongicide (tue les cellules) pour les champignons filamenteux (Ryder, 1992; Jessup *et al.*, 2000). Lorsque combiné avec

d'autres types d'antifongiques comme l'amphotéricine B ou des inhibiteurs de la calcineurine, le terbinafine devient fongicide pour certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Candida* spp. (Ryder et Leitner, 2001; Onyewu *et al.*, 2003). Le naftifine et le tolnaftate sont des agents qui sont plutôt utilisés dans les cas d'infections aux Dermatophytes (Ryder *et al.*, 1986; Muhlbacher, 1991). Bien que le butenafine ait démontré une bonne activité contre le *Candida albicans* (Iwatani *et al.*, 1993; Syed et Maibach, 2000), ce médicament n'est pas prescrit de façon courante pour les cas de candidoses.

Les azoles constituent la plus importante classe de médicaments antifongiques, comprenant une douzaine de composés différents. On distingue en fait deux types de médicaments azolés, selon leur structure chimique. Il y a d'abord les imidazoles, dont font partie le kétoconazole (KTC), le clotrimazole, l'econazole, le miconazole, l'oxiconazole et le tioconazole. Les triazoles ont été découverts par la suite. Ceux-ci comprennent le fluconazole (FLC), l'itraconazole (ITC), le terconazole et le voriconazole. Ces molécules sont caractérisées par la présence d'un groupement pentacyclique contenant deux (imidazoles) ou trois (triazoles) atomes d'azote, ainsi qu'un groupement benzène auquel sont greffés deux atomes de chlore ou de fluor (Tableau 1-2). Toutes ces molécules inhibent l'enzyme lanostérol 14 α -déméthylase, encodée par le gène *ERG11* (aussi désignée *CYP51*) (Georgopapadakou et Walsh, 1994). Cette enzyme fait partie de la classe des cytochromes P450 et contient donc une protoporphyrine de fer. L'inhibition de cet enzyme par les antifongiques azolés est basée sur la liaison entre un atome d'azote de l'anneau azolé et l'atome de fer contenu dans la partie hème de l'enzyme Erg11p (Podust *et al.*, 2001).

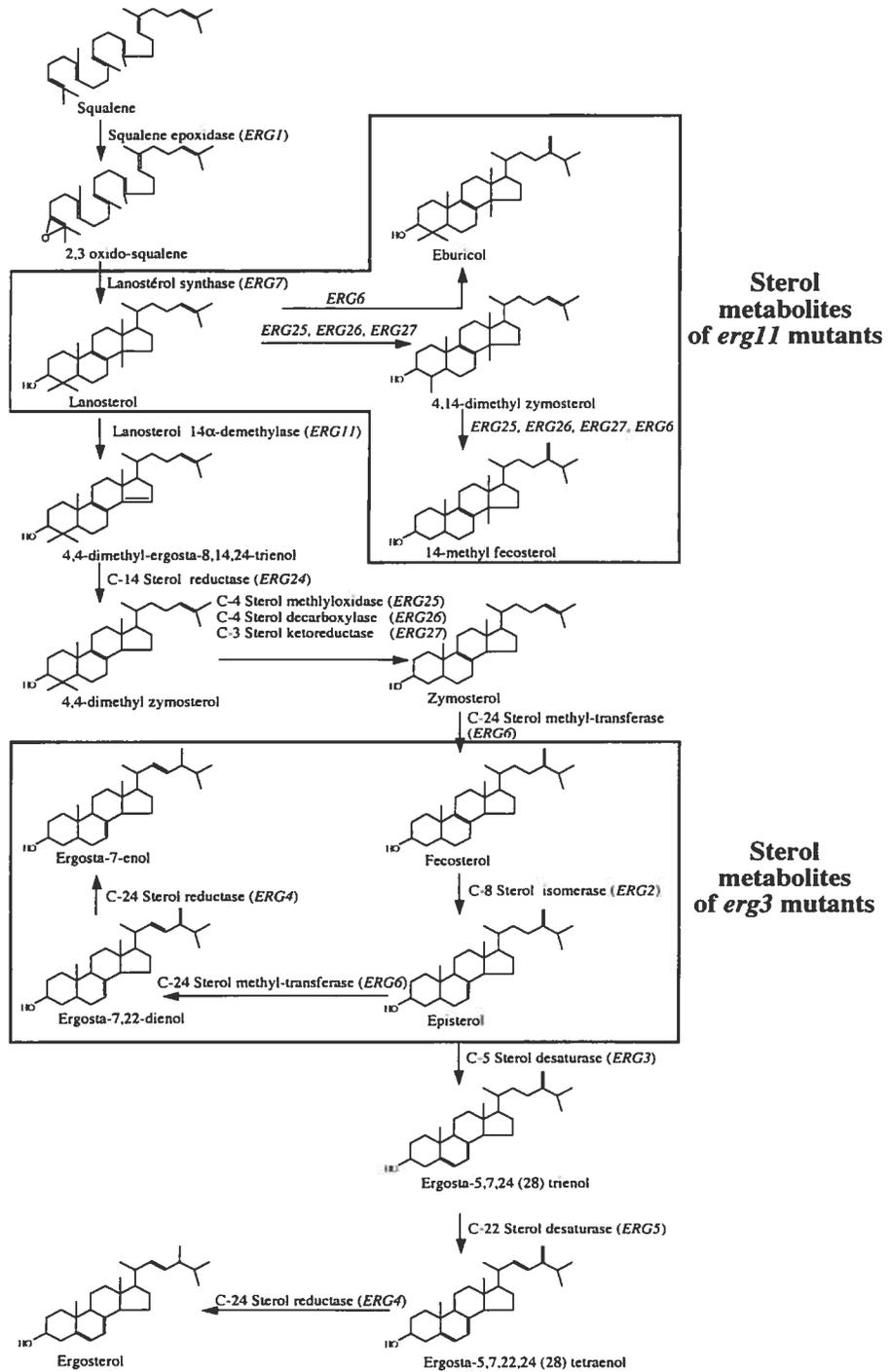


Figure 1-3 : La voie de biosynthèse de l'ergostérol chez *C. albicans*. Figure reproduite de (Sanglard *et al.*, 2003b).

Tableau 1-2 : Médicaments antifongiques

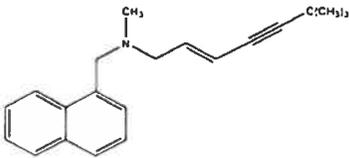
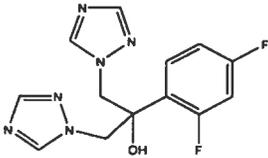
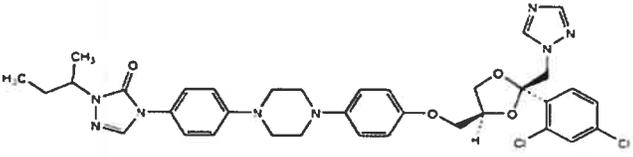
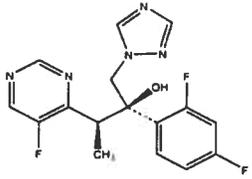
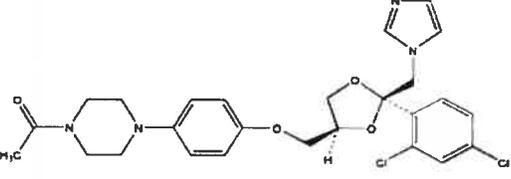
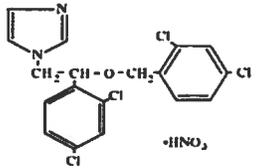
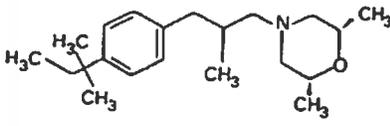
Nom générique (de commerce)	Structure chimique	Cible cellulaire	Utilisation clinique
Terbinafine (Lamisil)		Synthèse de l'ergostérol (Erg1p)	Mycoses superficielles
Fluconazole (Diflucan)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques et superficielles
Itraconazole (Sporanox)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques et superficielles
Voriconazole (Vfend)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques
Kétoconazole (Nizoral)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses systémiques et superficielles
Miconazole (Monistat)		Synthèse de l'ergostérol (Erg11p)	Mycoses superficielles
Amorolfine (Loceryl)		Synthèse de l'ergostérol (Erg24p et Erg2p)	Mycoses superficielles

Tableau 1-2 : Médicaments antifongiques (suite)

Nom générique (de commerce)	Structure chimique	Cible cellulaire	Utilisation clinique
Amphotéricine B (Fungizone)		Membrane plasmique (lie l'ergostérol)	Mycoses systémiques
Nystatin (Nyotran)		Membrane plasmique (lie l'ergostérol)	Mycoses systémiques et superficielles
Caspofungin (Cancidas)		Synthèse du glucane (Fks1p)	Mycoses systémiques
Flucytosine (Ancobon)		Synthèse de l'ADN/ARN	Mycoses systémiques
Griséofulvine (Grifulvin V et Gris-PEG)		Assemblage des microtubules	Mycoses systémiques

L'enzyme humaine équivalente à Erg11p est aussi très importante dans la synthèse du cholestérol. Lorsqu'un médicament azolé est administré, son efficacité antifongique est attribuable à sa plus grande affinité pour l'enzyme fongique que pour l'enzyme humaine (Sheehan *et al.*, 1999). Une levure exposée à un traitement aux azoles subira donc une déplétion d'ergostérol accompagnée d'une accumulation de métabolites toxiques, soit les stérols méthylés en position C-14. Une déplétion importante en ergostérol n'est pas seulement dommageable pour l'intégrité et la fluidité de la membrane plasmique, mais aussi pour son rôle dans l'initiation de la prolifération et la croissance cellulaire (Georgopapadakou et Walsh, 1996).

Dans les cas de candidoses mucocutanées et systémiques, le fluconazole (FLC) est le médicament privilégié à cause de son excellent profil pharmacologique et sa nature hydrophile qui permet autant une administration orale qu'intraveineuse (Goa et Barradell, 1995; Dismukes, 2000). Par contre, le FLC est considéré comme un agent fongistatique. Bien qu'il soit efficace contre *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. et *Coccidioides* spp., le FLC n'est d'aucune utilité face aux moisissures pathogènes comme l'*Aspergillus* spp. De plus, son efficacité est très faible face à certaines espèces comme le *C. glabrata* et le *C. krusei* ainsi que l'*Histoplasma capsulatum* et le *Blastomyces dermatitidis* (Pappas *et al.*, 1997; Wheat *et al.*, 1997; Rex *et al.*, 2000). L'ITC et le voriconazole, deux agents triazolés qui ont été développés plus récemment, ont quant à eux une activité fongicide contre *Aspergillus* spp. et autres mycètes difficiles à traiter comme *Fusarium* et *Scedosporium* (Van Cutsem *et al.*, 1984; Odds, 1993; Pierard *et al.*, 2000).

Le développement des imidazoles avait pour objectif d'augmenter la spécificité de ce type de médicament pour cette lanostérol 14 α -déméthylase fongique. Cependant, à l'exception du KTC, l'utilisation des imidazoles est limitée aux mycoses superficielles (Odds *et al.*, 2003). En fait, le KTC est maintenant presque exclusivement prescrit pour les cas de mycoses cutanées, à cause notamment de sa toxicité et du caractère erratique de sa biodisponibilité qui est fortement affectée par l'acidité gastrique (Como et Dismukes, 1994). Le FLC et l'ITC sont moins toxiques et généralement plus efficaces que le kétoconazole (Dismukes, 2000). La toxicité des azoles est tout de même relativement faible

comparativement aux autres classes d'antifongiques. L'ITC, pour sa part, est fortement lipophile. Il se concentre donc dans les tissus lipidiques rendant difficile sa distribution vers les organes atteints lors de mycoses profondes (De Beule et Van Gestel, 2001). Finalement, deux caractéristiques importantes limitent l'utilisation des antifongiques azolés, soit l'apparition du phénomène de résistance (discutée en détail plus loin) et le nombre élevé d'interactions avec des médicaments co-administrés entraînant des conséquences cliniques néfastes (Dismukes, 2000).

Enfin, l'amorolfine, un dérivé de la morpholine, représente le dernier type d'agent antifongique qui inhibe la production d'ergostérol. Ce composé bloque deux enzymes situées en aval dans la voie de synthèse de l'ergostérol, soit Erg24p, une Δ^{14} stérol réductase, et Erg2p, une Δ^8 - Δ^7 isomérase (Figure 1-3 et Tableau 1-2) (Haria et Bryson, 1995). L'amorolfine possède une activité fongicide face aux Dermatophytes. Il est donc principalement prescrit dans les cas d'onychomycoses en formule topique (Baran *et al.*, 2005). L'amorolfine peut également servir à contrer le *C. albicans* (mais pas le *C. glabrata*), et faire partie d'un régime combiné avec d'autres agents antifongiques, tels les azoles, le terbinafine et le griseofulvin (del Palacio *et al.*, 1991; Polak, 1993).

b. Médicaments qui perturbent la membrane plasmique

On retrouve dans le groupe des polyènes l'amphotéricine B (AmB) et le nystatin (Tableau 1-2). Ces molécules amphiphiles cycliques sont composées d'une chaîne polyhydroxyle hydrophile d'un côté et d'une chaîne d'hydrocarbure hydrophobe de l'autre côté. Leur activité repose sur une liaison directe avec l'ergostérol, causant la formation de pores traversant la membrane plasmique, ce qui perméabilise la levure, entraîne la perte des constituants cytoplasmiques et ultimement la mort cellulaire (Ghannoum et Rice, 1999). Les polyènes sont donc des agents fongicides à large spectre d'activité (Ellis, 2002). L'AmB en formule déoxycholate est utilisée depuis les années 60 pour traiter les candidoses systémiques et les candidémies. L'AmB et le FLC demeurent à ce jour les deux antifongiques de choix pour la plupart des types de candidoses, que ce soit chez les patients

immunodéficients ou non (Lortholary et Dupont, 1997; Rex *et al.*, 2000; Pappas *et al.*, 2004).

Malheureusement, les polyènes ne possèdent pas une spécificité très stricte pour l'ergostérol, ce qui cause chez les mammifères une importante toxicité au niveau des reins. Les effets secondaires imputables à l'AmB déoxycholate se manifestent chez 70% à 90% des patients (Eggimann *et al.*, 2003b). Ces problèmes de toxicité reliés à l'utilisation de l'AmB ont motivé les recherches dans les années 70 et 80 pour trouver des composés antifongiques comportant un meilleur profil pharmacologique, menant à la découverte des azoles. L'usage de l'amphotéricine B déoxycholate est maintenant limité à des mycoses systémiques graves. Afin de réduire le niveau de toxicité de l'amphotéricine B et pour palier à sa grande hydrophobicité, trois nouvelles formulations ont été développées récemment, soit la dispersion colloïdale, le complexe lipidique et la formule liposomale (Hiemenz et Walsh, 1996; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003a). Bien que ces nouvelles formules réduisent significativement la néphrotoxicité de l'AmB, leurs coûts d'achat sont importants (10 à 100 fois celui de l'AmB déoxycholate) et doivent être pris en considération (Rex et Walsh, 1999; Cagnoni *et al.*, 2000; Lewis, 2005). De plus, une proportion significative des isolats cliniques de *C. glabrata*, *C. krusei* et *C. lusitaniae* démontrent une sensibilité réduite à l'AmB (Rex *et al.*, 2000).

Le nystatin est un dérivé de l'AmB (Tableau 1-2). Le mécanisme d'action du nystatin est similaire à l'AmB, mais sa toxicité est moins importante, particulièrement dans sa nouvelle formule liposomale administrée par voie intraveineuse (Mehta *et al.*, 1987). Le nystatin montre une bonne activité contre toutes les espèces de *Candida* spp., mais demeure toutefois un agent moins puissant que l'AmB (Eggimann *et al.*, 2003b). La formule orale du nystatin est particulièrement intéressante comme alternative à l'AmB chez les patients qui sont sujets à des complications liés à la toxicité de l'AmB (Offner *et al.*, 2004).

c. Médicaments qui affectent la synthèse du glucane

Les échinocandines ont été développées récemment. Cette classe comprend la caspofungine, l'anidulafungine et la micafungine (Wiederhold et Lewis, 2003). Ces médicaments sont composés d'un noyau cyclique hexapeptidique avec une chaîne latérale lipidique (Tableau 1-2). Ils ciblent la synthèse du 1,3- β -glucane, un constituant important de la paroi cellulaire d'une grande variété de mycètes. Une diminution importante de la quantité de glucane cause une instabilité osmotique menant à la mort du mycète (Odds *et al.*, 2003). Il n'y a pas de système enzymatique permettant la synthèse du glucane chez les mammifères, d'où l'intérêt pour cette cible cellulaire (Ghannoum et Rice, 1999). Les échinocandines ont une activité fongicide envers un large éventail d'espèces de champignons et de moisissures, incluant *Candida* spp., *Aspergillus* spp. et *Pneumocystis carinii* (Marco *et al.*, 1998; Pfaller *et al.*, 1998b). La caspofungine est approuvée pour le traitement de candidoses et aspergilloses réfractaires aux azoles. Elle est aussi efficace que l'AmB, tout en étant beaucoup plus sécuritaire (Arathoon, 2001; Mora-Duarte *et al.*, 2002). Par contre, la caspofungine ne possède pas d'activité antifongique contre *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus* spp. ou *Fusarium* spp. (Pfaller *et al.*, 1998b; Arathoon, 2001; Maligie et Selitrennikoff, 2005). Les deux autres échinocandines, soit l'anidulafungine et la micafungine, sont également très actives contre des souches cliniques de *Candida* spp. résistantes aux azoles (Arathoon, 2001; Laverdiere *et al.*, 2002; Pfaller *et al.*, 2005).

d. Médicaments qui affectent la synthèse de l'ADN et l'ARN

Cette catégorie ne contient qu'un seul représentant : la flucytosine (5-fluorocytosine; Tableau 1-2). Cette pyrimidine fluorée fonctionne comme inhibiteur métabolique chez plusieurs levures comme les *Candida* spp. et *C. neoformans*. La flucytosine entre dans la levure grâce à une perméase de cytosine. La 5-fluorocytosine est d'abord convertie en 5-fluorouracile par la cytosine déaminase, ensuite modifié par l'uracile phosphoribosyle transférase pour être enfin incorporé dans l'ARN, entraînant un arrêt de la synthèse protéique (Ghannoum et Rice, 1999; Vermes *et al.*, 2000). La 5-fluorouracile est également converti en 5-fluorodeoxyuridine monophosphate qui est un puissant inhibiteur de la thymidylate synthase, une enzyme impliquée dans la synthèse de

l'ADN et de la division cellulaire (Vermes *et al.*, 2000). Cependant, plusieurs mycètes filamenteux ne possèdent pas les enzymes ciblées par la flucytosine. De plus, l'apparition fréquente de résistance à ce médicament limite considérablement son utilisation en monothérapie (Pfaller *et al.*, 2002; Hope *et al.*, 2004). La flucytosine est donc principalement administrée en combinaison avec d'autres agents antifongiques (Odds *et al.*, 2003; Girmenia *et al.*, 2003).

e. Autres médicaments antifongiques

La griséofulvine (Tableau 1-2) a été le premier médicament antifongique isolé (1939) et accepté pour usage clinique (1958) (Sheehan *et al.*, 1999). Ce composé insoluble dans l'eau peut être administré oralement sous forme microcristalline. Les détails de son mécanisme d'action restent à être élucidés, quoique qu'il s'agisse fort probablement d'une interférence dans l'assemblage des microtubules, causant ainsi une incapacité du mycète à effectuer la mitose (Odds *et al.*, 2003). Le spectre d'activité de la griséofulvine est limité aux Dermatophytes. Des médicaments moins toxiques et plus efficaces, tels l'ITC et le terbinafine, ont supplanté l'usage de la griséofulvine.

2. Les échecs des thérapies antifongiques

Les traitements antifongiques, qu'ils soient de nature physique (ex : retrait du cathéter infecté) ou pharmacologique, ne sont pas toujours couronnés de succès. Une multitude de facteurs entrent en ligne de compte pour expliquer l'échec clinique d'un traitement antifongique. Ces facteurs peuvent émaner non seulement du ou des mycètes causant l'infection, mais aussi du patient et de son état de santé ou du traitement médical en tant que tel, qui peut être inadéquat, insuffisant ou mal administré. Dans les prochaines sections, j'aborderai principalement les facteurs d'origine microbienne qui entraînent l'échec clinique d'une thérapie antifongique.

D. Les mécanismes de résistance aux agents antifongiques

1. Définitions de la résistance

Le phénomène de la résistance aux antifongiques, qu'elle soit d'origine clinique, pharmacologique ou microbienne, s'apparente à ceux décrits pour la résistance aux médicaments antibiotiques, antiviraux et anticancéreux (White *et al.*, 1998; Nikaido, 1998; Ghannoum et Rice, 1999; Gottesman, 2002). Il incombe maintenant de définir certains principes de base.

a. Résistance clinique versus résistance microbienne

Une infection persistante malgré l'administration d'un agent antifongique peut être décrite comme « résistante cliniquement » à cet agent (Sanglard et Odds, 2002). Il est possible que le mycète pathogène qui cause cette infection réfractaire au traitement antifongique démontre une sensibilité normale à cet antifongique *in vitro*. Dans ce cas, on doit considérer les facteurs dits « cliniques » pour expliquer cet échec thérapeutique. Certains de ces facteurs peuvent provenir du patient. Par exemple, l'état de son système immunitaire, la présence de cathéters, le site de l'infection, un abcès mal-drainé, le non-respect de la posologie, etc... (White *et al.*, 1998). Il faut aussi considérer les paramètres pharmacologiques, tels une dose inappropriée, la nature fongistatique du médicament, une mauvaise absorption, distribution ou métabolisme, et finalement, des interactions indésirables entre les médicaments prescrits (White *et al.*, 1998; Canuto et Rodero, 2002). À noter que la situation inverse est également connue, soit l'observation de la résistance *in vitro* du mycète à un agent antifongique, mais une réponse favorable au traitement chez le patient (Sanglard et Odds, 2002).

b. Résistance primaire versus résistance secondaire

Lorsque les facteurs cliniques et pharmacologiques sont exclus, des facteurs microbiologiques peuvent alors expliquer l'échec clinique d'une thérapie antifongique. Ces derniers comprennent la résistance primaire (intrinsèque), la résistance secondaire (acquise) ainsi que la taille de la population fongique infectant le patient (Canuto et Rodero, 2002).

Les niveaux de résistance primaires ou secondaires d'un mycète pathogène face à différents antifongiques peuvent être facilement quantifiables *in vitro* par des techniques de laboratoire.

Certains genres ou espèces de levure ou champignon peuvent être naturellement plus résistants à un agent antifongique que d'autres genres ou espèces, à cause de leurs différences anatomiques et/ou moléculaires. Ce phénomène s'appelle la résistance primaire (ou intrinsèque) (White *et al.*, 1998). Par exemple, les concentrations minimales de FLC qui inhibent la croissance de 50% après 48h (MIC₅₀) sont de 64 et 8 µg/ml pour des isolats cliniques de *C. krusei* et *C. glabrata*, respectivement, alors que le MIC₅₀ moyen pour des isolats de *C. albicans* est 0.5 µg/ml (St Germain *et al.*, 2001). Globalement, il est reconnu que le *C. albicans*, le *C. parapsilosis* et le *C. tropicalis* sont sensibles au FLC, ITC et à l'AmB, tandis que le *C. krusei* et le *C. glabrata* sont considérés comme des espèces exhibant une résistance intrinsèque au FLC et présentant des sensibilités réduites ou variables à l'ITC et à l'AmB (Rex *et al.*, 1995; Rex *et al.*, 1997; Pfaller *et al.*, 2000; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003b).

La résistance secondaire (ou acquise) se définit comme un changement (diminution) de la sensibilité du mycète à un agent antifongique; changement qui s'est développé suite à une exposition à cette molécule antifongique (White *et al.*, 1998). Il existe au moins trois grands principes théoriques qui peuvent expliquer l'acquisition d'une résistance secondaire. Le premier mécanisme relève du principe darwinien de l'évolution des espèces; l'agent antifongique appliqué à une population importante de cellules fongiques exerce une pression sélective qui favorise les rares cellules possédant des mutations facilitant leur survie en présence de cet antifongique. Ces mutations sont générées d'une manière aléatoire, à cause de l'instabilité génétique du *Candida* spp., d'erreurs de réplication de l'ADN commises par la polymérase ou induites par des facteurs physiques (rayons UV) et chimiques, ou autres facteurs épisomiques, tels l'insertion de transposons. Ce principe évolutif serait prépondérant dans l'établissement de la résistance secondaire chez *C. albicans* (Cowen *et al.*, 2000; Marr *et al.*, 2001). Le deuxième principe est l'influence directe ou indirecte que peut avoir un médicament antifongique sur les niveaux

d'expression de gènes favorisant la croissance de la levure en présence de cet antifongique. Il a en effet été démontré *in vitro* qu'un traitement avec un azole ou autre inhibiteur de la synthèse de l'ergostérol entraîne chez *C. albicans* une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'ergostérol (Henry *et al.*, 2000; De Backer *et al.*, 2001). Le facteur de transcription *UPC2* serait un déterminant de cet effet (MacPherson *et al.*, 2005). Ce mécanisme serait une réaction rapide face à la diminution des niveaux d'ergostérol dans la levure et expliquerait la tolérance du *Candida* spp. aux azoles, donc le caractère fongistatique de ce type de médicament (Henry *et al.*, 2000). Dans la même ligne d'idée, les niveaux d'expression des gènes affectant la résistance du *C. albicans* peuvent également être modulés par des hormones (progestérone, β -œstradiol) et une différence de température (Krishnamurthy *et al.*, 1998b; Karnani *et al.*, 2004). Un troisième principe qui pourrait expliquer l'acquisition de résistance secondaire est le transfert horizontal de matériel génétique encodant un ou plusieurs facteurs de résistance entre deux souches de levure. Bien que ce phénomène de conjugaison soit observé fréquemment chez les bactéries, il est très rare chez les levures (Anderson, 2005). Les échecs thérapeutiques reliés à une résistance secondaire élevée serait plutôt le fruit du premier principe d'« évolution locale » (Anderson, 2005). Il est à noter que la résistance secondaire est généralement un phénotype acquis de façon permanente, puisqu'elle résulte d'une modification du génotype, mais elle peut également l'être de façon transitoire (Marr *et al.*, 2001).

c. Méthodes de quantification de la résistance aux antifongiques

Les traitements antifongiques empiriques et prophylactiques sont parfois nécessaires afin de prévenir les mycoses chez les patients à risque. Préférentiellement, un spécimen sera prélevé afin d'identifier le ou les mycète(s) pathogène(s) en cause et parallèlement, un test de sensibilité à divers agents antifongiques sera effectué afin d'éclairer le clinicien dans son choix pour un médicament ainsi que la posologie. Bien que la corrélation ne soit pas parfaite entre les résultats de tests de sensibilité *in vitro* et la réussite de la thérapie antifongique, cette étape est importante puisqu'il est reconnu que la prescription aléatoire et abusive d'antimicrobiens contribue à l'émergence du phénomène de résistance (Anon., 2005a). La détection et la quantification de la résistance se font

sensiblement de la même façon chez les bactéries, levures et parasites. Il s'agit en fait de mesurer la réduction de la croissance du microbe suite à une exposition avec l'agent antimicrobien. L'approche peut consister en l'utilisation de milieux solides (gélouses) ou liquides. La première technique en milieu solide consiste à mesurer, après incubation, la zone d'inhibition autour d'un disque imprégné avec la drogue inhibitrice; les cellules ayant été étalées de façon uniforme sur la gélose. Une deuxième technique, souvent utilisée pour analyser les levures, consiste à appliquer des petites quantités de cultures diluées de cellules sur une gélose contenant une concentration fixe d'inhibiteur. La capacité de croissance des cellules, selon leur concentration initiale, est la mesure de résistance à cet agent. Ces deux techniques sont pratiques pour tester une grande quantité de drogues, mais leur interprétation est plus qualitative que quantitative. La technique la plus utilisée est celle de la microdilution en milieu liquide. Elle consiste à incuber dans des microplaques, une concentration fixe de cellules avec des concentrations croissantes de la drogue. Cette technique est pratique lorsqu'on teste un grand nombre de souches et elle fournit une mesure quantitative de la résistance, soit la concentration minimale de la drogue qui inhibe la croissance du microbe (MIC) (Sanglard et Odds, 2002). Toutes ces techniques demeurent dépendantes de certains facteurs, tels la concentration initiale du microbe, la solubilité du médicament, le pH du milieu, la méthode pour détecter la croissance, etc. Ainsi, une méthode standardisée pour évaluer la résistance des levures en milieu liquide (M27-A) a été établie en 1997 par le US National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) et permet de comparer les résultats entre différents laboratoires. Ce document contient non seulement la méthodologie pour effectuer le test de résistance aux antifongiques, mais également les critères d'interprétation des résultats. Ainsi, une souche de *Candida* spp. est considérée résistante lorsque son MIC pour le FLC est de 64 µg/ml ou plus et sensible lorsque son MIC est de 8 µg/ml ou moins. Entre ces deux valeurs de MIC, une souche sera considérée « intermédiaire » ou « sensible selon la dose ». Ces critères ont été établis aussi pour l'ITC, la flucytosine, ainsi que pour le *Cryptococcus* spp. En général, les taux de succès d'une thérapie antimicrobienne chutent avec l'augmentation des valeurs de MIC (Sanglard et Odds, 2002).

2. Les mécanismes de résistance aux agents antifongiques chez *C. albicans*

a. Principes généraux

Les microbes possèdent tout un arsenal de mécanismes leur permettant de contrer les traitements antimicrobiens. Les microbes ont développé cette grande capacité d'adaptation face aux attaques externes suite à la guerre incessante que se livrent les microbes entre eux depuis des millions d'années. En effet, certaines bactéries et levures, tels *Streptomyces* spp. et *Penicillium* spp. sécrètent des métabolites toxiques. Non seulement ces microbes producteurs d'agents antimicrobiens doivent se protéger contre leurs propres armes chimiques, mais aussi les microbes vivant à proximité de ceux-ci, qui ont dû développer des mécanismes de défense. Ironiquement, la plupart des médicaments antimicrobiens utilisés aujourd'hui sont dérivés de ces métabolites bactériens et fongiques, et sont ainsi sujets aux multiples systèmes de résistance microbiens. Par contre, comme nous le verrons plus loin, les microbes, parasites et cellules tumorales peuvent même développer une résistance à des médicaments de synthèse. Lorsque les conditions sont favorables, les microbes pathogènes se reproduisent rapidement et sont donc présents en grand nombre au site d'infection. Ainsi, d'un point de vue génétique, ce sont la taille d'une population microbienne, le taux d'apparition de mutations et la force de la pression sélective qui seront les facteurs déterminants pour l'acquisition de résistance face à un traitement antimicrobien (Anderson, 2005).

Les mécanismes moléculaires de résistance aux antifongiques ont été étudiés en détail chez la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi que chez la levure pathogène *C. albicans* (White *et al.*, 1998; Akins, 2005). Des informations moins détaillées sont également disponibles quant aux mécanismes qui prévalent chez *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus* spp. (Ghannoum et Rice, 1999; Sanglard et Odds, 2002; Kontoyiannis et Lewis, 2002; Perea et Patterson, 2002). Le Tableau 1-3 contient la liste des mécanismes moléculaires de résistance décrits jusqu'à présent chez quelques mycètes pathogènes importants. Je décrirai ensuite les mécanismes moléculaires prépondérants chez *C. albicans* selon les types de médicaments.

Tableau 1-3. Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la résistance secondaire chez les mycètes pathogènes^a

Mycètes pathogènes	Mécanismes de résistance ayant été observés chez des souches cliniques et/ou obtenus expérimentalement			
	Azoles	Amphotéricine	Flucytosine	Caspofungine
<i>Candida albicans</i>	Surexpression de pompes à efflux (<i>CDR</i> et <i>MDR1</i>)	Modification ou diminution du contenu en ergostérol	Diminution de l'activité de l'uracile phosphoribosyl transférase	Mutation de l'enzyme cible (<i>FKS1</i>)
	Mutation / surexpression de l'enzyme cible des azoles (<i>ERG11</i>)	Augmentation de l'activité catalase	Diminution de l'activité de la cytosine déaminase	
	Perte de fonction de l'enzyme stérol delta ^{5,6} désaturase (<i>ERG3</i>)			
<i>Candida glabrata</i>	Surexpression de pompes à efflux (<i>CDR1</i> et <i>PDH1</i>)	Modification ou diminution du contenu en ergostérol	Résistance primaire - Mutation de la cytosine perméase	
<i>Candida krusei</i>	Résistance primaire - sensibilité réduite de l'enzyme cible (<i>ERG11</i>)	Modification ou diminution du contenu en ergostérol	Résistance primaire	Mutation de l'enzyme cible (<i>FKS1</i>)
	Accumulation réduite d'azole (pompe à efflux ?)			
<i>Candida dubliniensis</i>	Surexpression de pompes à efflux (<i>CDR</i> et <i>MDR1</i>)			
	Mutation / surexpression de l'enzyme cible des azoles (<i>ERG11</i>)			
	Perte de fonction de l'enzyme stérol delta ^{5,6} désaturase (<i>ERG3</i>)			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Surexpression de pompes à efflux (<i>AtrF</i> et <i>MDR1</i>)			
	Sensibilité réduite de l'enzyme cible (<i>ERG11</i>)			
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Surexpression de pompes à efflux (<i>AFR1</i> et <i>MDR1</i>)	Modification dans la synthèse de l'ergostérol	Diminution de l'activité de l'uracile phosphoribosyl transférase	Résistance primaire
	Mutation / surexpression de l'enzyme cible des azoles (<i>ERG11</i>)		Diminution de l'activité de la cytosine déaminase	

^a Données combinées de White *et al.* 1998; Ghannoum et Rice 1999; Kontoyiannis et Lewis 2002; Perea et Patterson 2002; Sanglard et Odds 2002; Akins 2005

b. Résistance aux azoles et autres inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol

Les premiers cas de résistance aux azoles ont été rapportés au début des années 1980 (Horsburgh, Jr. et Kirkpatrick, 1983; Johnson *et al.*, 1984) et sont devenus plus courant suite à l'introduction du FLC (White *et al.*, 1998). Quatre mécanismes moléculaires principaux peuvent expliquer l'acquisition d'une résistance secondaire aux azoles : i) une accumulation intracellulaire réduite de ces agents; ii) une baisse d'affinité de l'enzyme Erg11p pour les azoles; iii) une augmentation des niveaux cellulaires de Erg11p; iv) une modification dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Sanglard et Odds, 2002).

i) L'incapacité des azoles à s'accumuler à l'intérieur de la cellule pathogène est un phénomène qui a été décrit chez plusieurs isolats post-traitement de *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1995; Venkateswarlu *et al.*, 1995), *C. glabrata* (Hitchcock *et al.*, 1993; Parkinson *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1999), *C. krusei* (Venkateswarlu *et al.*, 1996), *C. dubliniensis* (Pinjon *et al.*, 2005), *C. neoformans* (Venkateswarlu *et al.*, 1997). Ce mécanisme de résistance opère probablement aussi chez *Aspergillus fumigatus*, mais reste à être démontré chez des souches cliniques (Denning *et al.*, 1997; Latge, 1999; da Silva Ferreira *et al.*, 2004). Il est important de différencier la réduction de l'import du médicament dans la cellule versus l'augmentation de son export (efflux) à l'extérieur de la cellule. Des modifications dans la cinétique de ces deux processus peuvent expliquer une accumulation réduite du médicament et ainsi la résistance aux azoles. Cependant, la plupart des études concluent que le transport actif des azoles à l'extérieur des levures expliquerait en grande partie la résistance aux azoles chez les levures pathogènes (Sanglard *et al.*, 1995; Albertson *et al.*, 1996; White *et al.*, 1998). L'import des azoles dans les cellules de *Candida* était présumé comme étant un processus passif, par contre, de rares études suggèrent qu'il pourrait exister un système d'import actif pour les azoles (Boiron *et al.*, 1987; Noel *et al.*, 2003). Ainsi, l'accumulation réduite des azoles chez plusieurs mycètes pathogènes ayant développé une résistance secondaire serait principalement causé par la surexpression de transporteurs actifs appartenant à deux catégories différentes. Chez des isolats cliniques de *C. albicans*, il y a en effet une forte corrélation entre les niveaux de résistance au FLC et les niveaux d'expression du gène *CDR1* (*Candida drug resistance*), faisant partie de la

superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette), et/ou du gène *MDR1* (Multidrug resistance; anciennement nommé *BEN^r*), appartenant à la superfamille des facilitateurs majeurs (Fling *et al.*, 1991; Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1995). Plusieurs laboratoires ont validé cette observation (Albertson *et al.*, 1996; White, 1997; Lopez-Ribot *et al.*, 1998; Franz *et al.*, 1998a; White *et al.*, 2002). Le gène *CDR2* encode un transporteur ABC très similaire à *CDR1*. Il est également surexprimé dans certains isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux azoles (Sanglard *et al.*, 1997). À noter que *CDR1* et *CDR2* sont toujours surexprimés conjointement chez les souches cliniques résistantes, indiquant qu'ils sont contrôlés par un régulateur commun (Sanglard *et al.*, 1997; Perea *et al.*, 2001). Des gènes homologues à *CDR1* et *CDR2* chez d'autres espèces de *Candida*, par exemple *CgCDR1* et *PDH1* chez *C. glabrata* (Miyazaki *et al.*, 1998; Sanglard *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 2004), ainsi que *CdCDR1* et *CdCDR2* chez *C. dubliniensis* seraient également impliqués dans la résistance aux azoles chez ces espèces (Moran *et al.*, 1998; Perea *et al.*, 2002; Pinjon *et al.*, 2005). Les différences importantes entre les transporteurs de type ABC et le facilitateur *MDR1* sont leurs sources d'énergie pour effectuer l'extrusion des azoles et leur spectre d'activité vis-à-vis les azoles. En effet, les transporteurs ABC *CDR1* et *CDR2* utilisent la liaison et l'hydrolyse de l'ATP tout en étant capable d'expulser tout les médicaments azoles utilisés en clinique, alors que le facilitateur *MDR1* utilise le gradient de proton pour expulser spécifiquement le FLC (Sanglard *et al.*, 1995; Parkinson *et al.*, 1995; White, 1997).

ii) Le deuxième mécanisme important de résistance aux azoles chez *C. albicans* est la modification de l'enzyme ciblée par les azoles, soit la lanostérol 14 α -déméthylase (Erg11p). En effet, certaines mutations codantes qui changent des acides aminés situés près de l'hème dans ce cytochrome P450 ont pour effet de diminuer l'affinité entre Erg11p et les azoles, résultant ainsi en une perte d'efficacité de ce groupe de médicaments (Vanden Bossche *et al.*, 1990). Chez *C. krusei*, *Aspergillus* spp. et *C. neoformans*, Erg11p aurait une affinité réduite pour certains azoles à cause d'une structure légèrement différente de cette enzyme chez *C. albicans*, ce qui expliquerait en grande partie la résistance primaire de ces espèces (Lamb *et al.*, 1995; Sanglard et Odds, 2002; Diaz-Guerra *et al.*, 2003). En comparant les séquences du gène *ERG11* entre des souches cliniques de *C. albicans*

résistantes aux azoles et leurs souches parentales sensibles, une grande quantité de mutations ont été découvertes, dont une douzaine corrélerent avec l'augmentation de résistance (Sanglard *et al.*, 1998; Perea *et al.*, 2001). Sanglard et Bille ont répertorié 83 polymorphismes de *ERG11* provenant de souches cliniques de *C. albicans*, démontrant ainsi la grande variabilité allélique de ce gène (Sanglard et Bille, 2002). Trois de ces mutations (Y132H, G464S et R467K) ont été étudiées en détail grâce à l'expression hétérologue de ces versions mutantes de Erg11p chez *S. cerevisiae*, suivi de tests *in vitro* de liaison aux azoles (Kelly *et al.*, 1999a; Kelly *et al.*, 1999b; Lamb *et al.*, 2000). Les résultats de ces études montrent en effet que ces mutations affectent l'affinité de Erg11p pour le FLC. Dans une souche résistante, le gène *ERG11* peut contenir plus d'une mutation avec des effets potentiellement additifs sur le niveau de résistance (Perea *et al.*, 2001). La structure tridimensionnelle d'un orthologue de cette enzyme complexée avec le FLC (Cyp51p provenant de *Mycobacterium tuberculosis*) a été obtenue et permet, grâce à la modélisation moléculaire, de prédire l'impact au niveau atomique de ces mutations sur la liaison de nouveaux inhibiteurs, comme le posaconazole et le voriconazole (Podust *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2004). Cette structure 3D donne également une idée sur les modifications chimiques à apporter aux azoles dans le but d'augmenter leur affinité pour Erg11p.

iii) Un troisième mécanisme de résistance aux azoles qui a été postulé est la surexpression du gène *ERG11*. Ce phénomène a été observé chez des isolats cliniques de *C. albicans* et *C. glabrata*, mais les niveaux du transcrit n'excèdent jamais trois ou cinq fois le niveau moyen des souches sensibles parentales (Vanden Bossche *et al.*, 1992; Marichal *et al.*, 1997; White, 1997; Lopez-Ribot *et al.*, 1998). L'augmentation des niveaux d'ARNm d'*ERG11* peut s'expliquer soit par une amplification génique (augmentation du nombre de copies du gène) ou par une modification de la régulation transcriptionnelle de ce gène. La première possibilité a été démontrée chez *C. glabrata* (Marichal *et al.*, 1997), mais n'a pas été observée chez *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1995; White, 1997). L'augmentation du rythme de transcription de *ERG11* et autres gènes *ERG* impliqués dans la synthèse de l'ergostérol peut être obtenue suite à une exposition aux azoles (Henry *et al.*, 2000; De Backer *et al.*, 2001; MacPherson *et al.*, 2005). Somme toute, ce mécanisme n'aurait qu'une

faible contribution dans la résistance secondaire aux azoles chez *C. albicans* (Maebashi *et al.*, 2001; Sanglard et Odds, 2002; White *et al.*, 2002).

iv) Finalement, le quatrième mécanisme est la modification de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Il y a peu d'exemples de ce mécanisme rapportés dans la littérature, mais son impact est important lorsqu'on considère qu'il entraîne également la résistance à l'AmB (Kelly *et al.*, 1996; Nolte *et al.*, 1997). En effet, la perte de fonction de l'enzyme stérol $\Delta^{5,6}$ désaturase encodée par le gène *ERG3* entraîne une accumulation d'ergosta-7,22-dienol qui peut alors être converti en une forme de stérol structurellement différente de l'ergostérol (d'où la résistance à l'AmB), mais qui supporte quand même la prolifération des levures (Sanglard *et al.*, 2003b). Parallèlement, l'inhibition d'Erg11p entraîne des formes de stérol méthylées en position 14 α qui deviennent toxiques après avoir été métabolisées par Erg3p. Ainsi, l'inactivation de Erg3p supprime l'effet toxique des azoles (Kelly *et al.*, 1997; Lupetti *et al.*, 2002).

Ainsi, il existe plusieurs mécanismes moléculaires par lesquels *C. albicans* et autres mycètes pathogènes peuvent contourner l'effet fongistatique d'un agent azolé. Il a en effet été démontré que le traitement à long terme de patients sidéens favorisait le développement de la résistance au FLC suite à une combinaison échelonnée des différents mécanismes moléculaire expliqués précédemment (White *et al.*, 1998; Franz *et al.*, 1998a). Une étude de l'épidémiologie de ces mécanismes moléculaires a montré que chez 20 souches cliniques de *C. albicans* fortement résistantes au FLC, le mécanisme prépondérant était la surexpression des transporteurs ABC et facilitateurs (*CDR1*, *CDR2* et *MDR1*), avec un taux de 85% des isolats (Perea *et al.*, 2001). Des mutations dans le gène *ERG11* et des niveaux élevés de son ARNm ont été détectés chez 65% et 35% des isolats, respectivement. De plus, ces mécanismes étaient combinés dans 75% des souches analysées (Perea *et al.*, 2001). Il semblerait que chez *C. glabrata*, la surexpression des transporteurs ABC serait le seul (ou du moins le plus important) mécanisme de résistance aux azoles (Sanglard *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 2004).

Concernant les autres inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol, soit les allylamines, thiocarbamates et morpholines, la résistance secondaire face à ces agents est très rare et/ou très peu répertoriée (White *et al.*, 1998). Il a tout de même été démontré que le terbinafine et l'amorolfine sont des substrats pour les transporteurs ABC Cdr1p et Cdr2p (Sanglard *et al.*, 1997). Ces agents antifongiques seraient alors sujets à voir leur effet diminuer chez un patient infecté avec une souche clinique présentant une résistance croisée aux azoles, dû à la surexpression de ces pompes à efflux (Ryder *et al.*, 1998).

c. Résistance aux polyènes

La résistance microbienne secondaire aux polyènes est rarement rencontrée en clinique. Par contre, certains mycètes pathogènes, tels *C. lusitaniae* et *Trichosporon* spp., peuvent présenter une résistance primaire à l'AmB et être sélectionnés lors d'une exposition à cet agent (Ellis, 2002). Tel que mentionné précédemment, le mécanisme moléculaire de résistance aux polyènes (AmB et nystatin) serait le résultat de mutations inactivant l'enzyme Erg3p (Kelly *et al.*, 1996; Nolte *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 2003b). Il est aussi possible qu'une réduction dans la production d'ergostérol, par exemple suite à des mutations réduisant l'efficacité de Erg11p, favorisent la résistance aux polyènes (Sanglard et Bille, 2002). Également, une augmentation de l'activité catalase, contribuant à diminuer les effets des dommages oxydatifs causés par ce type d'agent, pourrait également expliquer la résistance aux polyènes (Sokol-Anderson *et al.*, 1986).

d. Résistance à la flucytosine

La résistance à la 5-FC serait probablement moins répandue que ce qui était évalué au début des années 1980 (Sanglard et Odds, 2002). Une déficience ou perte d'activité des enzymes nécessaires à l'action antifongique de la flucytosine, ou bien une dérégulation de la voie de biosynthèse des pyrimidines peuvent expliquer la résistance microbienne à la flucytosine (Whelan, 1987). La résistance primaire observée chez *C. glabrata* et *C. krusei* serait due à une défectuosité dans la cytosine perméase ou la cytosine déaminase, alors que la résistance secondaire chez *C. albicans* et *Cryptococcus neoformans* serait le résultat

d'une déficience de l'uracile phosphoribosyl transférase (White *et al.*, 1998; Hope *et al.*, 2004; Akins, 2005).

e. Résistance aux échinocandines

Les échinocandines ont été introduites récemment. Ainsi, la résistance clinique à ces médicaments reste un phénomène rare. En laboratoire, des souches mutantes de *C. albicans* ont été développées, soit par mutagenèse, soit par sélection de mutations spontanées apparaissant à basse fréquence. Ainsi, la délétion du gène *FKSI* encodant une enzyme responsable de la synthèse β -1,3-glucane entraîne la résistance à une échinocandine (L-733,560) (Douglas *et al.*, 1997). Des mutations dans *FKSI* permettent l'enzyme correspondante de fonctionner malgré la présence d'échinocandines (Park *et al.*, 2005). Ces expériences démontrent donc que Fks1p est la cible principale des échinocandines. Un autre mécanisme de résistance aux échinocandines serait la surexpression du gène *CDR2*, encodant un transporteur ABC qui causent également la résistance aux azoles et autres bloqueurs de synthèse de l'ergostérol. Ainsi, la caspofungine serait aussi un substrat pour cette pompe à efflux (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003b). Cette découverte était surprenante, puisqu'une étude antérieure avait montré que plusieurs souches cliniques de *C. albicans* résistantes au FLC, possédant différents mécanismes de résistance, dont la surexpression de *CDR2* et *CDR1* ou *MDR1*, demeuraient sensibles à la caspofungine (Bachmann *et al.*, 2002). Il est à noter que les niveaux de résistance conférés par Cdr2p chez *C. albicans* sont 30 fois inférieurs à ceux causés par les mutations ponctuelles dans Fks1p (Akins, 2005).

Notons que d'autres mécanismes moléculaires pourraient opérer chez *C. albicans*. Certains sont bien connus chez les procaryotes, mais n'ont pas encore été démontrés de manière évidente chez *C. albicans*; par exemple la modification ou la dégradation du médicament de façon intra- ou extracellulaire et la réduction de l'import du médicament (White *et al.*, 1998). ALK8 est un cytochrome P450 qui pourrait convertir les médicaments antifongiques en dérivés non-toxiques (Panwar *et al.*, 2001). Parmi les nouveaux mécanismes répertoriés, notons la déficience mitochondriale chez *C. glabrata* (Sanglard

et al., 2001), la régulation de l'homéostasie du calcium via la calcineurine (Sanglard *et al.*, 2003a), les changements dans la composition et la fluidité de la membrane plasmique (Loffler *et al.*, 2000; Kohli *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2004) et la séquestration du FLC dans des compartiments intracellulaires (Maebashi *et al.*, 2002). Finalement, des mécanismes dits « cellulaires » peuvent également expliquer la résistance clinique aux antifongiques, soit le remplacement d'une espèce sensible par une espèce résistante au site d'infection (ex : de *C. albicans* à *C. krusei* ou *C. glabrata*) ou bien le remplacement par une souche plus résistante de *C. albicans* (White *et al.*, 1998).

3. La formation de biofilm par *C. albicans*

La plupart des microorganismes vivent dans leur habitat naturel non pas sous forme de cellules uniques dispersées (planctoniques), mais attachés aux surfaces sous une forme dense que l'on nomme « biofilm ». Ceci est valide également pour les levures et bactéries pathogènes infectant l'humain. Un biofilm est défini comme une communauté microbienne structurée, attachée à une surface et encaissée dans une matrice de matériel exopolymérique (Ramage *et al.*, 2005). *C. albicans* est la levure qui est la plus souvent associée à la formation de biofilms sur les muqueuses de l'hôte (par exemple dans les candidoses oropharyngées) et sur les appareils médicaux implantés (cathéter, prothèse, dentier, implant, etc.). Plusieurs techniques et systèmes *in vitro* et *in vivo* ont été développés récemment pour étudier la biologie des biofilms à *Candida* spp., dont l'importance clinique est indéniable (Mukherjee *et al.*, 2005a). Une des caractéristiques principales d'un biofilm de *C. albicans* est son niveau élevé de résistance aux antifongiques (Hawser et Douglas, 1995). Les biofilms peuvent former une barrière physique limitant la pénétration/diffusion des médicaments antifongiques, ce qui peut expliquer la difficulté à éliminer les cellules qui sont enfouies dans de telles structures. Par contre, ce mécanisme n'explique pas à lui seul les valeurs élevées de MIC d'azoles et d'AmB requises pour éliminer les cellules de *C. albicans* présentées dans un biofilm versus des cellules planctoniques (Al Fattani et Douglas, 2004). Il a été observé que les pompes à efflux, soit les transporteurs ABC *CDR1* et *CDR2* ainsi que le facilitateur *MDR1* étaient surexprimées dans les cellules formant un biofilm comparativement aux cellules planctoniques de la même souche (Ramage *et al.*,

2002). Par contre, des souches mutantes dans lesquelles ces gènes sont inactivés forment également des biofilms présentant une forte résistance au FLC, bien que ces mêmes souches soient hypersensibles lorsque cultivées sous forme planctonique (Ramage *et al.*, 2002). Des études subséquentes ont montré une augmentation de la transcription des gènes encodant les transporteurs dans la phase initiale de la formation du biofilm (Mukherjee *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004). Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits par d'autres équipes utilisant des conditions expérimentales différentes (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004; Murillo *et al.*, 2005). Une diminution du contenu en ergostérol aurait aussi été observée, ce qui indique que l'acquisition de la résistance par les biofilms de *Candida* spp. est un processus complexe et multifactoriel (Mukherjee *et al.*, 2003).

4. L'impact clinique de la résistance aux azoles

Des études épidémiologiques confirment que les infections sévères à *Candida* spp ne peuvent plus être considérées comme étant restreintes à la population de patients immunodéficients ou neutropéniques (Eggimann *et al.*, 2003a). La résistance aux agents antifongiques chez *Candida* spp. est donc un problème clinique qui ne sera pas éliminé de sitôt. De plus, le nombre de sidéens ne cesse d'augmenter dans les pays en voie de développement. Les données épidémiologiques sur la prévalence de la résistance aux antifongiques dépendent de plusieurs variables, notamment du contexte clinique, du type d'infection et de la classe d'agent antifongique (Sanglard et Odds, 2002). Ainsi, pour la flucytosine et l'AmB, la prévalence du phénomène de résistance est difficile à évaluer à cause de problèmes liés à la méthodologie, mais serait bien en bas de 10% des isolats de *C. albicans*. Plusieurs études ont été effectuées pour évaluer l'étendue de la résistance aux azoles. Globalement, chez les patients VIH positifs, le pourcentage d'isolats de *C. albicans* résistant au FLC serait de 12-19% (Sanglard et Odds, 2002). Lorsqu'elle apparaît, la résistance à un antifongique confronte le clinicien à un choix limité pour un agent antifongique alternatif (White *et al.*, 1998). Finalement, aucun consensus n'a été établi quant à la posologie pour éviter l'apparition de résistance ou pour l'utilisation d'une combinaison d'agents antifongiques (Marr, 2000; Marr, 2004). Considérant l'importance de la surexpression de transporteurs ABC comme mécanisme de résistance aux médicaments antifongiques, il incombe maintenant d'introduire cette famille de protéines.

II. Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) et leur rôle dans la résistance aux médicaments

A. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des transporteurs ABC

1. La superfamille des transporteurs ABC et leurs rôles biologiques

Le transport sélectif de molécules à travers les membranes biologiques est un processus fondamental, qui est le plus souvent médié par des protéines ou complexes de protéines membranaires. Ceux-ci sont nommés « transporteurs » ou « perméases » et peuvent parfois fonctionner en collaboration avec des récepteurs extracytoplasmiques et/ou des protéines ou domaines cytoplasmiques qui contrôlent ou produisent l'énergie nécessaire à la réaction transport. On distingue deux grands types de transporteurs, soit les canaux et les porteurs (carriers). Alors que les canaux facilitent la diffusion de molécules d'une manière passive, c'est-à-dire sans utilisation d'énergie métabolique, les porteurs effectuent, pour la plupart, un transport actif, nécessitant une source d'énergie chimique. Il existe deux principaux systèmes de transport actif, qu'on retrouve chez toutes les formes de vie, soit les transporteurs ABC et les facilitateurs majeurs (MFS; major facilitator superfamily) (Saier, Jr., 2000).

La superfamille MFS est constituée de transporteurs encodés par un seul polypeptide, contenant de 12 à 14 segments transmembranaires formés d'hélices α , et qui sont énergisés par le gradient ionique (proton ou autres cations) (Pao *et al.*, 1998; Zuniga *et al.*, 2001). Ayant une spécificité généralement stricte, les MFS sont divisés en 29 sous-groupes selon le type de substrats qu'ils peuvent transporter (Saier, Jr., 2000). Trois des sous-groupes de MFS contiennent des pompes à efflux conférant la résistance à des agents cytotoxiques variés en utilisant l'antiport de proton (Paulsen *et al.*, 1996; Saier, Jr., 2000).

Les transporteurs ABC font partie d'une superfamille de protéines, définie par la présence d'une cassette de liaison à l'ATP (ATP-binding cassette). Celle-ci forme la plus grande famille de protéines transmembranaires (Higgins, 1992). À titre d'exemple, il y aurait 79 transporteurs ABC différents chez *Escherichia coli*, 31 chez *S. cerevisiae*, 56 chez

Drosophila melanogaster, 60 chez *Caenorhabditis elegans*, 49 chez *Homo sapiens* et environ 120 chez *Arabidopsis thaliana* (Linton et Higgins, 1998; Dean *et al.*, 2001; Dassa et Bouige, 2001; Garcia *et al.*, 2004; Sheps *et al.*, 2004). Ces protéines utilisent l'énergie provenant de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter diverses molécules à travers la membrane plasmique et autres membranes cellulaires. Leur appartenance à cette superfamille est définie par la séquence et l'organisation de leur cassette de liaison à l'ATP (aussi appelée « nucleotide-binding domain » ou NBD) (Higgins *et al.*, 1986; Hyde *et al.*, 1990). Typiquement, un transporteur ABC est constitué de quatre domaines, soit deux NBD et deux domaines transmembranaires (TMD) (Figure 1-4) (Hyde *et al.*, 1990). Chaque TMD contient généralement six hélices alpha qui traversent la membrane biologique et constituent le ou les site(s) de liaison pour les substrats qui seront transportés. Ces quatre domaines de base peuvent être encodés séparément ou fusionnés dans un, deux ou trois polypeptides avec une grande variété de configurations. Certains transporteurs possèdent des domaines additionnels dont les rôles seraient de contrôler l'activité hydrolytique, la localisation subcellulaire, la spécificité du transporteur, etc..

On peut diviser les transporteurs ABC en trois grandes classes, soit i) les « importeurs », qui catalysent l'entrée de nutriments ou autres substrats à partir du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule (le cytosol), ii) les « exporteurs », qui catalysent la translocation de diverses molécules du cytosol vers l'extérieur de la cellule ou vers le lumen d'organelles intracellulaires, et iii) les autres protéines ABC qui ne possèdent pas de TMD et qui sont impliquées dans d'autres processus cellulaires (Dassa et Bouige, 2001). Les transporteurs ABC sont en majorité dédiés à un substrat particulier, alors que quelques transporteurs, notamment ceux impliqués dans la résistance aux médicaments, présentent une spécificité très large (Higgins, 2001).

Les transporteurs ABC de type « importeurs » se trouvent en grande partie chez les procaryotes. Ces systèmes, souvent désignés par le terme « perméases », sont spécialisés dans l'import de nutriments essentiels aux bactéries, qui se retrouvent en faible quantité dans leur environnement (sucres, acides aminés, etc.). Un grand nombre de perméases fonctionnent en étroite collaboration avec des protéines périplasmiques de liaison au

substrat (PBP; Figure 1-4). Les systèmes d'import de l'histidine (HisJQMP₂), du maltose (MalEFGK₂) et de la vitamine B12 (BtuCDE) sont des transporteurs de type ABC de *E. coli* qui ont été l'objet d'études détaillées (Davidson et Chen, 2004). En fait, HisP a été le premier gène ABC à être séquencé (Higgins *et al.*, 1982). Chez les procaryotes, les domaines d'un transporteur ABC sont souvent encodés par des gènes différents se retrouvant dans un même opéron. Certains transporteurs ABC bactériens possèdent deux domaines fusionnés dans le même gène, sous diverses configurations (TMD-NBD, NBD-TMD, NBD-NBD). Les sous-unités s'assemblent physiquement suite à leur synthèse pour former un transporteur membranaire actif (Linton et Higgins, 1998). Chez les cellules de mammifères, les importeurs sont rares. Un exemple serait PMP70/PXMP1 (ABCD3) qui serait responsable de l'import des acides gras à longue chaîne dans les peroxysomes (Shani *et al.*, 1997). L'import de nutriments dans les cellules humaines se fait principalement par endocytose ou via des pompes à protons. Par contre, les eucaryotes qui sont limités dans leur capacité à acquérir des nutriments, comme les plantes, pourraient posséder plusieurs transporteurs ABC dédiés à ce rôle (Martinoia *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2004).

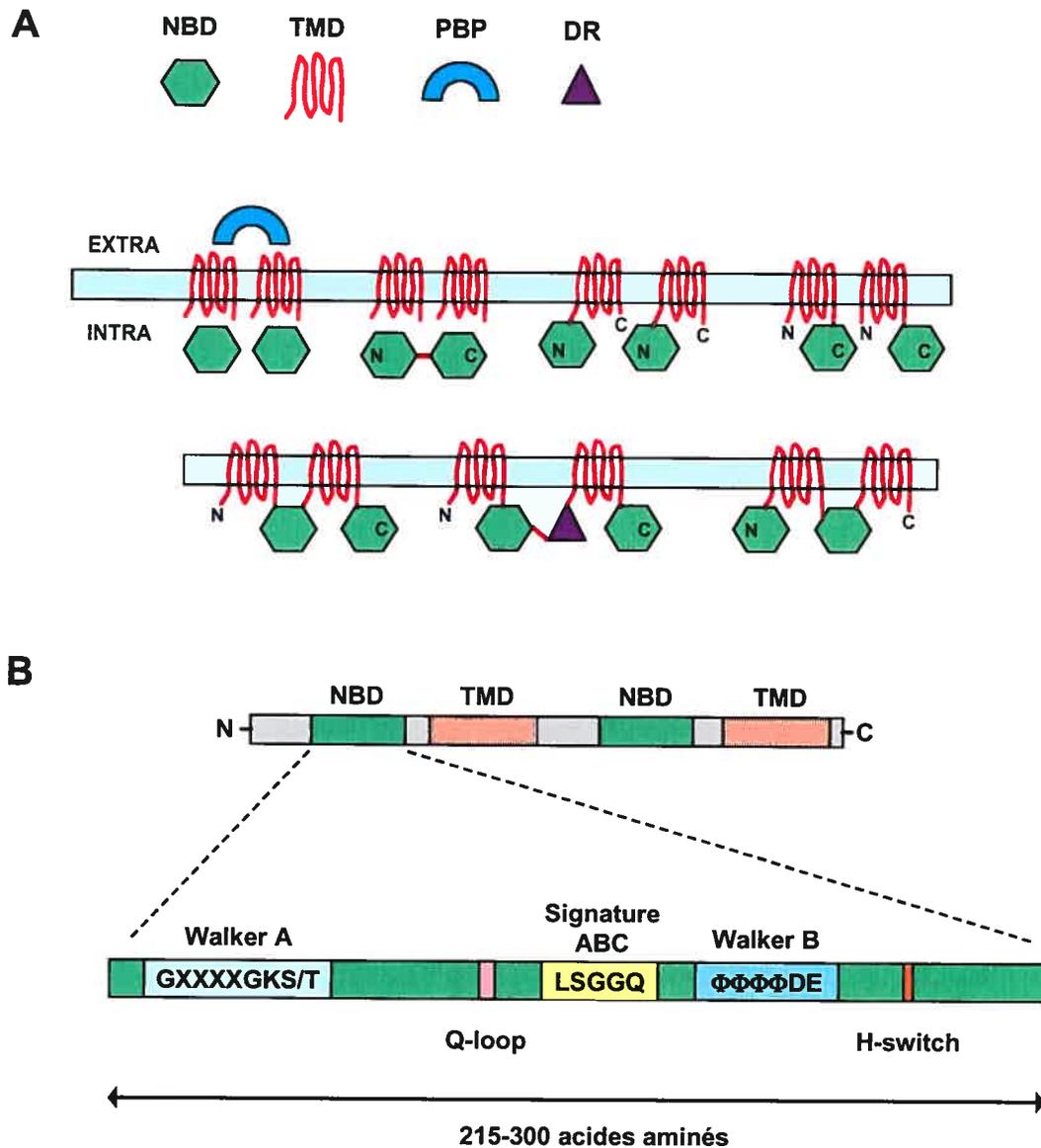


Figure 1-4 : Topologie des domaines et motifs formant les transporteurs ABC. **A**, quelques exemples de différentes organisations des domaines constituant des transporteurs ABC; NBD, nucléotide-binding domain; TMD, transmembrane domain; PBP, periplasmic substrate-binding protein; DR, domaine de régulation. Les côtés extra- et intracellulaire de la membrane cytoplasmique sont indiqués, ainsi que les extrémités N- et C-terminales lorsque des domaines sont fusionnés. **B**, motifs conservés formant un NBD, tels que décrits dans le texte. La zone variable de 90-120 acides aminés entre le motif Walker A et la signature ABC contient plusieurs hélices alpha dont une boucle contenant une glutamine conservée (Q-loop). Environ 35 résidus suivant le motif Walker B, une histidine conservée détermine une boucle nommée « His-switch ».

Les transporteurs ABC de type « exporteurs » se retrouvent autant chez les procaryotes que les eucaryotes et ils sont impliqués dans divers processus, notamment l'expulsion de composés cytotoxiques de nature endogène (ex : métabolites secondaires) ou exogène (ex : agents antimicrobiens) (van Veen *et al.*, 2001; Wolfger *et al.*, 2001; Lage, 2003). Des exemples de ces protéines ABC seraient la P-glycoprotéine (P-gp; produit du gène MDR1) et MRP1 chez *Homo sapiens*, LmrA de *Lactococcus lactis*, Pdr5p de *S. cerevisiae*, Cdr1p et Cdr2p de *C. albicans* et Pgh1 de *Plasmodium falciparum* (Lage, 2003). Il est intéressant de noter que ces transporteurs ABC impliqués dans la détoxification des cellules sont également capables d'affecter la distribution des lipides à travers les membranes biologiques (Borst *et al.*, 2000; Tannert *et al.*, 2003). D'autres exporteurs sont spécialisés dans l'extrusion de lipopolysaccharides formant de la paroi cellulaire (ex : MsbA de *E. coli*), dans la synthèse du cytochrome *c*, dans la production d'antibiotiques et l'export de la cire chez les plantes (Goldman et Kranz, 2001; Silver *et al.*, 2001; Mendez et Salas, 2001; Pighin *et al.*, 2004). Plusieurs polypeptides requis à l'extérieur de la cellule, comme des protéases, des phéromones et certaines toxines sont exportés via des transporteurs ABC spécifiques (Higgins, 1992). Le transporteur Ste6p de *S. cerevisiae* qui exporte le « facteur a », une phéromone nécessaire au processus de conjugaison, ainsi que le système HlyBD/TolC chez *E. coli*, qui exporte l'hémolysine A, sont des exemples de ce genre de transporteurs ABC (Higgins, 1992). Chez l'humain, TAP1 et TAP2 s'associent à la membrane du réticulum endoplasmique pour former un transporteur de peptides qui est impliqué dans le processus de la présentation des antigènes (Cresswell *et al.*, 1999). Quelques perméases et exporteurs peptidiques bactériens, dont HlyB, nécessitent une association avec d'autres protéines périplasmiques comme HlyD et TolC, permettant ainsi de former un lien avec la membrane externe. Dans la plupart des transporteurs ABC eucaryotes, les domaines sont génétiquement fusionnés dans une configuration de « demi-transporteur » (TMD-NBD ou NBD-TMD) ou de « transporteurs complets » ([TMD-NBD]₂ ou [NBD-TMD]₂). Il est généralement reconnu que les demi-transporteurs doivent soit s'homo- ou s'hétéro-dimériser pour être fonctionnels (Holland et Blight, 1999).

Certaines protéines de la superfamille ABC n'ont pas de domaine transmembranaire (TMD), mais appartiennent à cette catégorie à cause de la présence de cette cassette de liaison à l'ATP caractéristique (Geourjon *et al.*, 2001; Dassa et Bouige, 2001). Ces protéines ABC non-membranaires sont pour la plupart impliquées dans la modification des acides nucléiques; par exemple, UvrA et MutS de *E. coli* et Rad50 de *S. cerevisiae*, qui font partie de différents complexes de réparation de nucléotides, ainsi que des facteurs d'élongation, comme *YEF3* de *S. cerevisiae*. Par contre, la plupart des membres de la superfamille ABC sont des protéines membranaires que l'on nomme « transporteurs ABC » (Higgins, 1992).

Notons finalement que certains transporteurs ABC possèdent une structure différente (dont la présence du domaine de régulation) qui leur permettent de fonctionner en tant que canaux à ions, ou en tant que régulateur de canal à ions (Higgins, 1995). En effet, chez l'humain, la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) qui est responsable de la fibrose kystique (mucoviscidose) est en fait un canal à ion chlorure, alors que SUR1 (sulfonil urea receptor) n'a aucune activité de transport en soi, mais son activité ATPase régule l'ouverture et la fermeture du canal à potassium sensible à l'ATP (K_{ATP}). On retrouverait également des régulateurs de canaux à ions chez les bactéries (Higgins, 1995).

2. La structure des transporteurs ABC

Bien que les transporteurs ABC soient représentés en grand nombre dans la biosphère et qu'ils possèdent une très grande diversité de substrats et de rôle biologiques, ils présentent tous une architecture semblable. Tel que mentionné précédemment, cette architecture de base comprend minimalement quatre domaines et est organisée en deux moitiés similaires contenant chacune un NBD et un TMD.

a. Structure des NBD et des TMD

Les NBD sont formés de 215 à 300 acides aminés et contiennent les motifs conservés Walker A (GxxxxGKS/T ; où x représente n'importe quel acide aminé), Walker

B ($\phi\phi\phi\phi\text{DE}$; où ϕ représente un acide aminé hydrophobe), ainsi que le motif « signature » ou motif C (LSGGQ; Figure 1-4B) (Walker *et al.*, 1982; Schneider et Hunke, 1998). Les motifs Walker A et B sont présents dans la vaste majorité des protéines utilisant l'ATP, comme la myosine, l'ATP synthétase et l'adénylate kinase, alors que le motif C est spécifique à la superfamille ABC (Walker *et al.*, 1982; Saraste *et al.*, 1990; Smith et Rayment, 1996; Geourjon *et al.*, 2001). Les NBD de transporteurs ABC provenant des bactéries jusqu'aux humains présentent une homologie de séquence avoisinant 25-30%, ce qui suggère que la structure et le mode de fonctionnement de ce domaine sont globalement similaires chez tous les êtres vivants et ont été conservés au cours de l'évolution (Higgins, 1992; Kerr, 2002). Cette homologie s'étend non seulement aux motifs Walker A, B et signature initialement identifiés, mais aussi à d'autres régions dans les NBD. Ainsi, par comparaison de séquence, on peut identifier deux résidus fortement conservés, soit une glutamine et une histidine formant respectivement la « boucle glutamine » (Q-loop) et la « boucle histidine » (H-loop ou H-switch; Figure 1-4B) (Linton et Higgins, 1998; Hopfner *et al.*, 2000).

Possédant une moyenne de douze segments transmembranaires, les transporteurs ABC sont très difficiles à purifier et à cristalliser. Ainsi, les données structurales pour ce type de protéines proviennent essentiellement de données biochimiques ou des domaines NBD purifiés individuellement. La première structure tridimensionnelle publiée fut celle de HisP, le NBD de la perméase pour l'histidine chez *Salmonella thyphimurium* (Hung *et al.*, 1998). Le fait que ce domaine soit soluble et encodé séparément des TMD auxquels il s'associe a grandement facilité sa purification. La conformation générale de ce NBD a été confirmée par la suite grâce aux cristallisations de différents NBD de transporteurs bactériens (Kerr, 2002; Schmitt et Tampe, 2002; Davidson et Chen, 2004). Ainsi, les NBD se présentent sous une forme bilobée en forme de L avec un premier sous-domaine catalytique (lobe I) de type RecA, composés principalement de feuillettes β parallèles (Hung *et al.*, 1998). Cette portion contient la poche de liaison aux nucléotides qui est d'abord constituée du motif Walker A. Cette boucle de liaison aux phosphates (P-loop) riche en glycines, précède la première hélice α , et fait suite à trois feuillettes β (Figure 1-5). Le motif Walker A s'enroule autour de la chaîne di- ou triphosphate du nucléotide. La base

d'adénine du nucléotide est stabilisée par un résidu aromatique (Tyr16 chez HisP) situé entre les feuillets 1 et 2 (s1 et s2 dans la Figure 1-5). Ce site catalytique, qui est complété par le motif Walker B formant un feuillet β , est présent dans de nombreuses ATPases et GTPases (Smith et Rayment, 1996).

L'acide aspartique fortement conservé du motif Walker B coordonne un ion magnésium (Mg^{2+}) dans le site catalytique via une molécule d'eau. Cet ion serait un facteur essentiel dans l'hydrolyse de l'ATP (Davidson et Chen, 2004). On retrouve presque toujours un résidu glutamate immédiatement après l'acide aspartique du motif Walker B. Celui-ci forme des liens avec le Mg^{2+} et la molécule H_2O activatrice. Ce glutamate pourrait être la base catalytique pour l'hydrolyse de l'ATP, compte tenu que la mutation de ce résidu entraîne généralement une perte totale de l'activité ATPase (Smith *et al.*, 2002; Orelle *et al.*, 2003). Le Q-loop, aussi appelé le senseur (ou connecteur) du γ -phosphate, qui suit le feuillet β 6, est également responsable de la coordination du Mg^{2+} et d'une molécule d' H_2O potentiellement activatrice (Hopfner *et al.*, 2000; Diederichs *et al.*, 2000; Karpowich *et al.*, 2001). La structure de la boucle Q-loop semble assez flexible et des changements de sa conformation sont observés en comparant les structures des NBD sous forme *apo/ADP/ATP* (Yuan *et al.*, 2001; Karpowich *et al.*, 2001; Verdon *et al.*, 2003). Ces études structurales, avec d'autres utilisant la simulation moléculaire dynamique, suggèrent que cette boucle joue un rôle dans la rotation du sous-domaine hélical (lobe II) suite à la liaison et à l'hydrolyse de l'ATP (Jones et George, 2004). Ce lobe II est spécifique aux transporteurs ABC et est formé de trois à quatre hélices α (h3, h4 et h5 dans la Figure 1-5), dont le motif signature (LSGGQ). Des études de mutagenèse ont montré que ce motif signature joue un rôle important dans l'hydrolyse de l'ATP, mais sa fonction exacte était demeurée vague jusqu'à tout récemment. Enfin, l'histidine conservée du « His-switch » suivant le feuillet β 8 établit un pont hydrogène avec le γ -phosphate de l'ATP (Smith *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003a).

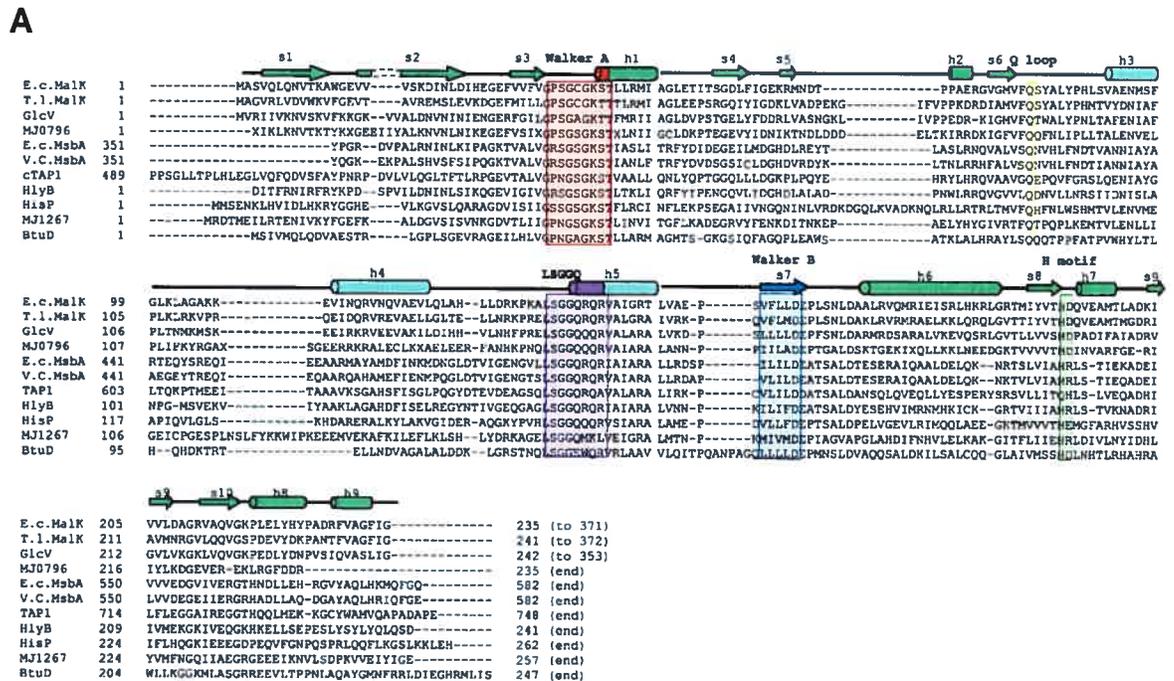
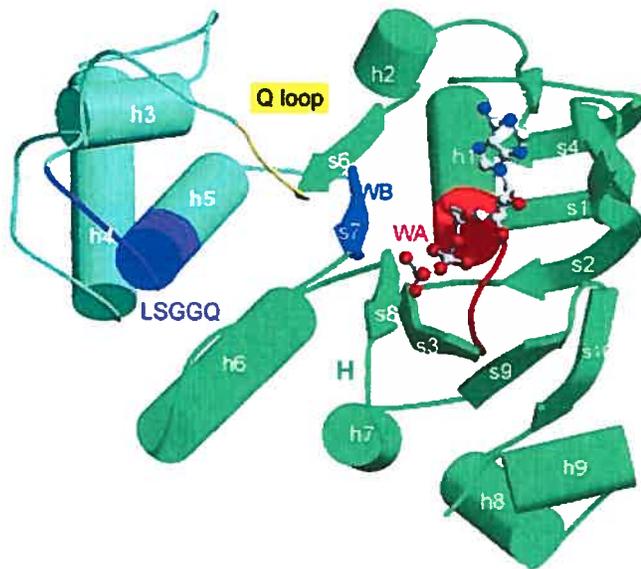
**B**

Figure 1-5 : Structure des domaines de liaison aux nucléotides (NBD). **A**, alignement des séquences de différents NBD dont les structures ont été déterminées à haute résolution. Les motifs conservés sont surlignés et la structure secondaire de *E. coli* MalK est indiquée au-dessus de l'alignement. **B**, structure du NBD de *E. coli* MalK (résidus 1-235) liant un ATP. Le lobe I est en vert et le lobe II est en turquoise. Les motifs Walker A (rouge), Walker B (bleu), signature (mauve), Q-loop (jaune) et H-loop (vert), ainsi que la molécule d'ATP sont représentés. Figure modifiée de (Davidson et Chen, 2004).

La question de la spécificité d'un NBD pour son TMD correspondant, qui est particulièrement importante dans le cas des perméases bactériennes où ces domaines, encodés séparément, doivent s'associer dans des combinaisons non-interchangeables, a été récemment éclaircie par l'identification d'une région variable constituée d'hélices α entre le Q-loop et le motif LSGGQ (Schmitt *et al.*, 2003). Suite aux récentes cristallisations de transporteurs complets (décrites plus loin), il est proposé que cette région variable interagisse avec une région conservée dans une boucle cytoplasmique des TMD, identifiée chez les perméases bactériennes (Mourez *et al.*, 1997) et confère ainsi la spécificité NBD-TMD.

Les domaines transmembranaires (TMD) sont essentiellement un regroupement de six hélices α qui traversent la bicouche lipidique, reliées entre elles par des boucles intra- et extracellulaires de longueur variable, ces dernières pouvant être glycosylées (Higgins, 1992). Un complément de dix à douze hélices serait le minimum nécessaire pour former un pore d'une dimension suffisante pour accepter les différents substrats connus des transporteurs ABC. Les deux TMD d'un transporteur ABC sont responsables de la reconnaissance et de la liaison des substrats. Une quantité importante d'études appuie cette affirmation, dont voici quelques exemples : i) l'homologie de séquence entre les TMD de différents transporteurs ABC est très faible (Higgins, 1992), ii) des mutations introduites dans ce domaine modifient la spécificité pour les substrats (Loo et Clarke, 1994; Hanna *et al.*, 1996; Edgar et Bibi, 1999; Ambudkar *et al.*, 1999; Robey *et al.*, 2003), iii) chez la drosophile, l'hétérodimérisation des demi-transporteurs *white*, *brown* et *scarlet* contenant des NBD très similaires, mais des TMD ayant peu d'homologie, produit des transporteurs ayant des spécificités différentes face aux précurseurs des pigments oculaires (Mackenzie *et al.*, 1999), iv) l'ajout de substrats à un transporteur purifié modifie la conformation des segments transmembranaires (Loo *et al.*, 2003) et v) le marquage de différents transporteurs ABC avec des dérivés radioactifs photoactivables suivie d'une analyse des fragments protéolytiques dévoile que les segments transmembranaires sont les principaux sites de liaisons aux substrats (Greenberger, 1993; Daoud *et al.*, 2001). La P-gp humaine aurait même plusieurs sites de liaisons aux substrats dans ses TMD (Dey *et al.*, 1997; Safa,

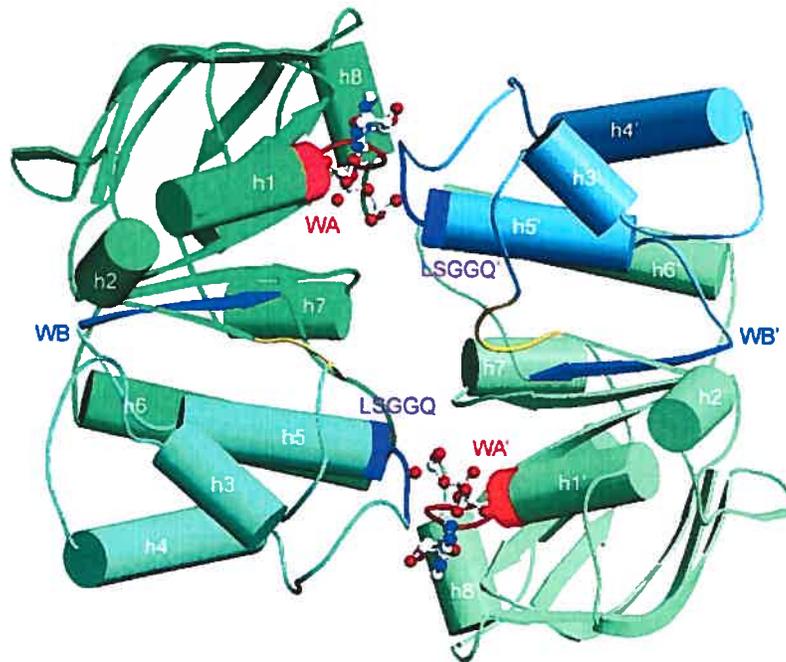
2004). Par contre, les mécanismes moléculaires qui permettent à des transporteurs ABC de type MDR comme P-gp, Pdr5p, Cdr1p et Cdr2p de reconnaître et d'expulser des centaines de composés différents demeurent encore à l'état d'hypothèses (Blackmore *et al.*, 2001; Golin *et al.*, 2003; Safa, 2004). Il en va de même pour le mécanisme de couplage entre l'activité ATPase et la translocation du substrat (Jones et George, 2004).

La preuve que l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire au transport des substrats a été apportée par la purification et la reconstitution en liposomes des systèmes bactériens d'import de l'histidine et du maltose (Bishop *et al.*, 1989; Davidson et Nikaido, 1991). La stœchiométrie de la réaction dans le cas des transporteurs ABC (ATP/substrat) est difficile à établir avec précision, mais ce rapport serait vraisemblablement de 2 molécules d'ATP hydrolysées pour une de substrat transporté (Patzlaff *et al.*, 2003). Dans la plupart des systèmes ABC analysés, cette hydrolyse de l'ATP serait effectuée par chacun des NBD travaillant en alternance et serait coopérative (Senior et Bhagat, 1998). En effet, lorsqu'un seul NBD est inactivé, le transporteur perd son activité ATPase en totalité (Azzaria *et al.*, 1989; Loo et Clarke, 1995). La nécessité pour les transporteurs ABC d'avoir deux cassettes de liaison à l'ATP fonctionnelles ainsi que la fonction exacte du motif signature LSGGQ ont longtemps été sujets de débats parmi les chercheurs.

Une percée importante a été réalisée en 2002 par l'équipe du Dr John Hunt. Ces chercheurs ont cristallisé la forme dimérique d'un mutant catalytiquement inactif de MJ0796, le NBD du transporteur LolD de *Methanococcus jannashii* (Smith *et al.*, 2002). En effet, lorsque le résidu glutamate suivant le motif Walker B est muté (E171Q), l'association de ce NBD avec lui-même est fortement stabilisée dans une configuration « tête-à-queue », c'est-à-dire avec une symétrie en deux axes perpendiculaires. Dans cette conformation appelée le « ATP-sandwich dimer », le motif signature LSGGQ (lobe II) d'un NBD vient établir des contacts importants avec la molécule d'ATP liée par l'autre NBD (dans le lobe I) et complète ainsi la poche de liaison de ce dernier (Figure 1-6). Cette configuration a été observée initialement dans la structure tridimensionnelle de Rad50, une ATPase de la superfamille ABC (Hopfner *et al.*, 2000), démontrée *in vitro* (Moody *et al.*, 2002), puis observée par la cristallisation d'autres NBD (Locher *et al.*, 2002; Chang, 2003;

Chen *et al.*, 2003a). Une autre étude, utilisant une approche biochimique de photoclivage, a démontré que cet arrangement dimérique de l'« ATP-sandwich » serait valable dans des conditions physiologiques (Fetsch et Davidson, 2002). Ainsi, les résidus des deux NBD dans un même transporteur coopèrent étroitement pour former les deux sites de liaisons à l'ATP. *In vitro*, les transporteurs ABC n'ont pas une spécificité très stricte pour l'ATP, mais peuvent également utiliser le GTP, le CTP ou l'UTP (al Shawi et Senior, 1993; Decottignies *et al.*, 1994). Même si l'ATP est fort probablement le principal nucléotide utilisé *in vivo* par ces protéines, on préfère nommer les cassettes de liaison à l'ATP (ABC) des domaines de liaison aux nucléotides (NBD).

A



B

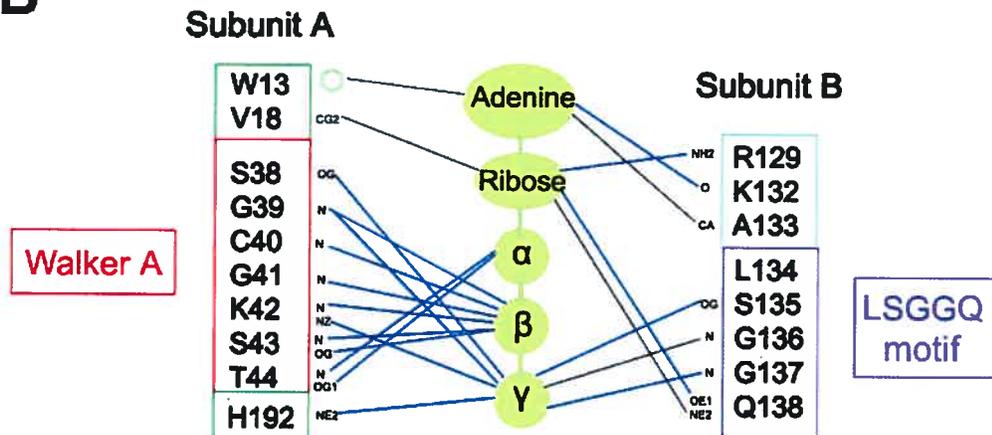


Figure 1-6 : Arrangement dimérique des NBD et interactions avec l'ATP. **A**, l'homodimère du NBD de *E. coli* MalK liant deux molécules d'ATP selon le modèle de l'« ATP-sandwich », en configuration tête-à-queue. Le système de couleur est le même qu'à la Figure 1-5, avec la sous-unité B (à droite) présentant des tons de couleur légèrement différents. **B**, diagramme des interactions moléculaires entre un des deux ATP lié à l'homodimère. Les lignes noires montrent les contacts van der Waals, les lignes bleues montrent les ponts hydrogènes et salés. Figure modifiée de (Davidson et Chen, 2004).

b. Structure des transporteurs ABC complets

La première image d'un transporteur ABC complet nous est venue des études de Rosenberg et collaborateurs portant sur l'analyse par microscopie électronique de la P-gp purifiée (Rosenberg *et al.*, 1997). Cependant la faible résolution nous limitait à une image d'un cylindre large de 10 nm et haut de 8 nm, formé par les TMD et traversant la bicouche lipidique, contenant un pore ouvert du côté extracellulaire et complété par deux lobes cytoplasmiques d'une dimension de 3 nm correspondant fort probablement aux NBD (Rosenberg *et al.*, 1997). Dans des études plus récentes, ces auteurs dévoilaient une projection 3D de P-gp qui se rapproche de la forme en spirale des hélices α des TMD selon les données biochimiques de Loo et Clarke (Loo et Clarke, 2000; Rosenberg *et al.*, 2001; Loo *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2005). En fait, notre compréhension de la structure et du fonctionnement des transporteurs ABC a fait un bond prodigieux suite à la publication des structures à haute résolution de deux transporteurs ABC de *E. coli*, MsbA et BtuCD (Chang et Roth, 2001; Locher *et al.*, 2002). MsbA est responsable du transfert du « lipide A » et du lipopolysaccharide (LPS), deux composantes importantes de la membrane externe chez les bactéries (Doerrler *et al.*, 2004), tandis que BtuCD est une perméase exécutant l'import de la vitamine B12 (Borths *et al.*, 2005). Alors que la structure de BtuCD confirmait la projection 3D de P-gp, à savoir qu'une chambre aqueuse est formée à l'intérieur de la membrane à l'interface entre les deux TMD et qu'elle est fermée du côté cytoplasmique, la structure de MsbA provenant *E. coli* montrait une géométrie très différente des TMD, semblable à un V inversé (Figure 1-7) (Chang et Roth, 2001; Locher *et al.*, 2002). De plus, les NBD de BtuCD interagissent entre eux de la manière prédite par le modèle « ATP sandwich », alors que les NBD d'*E. coli* MsbA sont séparés l'un de l'autre. Par contre, Chang et Reyes ont publié par la suite une structure « fermée » du MsbA de *Vibrio cholera* sous forme *apo* et tout récemment, la structure de la forme complexée avec le Mg·ADP·vanadate ainsi que son substrat, le LPS, qui représenterait beaucoup plus la conformation physiologique de ce transporteur ABC (Figure 1-7 E) (Chang, 2003; Reyes et Chang, 2005).

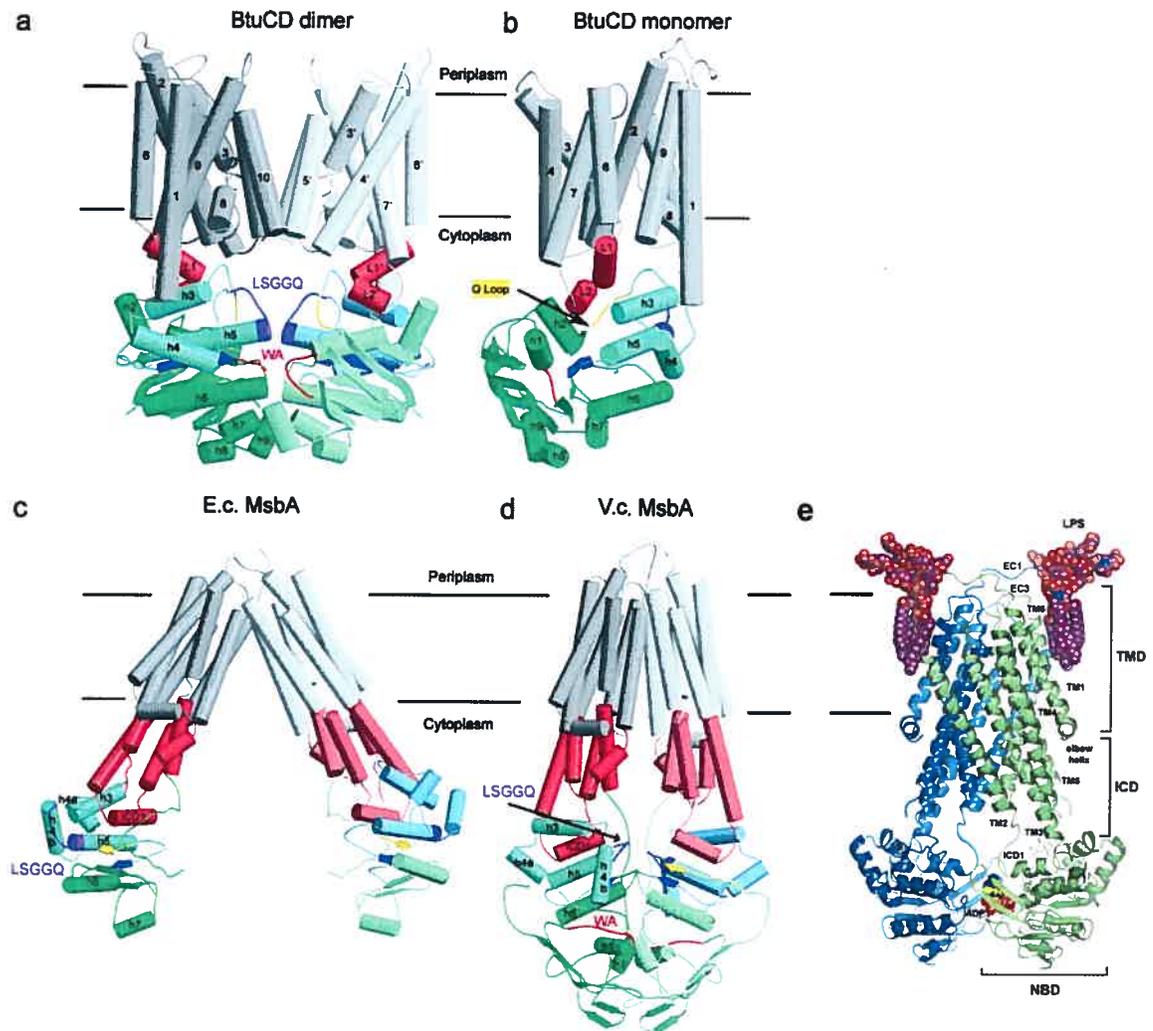


Figure 1-7 : Structures tridimensionnelles de transporteurs ABC complets. **A**, structure dimérique de BtuCD (*E. coli*; *E.c.*), vue de face avec un axe de symétrie verticale entre les deux sous-unités. Pour A-D, les TMD sont en gris, l'ICD est en mauve et les NBD sont en vert et turquoise. **B**, vue de côté d'une sous-unité BtuCD, montrant les hélices L1 et L2 du ICD de BtuC qui s'arriment sur le Q-loop et les hélices h2 et h3 de BtuD. **C**, vue de face de la structure de MsbA d'*E. coli*. Une partie des NBD était désordonnée dans le cristal, rendant impossible sa modélisation. **D**, vue de face de MsbA de *V. cholera* (*V.c.*) sous forme *apo* et **E**, vue de côté du MsbA de *S. typhimurium* sous forme complexée avec le MgADP, le vanadate et le LPS. En **E**, le code de couleur et la représentation de la structure tertiaire sont différents, mais les parties importantes du transporteur sont identifiées. Figure modifiée de (Davidson et Chen, 2004) et de (Reyes et Chang, 2005).

Dans le cas de MsbA, un troisième domaine a été identifié, soit le domaine intracellulaire (ICD) (Chang et Roth, 2001). Composé d'hélices α situées dans les boucles cytoplasmiques des TMD, l'ICD servirait à transmettre entre les TMD et les NBD les changements de conformation suite à la liaison du substrat et de l'ATP. La structure de BtuCD diffère de celle de MsbA en plusieurs points. À part une orientation plus verticale des TMD, ceux-ci présentaient chacun dix hélices α au lieu de six, le nombre typiquement prévu dans les calculs d'hydropathie. Ainsi, le nombre et l'orientation des hélices transmembranaires risquent de varier grandement entre les différentes classes de transporteurs ABC. De plus, aucun ICD n'est identifiable dans la structure de BtuCD, le contact entre les TMD et NBD se faisant tout de même via les boucles cytoplasmiques du TMD et la région du Q-loop dans le NBD, tel que décrit à la Figure 1-7 A et 1-7 B.

3. Les modèles de cycles catalytiques des transporteurs ABC

La dissection du cycle catalytique des transporteurs ABC a été effectuée principalement pour la P-gp, la pompe causant la résistance multiple aux drogues (MDR) chez les mammifères, et pour LmrA, une pompe bactérienne de type MDR. Selon différentes données biochimiques, trois groupes de recherches ont proposés des modèles de cycles catalytiques légèrement différents.

Dans le premier modèle (Figure 1-8 A), le transporteur ABC possède un seul site de liaison aux substrats, partagé entre les deux TMD, qui se réoriente de la face interne à la face externe de la bicouche lipidique suite à l'hydrolyse de l'ATP et au relâchement du phosphate, qui s'effectuent en alternance aux NBD, fonctionnant eux-mêmes en étroite collaboration (Senior *et al.*, 1995). Senior et collègues ont peaufiné leur modèle afin d'incorporer les notions de la « dimérisation » des NBD suite à la publication de la structure des NBD formant un « ATP-sandwich » (Urbatsch *et al.*, 2003). Ainsi, ils postulent que l'association des NBD et la réouverture du dimère sont des étapes importantes influençant les changements de conformation qui mènent à la translocation du substrat. Un seul ATP serait hydrolysé lors de l'association des deux NBD (Tomblin *et*

al., 2005). Au moment où ce premier modèle fut proposé (1995), il était présumé que les NBD et les TMD interagissent grâce à un mécanisme de couplage, mais les détails moléculaires de ce processus étaient alors inconnus.

Ce couplage entre les NBD et les TMD a été mis en évidence par des expériences utilisant le blocage de l'hydrolyse par la vanadate (Ramachandra *et al.*, 1998) (van Veen *et al.*, 2000) et par des études spectroscopiques (Liu et Sharom, 1996; Grimard *et al.*, 2001). Il a en outre été démontré que l'hydrolyse de l'ATP aux NBD causait des changements de translation et/ou de rotation des hélices formant les TMD (Vigano *et al.*, 2002). Le groupe du Dr van Veen a alors proposé un modèle où chaque moitié du transporteur aurait son propre site de liaison aux substrats, tandis que l'hydrolyse de l'ATP procède en alternance et de manière concomitante avec le transport du substrat à un des deux sites qui s'expose vers l'extérieur, alors que le second site reprend sa position vers l'intérieur de la membrane (Figure 1-8 B).

Lorsqu'un inhibiteur de l'activité ATPase comme le vanadate bloque P-gp dans un état de transition, le transporteur démontre alors une affinité réduite pour ses substrats (Ramachandra *et al.*, 1998). Cette observation principale a initié l'élaboration d'un troisième modèle dans lequel deux sites de liaison aux substrats coexistent, l'un faisant face du côté cytoplasmique de la membrane, qui présente une forte affinité pour les substrats (site « ON ») avant le premier événement d'hydrolyse de l'ATP, tandis que l'autre site du côté extracellulaire (« OFF ») présente une faible affinité pour les substrats (Figure 1-8 C). L'hydrolyse par un NBD et le relâchement du phosphate inorganique résulterait en un transfert de niveaux d'affinité entre les deux sites, menant alors à la translocation du substrat. Cependant, un deuxième événement d'hydrolyse serait nécessaire pour rétablir la forte affinité pour les substrats de la pompe au site interne (Sauna et Ambudkar, 2000; Sauna et Ambudkar, 2001).

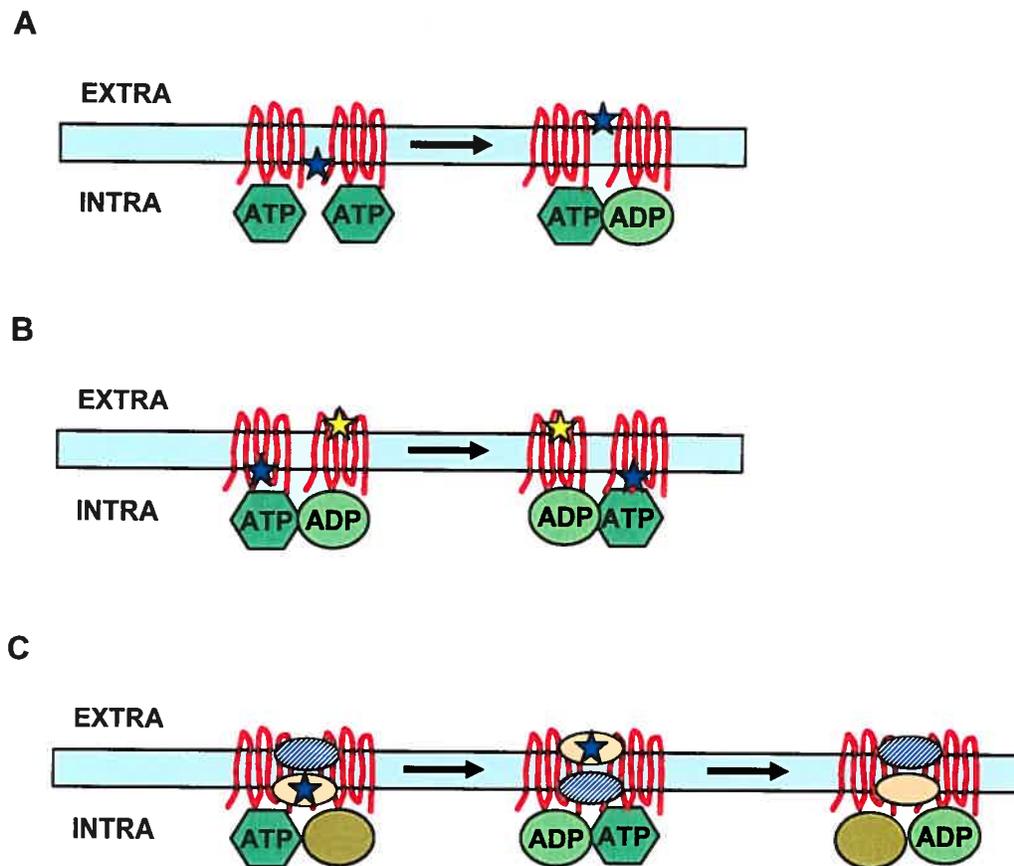


Figure 1-8 : Schémas simplifiés des différents modèles de cycles catalytiques pour les transporteurs ABC agissant comme pompe à efflux MDR. Les étoiles représentent les molécules de substrats, les NBD sont de différentes formes et couleurs selon qu'ils soient inoccupés ou sous forme pré-/post-hydrolyse. Voir texte pour plus de détails.

Ainsi, même si ces modèles diffèrent quant à la manière dont les substrats sont transportés par les protéines ABC, ils s'accordent sur le fait que l'énergie fournie par la liaison, l'hydrolyse et le relâchement des nucléotides serait transmise aux TMD par un mécanisme de couplage direct de façon à créer le mouvement vectoriel du substrat contre un gradient de concentration. Inversement, on sait que la liaison du substrat aux TMD affecte l'interaction des NBD avec l'ATP, principalement à cause du fait que l'ajout de substrats à une préparation de P-gp stimule son activité ATPasique intrinsèque (Orlowski *et al.*, 1996). Les structures tridimensionnelles de MsbA et BtuCD (Figure 1-7) apportent un

début d'explication à un tel couplage NBD-TMD, mais les différences majeures entre les deux structures nous empêchent à l'heure actuelle de déterminer un mécanisme applicable à tous les transporteurs ABC.

Higgins et Linton ont proposé récemment un modèle nommé « ATP switch » qui se veut unificateur (Higgins et Linton, 2004). En effet, trois types de données importantes recueillies récemment sur différents transporteurs ABC se devaient d'être consolidés dans un modèle généralisé. Des données biochimiques et structurales ont montré que i) l'étape de liaison de l'ATP, plus que son hydrolyse, apporterait l'essentiel de l'énergie nécessaire à la translocation du substrat (Aleksandrov *et al.*, 2000; Rosenberg *et al.*, 2003; Manciu *et al.*, 2003), ii) les deux NBD de certains transporteurs ABC, notamment ceux de la catégorie ABCC comme MRP1 et CFTR, ne sont pas équivalents dans leur capacité de lier et d'hydrolyser l'ATP (Aleksandrov *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2002), et iii) la liaison à l'ATP induit l'association physique des deux NBD (Hopfner *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003a). Ainsi, le concept d'un transfert entre deux conformations, l'une où les deux NBD s'associent suite à la liaison de l'ATP et l'autre où les deux NBD se dissocient suite à l'hydrolyse de l'ATP, forme l'essentiel de leur modèle « ATP switch ». Cette transition entre les deux états serait étroitement contrôlée par les signaux provenant des TMD.

Avant d'initier le cycle de transport, la protéine ABC sous forme *apo* présente une faible affinité pour l'ATP, mais le site de liaison aux substrats (en rose; Figure 1-9) est sous forme d'haute affinité. La première étape (Step I) serait initiée par la liaison du substrat, qui, par ricochet, aurait pour effet d'augmenter l'affinité des NBD pour l'ATP (Martin *et al.*, 2001). La liaison d'une deuxième molécule d'ATP se fait de manière coopérative et induirait la dimérisation des deux NBD (Step II). Des variations surviennent après cette étape, puisque comme mentionné plus haut, les NBD de certains transporteurs ont des affinités fort différentes pour l'ATP (Daumke et Knittler, 2001), tandis que chez d'autres protéines ABC, les deux NBD auraient des capacités identiques à lier les nucléotides (Berridge *et al.*, 2003). Durant l'étape II, l'association des NBD a causé un changement important dans la conformation des hélices α formant les TMD, de telle sorte que le site de liaison aux substrats expose maintenant le substrat soit directement au milieu

extracellulaire, soit au feuillet externe de la bicouche lipidique, selon la nature du transporteur et de l'hydrophobicité du substrat. Le substrat quitterait le transporteur à cette étape, quoique ceci reste à démontrer hors de tout doute. À l'étape III, l'ATP est hydrolysé en alternance par les deux NBD, un processus qui serait nécessaire afin de rétablir la forte affinité des TMD pour les substrats (Figure 1-9). Cette hydrolyse provoquerait une rotation du lobe II (Figure 1-5 B), déstabilisant alors l'association entre les NBD (Jones et George, 2004). L'événement qui déclenche l'hydrolyse à un des deux sites demeure inconnu, mais pourrait être relié soit au relâchement du substrat par les TMD, soit à la géométrie de l'ATP par rapport à certains résidus catalytiques dans les NBD lorsque ceux-ci sont étroitement associés (Higgins et Linton, 2004). Dans la dernière étape (Step IV), les molécules d'ADP et de phosphate inorganique se dissocient séquentiellement à cause de répulsions électrostatiques (Smith *et al.*, 2002), rétablissant alors le transporteur à son état initial. Il se peut que la liaison d'une nouvelle molécule de substrat occasionne à la fois la dissociation de l'ADP de la fin d'un cycle, tout en stimulant la liaison de l'ATP dans le prochain cycle (Higgins et Linton, 2004).

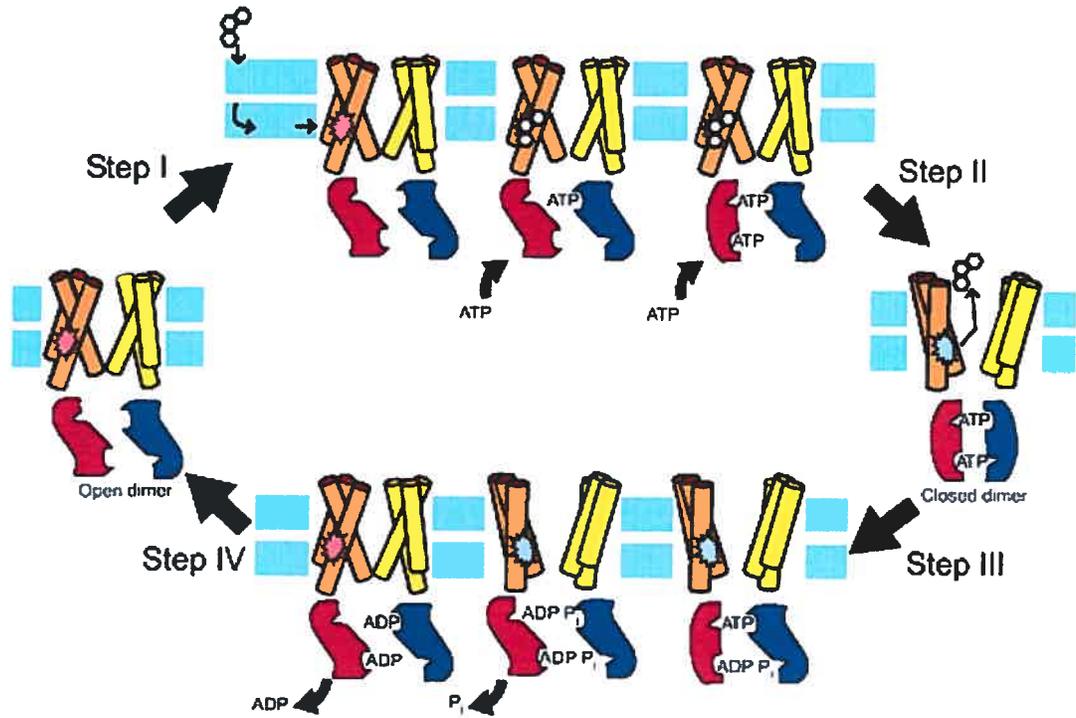


Figure 1-9 : Le modèle général du « ATP switch » pour le fonctionnement des transporteurs ABC de type « exporteurs ». Les TMD sont représentés par des cylindres jaunes et orangés, à la perpendiculaire du plan de la membrane plasmique (bleu pâle). Les NBD sont représentés par des formes rouges et bleues, et dans un but de clarté, vus par le dessus (parallèle à la membrane plasmique), comme à la Figure 1-6 A. Les étapes du cycle (Step I-IV) sont décrites dans le texte. La figure est tirée de (Higgins et Linton, 2004) et on trouve dans cette publication les variations applicables pour les transporteurs de type « importeurs ».

B. L'implication des transporteurs ABC dans la résistance multiple aux médicaments

Les transporteurs ABC sont importants non seulement à cause de leur présence en grand nombre dans toutes les formes de vie et des rôles biologiques qu'ils jouent dans les cellules, mais également parce qu'ils sont impliqués dans diverses maladies chez l'humain. Les 49 transporteurs ABC répertoriés chez l'humain sont divisés d'après une analyse phylogénétique en 7 sous-groupes, ceux-ci étant désignés d'ABCA à ABCG (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>) (Dean *et al.*, 2001). Cinq de ces sous-groupes se retrouvent chez la levure modèle *S. cerevisiae* (Decottignies et Goffeau, 1997; Bauer *et al.*, 1999). Des déficiences dans 14 transporteurs ABC humains causeraient au moins 13 maladies différentes, les plus communes étant la fibrose kystique (CFTR/ABCC7), la dégénérescence maculaire (maladie de Stargardt; ABCR/ABCA4), l'adrénoleucodystrophie (ALD/ABCD1) et la maladie de Tangier (ABC1/ABCA1). La fibrose kystique est en effet l'une des maladies héréditaires les plus répandues en Amérique de Nord et elle est causée par des mutations dans CFTR, le transporteur ABC qui fonctionne comme canal à ion chlorure dans les cellules épithéliales pulmonaires (Riordan *et al.*, 1989; Sheppard et Welsh, 1999). Pour une liste complète des transporteurs ABC et les maladies chez l'humain qui leurs sont reliées, j'invite le lecteur à consulter les revues suivantes (Dean *et al.*, 2001; Borst et Elferink, 2002; Stefkova *et al.*, 2004).

1. La résistance multiple aux médicaments chez les cellules cancéreuses

Tout comme pour les infections fongiques, les cellules cancéreuses et les tumeurs qu'elles développent peuvent être réfractaires aux traitements chimiques, d'une manière intrinsèque ou acquise. Il existe plusieurs mécanismes qui peuvent expliquer le développement d'une résistance à la chimiothérapie, mais l'expulsion active des composés via la surexpression de transporteurs ABC serait un mécanisme prépondérant dans différents types de cancers (Gottesman, 2002). Une des conséquences graves de ce mécanisme est que les pompes membranaires impliquées possèdent un large spectre

d'activité et confèrent donc la résistance à une grande quantité de molécules n'ayant que très peu de relations chimiques ou structurales. Ce phénomène de résistance croisée aux médicaments se nomme « multidrug resistance » (MDR). Au moins six gènes ABC sont impliqués dans le phénomène MDR dans les cellules cancéreuses (Dean *et al.*, 2001; Gottesman, 2002). Les plus importants sont la P-glycoprotéine (P-gp/ABCB1), MRP1 (ABCC1) et ABCG2 (BCRP/MXR) (Gottesman, 2002).

La P-gp a été le premier transporteur ABC identifié chez l'humain (Juliano et Ling, 1976; Gros *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1986). P-gp est un transporteur « complet » présentant une structure [TMD-NBD]₂ et qui est exprimé principalement à la barrière hémato-encéphalique ainsi que dans les cellules épithéliales du foie, des intestins et des reins. Sa fonction serait de protéger les tissus contre les xénotoxines et de transporter des composés biologiques qui ne peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique, tels le glucosyl-céramide et le facteur activateur des plaquettes (Borst et Elferink, 2002). Les facteurs qui causent l'augmentation du niveau d'activité de la P-gp dans les tumeurs chez l'humain incluent l'activation transcriptionnelle accrue via le réseau p53, l'amplification génique suite à des aberrations chromosomiques ou l'expression d'un allèle mutant hyperactif (Lin *et al.*, 1997; Mathieu *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Cette surexpression de P-gp entraîne une résistance croisée à une pléiade de médicaments dont la doxorubicine, la vinblastine, l'étoposide, le taxol, etc. En revanche, des inhibiteurs de P-gp sont présentement en études cliniques, soit la cyclosporine A, le PSC833 et le LY335979 (Breedveld *et al.*, 2005). MRP1/ABCC1 est un autre transporteur impliqué dans la résistance des cellules cancéreuses (Cole *et al.*, 1992). MRP1 est différent de la P-gp sur le plan structural et fonctionnel puisqu'il possède un TMD additionnel en position N-terminale. Ce transporteur possède un spectre d'activité similaire à P-gp, mais ses substrats doivent être conjugués au glutathion, sulfate ou glucuronate (Borst et Elferink, 2002). ABCG2 quant à lui a été identifié dans des lignées de cellules cancéreuses résistantes au mitoxanthrone qui ne surexprimaient ni P-gp, ni MRP1 (Allikmets *et al.*, 1998; Doyle *et al.*, 1998; Miyake *et al.*, 1999). ABCG2 est un demi-transporteur qui possède une topographie NBD-TMD et qui s'associe *in vivo* en homodimère ou même en homotétramère (Xu *et al.*, 2004; Bhatia *et al.*, 2005). Ce transporteur est donc surexprimé dans différents type de cancers et il cause la

résistance aux anthracyclines (ex : daunorubicine, doxorubicine), au mitoxantrone et au topotécan (Borst et Elferink, 2002). La fonction biologique d'ABCG2 demeure inconnue, mais ce transporteur se trouve principalement exprimé dans le placenta, dans l'intestin et aux différentes barrières hématologiques (encéphalique, rachidienne, testiculaire). Il pourrait donc servir à la protection de l'organisme contre les métabolites toxiques (Leslie *et al.*, 2005; Krishnamurthy et Schuetz, 2006).

2. L'étude de la résistance pléiotropique aux drogues (PDR) chez la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* est un organisme modèle important, puisque l'expression de plusieurs transporteurs ABC chez cet organisme entraîne un phénomène de résistance pléiotropique aux drogues (PDR) très similaire au phénomène MDR des cellules de mammifères et autres microorganismes pathogènes (Wolfger *et al.*, 2001). De plus, certains gènes ABC de cette levure sont des orthologues de ceux qui causent des maladies chez l'humain. En effet, des études de complémentation entre des transporteurs ABC de levure et de mammifère ont démontré ce fait (Raymond *et al.*, 1992; Kuchler et Thorner, 1992; Tommasini *et al.*, 1996). L'étude des gènes régulateurs et effecteurs du phénomène MDR/PDR a d'abord été effectuée chez *S. cerevisiae*, à cause de la disponibilité des outils génétiques et biochimiques pour cet organisme. Deux réseaux complexes de gènes, PDR et YAP (Yeast AP-1 like factor) sont impliqués dans la résistance pléiotropique chez *S. cerevisiae* (Figure 1-10). La sélection de mutations spontanées et autres modifications génétiques causant une surproduction ou une hyperactivation des gènes régulateurs serait à l'origine de la surexpression des pompes à efflux (Kolaczowska et Goffeau, 1999).

Les régulateurs-clés du réseau PDR sont *PDR1* (Balzi *et al.*, 1987), *PDR3* (Delaveau *et al.*, 1994) et *YRR1* (Cui *et al.*, 1998) qui encodent des facteurs de transcription de type « zinc finger » $Zn(II)_2Cys_6$ (Figure 1-10). Pdr1p et Pdr3p sont deux protéines paralogues qui fonctionnent en tant qu'homo- et hétérodimères *in vivo* (Mamnun *et al.*, 2002). En effectuant la délétion de Pdr1p ou de Pdr3p ou bien en observant l'effet de mutations activatrices dans chacun de ces gènes, on obtient différents phénotypes quant à la

résistance et à l'activité transcriptionnelle des gènes cibles, identifiables notamment par la présence d'une séquence consensus 5'-TCCGCGGA-3' que l'on nomme PDRE (Pdr1p/Pdr3p Response Element) (Mahe *et al.*, 1996b; Kolaczowska et Goffeau, 1999; DeRisi *et al.*, 2000). Ainsi, ces deux facteurs de transcription possèdent des gènes cibles communs, mais également des cibles distinctes. La composition, le nombre d'éléments PDRE et la séquence environnante dans les promoteurs des gènes ciblés varient grandement (Bauer *et al.*, 1999; Kolaczowska et Goffeau, 1999), ce qui pourrait contribuer au contrôle transcriptionnel exercé par ces deux régulateurs. Récemment, deux autres facteurs impliqués dans le réseau PDR ont été caractérisés, soit Stb5p et Rdr1p, qui agissent respectivement comme activateur et répresseur de la transcription de *PDR5* (Hellauer *et al.*, 2002; Akache et Turcotte, 2002). Stb5p agit en tant qu'hétérodimère avec Pdr1p, alors que Yrr1p, un autre activateur important des transporteurs ABC de levure causant la résistance agit comme homodimère pour activer principalement la transcription de *SNQ2*, *YOR1* et le facilitateur *FLR1* (Le Crom *et al.*, 2002; Akache *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que Pdr1p peut activer la transcription de Pdr3p et Yrr1p, alors que ces deux derniers s'autorégulent par la présence de PDRE dans leurs promoteurs (Figure 1-10) (Delahodde *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001). Ainsi, on peut comprendre la forte augmentation de transcription des transporteurs de type MDR qui survient lors de la sélection de mutants hyperactifs *PDR1* et/ou *PDR3*. Ceci apporte une importance particulière à Ngg1p (Ada3), un membre du complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acétyltransférase) qui agit normalement en tant que répresseur de Pdr1p, probablement via une interaction avec l'hétérodimère Pdr1p/Pdr3p (Martens *et al.*, 1996). Pdr1p serait positivement régulée par Pdr13p, une protéine de choc thermique de la famille Hsp70p (Hallstrom *et al.*, 1998), alors que la localisation nucléaire de Pdr1p serait assurée par la karyophérine Kap121p (Delahodde *et al.*, 2001). L'activation de la transcription de *PDR5* nécessite en plus de Pdr1p/Pdr3p, le recrutement des complexes SAGA, SWI/SNF, la protéine de liaison à la boîte TATA et des éléments coactivateurs, résultant ainsi en un remodelage de la chromatine au niveau du promoteur et de la région codante de *PDR5* (Gao *et al.*, 2004).

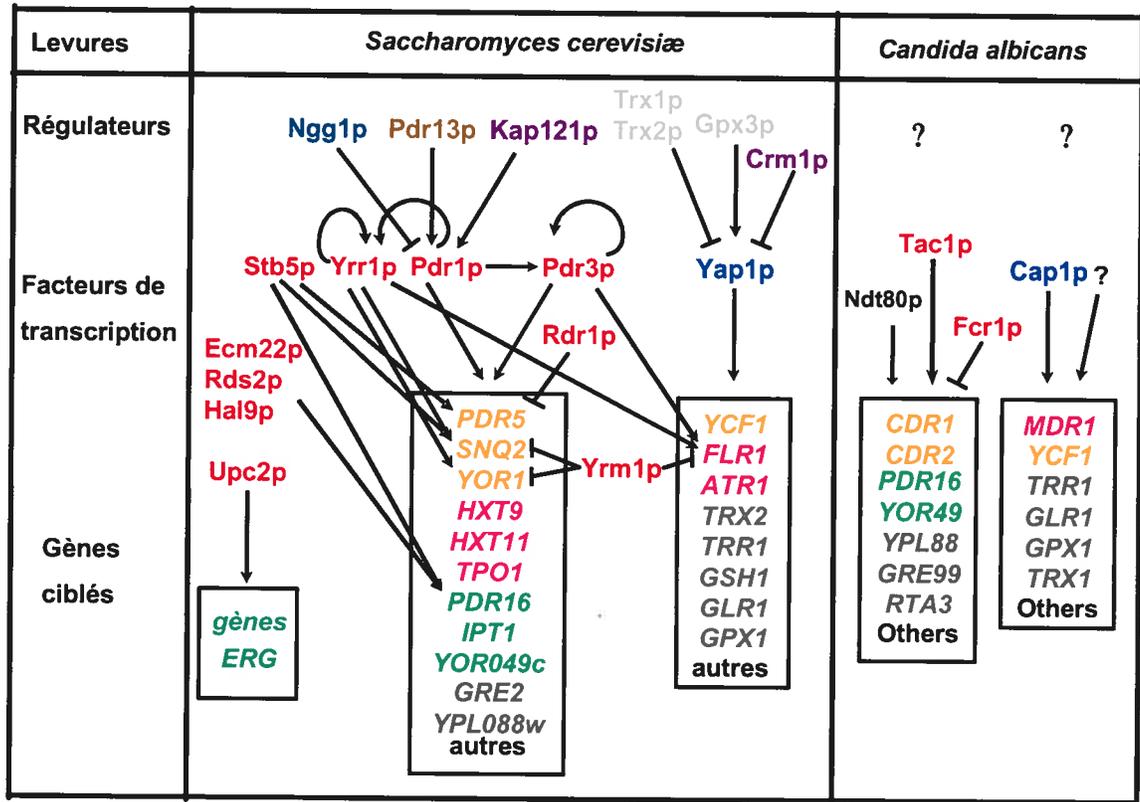


Figure 1-10 : Le réseau PDR chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Du haut vers le bas : régulateurs de la chromatine; protéine du choc thermique; transport nucléaire; facteurs de transcription zinc cluster; facteurs de transcription bzip; transporteurs ABC; facilitateurs majeurs; biosynthèse des lipides; réponse au stress. Cette figure a été élaborée par Dr Martine Raymond et elle résume les données provenant de (Bauer *et al.*, 1999; Kolaczowska et Goffeau, 1999), ainsi que plusieurs autres études (voir texte).

Les cibles principales du réseau *PDR1-PDR3* sont les trois transporteurs ABC, *PDR5* (Balzi *et al.*, 1994; Bissinger et Kuchler, 1994), *SNQ2* (Servos *et al.*, 1993) et *YOR1* (Katzmann *et al.*, 1995) ainsi que les facilitateurs de type MFS *HXT9*, *HXT11* et *TPO1* (Nourani *et al.*, 1997b; Tomitori *et al.*, 1999; DeRisi *et al.*, 2000). *PDR5* a d'abord été identifié en 1990 par Leppert et collaborateurs (coll.) (Leppert *et al.*, 1990). Comme pour le gène humain *MDR1* (P-gp), *PDR5* cause un phénotype MDR lorsque surexprimé chez la levure et son inactivation n'est pas létale, mais entraîne une hypersensibilité à plusieurs agents cytotoxiques (Leppert *et al.*, 1990). La séquence complète de ce gène a révélé que Pdr5p présente une topologie [NBD-TMD]₂ qui est inversée par rapport à celle de P-gp

([TMD-NBD]₂), tout en partageant une homologie fonctionnelle avec cette dernière (Balzi *et al.*, 1994). L'analyse de séquence de *PDR5* a également dévoilé des substitutions importantes dans les motifs consensus Walker A et signature ABC. En effet, chez les transporteurs ABC du sous-groupe PDR, incluant *SNQ2*, la lysine fortement conservée du motif Walker A (GxxxxGKS/T) est remplacée par une cystéine dans le domaine NBD du côté N-terminal de la protéine (NBD1), alors que le motif signature (LSGGQ) est remplacé par la séquence LNVEQ dans le NBD du côté C-terminal (NBD2) (Balzi *et al.*, 1994; Decottignies et Goffeau, 1997). Les implications au niveau fonctionnel de ces substitutions font l'objet du Chapitre 3 de cette thèse. Chez des souches comportant différentes mutations activatrices de *PDR1*, telles *pdr1-3* et *pdr1-6*, les niveaux en ARN et en protéine de Pdr5p sont fortement augmentés par rapport à des souches parentales comportant l'allèle sauvage de *PDR1* (Balzi *et al.*, 1994) et *PDR3* (Nourani *et al.*, 1997a). L'utilisation de la souche mutante *pdr1-3* a permis d'obtenir des fractions de membranes plasmiques fortement enrichies en Pdr5p, permettant alors de détecter *in vitro* une activité d'hydrolyse des nucléotides triphosphates (Decottignies *et al.*, 1994). L'activité hydrolytique de Pdr5p se distingue de celle de la pompe à proton Pma1p (une ATPase importante de la membrane plasmique), par i) sa plus grande activité à pH 7.5, ii) sa capacité à hydrolyser non seulement l'ATP, mais aussi le CTP, le GTP et l'UTP, iii) sa plus grande sensibilité au vanadate et l'oligomycine et finalement iii) son insensibilité à l'azide de sodium (Decottignies *et al.*, 1994). Le même groupe de recherche a par la suite mis au point un système permettant de mesurer *in vivo* l'activité de transport de Pdr5p, grâce à l'expulsion active du composé fluorescent rhodamine 6G (Rh6G), et de déterminer *in vitro* le spectre de substrats de cette pompe par le déplacement de la Rh6G liée aux fractions membranaires (Kolaczowski *et al.*, 1996). Une autre façon, plus indirecte, de déterminer la spécificité de ce genre de transporteurs est de comparer les niveaux de résistance en milieu liquide ou solide de levures mutantes (surexprimant la protéine ou comportant une délétion génétique) par rapport à la souche parentale sauvage. Ainsi, des souches comportant des délétions simples ou combinées des transporteurs *PDR5*, *SNQ2* et *YOR1* ou de leurs régulateurs *PDR1* et *PDR3*, sont hypersensibles à plusieurs centaines de composés cytotoxiques différents. *PDR5* se distingue notamment par sa capacité à conférer la résistance au cycloheximide. Ces trois transporteurs modulent donc la sensibilité de la levure à des

substances aussi variées que des médicaments antifongiques, des fongicides utilisés en agriculture, des herbicides, des drogues antitumorales, des peptides, des stéroïdes et même des détergents, avec des spectres d'activités qui se chevauchent partiellement selon les gènes inactivés (Mahe *et al.*, 1996a; Kolaczowski *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 2001).

Snq2p est fortement homologue à Pdr5p (40% identiques sur toute leur longueur de plus de 1500 acides aminés). *SNQ2* a été identifié par sa capacité à conférer une résistance spécifique au 4-nitroquinoline-*N*-oxyde (4-NQO), au sulphométhuron méthyle et à la phénanthroline (Servos *et al.*, 1993). Les deux protéines sont localisées à la membrane plasmique (Decottignies *et al.*, 1995), sont dégradées à la vacuole suite à un processus d'ubiquitination (Egner *et al.*, 1995; Egner et Kuchler, 1996) et peuvent être phosphorylées *in vivo* par la caséine kinase 1 (Yck1p) (Decottignies *et al.*, 1999). Les auteurs de cette dernière étude suggèrent que la phosphorylation de Pdr5p serait impliquée dans la localisation à la membrane ou dans le recyclage protéolytique de cette protéine. Snq2p et Pdr5p peuvent moduler la sensibilité de la levure à différents cations (Na^+ , Li^+ et Mn^{2+}) (Miyahara *et al.*, 1996), dont notamment le calcium (Tutulan-Cunita *et al.*, 2005b), mais le transport direct de ces ions via les deux protéines reste à être démontré. Ces deux transporteurs sont également responsables de la détoxification de la levure face à la diazaborine (Wehrschutz-Sigl *et al.*, 2004).

D'autres homologues de *PDR5* sont également recensés dans le génome de *S. cerevisiae*, notamment *PDR10*, *PDR12* et *PDR15*, qui seraient aussi régulés par *PDR1* et *PDR3* (Wolfger *et al.*, 1997; Decottignies *et al.*, 1998; Piper *et al.*, 1998). Cependant l'implication de ces derniers dans la résistance multiple aux agents antifongiques n'est pas aussi importante que celle de Pdr5p et Snq2p. Pdr12p peut conférer la résistance aux acides organiques faibles et sa transcription est induite par ces mêmes composés via le facteur de transcription de type zinc finger War1p et la kinase Cmk1p (Holyoak *et al.*, 2000; Kren *et al.*, 2003). Contrairement à *PDR5* qui est transcrit activement au début de la phase exponentielle de croissance (Mamnun *et al.*, 2004), *PDR15* serait activé après cette phase et serait responsable en partie de la détoxification de la cellule suite à des conditions de stress,

comme l'augmentation de température, de pression osmotique ou de l'acidité du milieu (Wolfger *et al.*, 2004).

YOR1 (Yeast Oligomycin Resistance 1) est un autre transporteur ABC de la levure *S. cerevisiae*. Cette pompe a été identifiée par des criblages génétiques ciblant les gènes qui affectent la résistance à l'oligomycine et la révéromycine A (Katzmann *et al.*, 1995; Cui *et al.*, 1996). Comme *YOR1*, *YCF1* (Yeast Cadmium Factor 1) appartient au sous-groupe des MRP (ABCC), qui comprend MRP1 et CFTR chez l'humain. Ce transporteur ABC confère la résistance au cadmium, à différents métaux et médicaments anioniques qui doivent être conjugués au glutathion en collaboration avec un autre transporteur homologue, *BPT1* (Wemmie *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996; Petrovic *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2002). En tant qu'orthologues de CFTR, ces deux transporteurs de levure sont utilisés dans des études de mutagenèse afin d'obtenir de l'information sur les mutations fréquentes retrouvées chez les patients atteints de fibrose kystique (Wemmie et Moye-Rowley, 1997; Katzmann *et al.*, 1999). Contrairement à Yor1p, qui est localisé à la membrane plasmique et qui est contrôlé au niveau transcriptionnel par le réseau PDR, Ycf1p est localisé à la vacuole (comme Bpt1p) et est sous l'influence du réseau YAP (Wemmie *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2002).

Yap1p est un facteur de transcription de la famille bZip (basic leucine zipper) qui active non seulement *YCF1*, mais aussi les facilitateurs *FLR1* (Alarco *et al.*, 1997) et *ATR1* (Coleman *et al.*, 1997) impliqués dans la résistance au fluconazole et au cycloheximide (Coleman *et al.*, 1999). La plupart des gènes ciblés par Yap1p affectent la tolérance des cellules au stress oxydatif (Nguyen *et al.*, 2001; Moye-Rowley, 2003). Le contrôle de l'activité de Yap1p se ferait au niveau du transport entre le cytoplasme et le noyau via l'exportine Crm1p (Yan *et al.*, 1998). Finalement, il semblerait y avoir une interaction croisée entre les réseaux *PDR1/3* et *YAP1* (Wendler *et al.*, 1997; Wehrschutz-Sigl *et al.*, 2004).

3. Le réseau *PDR/CDR* chez *C. albicans*

Des travaux effectués dans notre laboratoire ont permis d'identifier des facteurs de transcription impliqués dans la résistance aux agents antifongiques chez *C. albicans*. Premièrement, le facteur bZip *CAP1* (*Candida* AP-1) a été isolé à partir d'une banque génomique de *C. albicans* par sa capacité à conférer la résistance au FLC lorsque surexprimé chez *S. cerevisiae* (Alarco *et al.*, 1997). La surexpression de Yap1p cause la résistance au FLC grâce, entre autres, à la transactivation du gène *FLR1*, un transporteur MFS. Chez *S. cerevisiae*, l'expression hétérologue de Cap1p active également la transcription de *FLR1* (Alarco *et al.*, 1997). Chez *C. albicans*, l'orthologue du facilitateur *FLR1* est *MDR1/BEN^R* (Ben-Yaacov *et al.*, 1994). *CAP1* est également impliqué dans le phénotype MDR et la réponse au stress oxydatif chez *C. albicans* (Alarco et Raymond, 1999). *CAP1* agit comme régulateur négatif de *MDR1*, puisque sa délétion chez la souche clinique *C. albicans* FR2 entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm de *MDR1*. D'autre part, l'introduction d'une version tronquée de *CAP1* chez une souche de laboratoire CJD21 (*cap1* homozygote) entraîne la résistance à plusieurs composés toxiques et corrèle avec la surexpression de certains de ses gènes cibles, soit *MDR1*, le transporteur ABC CaYCF1, ainsi que CaGLR1 (une glutathion réductase) et CaTRR1 (une thioredoxine réductase; voir Figure 1-10) (Alarco et Raymond, 1999). Le transfert de *CAP1* entre le cytoplasme et le noyau serait un des mécanismes contrôlant l'activité de *CAP1* dans la réponse au stress oxydatif (Zhang *et al.*, 2000), mais les détails de son activité et la cause de la surexpression de *MDR1* dans certaines souches cliniques résistantes doivent être éclaircis (Wirsching *et al.*, 2000a).

En deuxième lieu, notre laboratoire a mis en évidence trois autres facteurs de transcription (*FCR1-3*; Fluconazole Resistance 1 à 3) qui ont la capacité de compléter la résistance au FLC d'une souche de *S. cerevisiae* contenant la délétion double *pdr1 pdr3* (Talibi et Raymond, 1999). *FCR1* contient un motif « zinc cluster » similaire à ceux retrouvés chez *PDR1* et *PDR3*. Alors que *FCR1* stimule l'expression du transporteur ABC *PDR5* lorsque surexprimé de façon hétérologue chez *S. cerevisiae*, la délétion de *FCR1* chez *C. albicans* résulte en une augmentation de la résistance MDR, indiquant ainsi que la forme sauvage de *FCR1*, comme *CAP1*, agirait comme régulateur négatif de la résistance aux

antifongiques chez *C. albicans* (Figure 1-10) (Talibi et Raymond, 1999). La caractérisation de *FCR3* a établi que celui-ci appartient à la famille de facteurs bZip, est homologue à *YAP3* de *S. cerevisiae* et peut activer l'expression de *PDR5* lorsqu'exprimé chez *S. cerevisiae* et autres gènes impliqués dans la résistance au 4-NQO, comme possiblement *Snq2* (Yang *et al.*, 2001). Cependant, les rôles de *FCR3* et *FCR2* n'ont pas été déterminés chez *C. albicans*.

Le premier gène qui a été identifié chez *C. albicans* comme effecteur de la résistance clinique aux agents antifongiques fut *BEN^R*, la pompe de type MFS (Fling *et al.*, 1991) qui a été renommée *MDR1* par la suite (à ne pas confondre avec le gène *MDR1* humain encodant le transporteur ABC nommé P-gp). Fonctionnant comme « antiporteur », cette pompe membranaire utilise l'énergie dérivée de l'import d'un proton pour expulser un spectre limité de composés à l'extérieur de la cellule, soit le FLC, le bénomyl, le méthotrexate, le cycloheximide et le sulphométhuron méthyle et le 4-NQO (Fling *et al.*, 1991; Ben-Yaacov *et al.*, 1994; Kohli *et al.*, 2001). Une levure mutante *mdr1* est hypersensible à certains de ces composés, mais pas au bénomyl, le médicament antifongique ayant permis la découverte de ce facilitateur (Goldway *et al.*, 1995). Ainsi, d'autres gènes seraient également impliqués dans la résistance au bénomyl chez *C. albicans*. La délétion de *MDR1* dans une souche clinique qui surexprimait ce transporteur a établi que ce facilitateur joue un rôle important dans l'acquisition de la résistance au FLC (Wirsching *et al.*, 2000b), mais il semblerait selon plusieurs études, que la surexpression des transporteurs ABC *CDR1* et *CDR2* serait le mécanisme prépondérant au niveau de l'intensité de la résistance, du spectre d'activité et de la représentation de ce mécanisme parmi les souches résistantes rencontrées en clinique (Sanglard *et al.*, 1996; White, 1997; Perea *et al.*, 2001; Maebashi *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002; Chau *et al.*, 2004). Notons finalement qu'un homologue de *MDR1*, le facilitateur *FLU1*, a été décrit chez *C. albicans* par sa capacité à compléter la résistance au FLC et au cycloheximide d'un mutant *S. cerevisiae pdr5* (Calabrese *et al.*, 2000). Toutefois, son niveau en ARNm ne corrèle pas avec les niveaux de résistance parmi une collection restreinte de souches cliniques (White *et al.*, 2002).

Le contrôle transcriptionnel de *CDR1* et *CDR2* chez *C. albicans* est demeuré mystérieux jusqu'à tout récemment. *CDR1* est exprimé durant toutes les phases de croissance, mais son niveau diminue de moitié à la fin de la phase exponentielle (Krishnamurthy *et al.*, 1998b). Il était connu qu'une fusion *CDR1-GFP* pouvait être induite par différents stress, comme la température élevée, la présence de stéroïdes et certains agents antifongiques comme le miconazole et le FLC (Hernaiz *et al.*, 1998; Krishnamurthy *et al.*, 1998b). Une analyse de la séquence promotrice en amont de *CDR1* a dévoilé la présence de quatre éléments activateurs et quatre éléments répresseurs (Puri *et al.*, 1999). De Micheli et collaborateurs ont par la suite identifié un élément commun de réponse aux drogues et aux stéroïdes, contenant une répétition du triplet CGG, qu'ils ont nommé DRE (Drug/steroid Responsive Element) (de Micheli *et al.*, 2002). Dans leur étude, ces auteurs ont toutefois démontré que le FLC ne stimule pas l'expression de *CDR1 in vivo*. Cette étude a également montré la présence d'un élément responsable de l'expression de base de *CDR1* (de Micheli *et al.*, 2002). En effet, alors que *CDR1* est exprimé faiblement dans les souches de *C. albicans* utilisées en laboratoire et les souches cliniques sensibles aux azoles, *CDR2* n'est pas exprimé de façon basale (Sanglard *et al.*, 1997). Par contre, suite à un stimulus (exposition aux stéroïdes ou certains médicaments antifongiques tel la fluphenazine ou l'amorolfine) ou bien suite à une mutation dans un facteur agissant en *trans*, les gènes se retrouvent co-régulés et démontrent alors une forte augmentation de leur niveau d'expression, causant alors le phénotype MDR (de Micheli *et al.*, 2002). Cette différence dans la régulation de l'expression basale de *CDR1* et *CDR2* est importante et sera discutée plus en détail dans les chapitres 2 et 4. Le groupe du Dr Prasad a récemment identifié d'autres éléments responsables du contrôle de l'expression basale de *CDR1* et de sa réponse aux stéroïdes (Karnani *et al.*, 2004; Gaur *et al.*, 2004; Gaur *et al.*, 2005b).

Une importante découverte fut rapportée récemment. Il s'agit de l'identification de *TAC1*, un facteur de transcription de type zinc cluster qui est responsable de l'activation de *CDR1* et *CDR2* et autres gènes contenant des répétitions CGG dans leurs promoteurs (éléments DRE) (Coste *et al.*, 2004). Le gène *TAC1* se retrouve au milieu de deux autres gènes fortement homologues à proximité d'un locus important pour la conjugaison des levures (« mating type »), ce qui est en accord avec l'observation que le caractère

homozygote du locus responsable du « mating type » corrèle avec la résistance aux azoles (Rustad *et al.*, 2002). La délétion de *TAC1* entraîne une diminution de la résistance croisée aux substrats connus de Cdr1p et Cdr2p, alors que l'introduction dans une souche sensible d'un allèle mutant de *TAC1* provenant d'une souche clinique résistante induit une forte résistance à ces antifongiques.

Un autre facteur de transcription, *CaNDT80*, dont le domaine de liaison à l'ADN serait homologue à celui de *ScNDT80* impliqué dans la méiose (Chu et Herskowitz, 1998), a été isolé à partir d'une banque génomique de *C. albicans* par sa capacité à activer le promoteur de *CDR1* couplé au gène rapporteur *LacZ* (Chen *et al.*, 2004a). La délétion de *NDT80* chez *C. albicans* réduit le niveau d'expression de *CDR1* et la résistance aux agents antifongiques (Chen *et al.*, 2004a).

D'autres études suggèrent un lien possible entre la régulation du calcium, l'activité de la phosphatase calcineurine (*CNA1-CNBI*) ou la kinase *CK2* et les niveaux de résistance aux agents antifongiques chez *C. albicans* (Cruz *et al.*, 2002; Sanglard *et al.*, 2003a; Bruno et Mitchell, 2005). Cependant, la relation entre ces découvertes et la transcription ou l'activité de *CDR1* et *CDR2* n'est pas claire et sera discutée en profondeur au Chapitre 4. En résumé, ces découvertes démontrent bien le caractère complexe et multifactoriel de la résistance aux azoles au niveau moléculaire chez *C. albicans*. Comme chez *S. cerevisiae*, plusieurs gènes régulateurs et effecteurs sont impliqués dans le phénomène MDR, sans mentionner les interactions hôte-pathogène, ni l'impact du système immunitaire lors d'une infection de *C. albicans*.

C. Les transporteurs *CDR* de *C. albicans*

Nous avons vu précédemment que les transporteurs ABC Cdr1p et Cdr2p jouent un rôle important dans la résistance aux azoles chez *C. albicans*. Dans les prochaines sections, je décrirai l'état des connaissances à propos de ces protéines jusqu'au moment où a débuté mon projet de doctorat.

1. L'identification et la caractérisation des gènes *CDR*

Le gène *CDR1* (*Candida* Drug Resistance 1) a été identifié à partir d'une banque d'ADN génomique de *C. albicans* grâce à sa capacité à rétablir la résistance au cycloheximide lorsqu'introduit dans une souche *S. cerevisiae pdr5* (Prasad *et al.*, 1995). Une stratégie similaire a permis de cloner le gène *CDR2* (Sanglard *et al.*, 1997). L'analyse des séquences de *CDR1* et *CDR2* montrent que ces deux transporteurs ABC sont fortement homologues entre eux (84% identiques et 92% similaires en acides aminés) et sont des orthologues de *PDR5* retrouvé chez *S. cerevisiae* (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). *CDR1* et *CDR2* encodent des protéines de 1501 et 1499 acides aminés, ayant toutes les deux une masse moléculaire théorique d'environ 169 kDa. Ils présentent la configuration [NBD-TMD]₂ (Figure 1-4 B et Tableau 1-4) ce qui les classe parmi le sous-groupe PDR, selon Bauer et coll. (Bauer *et al.*, 1999) (ou le sous-groupe I.1, selon Decottignies et coll.; (Decottignies et Goffeau, 1997)).

CDR1 et *CDR2* confèrent une résistance croisée à divers médicaments et agents antifongiques lorsqu'exprimés de façon hétérologue dans une souche hypersensible *S. cerevisiae pdr5*, avec un spectre d'activité similaire, mais distinct de celui conféré par le facilitateur *MDR1* (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). *CDR1* avait été cloné indépendamment par le groupe du Dr Sanglard, qui a présenté pour la première fois une corrélation entre l'augmentation des niveaux d'ARNm de *CDR1/CDR2* et l'acquisition de la résistance aux antifongiques azolés chez des souches cliniques de *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1995). En parallèle, ces souches résistantes montraient une diminution importante dans l'accumulation de [³H]-fluconazole par rapport aux souches sensibles isolées chez le même patient (Sanglard *et al.*, 1995). L'ajout d'une concentration sub-inhibitrice d'azide de sodium (NaN₃), un agent qui interfère avec la production d'ATP par les mitochondries, rétablissait les niveaux intracellulaire de [³H]-fluconazole chez ces souches résistantes qui surexpriment *CDR1* et *CDR2*, suggérant ainsi que ces deux transporteurs ABC utilisent l'énergie provenant de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP afin d'expulser leurs substrats à l'extérieur de la levure (Sanglard *et al.*, 1995).

Tableau 1-4 : La famille des gènes *CDR* de *C. albicans*

Gène	Topologie	# a.a.	Phénotype de délétion	Phénotype de surexpression	Orthologue chez <i>S. cerevisiae</i>	Réf.
<i>CDR1</i>	(NBD-TMD) ₂	1501	Viable; hypersensible aux drogues	Résistance croisée aux drogues	<i>PDR5</i> (55% ident. en a.a.)	(Prasad <i>et al.</i> , 1995)
<i>CDR2</i>	(NBD-TMD) ₂	1499	Viable; hypersensible aux drogues (<i>cdr1 cdr2</i>)	Résistance croisée drogues	<i>PDR5</i> (54%)	(Sanglard <i>et al.</i> , 1997)
<i>CDR3</i>	(NBD-TMD) ₂	1501	Viable; aucun découvert	Aucun découvert; surexprimé naturellement dans les cellules opaques	<i>PDR5</i> (50%)	(Balan <i>et al.</i> , 1997)
<i>CDR4</i>	(NBD-TMD) ₂	1490	Viable; aucun découvert	N/D	<i>PDR5</i> (54%)	(Franz <i>et al.</i> , 1998)
<i>CDR5/CDR11/CDR99</i>	(NBD-TMD) ₂	1513	N/D	N/D	<i>PDR5</i> (53%)	
<i>SNQ2</i>	(NBD-TMD) ₂	1495	Viable; croissance filamenteuse anormale	N/D	<i>SNQ2</i> (52%)	(Uhl <i>et al.</i> , 2003)
orf19.4531 / IPF7530	(NBD-TMD) ₂	1274	N/D	N/D	<i>YOL075c</i> (36%)	
orf19.3120 / IPF12300	NBD-TMD	579	N/D	N/D	<i>YOL075c</i> (28% ident. à la partie N-terminale)	
<i>ADP1</i>	TM2-NBD-TMD	1038	N/D	N/D	<i>ADP1</i> (51%)	

La délétion du gène *CDR1* dans une souche de laboratoire entraîne une hypersensibilité du *C. albicans* aux médicaments azolés ainsi qu'à plusieurs autres composés antifongiques (Tableau 1-4) (Sanglard *et al.*, 1996). De plus, les cellules *cdr1* accumulent 2.7 fois plus de [³H]-fluconazole que la souche de référence (sauvage). Cette expérience confirmait alors le rôle important de *CDR1* dans la résistance à plusieurs agents antifongiques et que ceux-ci étaient probablement des substrats pour cette pompe membranaire. Le phénotype de la délétion de *CDR2* dans cette même souche de laboratoire (CAF2-1) était imperceptible, fort probablement à cause du très faible niveau d'expression basale de *CDR2* dans les souches sensibles aux azoles (Sanglard *et al.*, 1997). Néanmoins, il est possible d'observer un phénotype d'hypersensibilité lorsque le *CDR2* est retiré du génome d'une souche mutante *cdr1* (Tableau 1-4) (Sanglard *et al.*, 1997). Ainsi, *CDR2* joue également un rôle dans la résistance du *C. albicans* aux azoles et autres agents antifongiques. La preuve formelle de l'implication de *CDR1* et de *CDR2* dans l'acquisition

de la résistance secondaire aux azoles nécessiterait d'effectuer la délétion combinée de ces deux gènes chez une souche clinique résistante aux azoles. Les outils génétiques permettant une telle démonstration sont maintenant disponibles (Wirsching *et al.*, 2000b). Considérant les données obtenues jusqu'à maintenant, nous pouvons envisager le mécanisme suivant. Lorsqu'une infection à *Candida* est traitée sur une longue période, particulièrement chez une personne immunodéficiente et/ou avec un agent fongistatique comme le fluconazole, il est postulé qu'une souche ayant acquise une mutation dans un facteur de transcription (par exemple *TAC1*) sera sélectionnée et se propagera ensuite malgré le traitement antifongique. Dans ce type de souche résistante, les gènes *CDR1* et *CDR2* deviennent alors co-régulés et leurs niveaux d'expression se retrouvent fortement augmentés, généralement en quantité similaires et de façon non-réversible (White *et al.*, 2002; de Micheli *et al.*, 2002). Ce mécanisme de résistance n'exclut pas les autres décrits à la section I.D.2, ni la possibilité que différents allèles de *CDR1* et *CDR2* ayant des capacités supérieures à expulser les médicaments antifongiques puissent être sélectionnés durant un traitement.

Chez *S. cerevisiae*, le sous-groupe PDR contient 8 gènes pleine-longueur, homologues à *PDR5* (Decottignies et Goffeau, 1997). Ainsi, il était prédit que d'autres transporteurs *CDR* se retrouvent dans le génome de *C. albicans*. En effet, deux autres membres ont été caractérisés, soit *CDR3* et *CDR4*. Cependant, il ne semblerait pas que ces derniers soient impliqués dans le phénomène MDR, même s'ils sont fortement homologues à *CDR1* (*Cdr3p* et *Cdr4p* sont 74% et 70% similaires à *Cdr1p*, respectivement). Ni la délétion homozygote de *CDR3*, ni celle de *CDR4* n'affecte les niveaux de résistance aux drogues antifongiques (Tableau 1-4) (Balan *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1998b). Une surexpression constitutive de *CDR3* dans la souche *C. albicans cdr3* ne confère pas de phénotype de résistance (Balan *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter cependant que *CDR3* est régulé de façon phase-spécifique; n'étant pas exprimé dans une souche de laboratoire (CAI4), ni dans la phase « white » des cellules WO-1, l'ARNm de *CDR3* se retrouve en forte quantité lorsque cette souche WO-1 est en phase « opaque » (Balan *et al.*, 1997). *CDR4*, quant à lui, est exprimé dans les souches cliniques de *C. albicans*, mais son niveau d'expression ne corrèle pas avec le niveau de résistance aux azoles (Franz *et al.*, 1998b; Lyons et White, 2000). La séquence complète du génome de *C. albicans*, son

assemblage et son annotation ont été publiés récemment et sont disponibles dans plusieurs banques de données, dont www.candidagenome.org (Jones *et al.*, 2004; Braun *et al.*, 2005). Il a été établi par des recherches bioinformatiques que 27 à 28 gènes encodent des protéines de la superfamille ABC (Braun *et al.*, 2005; Gaur *et al.*, 2005a). De celles-ci, neuf appartiennent au sous-groupe PDR/CDR, dont six ayant la topologie pleine-longueur de *PDR5*, alors que trois présentent des topologies atypiques, semblable à celles de *YOL075c* et *ADP1* de *S. cerevisiae*, pour lesquels très peu d'information est disponible (Tableau 1-4). Ainsi, à part les gènes *CDR1-4* déjà caractérisés, *C. albicans* possède aussi un homologue de *ScSNQ2* et un cinquième gène *CDR* (nommé *CDR5/CDR11/CDR99* selon les différentes banque de données). *CDR5* n'a pas encore été caractérisé. Une inactivation de *CaSNQ2* par insertion de transposon cause une croissance ralentie du *C. albicans* lorsque sous forme filamenteuse (Uhl *et al.*, 2003). Les deux membres du sous-groupe MRP qui peuvent théoriquement influencer la résistance aux médicaments, *CaYOR1* et *CaYCF1*, ont été identifiés dans le génome de *C. albicans* (Ogawa *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 2005), mais leurs fonctions n'ont pas encore été caractérisées. À noter également que l'homologue structural de la P-gp humaine chez la levure, *STE6* et son orthologue chez *Candida*, *HST6*, ne sont pas impliqués dans la résistance aux antifongiques, mais bien dans le transport d'une phéromone essentielle au processus de conjugaison chez les levures (Raymond *et al.*, 1992; Raymond *et al.*, 1998).

Au moment de leur découverte, un trait étonnant au niveau de la séquence des transporteurs du sous-groupe PDR chez les levures était cette configuration « inversée » ([TMD-NBD]₂) par rapport à celle des transporteurs ABC qui causent la résistance multiple aux médicaments chez les mammifères (P-gp : [TMD-NBD]₂, MRP1 : TMD-[TMD-NBD]₂). En effet à cette période (1994-1997), on ne connaissait cette topologie inversée que chez les demi-transporteurs *white*, *brown* et *scarlet*, responsable du transport des acides aminés précurseurs de la pigmentation des yeux chez la drosophile (Higgins, 1992). Cependant, une grande quantité de transporteurs de type PDR pleine-longueur furent découverts par la suite, notamment grâce aux projets de séquençage des génomes de Plantes, de Mycètes et de Protozoaires (Decottignies et Goffeau, 1997; Anjard et Loomis, 2002; Garcia *et al.*, 2004). Ceux-ci seraient probablement le résultat d'un événement de

fusion génétique. Selon les séquences disponibles actuellement, aucun gène PDR pleine-longueur (fusionné) ne se retrouve chez les Bactéries, Archéobactéries ou chez les Animaux (le sous-groupe ABCG des mammifères ne contenant que des demi-transporteurs) (Dean *et al.*, 2001). Tel que mentionné pour Pdr5p à la section II.B.2, la dégénérescence des motifs Walker A et signature ABC dans les NBD N- (NBD1) et C-terminaux (NBD2), respectivement est un autre trait des transporteurs PDR/CDR qui a une importance indéniable (Figure 1-11). Il a été démontré, en effet, que la mutation dans un seul NBD de la lysine très fortement conservée du motif Walker A entraîne inévitablement une perte totale de l'activité du transporteur (Azzaria *et al.*, 1989; Berkower et Michaelis, 1991; van Veen *et al.*, 1998).

D'autres implications génétiques par rapport aux CDR sont aussi intéressantes à considérer. En effet, alors que *CDR3* et *CDR4* se trouvent sur les chromosomes 4 et 1, respectivement, *CDR1* et *CDR2* se retrouvent dans la même orientation et sur le même « contig » dans le chromosome 3, à 94 Kb de distance l'un de l'autre. Étant donné que le plus proche homologue à la fois de *CDR1* et de *CDR2* est *PDR5* chez *S. cerevisiae*, on peut interpréter que ces deux transporteurs seraient issus d'une duplication du gène ancestral ayant donné les orthologues de *PDR5* chez les mycètes. Chez d'autres espèces de *Candida*, on retrouve également plus d'un homologue *PDR5*, par exemple *CdCDR1* et *CdCDR2* de *C. dubliniensis* (Moran *et al.*, 1998), *CgCDR1* et *CgPDH1* de *C. glabrata* (Miyazaki *et al.*, 1998; Sanglard *et al.*, 1999), *CkABC1* et *CkABC2* de *C. krusei* (Katiyar et Edlind, 2001). *CDR5* quant à lui se présente sous deux ORF adjacents, plus loin sur le chromosome 3, ce qui pourrait être le résultat d'une erreur de séquence.

		NBD 1						
		<u>Walker A</u>		<u>ABC</u>		<u>Walker B</u>		
Cdr1p	187-	GRPGAGCS	303-	VSGGE	323-	IQCWDN
Cdr2p	185-	GRPGAGCS	301-	VSGGE	321-	IQCWDN
Cdr3p	178-	GRPGAGCS	294-	ISGGE	314-	IQCWDN
Cdr4p	190-	GRPGAGCS	306-	VSGGE	326-	VQCWDN
Cdr5p	180-	GRPGAGCS	296-	VSGGE	316-	IQCWDN
Snq2p	174-	GRPGAGCT	290-	VSGGE	310-	IYCWDN
IPF7530	70-	GGSGSGKT	180-	LSGGE	200-	ILFLDE
IPF12300								
Adp1p								

		NBD 2						
		<u>Walker A</u>		<u>ABC</u>		<u>Walker B</u>		
Cdr1p	895-	GASGAGKT	1001-	LNVEQ	1022-	LLFLDE
Cdr2p	893-	GASGAGKT	999-	LNVEQ	1020-	LLFLDE
Cdr3p	876-	GASGAGKT	982-	LNVEQ	1003-	LVFLDE
Cdr4p	882-	GASGAGKT	988-	LNVEQ	1009-	LVFLDE
Cdr5p	891-	GATGAGKT	997-	LNVEQ	1018-	LLFLDE
Snq2p	881-	GESGAGKT	986-	LNVEQ	1007-	LLFLDE
IPF7530	725-	GPSGSGKT	836-	ISGGE	856-	VLFLDE
IPF12300	39-	GPSGCGKS	145-	ISGGQ	165-	ILFLDE
Adp1p	421-	GGSGAGKT	528-	ISGGE	548-	ILFLDE

Consensus:	GxxxxGKS	LSGGQ	hhhhDE
	T		

Figure 1-11 : Motifs conservés dans les NBD des transporteurs Cdrp. « x » signifie n'importe quel acide aminé (a.a.), alors que « h » signifie n'importe quel a.a. hydrophobe. Ces motifs impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP sont décrits à la section II.A.2. Les a.a. indiqués en caractères gras sont ceux qui dévient des séquences consensus.

2. La caractérisation fonctionnelle des transporteurs CDR

La comparaison initiale des spectres de résistance attribués à *CDR1* et *CDR2* n'a montré que des différences subtiles. En effet, une souche *S. cerevisiae pdr5* (YKKKB-13) qui est transformée avec un fragment génomique contenant *CDR1* devient résistante à différents composés toxiques, notamment le FLC, l'ITC, le cycloheximide, la terbinafine, l'amorolfine, le sulfométhuron méthyle, ainsi que la Rh6G (Sanglard *et al.*, 1997). De son côté, un fragment génomique contenant *CDR2* transformé dans la même souche entraîne une résistance moins forte à ces composés, selon l'évaluation de la croissance des

transformants sur milieu solide. Aussi, les transformants *CDR2* montrent une résistance similaires aux transformants *CDR1* pour le KTC, la fluphénazine, la céruléine et la bréfeldine A. Notamment, *CDR2* confère la résistance au crystal violet, alors que l'expression de *CDR1* n'apporte aucun effet face à ce composé (Sanglard *et al.*, 1997). Cependant, sachant que les niveaux de résistance dépendent fortement du niveau d'expression du (des) transporteurs et puisqu'aucun immunobuvardage n'est présenté dans cette étude, il est impossible de tirer une conclusion définitive quant aux différences de spécificité entre Cdr1p et Cdr2p (voir Discussion; Chapitre 4).

La localisation de Cdr1p à la membrane plasmique a été montrée initialement par une fusion *CDR1-GFP* (Hernaiz *et al.*, 1998), ce qui a été confirmé subséquemment par d'autres groupes de recherches utilisant une technique similaire (Shukla *et al.*, 2003; Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003b). En plus de réduire l'accumulation intracellulaire de fluconazole radioactif (Sanglard *et al.*, 1995), Cdr1p affecte également l'accumulation du [³H]- β -estradiol et du [³H]-corticostérone, suggérant que Cdr1p est capable de transporter directement ces hormones stéroïdiennes (Krishnamurthy *et al.*, 1998c). Cet effet est réduit par un excès d'ergostérol, de dexaméthasone, de cycloheximide, fluconazole et d'autres composés, et est aboli par l'ajout d'azide de sodium, le carbonyl cyanide *m*-chlorophénylhydrazone et autres inhibiteurs métaboliques (Krishnamurthy *et al.*, 1998c). Les mêmes auteurs ont également découvert que la délétion du 12^{ième} segment transmembranaire (TM12) entraînait une modification dans la spécificité de Cdr1p pour différents substrats. Dans cet article, il a été montré que des préparations de membranes plasmiques provenant d'une levure ou des cellules d'insecte transformées avec *CDR1* libèrent plus de phosphate inorganique que les membranes provenant de souches contrôles, indiquant une activité ATPase possible pour Cdr1p (Krishnamurthy *et al.*, 1998a). En utilisant deux sondes moléculaires différentes, il a été démontré que *CDR1* affecte les niveaux de phosphatidyléthanolamine dans le feuillet externe de la membrane plasmique, que ce soit avec une souche *C. albicans cdr1* ou une souche de *S. cerevisiae pdr5* transformée avec *CDR1* (Dogra *et al.*, 1999). Ces auteurs ont alors suggéré que Cdr1p affecte la distribution asymétrique des phospholipides et inversement, que la fluidité de la membrane influence l'activité de Cdr1p (Smriti *et al.*, 1999).

Le mutant *S. cerevisiae* SY1 (*sec6-4*) peut être très utile pour étudier les protéines membranaires, comme les transporteurs ABC (Ruetz et Gros, 1994). En effet, dans cette souche, la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique est inhibée de façon température-dépendante. Compte tenu que 100% des transporteurs sont topologiquement inversés dans ces vésicules (partie cytoplasmique à l'extérieur), cette approche permet une caractérisation très fine du fonctionnement de ce type de protéines, notamment l'activité ATPase et la cinétique de transport de substrats radioactifs. Un tel système d'expression a été développé pour Cdr1p, mais très peu d'information quant aux propriétés de Cdr1p n'en a été tiré (Cannon *et al.*, 1998; Lamping *et al.*, 2005).

Un test de transport de la Rh6G, similaire à celui utilisé pour caractériser l'activité de transport de Pdr5p (Kolaczkowski *et al.*, 1996), a été développé pour démontrer que des souches cliniques de *C. albicans* résistantes aux traitements antifongiques accumulent moins de Rh6G que les souches sensibles. Cette activité de transport est directement proportionnelle aux niveaux d'expression de *CDR1* et *MDR1* (Maesaki *et al.*, 1999). Ces mêmes auteurs ont découvert que le tacrolimus (FK506), un agent immunosuppresseur connu comme modulateur de l'activité de la P-gp (Saeki *et al.*, 1993), a pour effet d'abroger le transport des azoles radioactifs par des levures surexprimant *CDR1* (Maesaki *et al.*, 1998). Ce composé est également capable d'inhiber la résistance multiple conférée par Pdr5p. Une mutagenèse aléatoire a permis d'identifier un résidus important dans le TM10 de Pdr5p (S1360) qui modifie la spécificité de ce transporteur de levure lorsque muté et affecte sa sensibilité vis-à-vis l'inhibiteur FK506 (Egner *et al.*, 1998). Finalement, un autre type d'interaction entre les substrats de Cdr1p et Cdr2p a été mis en évidence. Il s'agit de la découverte de l'induction de l'expression de *CDR1* et *CDR2* par la fluphénazine, qui permet à une souche standard de *C. albicans* de croître malgré la présence de FLC (effet antagoniste) (Henry *et al.*, 1999). Cependant, à plus forte concentration de FLC, l'ajout de fluphénazine produit un effet contraire (synergique ou additif), probablement parce que ce dernier est un substrat pour Cdr1p et Cdr2p, qu'il entre en compétition avec le FLC pour le transport et qu'il possède une faible activité antifongique intrinsèque (Henry *et al.*, 1999).

III. Les objectifs de mon projet

Compte tenu de l'importance des transporteurs ABC Cdr1p et Cdr2p dans l'acquisition de la résistance aux traitements antifongiques chez *C. albicans* et du peu d'information disponible quant à leur propriétés et les mécanismes moléculaires sous-jacents à leur fonctionnement, une étude structure-fonction s'imposait. L'objectif principal de mon projet de doctorat était donc de caractériser plus en détails Cdr1p et Cdr2p, de répertorier des différences fonctionnelles entre ces deux protéines membranaires pouvant nous donner des indices quant à leurs fonctions et aux méthodes envisageables pour contrecarrer leur fonctionnement. Comme pour les autres transporteurs ABC de type MDR, plusieurs aspects demeurent mystérieux. Par exemple, comment ces protéines peuvent-elles reconnaître une si grande diversité de substrats ? Quelle est la composition (localisation et quantité) des sites de liaison aux substrats ? Comment la liaison et l'hydrolyse de l'ATP sont-elles couplées au transport des substrats ?

Mon étude s'est déroulée en deux phases. Dans la première partie, j'ai mis au point un système d'expression hétérologue chez *S. cerevisiae*. Au moment où j'ai débuté mon doctorat, les outils génétiques et biochimiques pour *C. albicans* étaient limités. De plus, un système hétérologue permet la surexpression de la protéine d'intérêt, tout en contrôlant les effets attribuables à des protéines homologues. Ce système m'a permis de mettre en évidence des similitudes, mais surtout, des différences fonctionnelles majeures entre Cdr1p et Cdr2p dans leurs interactions avec les substrats antifongiques (Chapitre 2).

Dans la deuxième partie, j'ai caractérisé les propriétés des domaines de liaison à l'ATP (NBD) et étudié les conséquences fonctionnelles du motif atypique dans le NBD1 des transporteurs PDR/CDR. Pour ce projet, j'ai utilisé Cdr2p comme transporteur modèle, en le soumettant à une mutagenèse dirigée (Chapitre 3).

CHAPITRE 2

FUNCTIONAL SIMILARITIES AND DIFFERENCES BETWEEN *CANDIDA ALBICANS* CDR1 AND CDR2 TRANSPORTERS

Contribution des auteurs

Chapitre 2

Pour ce premier article, ma contribution relative s'évalue à au moins 75 % du travail. La deuxième auteure (Sandra Weber) a débuté le projet en effectuant le clonage des deux gènes (*CDR1* et *CDR2*) dans le vecteur d'expression, ainsi qu'en faisant les transformations de levure. Anne-Marie Alarco et Sandra Weber ont également développé les anticorps utilisés dans cet article. Les membres du laboratoire du Dr Elias Georges (Omar AlQawi et Roni Daoud) ont généré le dérivé photoactivable et radioactif de la rhodamine 123. J'ai alors utilisé ces outils pour effectuer toutes les expériences publiées dans l'article. J'ai effectué la rédaction en concert avec ma directrice de recherche, Dre Martine Raymond.

Cet article a été publié en 2003 dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* et est disponible à l'adresse suivante :

<http://aac.asm.org/cgi/content/full/47/5/1543>

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003. Vol. 47, No. 5, p. 1543-1554.

**Functional Similarities and Differences between *Candida albicans*
Cdr1p and Cdr2p Transporters**

**Christian Gauthier,¹ Sandra Weber,¹ Anne-Marie Alarco,^{1,†} Omar Alqawi,²
Roni Daoud,² Elias Georges,² and Martine Raymond^{1*}**

Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec H2W 1R7,¹
Institute of Parasitology, McGill University, Ste-Anne-de-Bellevue, Québec H9X 3V9,
Canada²

* Corresponding author. Mailing address: Institut de Recherches Cliniques de Montréal,
110 Pine Ave. West, Montréal, Québec H2W 1R7, Canada. Phone: (514) 987-5770. Fax:
(514) 987-5764. E-mail: [REDACTED]

† Present address: Eukaryotic Genetics Group, Biotechnology Research Institute, National
Research Council of Canada, Montréal, Québec H4P 2R2, Canada.

Running title: *Candida albicans* Cdrp transporters

I. Abstract

The *Candida albicans* *CDR1* and *CDR2* genes code for highly homologous ATP-binding cassette (ABC) transporters, which are overexpressed in azole-resistant clinical isolates and which confer resistance to multiple drugs by actively transporting their substrates out of the cells. These transporters are formed by two homologous halves, each with an intracellular domain containing an ATP-binding site followed by a membrane-associated domain. We have expressed Cdr1p and Cdr2p in *Saccharomyces cerevisiae* to investigate their functions. The two proteins were properly expressed and functional, as determined by Western blotting, drug susceptibility assays, and rhodamine efflux. Using total membrane proteins from these transformants, we showed that Cdr1p and Cdr2p bind to the photoreactive analogue of rhodamine 123, [¹²⁵I]iodoaryl-azido-rhodamine123 (IAARh123). IAARh123 photoaffinity labeling of membranes prepared from cells expressing either the N half or the C half of Cdr2p, or both, demonstrated that both halves contribute to rhodamine binding and can bind to rhodamine independently. Interestingly, Cdr1p was found to confer hypersusceptibility to FK520, an immunosuppressant and antifungal agent, whereas Cdr2p conferred resistance to this compound, uncovering a major functional difference between the two transporters. Furthermore, when administered in combination with azoles, FK520 sensitized cells expressing *CDR1* but not those expressing *CDR2*. Finally, we showed that Cdr2p confers hypersusceptibility to hydrogen peroxide and resistance to diamide, while Cdr1p has no effect against these oxidative agents. Taken together, our results demonstrate that, despite a high level of structural conservation, Cdr1p and Cdr2p exhibit major functional differences, suggesting distinct biological functions.

II. Introduction

Multidrug resistance (MDR) or pleiotropic drug resistance (PDR) is characterized by cellular cross-resistance to a broad spectrum of structurally and functionally unrelated cytotoxic compounds. It operates in a wide variety of cell types and involves the overexpression of membrane-associated transporters functioning as drug efflux pumps. Many of these transporters belong to the ATP-binding cassette (ABC) superfamily and contain highly conserved consensus sequences for ATP binding and hydrolysis (Higgins, 1992). Well-characterized ABC transporters involved in MDR in mammalian cells include P glycoprotein type 1 (P-gp1) and the MDR-associated protein type 1 (MRP1), whose overexpression causes resistance to several anticancer drugs (Ambudkar *et al.*, 1999; Hipfner *et al.*, 1999). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, overexpression of the ABC transporters Pdr5p and Snq2p has been shown to confer resistance to several different compounds with antifungal activities (Bauer *et al.*, 1999). Pdr5p and Snq2p are homologous proteins formed by two similar halves, each with an N-terminal hydrophilic domain that contains the ABC motif followed by a C-terminal hydrophobic domain with six predicted transmembrane (TM) segments, a structure characteristic of the PDR subfamily of ABC transporters ([ABC-TM]₂) (Decottignies et Goffeau, 1997; Taglicht et Michaelis, 1998). Both proteins have nucleotide triphosphatase activities and can transport steroids *in vivo*, suggesting that steroids or related membrane lipids represent endogenous substrates for these transporters (Mahe *et al.*, 1996a). Cells lacking the *PDR5* gene but not the *SNQ2* gene display an increase in phosphatidylethanolamine (PE) accumulation, and it has been proposed that Pdr5p functions as a PE translocator (Decottignies *et al.*, 1998).

The yeast *Candida albicans* is an opportunistic human pathogen that causes severe infections in immunocompromised individuals (Dixon *et al.*, 1996). Azole derivatives such as fluconazole (FLC) are commonly used to treat *Candida* infections. However, resistant strains often emerge during long-term or prophylactic treatment (White *et al.*, 1998). Two major mechanisms of FLC resistance have been identified so far in these strains: (i) alterations in the drug target (14- α -sterol demethylase, the product of the *ERG11* gene), which results in an increased level of production of the enzyme or in its reduced binding

affinity for FLC, and (ii) a reduced level of intracellular FLC accumulation, which correlates with the overexpression of the *CDR1* and *CDR2* (*Candida* drug resistance) genes encoding transporters of the ABC family and of the *CaMDR1* gene coding for a major facilitator (for a review, see reference (White *et al.*, 1998)). These different mechanisms of azole resistance can coexist in different subpopulations of *C. albicans* cells within a given patient as well as within the same cell, contributing to the stepwise development of azole resistance in the clinical setting (Albertson *et al.*, 1996; White, 1997; Franz *et al.*, 1998a; Lopez-Ribot *et al.*, 1999).

CDR1 and *CDR2* were cloned by functional complementation of an *S. cerevisiae* *pdr5* mutant and were found to code for ABC transporters displaying extensive sequence homology with each other (84% identity, 92% similarity) and with *S. cerevisiae* Pdr5p and Snq2p (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). Since clinical isolates overexpressing *CDR1* and *CDR2* display energy-dependent reductions in their levels of intracellular FLC accumulation compared to those of their azole-susceptible counterparts, it was suggested that Cdr1p and Cdr2p mediate azole resistance by causing active extrusion of the drug out of the cells (Sanglard *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). Heterologous expression systems in *S. cerevisiae* have recently been used to confirm this hypothesis for Cdr1p and to demonstrate that Cdr1p and Cdr2p function as general phospholipid translocators and possess nucleotide triphosphatase activities (Nakamura *et al.*, 2001; Smriti *et al.*, 2002).

In the present study, we expressed the *CDR1* and *CDR2* genes in drug-hypersusceptible *S. cerevisiae* strain TY310 (Talibi et Raymond, 1999) and generated polyclonal antibodies against the Cdr1p and Cdr2p transporters. Using these tools, we show that Cdr1p and Cdr2p bind to a photoreactive analogue of rhodamine (Rh) 123, [¹²⁵I]iodoaryl azido-rhodamine 123 (IAARh123) and that both halves of Cdr2p participate in IAARh123 binding. We also present experimental evidence demonstrating that, despite a high level of structural conservation, Cdr1p and Cdr2p exhibit major functional differences and probably possess distinct biological functions.

III. Materials and Methods

Strain and culture conditions

S. cerevisiae strain TY310 (*MAT α pdr1 pdr3::URA3 pdr5 Δ ::TRP1 ura3-52 ade2-101 trp-81 lys2-801 his3- Δ 200 leu2::PET56*) was used throughout this study and has been described elsewhere (Talibi et Raymond, 1999). Cells were grown in yeast peptone dextrose (YPD) medium or in synthetic dextrose (SD) medium lacking leucine (SD -leu) or lacking leucine and histidine (SD -leu -his) for plasmid selection (Sherman, 1991). Cell transformation was performed by the lithium acetate procedure (Ito *et al.*, 1983). Isolated clones were selected and used throughout the study. *C. albicans* clinical strains 5457 and 5674 were obtained from the Laboratoire de Santé Publique du Québec and will be described elsewhere (S. Saidane, S. Weber, X. De Deken, G. St-Germain, T. Parkinson, C. A. Hitchcock, and M. Raymond, unpublished data). Cultures were routinely grown at 30°C.

Plasmid construction

A 4.5-kb DNA fragment comprising the entire *CDR1* gene (positions -10 to +4506 with respect to the A of the initiation codon set at +1 (Prasad *et al.*, 1995)) was amplified by PCR with *C. albicans* 1006 genomic DNA as the template (Goshorn et Scherer, 1989), high-fidelity *Pfu* DNA polymerase (Stratagene), and oligonucleotides 5'-GGACTAGTGGAAAAAATTATGTCAGATTCTAAG (forward) and 5'-GGACTAGTTTTATTTCTTATTTTTTTTCTCTCTG (reverse), into both of which an *SpeI* site (underlined) was incorporated. A 4.6-kb fragment corresponding to positions -12 to +4668 in *CDR2* (Sanglard *et al.*, 1997) was amplified by PCR with *C. albicans* CAI4 genomic DNA as the template (Fonzi et Irwin, 1993), *Pfu* DNA polymerase, and the oligonucleotides 5'-GGACTAGTCAATAAAAACATATGAGTACTGC (forward) and 5'-GGACTAGTCTACTACAACAACCAATACAGATC (reverse), into both of which an *SpeI* site (underlined) was incorporated. The *CDR1* and *CDR2* PCR fragments were gel purified and digested with *SpeI* for cloning into the *SpeI*-digested *LEU2*-based vector p425GPD (kindly provided by Martin Funk, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, Germany) (Mumberg *et al.*, 1995), yielding plasmids p425GPD-CDR1 and

p425GPD-CDR2^L, respectively (see below for an explanation of the plasmid nomenclature). Sequencing of the inserts was performed with a CEQ 2000 automated sequencer (Beckman Coulter, Fullerton, Calif.) and a series of internal primers. Finally, the insert of p425GPD-CDR1 was released by digestion with *SpeI*, gel purified, and cloned into the *HIS3*-based vector p423GPD at the *SpeI* site (Mumberg *et al.*, 1995) for coexpression experiments.

The two CTG codons in *CDR2* (positions +61 and +1894 with respect to the initiation codon) were mutated to TCT by the QuikChange PCR-based site-directed mutagenesis technique (Stratagene). The 0.8-kb *NdeI* and 2.8-kb *PstI* fragments (overlapping the first and second CTG codons, respectively) were isolated from p425GPD-CDR2^L and cloned into pGEM-5Zf (Promega), yielding plasmids pGEM/*NdeI*-0.8 and pGEM/*PstI*-2.8, respectively. These two plasmids were submitted to separate PCRs with *Pfu Turbo* DNA polymerase (Stratagene) and a mutagenic pair of oligonucleotides, 5'-GCCATGGGTGGATGCATCTGACAATTCATCAGTTC and 5'-GAACTGATGAATTGTCCAGATGCATCCACCCATGGC or 5'-GGTTAATGTGTGCATCTTGCACTTTGGTAATGTCCC and 5'-GGGACATTACCAAAGTGCAAAGATGCACACATTAACC, which incorporate the mutations ⁶¹CTG to TCT and ¹⁸⁹⁴CTG to TCT (underlined) in pGEM/*NdeI*-0.8 and pGEM/*PstI*-2.8, respectively. Sequencing of the resulting inserts confirmed the codon changes and the absence of additional mutations. The mutated 2.8-kb *PstI* fragment was excised from the pGEM backbone and used to replace the corresponding fragment in p425GPD-CDR2^L cut with *PstI*, generating plasmid p425GPD-CDR2^{L632S}. The mutated 0.8-kb *NdeI* fragment was then used to replace the corresponding fragment in p425GPD-CDR2^{L632S} cut with *NdeI*, yielding plasmid p425GPD-CDR2^{L21S/L632S}, abbreviated p425GPD-CDR2.

The following cloning strategy was used to express Cdr2p as two separate halves. An *SpeI* restriction site was inserted in the linker region of *CDR2* (between nucleotide positions +2565 and +2566), along with proper stop and start codons, by PCR with *Pfu* polymerase, p425GPD-CDR2^L as the template, and primer pair 5'-

CGGTAGGTATTGATTGTAATTC (forward) and 5'-
GACTAGTCTTATTACGGTTTTCTGGG (reverse) or primer pair 5'-
GACTAGTCATGATATTTTTCTGGAGAG (forward) and 5'-
 CAGGTTGTCTAACTCCTTCC (reverse) to amplify the N- and C-terminal halves,
 respectively (the *SpeI* sites are underlined, and the stop and start codons are shown in
 boldface). The resulting PCR products were gel purified, digested with *SpeI*, and cloned
 into p425GPD and p423GPD cut with *SpeI*, yielding plasmids p425GPD-CDR2^{L(1-855)} and
 p423GPD-CDR2⁽⁸⁵⁶⁻¹⁴⁹⁹⁾, respectively. The inserts were entirely sequenced, ruling out the
 presence of mutations introduced by PCR. These plasmids were transformed in different
 combinations in TY310 cells by using SD -leu -his selective medium.

Preparation of antisera

The generic anti-Cdrp polyclonal antibody was raised against a multiple-antigen peptide (P13-MAP) consisting of a 13-amino-acid (aa) synthetic peptide (DSSFQRSIGYVQQ) linked to a polylysine core (Sheldon Biotechnology Center, McGill University, Montreal, Quebec, Canada). To generate the anti-Cdr2p antibody, a *CDR2* PCR fragment overlapping nucleotide positions +9 to +302 of the *CDR2* gene and cloned blunt into the *SmaI* site of pUC19 was excised from this plasmid by an *EcoRI-SalI* double digestion, blunt ended with T4 DNA polymerase, and cloned into the *SmaI* site of plasmid pGEX-4T-2 (Pharmacia), yielding plasmid pGEX-CDR2. The resulting Gst-Cdr2p fusion protein contains 97 aa from the NH₂ terminus of Cdr2p (amino acid positions 4 to 101). *Escherichia coli* DH5α cells transformed with pGEX-CDR2 were treated with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (0.1 mM) for 4 h at 30°C to induce expression of Gst-Cdr2p. The resulting fusion protein was soluble in aqueous solution and was thus purified from a crude bacterial lysate by affinity chromatography on immobilized glutathione (Smith et Johnson, 1988). The synthetic P13-MAP peptide and the purified Gst-Cdr2p fusion protein were used to raise polyclonal antisera in New Zealand White rabbits by standard immunization protocols (Harlow et Lane, 1988). One anti-P13mer (RXb) and two anti-Cdr2p (R2a and R2b) antisera of high titers were obtained and used without any further purification.

Protein preparation and Western blot analysis

Total membrane proteins were prepared as described previously (Raymond *et al.*, 1992) with the following modifications. Concentrated yeast cells were passed twice through a French press (SLM Instruments Inc., Rochester, N.Y.) at 20,000 lb/in². After solubilization of the crude membranes in cold TNE buffer (10 mM Tris [pH 7.0], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) followed by a quick spin in a microcentrifuge to remove insoluble material, the membranes were centrifuged in a TLA100.3 ultramicrocentrifuge rotor (Beckman) at 50,000 rpm for 45 min at 4°C. The membrane pellets were resuspended in cold TS buffer (5 mM Tris [pH 7.4], 250 mM sucrose) by using 1-ml syringes and 21G1^{1/2}-gauge needles (Becton Dickinson). The membranes were aliquoted and stored at -80°C. All experimental steps for protein preparation were carried out in the presence of the protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma) at 1 mM and leupeptin, pepstatin, and aprotinin (Roche Diagnostics), each at 5 µg/ml. The protein concentration was determined by the method described by Bradford (Bradford, 1976). Proteins from total membrane extracts (25 to 50 µg) were solubilized for 15 min at room temperature in Laemmli buffer and were separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on 7.5% polyacrylamide gels (Laemmli, 1970). The proteins were transferred to nitrocellulose membranes with a Trans Blot SD Semi-Dry transfer apparatus (Bio-Rad). The anti-Cdr2p (R2a) polyclonal antibody was used at a 1:4,000 dilution, while the generic polyclonal anti-Cdrp (RXb) antibody was used at a 1:1,000 dilution. Immune complexes were revealed by incubation with goat anti-rabbit immunoglobulin G antibodies coupled to alkaline phosphatase (Bio-Rad) and developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate *p*-toluidine salt and nitroblue tetrazolium chloride substrates, as recommended by the manufacturer (Bio-Rad).

Antifungal compounds and susceptibility testing

Stock solutions of FLC (a gift from Pfizer Canada Inc.) were prepared at a concentration of 5 mg/ml in water. Itraconazole (ITC; Janssen Pharmaceuticals) and ketoconazole (KTC; Medisca, Montreal, Canada) were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) at concentrations of 10 and 5 mg/ml, respectively. Rh 6G (Sigma) was dissolved at 20 mM in ethanol. FK520 (a gift from Merck Sharp & Dohme Research Laboratories,

Rahway, N.J.) was prepared at a concentration of 10 mg/ml in methanol. Stock solutions of 1 M diamide (Sigma) were prepared in DMSO. Hydrogen peroxide (30%) was purchased from Aldrich Chemical Company Inc. For drug resistance assays in liquid medium, cells were grown overnight on selective plates (SD -leu or SD -leu -his) and diluted in selective liquid medium to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.1, followed by a second 1:100 dilution in the same medium. Fifty microliters of this dilution was added to 50 μ l of a drug solution concentrated two times or drug-free medium in 96-well microtiter plates. The ranges of drug concentrations tested were 0.1 to 250 μ g/ml for FLC, 0.005 to 10 μ g/ml for ITC, 0.05 to 50 μ g/ml for KTC, and 0.5 to 200 μ g/ml for Rh 6G. Growth was measured spectrophotometrically at an OD_{595} after 2 days of incubation at 30°C in a humid chamber. The relative growth was calculated as the percentage of growth in drug-containing medium relative to the control growth in drug-free medium containing the solvent that was used to dissolve the drug. For the FK520-azole synergy experiments, 10 μ g of FK520 per ml (a non-toxic concentration for the p425GPD, p425GPD-CDR1, and p425GPD-CDR2 transformants) was added to FLC or KTC under the conditions described above. The concentrations of azoles selected for use in the experiments whose results are presented in Fig. 2-5 were 10 μ g/ml for FLC and 0.5 μ g/ml for KTC, which correspond to the respective MICs of these azoles for control TY310 cells transformed with p425GPD. For spot assays, cells were grown overnight on plates with selective (TY310 transformants) or YPD (*C. albicans* clinical isolates) medium and suspended in sterile water to an OD_{600} of 0.1. Three microliters of fivefold serial dilutions of each strain were spotted onto YPD medium plates supplemented with the indicated concentrations of the antifungal compounds or supplemented with the solvent alone. The ranges of concentrations tested were 20 to 80 μ g/ml for FK520, 0.2 to 1.2 mM (TY310 transformants) or 1 to 5 mM (*C. albicans* isolates) for diamide, and 0.5 to 3 mM (TY310 transformants) or 1 to 5 mM (*C. albicans* isolates) for H_2O_2 . The plates were incubated for 2 days at 30°C.

Rh efflux

Cells were grown in SD -leu medium and harvested in the early logarithmic phase ($OD_{600} = 0.7$ to 1.0). Two OD_{600} U of cells were collected by centrifugation in 1.5-ml microcentrifuge tubes (4,700 \times g for 1 min at room temperature). The cell pellets were

washed four times with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in 1 ml HEPES-buffered saline (pH 7.0; without dextrose)-10 mM 2-deoxy-D-glucose (Sigma)-5 μ M Rh 6G, and incubated for 3 h at room temperature in the dark. The cells were washed once with 1 ml of PBS, spun again, and resuspended in 1 ml of prewarmed PBS containing 1% glucose (Sigma). After 14 min at 30°C in the dark, the tubes were spun for 1 min at room temperature (for a total incubation period of 15 min) and placed in an ice-water bath (0°C) to stop the efflux activity (a 15-min time point was chosen since it was the optimal condition for discrimination of the different transformants; a 10-min incubation was too short to measure significant Cdr1p activity above that for the control values, whereas longer incubation times were in the plateau phase for Cdr2p). Six aliquots (100 μ l each) of sample supernatant and of PBS with 1% glucose (blank) each were placed in a Dynex Microfluor microplate, and Rh fluorescence was measured by spectrofluorometry (LS-50B; Perkin-Elmer). Excitation and emission wavelengths were set at 529 nm (slit 2.5 nm) and 553 nm (slit 2.5 nm), respectively. A 515-nm band-pass filter was applied, the photomultiplier tube voltage was automatically set, and the acquisition time was 0.1 s. To normalize the Rh efflux activity with respect to the number of cells present in each sample, the remaining supernatant was removed, the cells were resuspended in 1 ml of cold PBS, and the OD₆₀₀ was measured. The efflux activity was calculated as follows: (sample mean fluorescence units - blank mean fluorescence units)/OD₆₀₀.

Photoaffinity labeling and immunoprecipitation

Total membrane proteins in TS buffer (50 μ g for direct labeling or 300 μ g for immunoprecipitation, in a final volume of 20 μ l) were incubated with 0.5 to 1.0 μ M IAARh123 (Nare *et al.*, 1994) for 30 min at room temperature under subdued light conditions. The samples were further incubated for 10 min on ice, followed by UV irradiation at 254 nm (1800 UV cross-linker; Stratagene, La Jolla, Calif.) for 10 min on ice. All the photoaffinity labeling and immunoprecipitation steps were performed in the presence of the four protease inhibitors described above in the membrane protein extraction procedure. Samples that were not subjected to immunoprecipitation were solubilized for 15 min at room temperature in Laemmli buffer and separated by SDS-PAGE on a 7.5% polyacrylamide gel (Laemmli, 1970). For immunoprecipitation, the samples were incubated

for 15 min on ice in lysis buffer A (1% SDS, 50 mM Tris [pH 7.4]) and then diluted to 420 μ l with lysis buffer B (1.25% Triton X-100, 190 mM NaCl, 50 mM Tris [pH 7.4]). After incubation for 1 h on ice, the polyclonal antibody (anti-Cdrp or anti-Cdr2p) was added at a 1:100 dilution and the tubes were placed on a rotating wheel at 4°C overnight. A protein A-Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia) suspension (100 μ l) was added to each sample, followed by another incubation on the rotating wheel at 4°C for 3 h. The beads were washed four times with wash A buffer (0.1% Triton X-100, 0.05% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris [pH 7.5], 5 mM EDTA) and two times with detergent-free wash B buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris [pH 7.5], 5 mM EDTA). The immune complexes were solubilized in Laemmli buffer for 20 min at room temperature, followed by a 2 min incubation at 37°C, and were resolved by SDS-PAGE on 7.5% polyacrylamide gels. The gels were fixed, dried, and exposed to Kodak BioMax MS films with two BioMax MS intensifying screens at -80°C.

IV. Results

Expression of *CDR1* and *CDR2* in *S. cerevisiae*

CDR1 and *CDR2* expression plasmids were constructed by isolating the coding region of each *CDR* gene by PCR amplification and cloning them under the control of the strong constitutive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GPD*) promoter in the multicopy vector p425GPD (Mumberg *et al.*, 1995). DNA sequencing indicated that there was no difference between the nucleotide sequence of the amplified *CDR1* gene and the published sequence of *CDR1* (Prasad *et al.*, 1995). The sequence of the amplified *CDR2* gene had three nucleotide differences (C946G, G2325C, and C3263A; the PCR-amplified *CDR2* sequence is underlined) that caused three amino acid changes (N15K, G475A, and L788M) compared to the published *CDR2* sequence (Sanglard *et al.*, 1997). However, our sequence was identical to that in the Stanford *C. albicans* genome sequence database and probably corresponds to the second allele of *CDR2*. Since *C. albicans* uses an alternative genetic code, in which the CTG codon is decoded as a serine instead of a leucine, the product of a *C. albicans* gene containing such codons contains leucine rather than serine residues at the corresponding positions when it is expressed in *S. cerevisiae* (Santos et Tuite, 1995). Sequence analysis indicated that *CDR1* had no CTG codons, while our cloned allele of *CDR2* had two (at amino acid positions 21 and 632) and was designated *CDR2^L*. By using site-directed mutagenesis, the two CTG codons in *CDR2^L* were replaced by TCT codons specifying serines. The resulting plasmids, designated p425GPD-*CDR1*, p425GPD-*CDR2^L*, and p425GPD-*CDR2^{L21S/L632S}* (abbreviated p425GPD-*CDR2*), as well as p425GPD as a control, were transformed into *S. cerevisiae* strain TY310, which harbors a triple *pdr1 pdr3 pdr5* mutation that renders the cells hypersusceptible to many drugs (Talibi et Raymond, 1999). TY310 cells transformed with p425GPD-*CDR2* or p425GPD-*CDR2^L* displayed similar drug resistance profiles (data not shown), indicating that the presence of leucines rather than serines at positions 21 and 632 does not significantly alter the activity of Cdr2p. Plasmid p425GPD-*CDR2* was used throughout this study except where mentioned otherwise.

To examine the expression of the Cdr1p and Cdr2p proteins in the TY310 transformants, total membranes were prepared and analyzed by Western blotting with two different polyclonal antibodies (Fig. 2-1). First, we used an anti-Cdrp antibody raised against a 13-aa synthetic peptide whose sequence, located downstream of the C-terminal Walker A motif (Fig. 2-1A), is perfectly conserved between the two proteins (DSSFQRSIGYVQQ; amino acid positions 930 to 942 in Cdr1p and 928 to 940 in Cdr2p) (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). This antibody detected a protein of high molecular weight in membranes from the *CDR1* or the *CDR2* transformants but not in membranes from the control cells, indicating that these two proteins correspond to Cdr1p and Cdr2p, respectively (Fig. 2-1B, left panel). This antibody also detects an endogenous *S. cerevisiae* protein of high molecular weight which can be used as an internal control for protein loading (Fig. 2-1B, left panel). This experiment demonstrated that Cdr1p and Cdr2p are properly expressed in the TY310 transformants, with about 1.5- to 2.0-fold more Cdr2p than Cdr1p, but the reason for this difference is unclear (Fig. 2-1B, left panel). We also used an anti-Cdr2p antibody raised against the NH₂-terminal domain of Cdr2p (Fig. 2-1A), a region where the level of amino acid sequence homology between Cdr1p and Cdr2p is the lowest. This antibody recognized a protein of high molecular weight only in membranes prepared from the *CDR2* transformants, confirming that this protein corresponds to Cdr2p and demonstrating the isoform specificity of the antibody (Fig. 2-1B, right panel). As determined by indirect immunofluorescence, cells expressing *CDR1* and *CDR2* exhibited predominantly intracellular staining which was not detected in the control transformants (data not shown), indicating that the two proteins are similarly located in internal membranes of the TY310 transformants, probably as a consequence of the high level of expression achieved with the p425GPD vector.

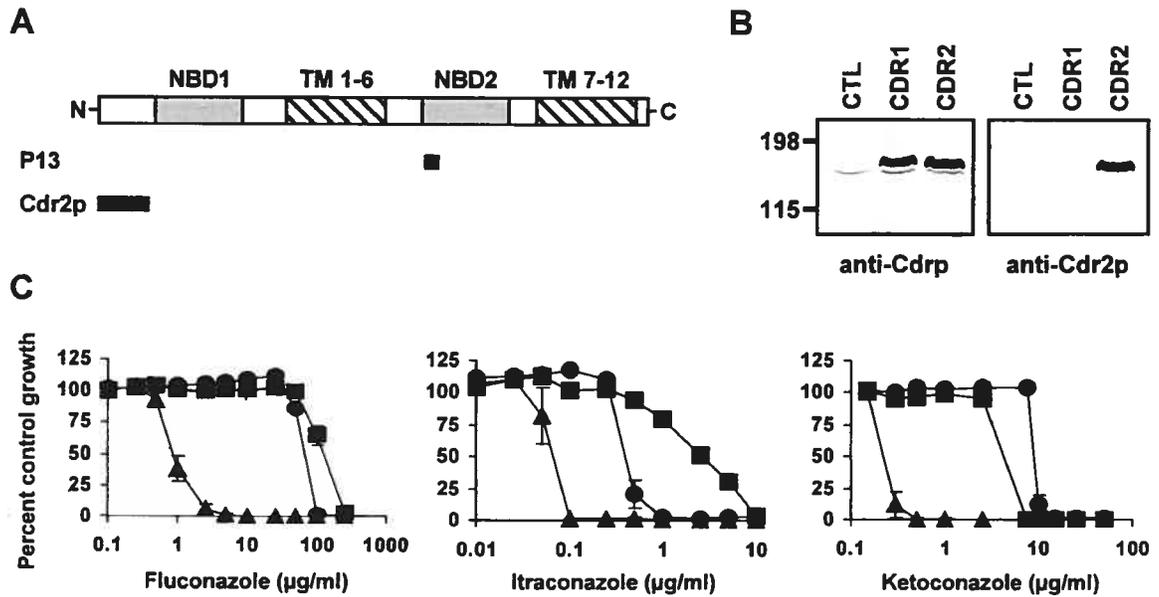


Figure 2-1 : Expression of Cdr1p and Cdr2p in *S. cerevisiae* TY310. (A) Schematic representation of the Cdrp proteins. Shaded boxes represent the nucleotide-binding domains (NBD1 and NBD2), and striped boxes correspond to the predicted TM domains (TM 1 to 6 and TM 7 to 12). The protein segments used as antigens to generate the generic anti-Cdrp (P13) and anti-Cdr2p polyclonal antibodies are indicated by the filled boxes. (B) Immunodetection of Cdr1p and Cdr2p. Total membrane proteins (25 µg) prepared from TY310 cells transformed with p425GPD (control [CTL]), p425GPD-CDR1 (CDR1), or p425GPD-CDR2 (CDR2) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and analyzed with the indicated antibodies. The positions of the molecular mass standards (in kilodaltons) are shown on the left. (C) Azole resistance profiles of the *CDR1* and *CDR2* transformants. TY310 cells transformed with plasmid p425GPD-CDR1 (squares), p425GPD-CDR2 (circles), or p425GPD (triangles) were analyzed by liquid microdilution assay for their ability to grow in medium containing the indicated azoles. Cell growth is presented as the percentage of growth in azole-containing medium relative to the growth in azole-free (control) medium containing the solvent alone. Values represent the means \pm standard deviations of three independent experiments performed in duplicate.

Analysis of the azole resistance profiles of these transformants by a microtiter plate assay showed that *CDR1*- and *CDR2*-expressing cells were more resistant than control cells to the three azoles tested: FLC, ITC, and KTC (Fig. 2-1C). The p425GPD-*CDR1* transformants were able to withstand higher concentrations of FLC and ITC than the p425GPD-*CDR2* transformants, suggesting that Cdr1p is more active than Cdr2p at effluxing FLC and ITC (Fig. 2-1C). Conversely, the p425GPD-*CDR2* transformants were able to grow in the presence of higher concentrations of KTC than the p425GPD-*CDR1* transformants, although this difference could be attributed to the higher levels of Cdr2p expression compared to those of Cdr1p expression (Fig. 2-1B, left panel). Taken together, these results demonstrate that Cdr1p and Cdr2p are functionally expressed in *S. cerevisiae* TY310.

Photoaffinity labeling of Cdr1p and Cdr2p with IAARh123

Rh, a cationic fluorescent dye with antifungal activity, is a substrate for several ABC transporters, including Cdr1p and Cdr2p (Nakamura *et al.*, 2001; Smriti *et al.*, 2002). As anticipated, TY310 cells transformed with p425GPD-*CDR1* or p425GPD-*CDR2* were more resistant to Rh 6G and displayed increased levels of efflux of this compound compared to control cells (Fig. 2-2A and B). Cells expressing Cdr2p grew in the presence of higher concentrations of Rh 6G (Fig. 2-2A) and effluxed more Rh 6G than those expressing Cdr1p (Fig. 2-2B), although these differences were not significant when the results were normalized for protein content (Fig. 2-1B). Given the abilities of Cdr1p and Cdr2p to confer Rh resistance and to mediate its efflux, it was of interest to investigate the abilities of the two proteins to bind to this compound. To this end, we performed cross-linking experiments with the photoreactive-iodinated analogue of Rh 123, IAARh123, which was previously used to demonstrate binding of Rh to P-gp1 and MRP1 (Nare *et al.*, 1994; Daoud *et al.*, 2000). Membranes from the TY310 transformants were incubated with IAARh123, UV cross-linked, and resolved by SDS-PAGE (Fig. 2-2C, left panel). A high-molecular-weight protein was specifically photolabeled with IAARh123 in total membranes isolated from the p425GPD-*CDR1* or the p425GPD-*CDR2* transformants but not from the p425GPD transformants (control), suggesting that the labeled proteins correspond to Cdr1p and Cdr2p. This was confirmed by immunoprecipitation of the photolabeled membranes

with the generic anti-Cdrp polyclonal antibody (Fig. 2-2C, right panel). When normalized for the amount of Cdr1p and Cdr2p proteins present in the membrane samples (Fig. 2-1B), the levels of photolabeling of Cdr1p and Cdr2p were roughly equivalent. Taken together, our results demonstrate that Cdr1p and Cdr2p can be photoaffinity labeled with IAARh123 and that this compound may be used to characterize the Rh 123 binding site(s) in the Cdrp transporters.

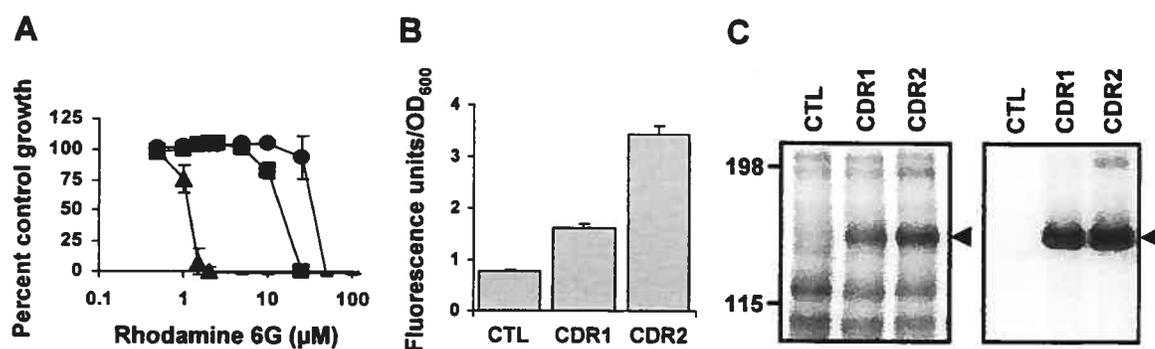


Figure 2-2 : Rh transport and binding by Cdr1p and Cdr2p. (A) Rh 6G resistance profile of TY310 cells transformed with p425GPD-CDR1 (squares), p425GPD-CDR2 (circles), or p425GPD (triangles) as determined by liquid microdilution assay. Values represent the means \pm standard deviations of three independent experiments performed in duplicate. (B) Rh 6G efflux activities of the TY310 transformants mentioned in panel A. Extracellular Rh 6G fluorescence was measured by spectrofluorometry and normalized for the amount of cells present in each sample, as determined by measurement of the OD₆₀₀. Values represent the means \pm standard deviations of three independent experiments. (C) Photoaffinity labeling of Cdr1p and Cdr2p with IAARh123. Left panel, total membrane proteins (50 μ g) from the transformants described above were incubated with 0.5 μ M IAARh123, UV cross-linked, and separated by SDS-PAGE; right panel, total membrane proteins (300 μ g) were incubated with 1 μ M IAARh123, UV cross-linked, and immunoprecipitated with the anti-Cdrp antibody. The immune complexes were resolved by SDS-PAGE. The gels were dried and exposed to Kodak BioMax MS films with two intensifying screens at -80°C for 4 h (left panel) or 5 days (right panel). The results shown are representative of those of at least three independent experiments. The positions of the molecular mass standards (in kilodaltons) are indicated on the left. CTL, control.

As a first step in that direction, we used a coexpression system to determine whether both halves of Cdr2p bind to Rh123. Plasmids expressing the N- or the C-terminal half of Cdr2p (p425GPD-CDR2^{L(1-855)} and p423GPD-CDR2⁽⁸⁵⁶⁻¹⁴⁹⁹⁾, respectively; Fig. 2-3A) were transformed independently or simultaneously into TY310 cells, along with the appropriate control vectors. Analysis of the drug resistance profiles of the resulting transformants showed that cells coexpressing the two halves of Cdr2p were significantly resistant to FLC and Rh 6G, with about 50% resistance compared to the level of resistance of cells expressing full-length Cdr2p, while cells expressing each half alone were as susceptible to FLC and Rh 6G as the control cells transformed with the empty vectors (Fig. 2-3B). These results demonstrate that each half of Cdr2p is unable to confer resistance by itself and that coexpression of the two halves is necessary to reconstitute a functional transporter. Western blot analysis of total membrane extracts by use of the N-terminal-specific anti-Cdr2p antibody or the C-terminal-specific anti-Cdrp antibody (Fig. 2-3A) confirmed that the two halves are properly expressed in the TY310 transformants. The N-terminal half migrates at a position corresponding to its predicted molecular mass of 96 kDa (Fig. 2-3C, upper panel) and is detected as a doublet, possibly due to posttranslational modifications such as glycosylation, ubiquitination, or phosphorylation (16, 22). The C-terminal half appears as a single band migrating approximately 10 kDa lower than its calculated molecular mass of 73 kDa (Fig. 2-3C, lower panel). The reason for this difference is unclear, but expression of the C-terminal half of the yeast ABC transporter Ste6p also gives rise to a similar discrepancy between its calculated and apparent molecular masses (8). Taken together, these results indicate that both halves of Cdr2p are properly expressed in *S. cerevisiae*, thus providing a system that can be used to evaluate the ability of each half to bind to Rh within the context of a functionally reconstituted transporter. Photoaffinity labeling with IAARh123 was performed by using total membrane extracts from the different transformants, followed by immunoprecipitation with either the anti-Cdr2p antibody (Fig. 2-3D, upper panel) or the anti-Cdrp antibody (Fig. 2-3D, lower panel). Figure 2-3 shows that each half of Cdr2p can be photolabeled with IAARh123 when it is expressed either alone or in combination with the other half (Fig. 2-3D, lanes N, C, and N + C). These results demonstrate the presence of at least one Rh-binding site in each half of Cdr2p and suggest that each half is involved in Rh recognition.

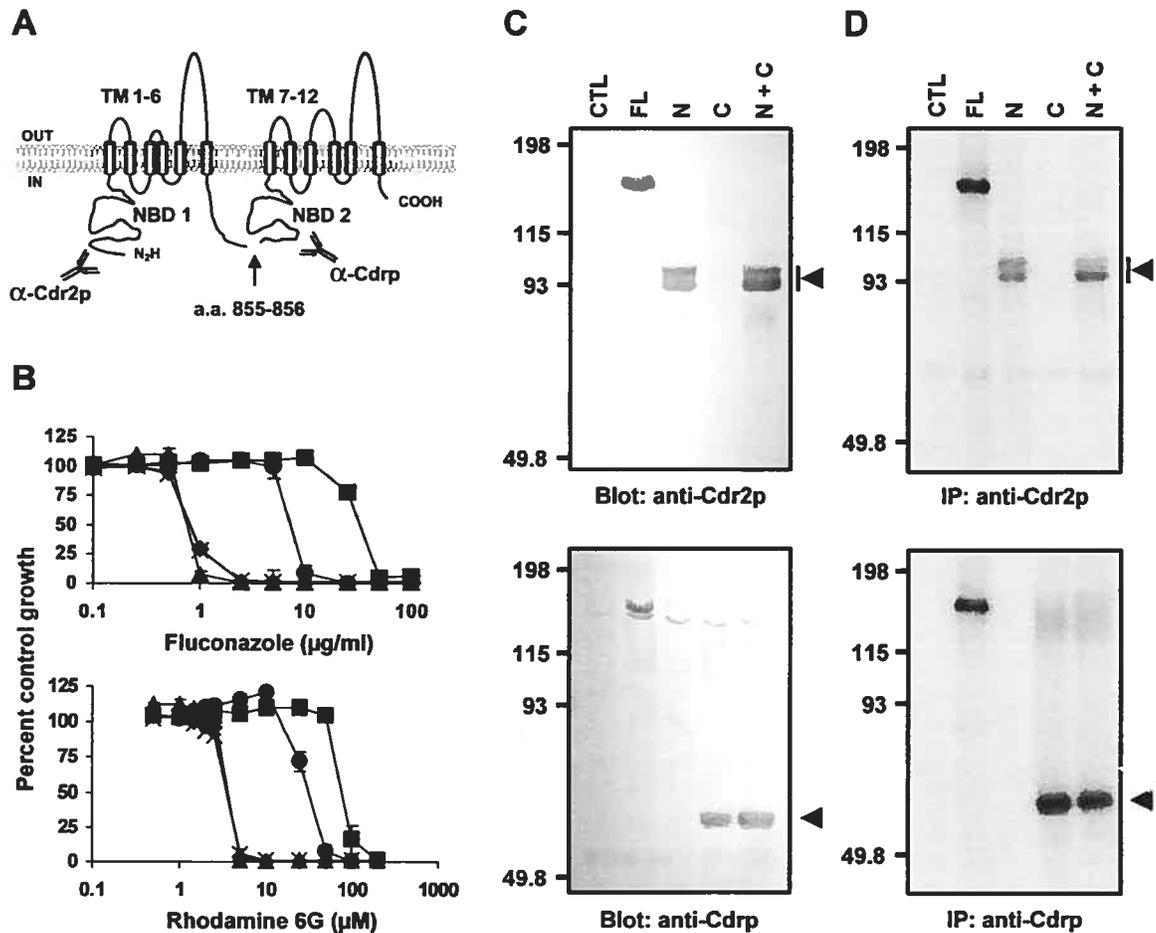


Figure 2-3 : Photoaffinity labeling of the N- and C-terminal halves of Cdr2p by IAARh123. (A) Schematic representation of Cdr2p showing the positions of the cleavage site and of the epitopes recognized by the anti-Cdr2p and anti-Cdrp polyclonal antibodies. (B) Drug resistance profiles of TY310 cells cotransformed with p425GPD-CDR2^L and p423GPD (squares), p425GPD-CDR2^{L(1-855)} and p423GPD-CDR2⁽⁸⁵⁶⁻¹⁴⁹⁹⁾ (circles), p425GPD-CDR2^{L(1-855)} and p423GPD (triangles), p425GPD and p423GPD-CDR2⁽⁸⁵⁶⁻¹⁴⁹⁹⁾ (diamonds), as well as p425GPD and p423GPD (x), as determined by liquid microdilution assay. (C) Immunodetection of the halves of Cdr2p expressed in *S. cerevisiae* TY310. Total membrane proteins (50 μg) from TY310 cells cotransformed with p425GPD-CDR2^L and p423GPD (lane FL, for full-length *CDR2*), p425GPD-CDR2^{L(1-855)} and p423GPD (lane N), p425GPD and p423GPD-CDR2⁽⁸⁵⁶⁻¹⁴⁹⁹⁾ (lane C), p425GPD-CDR2^{L(1-855)} and p423GPD-CDR2⁽⁸⁵⁶⁻¹⁴⁹⁹⁾ (lane N + C), as well as p425GPD and p423GPD (control [CTL]) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and analyzed with the anti-Cdr2p (upper panel) or the anti-Cdrp (lower panel) polyclonal antibody. The positions of the N- and C-terminal halves are indicated by arrowheads. (D) Photoaffinity labeling of the two halves of Cdr2p by IAARh123. Total membrane proteins (300 μg) from the cotransformants for which the results are shown in panel C were incubated with 1 μM IAARh123, UV cross-linked, and immunoprecipitated (IP) with either the anti-Cdr2p (upper panel) or the anti-Cdrp (lower panel) antibody. The immune complexes were separated by SDS-PAGE. The gels were

dried and exposed to Kodak BioMax MS films with two intensifying screens at -80°C for 5 days. The positions of the molecular mass standards (in kilodaltons) are indicated on the left.

They also show that the inability of individual halves to confer Rh resistance is not due to impaired Rh binding. Finally, they indicate that the presence of leucines rather than serines at positions 21 and 632 in Cdr2p does not affect the binding of Rh to the transporter (compare Fig. 2-3D, lane FL, and Fig. 2-2C, lane CDR2).

Differential activity of Cdr1p or Cdr2p against FK520

FK506 (tacrolimus) and FK520 (ascomycin; an FK506 derivative in which the C-21 allyl group is replaced by an ethyl group (Hatanaka *et al.*, 1988)) are macrolide compounds with potent immunosuppressive and antimicrobial activities (Arndt *et al.*, 1999; Dumont, 2000). They exert their action by forming a complex with FKBP12, a peptidyl-prolyl isomerase, and inhibiting the calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin, which is involved in signal transduction and regulation of gene expression (Hemenway et Heitman, 1999; Carreras *et al.*, 2001). In addition, they function as modulators of P-gp1-mediated MDR in mammalian cells: FK506 has been shown to compete with anticancer drugs for binding and transport by P-gp1 and both compounds stimulate P-gp1 ATPase activity with high efficiencies (Arceci *et al.*, 1992; Saeki *et al.*, 1993; Rao et Scarborough, 1994). Also, P-gp encoded by the mouse *mdr3* gene confers resistance to both compounds when it is expressed in *S. cerevisiae* (Raymond *et al.*, 1994; Urbatsch *et al.*, 2000). Finally, FK506 has been shown to inhibit the transport of drugs and steroids by Pdr5p, suggesting a potential clinical role for this compound as an agent that can be used to reverse azole resistance (Kralli et Yamamoto, 1996; Egner *et al.*, 1998). It was therefore of interest to determine whether Cdr1p and Cdr2p expression in *S. cerevisiae* affects the tolerance of cells to this class of compounds. Using a spot assay, we compared the ability of TY310 cells transformed with p425GPD, p425GPD-CDR1, or p425GPD-CDR2 to grow in the presence of increasing concentrations of FK520. Interestingly, we found that *CDR1* expression and *CDR2* expression have opposite effects: Cdr1p conferred hypersusceptibility to FK520, whereas Cdr2p conferred resistance to this compound (Fig. 2-4A), uncovering a major functional difference between the two transporters.

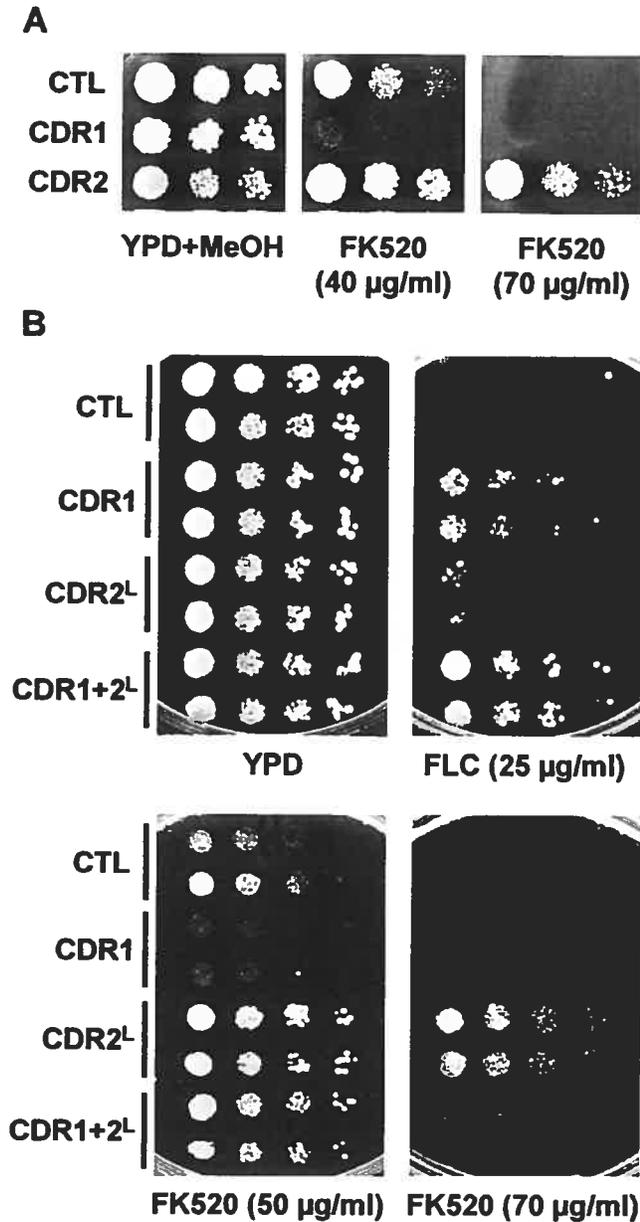


Figure 2-4 : Differential susceptibilities of TY310 cells expressing Cdr1p and Cdr2p in the presence of FK520. (A) TY310 cells transformed with plasmid p425GPD (control), p425GPD-CDR1 (CDR1), or p425GPD-CDR2 (CDR2) were analyzed by spot assay on YPD plates containing the solvent alone (0.7% methanol [YPD + MeOH]) or FK520 at the indicated concentrations. (B) Coexpression of *CDR1* and *CDR2*. Two different TY310 transformants harboring plasmids p425GPD and p423GPD (control), p425GPD and p423GPD-CDR1 (CDR1), p425GPD-CDR2^L and p423GPD (CDR2^L), or p423GPD-CDR1 and p425GPD-CDR2^L (*CDR1* + 2^L) were analyzed by spot assay on YPD plates in the absence of FLC and FK520 (YPD) or in the presence of FLC and FK520 at the indicated concentrations. The plates were incubated at 30°C for 2 days. CTL, control.

Since azole-resistant *C. albicans* strains overexpress both *CDR1* and *CDR2*, we investigated the functional consequences of *CDR1* and *CDR2* coexpression on cellular resistance to FLC and FK520. To this end, we cloned *CDR1* into p423GPD and generated the appropriate sets of double transformants by transforming TY310/p425GPD-*CDR2*^L cells with p423GPD-*CDR1* for *CDR1* and *CDR2* coexpression, TY310/p423GPD-*CDR1* with p425GPD and TY310/p425GPD-*CDR2*^L with p423GPD for the individual expression of *CDR1* and *CDR2*, respectively, and TY310/p425GPD cells with p423GPD as a control. Western blot analysis of the resulting Leu⁺ His⁺ clones was performed, confirming that Cdr1p and Cdr2p are properly expressed in the single-gene transformants as well as in the double-gene transformants (data not shown). We first analyzed these clones for their resistance to FLC by spot assay. At a concentration of 25 µg/ml, *CDR1*- and *CDR2*-expressing cells displayed moderate and low levels of FLC resistance, respectively, compared to the level of resistance of control cells (Fig. 2-4B). Cells coexpressing *CDR1* and *CDR2* were more resistant to FLC than each single-gene transformant. These results demonstrate that Cdr1p and Cdr2p have additive activities against FLC, suggesting that the concomitant overexpression of *CDR1* and *CDR2* observed in many azole-resistant *C. albicans* strains helps to confer high levels of resistance in these cells. We then analyzed these transformants for their levels of resistance to FK520 (Fig. 2-4C). As expected, *CDR1*- and *CDR2*-overexpressing cells were hypersusceptible and resistant to FK520, respectively, compared to the susceptibilities of control cells. However, cells coexpressing *CDR1* and *CDR2* were more susceptible to FK520 than *CDR2*-expressing cells but more resistant than *CDR1*-expressing cells, demonstrating that Cdr1p and Cdr2p additivity also applies to susceptibilities to compounds against which the two transporters have opposite activities. These results further substantiate that *CDR1* and *CDR2* have similar but also distinct cellular functions.

Previous studies have shown that FK506 has synergistic activity with FLC against *C. albicans* and other pathogenic fungi (Maesaki *et al.*, 1998; Del Poeta *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2002). It has been proposed that this synergy could be due to the ability of FK506 to inhibit multidrug transporters, resulting in increased levels of intracellular FLC

accumulation and thus increased FLC susceptibility (Maesaki *et al.*, 1998; Del Poeta *et al.*, 2000). We therefore used our expression system to examine possible functional interactions between this class of compounds and the azole resistance activities of the Cdr1p and Cdr2p transporters. TY310 cells transformed with p425GPD, p425GPD-CDR1, or p425GPD-CDR2 were grown in the presence or in the absence of a nontoxic concentration of FK520 (10 μ g/ml) in combination with FLC (Fig. 2-5A) or KTC (Fig. 2-5B) in microtiter plate assays. Again, an important difference was observed between cells expressing Cdr1p or Cdr2p: while the addition of FK520 had no effect on the growth of the p425GPD (control) or the p425GPD-CDR2 transformants in the presence of azoles, it strongly inhibited the growth of the p425GPD-CDR1 transformants in the presence of the two azoles tested (Fig. 2-5A and B). This finding highlights yet another functional difference between Cdr1p and Cdr2p which has important clinical implications (see Discussion).

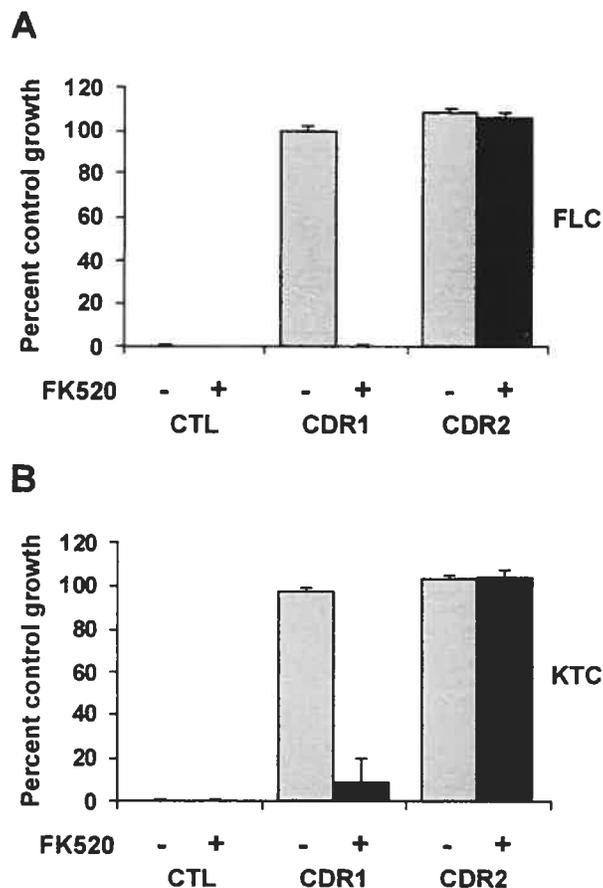


Figure 2-5 : Effects of the combination of azoles with FK520 on the viability of *S. cerevisiae* TY310 cells expressing *CDR1* or *CDR2*. The TY310 transformants were grown in SD -leu medium in the presence (+) or in the absence (-) of 10 μ g of FK520 per ml in combination with 10 μ g of FLC per ml (A) or 0.5 μ g of KTC per ml (B). CTL, control. Values represent the means \pm standard deviations of three independent experiments performed in duplicate.

Functional consequences of *CDR1* and *CDR2* expression on cell response to oxidants

We have observed that the acquisition of azole resistance in *C. albicans* clinical isolates is accompanied by an altered susceptibility of the cells to oxidative agents. For example, an azole-resistant *C. albicans* isolate (isolate 5674) overexpressing *CDR1* and *CDR2* but not *CaMDR1* is resistant to diamide and hypersusceptible to hydrogen peroxide compared to the susceptibility of its matched parental azole-susceptible isolate (isolate 5457) (Fig. 2-6A), suggesting that *CDR1* and/or *CDR2* overexpression could be responsible for the phenotypes observed. However, molecular changes other than transporter overexpression may have taken place in these cells during the acquisition of azole resistance. To directly investigate this question, we analyzed the p425GPD-*CDR1* and p425GPD-*CDR2* transformants for their abilities to grow in the presence of increasing concentrations of these oxidants by spot assay. This experiment showed that Cdr2p expression causes hypersusceptibility to H₂O₂ and resistance to diamide, while Cdr1p expression has no effect on the susceptibilities to these two compounds (Fig. 2-6B). The inability of Cdr1p to generate these phenotypes confirms that they specifically result from the expression of *CDR2* and not simply from high levels of expression of a polytopic membrane protein in a heterologous host. These results further demonstrate that Cdr1p and Cdr2p possess distinct activities. They also indicate that the altered susceptibilities to oxidative agents observed in azole-resistant *C. albicans* clinical isolates overexpressing *CDR1* and *CDR2* are likely to be a consequence of *CDR2* overexpression and that ABC transporters like Cdr2p can influence cell response to oxidative stress.

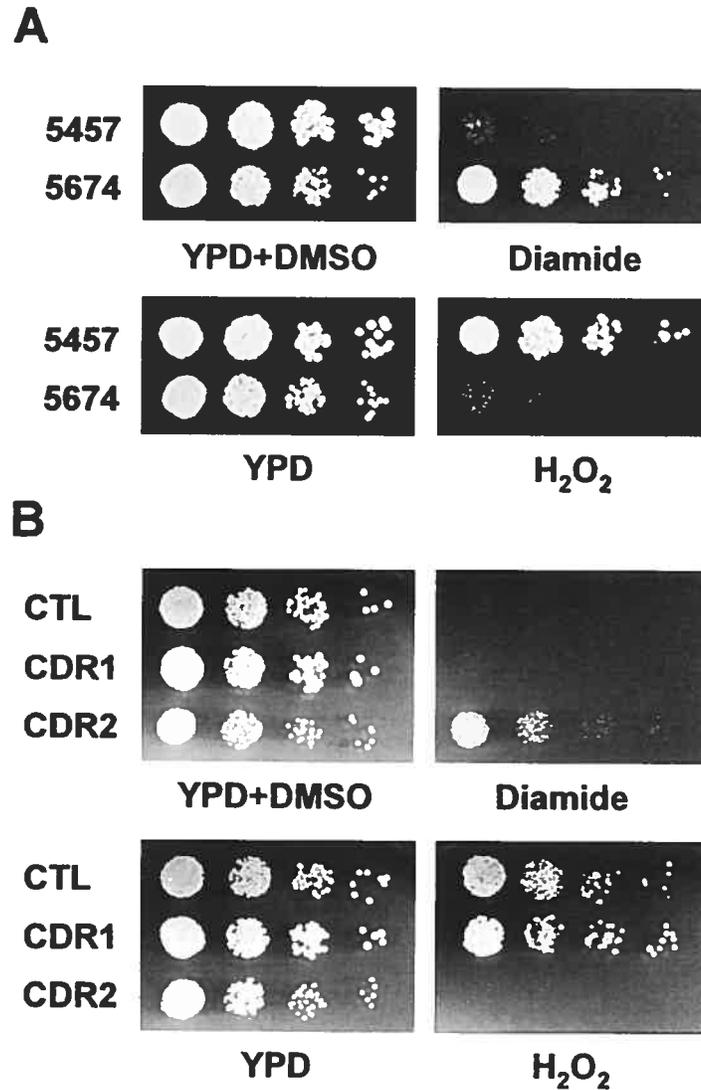


Figure 2-6 : Functional consequences of *CDR1* and *CDR2* expression on cellular responses to oxidants. (A) *C. albicans* isolates 5457 and 5674 were spotted on YPD plates containing diamide (1 mM) or H₂O₂ (3 mM). (B) TY310 cells transformed with p425GPD (control), p425GPD-*CDR1* (*CDR1*), or p425GPD-*CDR2* (*CDR2*) were spotted on YPD plates containing diamide (0.75 mM) or H₂O₂ (2 mM). Control growth in the absence of oxidants is also shown (YPD and YPD + DMSO). The plates were incubated at 30°C for 2 days. CTL, control.

V. Discussion

Transporter-mediated azole resistance represents an important clinical problem for the treatment of *C. albicans* infections. The molecular characterization of several azole-resistant clinical isolates has shown that a large proportion of these strains overexpress the *CDR1* and *CDR2* genes (White *et al.*, 1998). This overexpression is stable and probably the consequence of mutations in a *trans*-acting factor coregulating the expression of both genes. Indeed, several studies have shown that the transcription of *CDR1* and *CDR2* is similarly regulated; i.e., both genes can be induced upon treatment of cells with different steroids and antifungal agents through a drug response element present in their promoters (Krishnamurthy *et al.*, 1998b; Henry *et al.*, 1999; de Micheli *et al.*, 2002). In addition, studies performed so far have shown that Cdr1p and Cdr2p perform similar functions: both transporters confer resistance to multiple antifungal compounds, including azoles, Rh, and other drugs (although to various degrees) and function as phospholipid translocators (Sanglard *et al.*, 1997; Smriti *et al.*, 2002). In the present study, we have used a heterologous expression system in *S. cerevisiae* to compare the activities of these two transporters. Our system uses multicopy vectors containing a strong constitutive promoter, a situation mimicking the stable overexpression observed in azole-resistant clinical isolates. We have also generated and characterized polyclonal antibodies recognizing different epitopes in these transporters. These antibodies are advantageous since they permit (i) normalization of the activities of the transporters with respect to their expression levels, (ii) specific detection of different domains of the transporters, and (iii) analysis of these transporters without the use of tags that may impair their function. Using this well-characterized system, we were able to identify different phenotypes specifically associated with the expression of Cdr1p or Cdr2p, unraveling fundamental functional differences between the two transporters. In particular, we show that *CDR2* confers resistance to FK520 and diamide but hypersusceptibility to H₂O₂, whereas *CDR1* confers hypersusceptibility to FK520 but does not affect the tolerance of cells to oxidative agents. Since Cdr1p and Cdr2p display very high levels of structural conservation, these functional differences are possibly encoded by a limited number of amino acid residues. Alternatively, different subcellular localizations, half-lives, and/or phosphorylation status could account

for the differences between the two transporters. The availability of a functional expression system in *S. cerevisiae* together with well-characterized antibodies now allows us to dissect the molecular mechanisms underlying these functional dissimilarities.

Although Cdr1p, Cdr2p, P-gp1, and MRP1 all function as MDR pumps, Cdr1p and Cdr2p are structurally different from the mammalian P-gp1 and MRP1 transporters. They possess an inverted domain organization ([ABC-TM]₂) compared to those of P-gp1 and MRP1 ([TM-ABC]₂). They also display a low level of sequence identity with P-gp1 and MRP1 (<17%) outside of the conserved ABC domains. Despite these differences, the results of our photoaffinity labeling analyses demonstrate that Cdr1p and Cdr2p have a number of characteristics in common with P-gp1 and MRP1 with respect to substrate binding. First, we show that, like P-gp1 and MRP1, Cdr1p and Cdr2p bind to IAARh123 (Fig. 2-2C) (Nare *et al.*, 1994; Daoud *et al.*, 2000), indicating that the Cdrp transporters share sites for binding to this compound with the mammalian transporters. Second, we found that Cdr1p and Cdr2p also bind to the photoactive dihydropyridine analog [³H]azidopine (data not shown), a well-characterized MDR modulator which inhibits drug binding on P-gp1 and which is exported by this transporter (Safa *et al.*, 1987; Tamai et Safa, 1991). These data further demonstrate that the proteins Cdrp and P-gp1 recognize similar substrates and suggest that dihydropyridine may function as an inhibitor of Cdrp activity and, thus, of Cdrp-mediated azole resistance. Finally, we show that each half of Cdr2p can be photolabeled by IAARh123 (Fig. 2-3D), indicating the presence of at least one substrate-binding site in each half of the transporter, as demonstrated for P-gp1 and MRP1 (Dey *et al.*, 1998; Greenberger, 1998; Safa, 1998; Daoud *et al.*, 2001). Interestingly, our results show that each half of Cdr2p, although unable by itself to confer Rh resistance (Fig. 2-3B), can be independently photolabeled by IAARh123 (Fig. 2-3D). To our knowledge, this is the first demonstration that each half of an ABC transporter, expressed alone, can bind to a substrate independently of the other half. These results demonstrate that each half of Cdr2p contains all the structural determinants necessary for Rh binding. They also suggest that the inability of individual halves of Cdr2p to confer Rh resistance is not due to impaired Rh binding but rather to impaired Rh translocation. This hypothesis is supported by the recent demonstration that the two ABC domains of an ABC transporter

cooperate to form the catalytic pockets involved in ATP binding and hydrolysis and, thus, are required to provide the energy necessary for substrate translocation (Smith *et al.*, 2002; Fetsch et Davidson, 2002). Our coexpression system will be useful for investigation not only of the substrate binding sites in Cdr2p but also of the functions of its ABC domains in substrate translocation.

One question that remains to be answered is whether the IAARh123-binding sites in Cdr1p and Cdr2p overlap with those for azoles or other known Cdrp substrates (e.g., steroids and phospholipids) and, thus, whether they are clinically and/or physiologically relevant. Experimental evidence suggests that that should be the case. On the one hand, IAARh123 binding by P-gp1 and MRP1 is efficiently competed by anticancer drugs, MDR modulators, and physiological substrates, demonstrating the relevance of IAARh123 in studying the drug-binding sites on the mammalian transporters (Nare *et al.*, 1994; Daoud *et al.*, 2000). On the other hand, azoles such as ITC and KTC have been shown to inhibit the P-gp1-mediated transport of Rh123 and anticancer drugs (Wang *et al.*, 2002), suggesting that Rh123 and these azoles have the same or an overlapping binding site(s) in P-gp1. On the basis of this evidence, we predict that IAARh123 should prove useful in characterizing the Cdr1p and Cdr2p substrate-binding sites and in exploring the molecular basis of substrate specificity in the Cdrp subfamily of ABC transporters, a question that we are addressing through competition experiments.

Our study with FK520 revealed that *CDR2* confers resistance to FK520, whereas *CDR1* confers hypersusceptibility to this compound (Fig. 2-4A). It also showed that *CDR1* expression together with *CDR2* expression decreases the ability of the *CDR2*-expressing cells to grow in the presence of FK520, demonstrating that these opposite phenotypes are additive and can take place in the same cell (Fig. 2-4B). These results are important because (i) FK520 is the only compound identified so far against which Cdr1p and Cdr2p have opposite activities and (ii) they underscore the major functional differences between Cdr1p and Cdr2p, despite the very high level of structural conservation between the two transporters. What are the molecular mechanisms underlying these opposite phenotypes? It is possible that Cdr2p confers resistance to FK520 by directly exporting this compound out

of the cells, as previously shown for P-gp1 (Saeki *et al.*, 1993; Ruetz, 1998), although indirect mechanisms such as decreased membrane permeability or activation of another transporter are also conceivable. The mechanism by which Cdr1p confers hypersusceptibility is less clear but could well be related to that recently reported for the Cdr1p-mediated hypersusceptibility of *S. cerevisiae* cells to FMDP [N^3 -(4-methoxyfumaroyl)-L-2,3-diaminopropanoic acid] antifungal peptides (Milewski *et al.*, 2001). This study showed that a proton motive force generated by Cdr1p stimulates uptake of these peptides, giving rise to the observed hypersusceptibility (Milewski *et al.*, 2001). It is therefore possible that Cdr1p mediates hypersusceptibility to FK520 by promoting its cellular uptake directly or indirectly.

The mechanisms underlying the azole-FK506 synergy are not fully understood and appear to vary among different fungi. On the one hand, Del Poeta *et al.* (Del Poeta *et al.*, 2000) have shown that this synergy is independent of FKBP12 and calcineurin in *Cryptococcus neoformans* and suggested that direct inhibition of azole-exporting transporters by FK506 might cause increased levels of intracellular accumulation of azoles and, thus, increased azole susceptibility. On the other hand, Cruz *et al.* have shown that the azole-FK506 synergy depends upon FKBP12 and calcineurin in *C. albicans* and concluded that there was no need to consider an additional effect of FK506 on MDR transporters to explain the synergy in this fungus (Cruz *et al.*, 2002). Our results showing (i) that FK520 in combination with azoles strongly inhibits the growth of *S. cerevisiae* cells expressing *CDR1* (Fig. 2-5) and (ii) that *CDR1* confers hypersusceptibility to FK520 and *CDR2* confers resistance to this compound (Fig. 2-4A) indicate that the Cdr1p and Cdr2p transporters can affect cell tolerance to FK520 and suggest a possible involvement of these transporters in the azole-FK506 synergy in *C. albicans*. Interestingly, it has been shown that exposure of *C. albicans* cells to FLC promotes the intracellular accumulation of FK506 by about 20-fold, potentially through an increase in levels of uptake or a decrease in levels of export (Cruz *et al.*, 2002). It is thus possible that Cdr1p could function as the (or one of the) determinant(s) mediating the FLC-triggered accumulation of FK506 in *C. albicans*, with FKBP12 and calcineurin being further required to mediate the toxic effect of the intracellular FK506. Since normal (azole-susceptible) cells express only *CDR1* (Sanglard *et*

al., 1995; Sanglard *et al.*, 1997), there would be no involvement of Cdr2p in the observed phenotype. In azole-resistant isolates overexpressing *CDR1* and *CDR2*, the function of *CDR2* would add to that of *CDR1* in conferring azole resistance but would partly overcome the *CDR1*-mediated susceptibility of the cells to FK506, as suggested by the results of our *CDR1-CDR2* coexpression experiment with *S. cerevisiae* (Fig. 2-4B). *CDR2* expression would reduce, to some extent, the effect of a *CDR1*-mediated azole-FK506 synergy, a hypothesis consistent with the demonstration that clinical isolates overexpressing *CDR1* and *CDR2* are slightly more resistant to the FLC-FK506 combination than their parental isolates which express only *CDR1* (Cruz *et al.*, 2002). Indeed, this model is still tentative and remains to be tested in *C. albicans* with *CDR1*- and *CDR2*-overexpressing strains and strains with *CDR1* and *CDR2* deletions. Understanding the molecular basis of the different behaviors of Cdr1p and Cdr2p toward FK520 is important, since it has clinical implications for the design of strategies aimed at overcoming azole resistance in *C. albicans* with inhibitors of both efflux pumps and drugs that act synergistically with azoles.

We observed that an azole-resistant *C. albicans* clinical isolate overexpressing *CDR1* and *CDR2* (but not *CaMDR1*) displays altered sensitivities to compounds which induce oxidative stress, namely, resistance to diamide and hypersusceptibility to H₂O₂ (Fig. 2-6A). Likewise, we have found that FR2, an azole-resistant strain that was derived from azole-susceptible strain SGY243 by stepwise selection with FLC and that overexpresses *CDR1*, *CDR2*, and *CaMDR1* (Albertson *et al.*, 1996), is also resistant to diamide and hypersusceptible to H₂O₂ compared to the susceptibility of SGY243 (unpublished data), demonstrating that our observation also applies to other azole-resistant strains. Our results showing that the heterologous expression of *CDR2* in *S. cerevisiae* sensitizes the cells to hydrogen peroxide and confers resistance to diamide (Fig. 2-6B) suggest that the altered susceptibilities of these azole-resistant *C. albicans* strains to oxidative agents may result from the overexpression of *CDR2*. On the one hand, Cdr2p may confer resistance to diamide by directly exporting this compound, either in an unmodified form or with diamide coupled to glutathione (Kosower *et al.*, 1995), or by an indirect mechanism, as postulated for FK520. On the other hand, the increased susceptibilities to H₂O₂ of cells expressing Cdr2p could be the consequence of changes in the plasma membrane

composition induced by the activity of this transporter with respect to phospholipid translocation and/or sterol transport (Kontoyiannis, 2000; Smriti *et al.*, 2002). These changes would alter the fluidity of the membrane and therefore the diffusion of the different oxidative agents. Indeed, it has been shown that the acquisition of *CDR1*- and *CDR2*-mediated azole resistance in *C. albicans* is accompanied by changes in membrane fluidity and asymmetry (Kohli *et al.*, 2002). Interestingly, such phenotypes are not restricted to *CDR2*. We have shown that overexpression of the *S. cerevisiae* *FLR1* gene, which codes for a major facilitator homologous to *C. albicans* CaMdr1p, also confers diamide resistance and H₂O₂ hypersusceptibility (Nguyen *et al.*, 2001). Taken together, our findings suggest that the acquisition of azole resistance in *C. albicans* through the upregulation of transporter-encoding genes such as *CDR2* may be accompanied by an altered susceptibility of the cells to oxidative stress.

Since the production of reactive oxygen species by human phagocytic neutrophils is a major line of defense against fungal infections (Murphy, 1991), the ability of Cdr2p to elicit H₂O₂ hypersusceptibility suggests that the acquisition of azole resistance through *CDR2* upregulation in *C. albicans* could be achieved at the expense of the capacity of the cells to counteract the host immune response. Studies of the virulence of *C. albicans* strains have been performed in a murine model of systemic candidiasis and agree to some extent with this prediction. Graybill and colleagues (Graybill *et al.*, 1998) have shown that azole-resistant strains isolated from two different patients and overexpressing *CDR1* and *CDR2* displayed reduced virulence compared to the virulence of their matched azole-susceptible isolates and suggested that the observed link between FLC resistance and decreased virulence may relate to the overexpression of a pump of the *CDR* family in these strains. However, those investigators also reported that an azole-resistant strain that was isolated from a third patient and that showed no overexpression of the *CDR* genes also displayed reduced virulence, demonstrating that the interaction between *C. albicans* and its host is complex and probably involves many different factors besides transporter overexpression (Graybill *et al.*, 1998). Also, the interaction between the immune system and MDR transporters in *C. albicans* may also extend to transporters of the major facilitator superfamily, since deletion of the *CaMDR1* gene in *C. albicans* has been shown to result in

reduced virulence (Becker *et al.*, 1995). Finally, other studies have shown that the virulence of *C. albicans* strains does not appear to be related to their azole resistance status (Barchiesi *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2000), although the molecular mechanism of azole resistance in these strains was not identified. It will be important to determine the capacity of multidrug transporters to modulate *C. albicans* virulence in animal models by using well-characterized strains engineered to overexpress such transporters individually or in combination in otherwise identical genetic backgrounds.

In conclusion, the heterologous expression system for Cdr1p and Cdr2p presented here has allowed us to make novel and important observations pertaining to the functions of these transporters. This system will be useful for the identification of the drug-binding sites in Cdr1p and Cdr2p and to address the molecular basis of their substrate specificities. It will also permit the dissection of the molecular determinants underlying the functional similarities and the differences between these two clinically important multidrug transporters.

VI. Acknowledgements

We are grateful to Martin Funk for providing the p423GPD and p425GPD vectors.

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; grant MT-15679) to M.R. and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant OGP0121558) to E.G. C.G. is supported by a studentship from CIHR, and M.R. is a senior scientist from le Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

CHAPITRE 3

**CHARACTERIZATION OF THE NUCLEOTIDE-BINDING DOMAINS OF
CANDIDA ALBICANS CDR2, AN ATP-BINDING CASSETTE MULTIDRUG
TRANSPORTER CONTAINING A DIVERGENT WALKER A MOTIF**

Contribution des auteurs

Chapitre 3

J'ai mis au point la plupart des techniques utilisées et toutes les figures présentées sont le fruit de mon travail. J'ai écrit en totalité le texte de cet article, qui a été modifié afin de refléter les derniers résultats, puisque cet article avait été soumis précédemment à différents journaux. Ma contribution aux expériences a été de 85 %. La deuxième auteure, Sarah Tsao, m'a aidé à construire deux des cinq mutations présentées, ainsi qu'à effectuer la reprise de plusieurs expériences. La rédaction de l'article a aussi été faite de concert avec Dr Raymond, qui est responsable principalement de la discussion, de la lettre à l'éditeur ainsi que le processus de soumission.

Cet article sera soumis prochainement à *Biochemical Journal*.

**Characterization of the nucleotide-binding domains of *Candida albicans*
Cdr2p, an ATP-binding cassette multidrug transporter containing a
divergent Walker A motif**

Christian GAUTHIER, Sarah TSAO and Martine RAYMOND¹

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC), Université de Montréal,
Box 6128 Centre-ville, Montréal, QC H3C 3J7, Canada.

Abbreviations used: ABC, ATP-binding cassette; [α -³²P]8N₃ATP, 8-azido- $[\alpha$ -³²P]adenosine triphosphate; CDR, *Candida* drug resistance; FLC, fluconazole; IP, immunoprecipitation; MDR, multidrug resistance; NBD, nucleotide binding domain; PDR, pleiotropic drug resistance; P-gp, P-glycoprotein (MDR1); Rh6G, rhodamine 6G; R^oT, room temperature; TMD, transmembrane domain; WT, wild-type.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail [REDACTED])

Running title: Nucleotide-binding domains of *C. albicans* Cdr2p

I. Abstract

ATP-binding cassette (ABC) transporters typically contain two nucleotide-binding domains (NBDs) and two membrane-spanning regions. The NBDs have a highly conserved Walker A motif (GX₄GKS/T) which is important for ATP interaction. Fungal ABC transporters of the *PDR/CDR* subgroup possess an atypical Walker A motif in NBD1 (GX₄GCS/T). To characterize the ATP binding and hydrolysis properties of transporters from this subgroup and to determine the functional consequences of the Lys to Cys substitution, we performed a mutational analysis of *Candida albicans* *CDR2*, which encodes a multidrug efflux pump. We functionally expressed Cdr2p in *S. cerevisiae* as a full-length transporter or as two separate halves. Both NBDs were photolabeled by the ATP analog [α -³²P]8N₃ATP. The labeling of NBD1 was much stronger than that of NBD2, indicating a higher affinity for nucleotides at the divergent ATP binding site. Furthermore, a C191K mutation that restores the consensus Walker A motif in NBD1 increased [α -³²P]8N₃ATP binding, while the C191A replacement did not produce this effect. These mutations had no significant impact on ATPase activity or rhodamine 6G intracellular accumulation. Corresponding mutations in NBD2 (K899C or K899A) abolished Cdr2p transporter activity, showing that, in contrast to NBD1, the conserved Walker A Lys in NBD2 is essential for function. Since the atypical Cys191 of NBD1 is not essential for Cdr2p function, our results highlight a strong functional asymmetry for the NBDs of this medically important ABC transporter.

II. Introduction

ATP-binding cassette (ABC) transporters are membrane-associated proteins that mediate the active import or export of small molecules across biological membranes (Higgins, 1992). ABC transporters have a wide array of substrates, ranging from ions to polypeptides, with either extremely tight or very loose specificity (Higgins, 1992). A typical ABC transporter consists of four domains: two highly hydrophobic membrane-spanning domains (TMDs) which contain the substrate-binding sites and form the translocation pathway and two hydrophilic ABCs, also called nucleotide-binding domains (NBDs), that couple ATP binding/hydrolysis to the transport process (Davidson et Chen, 2004; Jones et George, 2004). The NBDs contain highly conserved consensus sequences for ATP binding and hydrolysis: the “Walker A” (or P-loop) and “Walker B” motifs (Walker *et al.*, 1982) as well as the “ABC signature” (or LSGGQ) motif (Holland et Blight, 1999). Biochemical and structural analyses of various ABC proteins have revealed that the two L-shaped NBDs of an ABC transporter adopt, following ATP binding, a head-to-tail “nucleotide-sandwich” dimer configuration in which the ABC signature from one NBD completes the ATP-binding site of the opposing NBD (Smith *et al.*, 2002; Higgins et Linton, 2004). The TMDs and NBDs can be expressed as separate polypeptides or fused under different configurations into larger multifunctional polypeptides. Some ABC transporters, referred to as “half-size” transporters, have either a [TMD-NBD] or a [NBD-TMD] configuration and function either as homo- or hetero-dimers (Holland et Blight, 1999). Finally, many eukaryotic ABC transporters have a duplicated intramolecular structure with either a [TMD-NBD]₂ or [NBD-TMD]₂ configuration (Holland et Blight, 1999).

ABC transporters are implicated in multidrug resistance of cancer cells (MDR) (Borst et Elferink, 2002). This MDR phenomenon is also observed in microbial pathogens where it is often linked to the overexpression of MDR-type ABC transporters. In the opportunistic yeast pathogen *Candida albicans*, *CDR1* and *CDR2* (*Candida* Drug Resistance 1 and 2) encode two ABC transporter genes that are frequently overexpressed in antifungal resistant clinical isolates (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997; White *et al.*,

1998). They are homologous to *Saccharomyces cerevisiae* *PDR5*, which is the primary effector of tolerance to xenobiotic compounds in the budding yeast (Balzi *et al.*, 1994; Decottignies et Goffeau, 1997). These are full-length ABC transporters of the [NBD-TMD]₂ topology. Cdr1p and Cdr2p have been shown to localize at the plasma membrane (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003b) and their drug resistance phenotype correlates with active drug extrusion from Cdr1p-/Cdr2p-expressing cells (Nakamura *et al.*, 2001; Gauthier *et al.*, 2003).

An intriguing feature of yeast *PDR/CDR* multidrug ABC transporters (subcluster I.1 in (Decottignies et Goffeau, 1997)) is the atypical Walker A motif of the N-terminal NBD (NBD1). Unlike in NBD2, the highly conserved lysine (Lys) residue involved in ATP binding (GX₄GKS/T) is replaced by a cysteine (Cys) in the NBD1 of *PDR/CDR* proteins (GX₄GCS/T). This substitution is surprising since it had been shown in several prokaryotic and eukaryotic ABC transporters that mutations of this key Lys residue lead to severely impaired ATPase activity and transporter function (Azzaria *et al.*, 1989; Berkower et Michaelis, 1991; Muller *et al.*, 1996; Davidson et Sharma, 1997; Urbatsch *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2000; van Veen *et al.*, 2000; Vergani *et al.*, 2003). Crystallographic studies of various P-loop-containing proteins and purified NBDs have shown that the Walker A Lys forms hydrogen bonds with the β- and γ-phosphates of the bound nucleotide (Kerr, 2002). At least three essential roles have been identified for the invariant Lys: i) to orient the nucleotide triphosphate side-chain in a proper conformation for catalysis, ii) to stabilize the reaction transition state and iii) to maintain the conformation of the P-loop (Byeon *et al.*, 1995; Krell *et al.*, 2001). Thus, the structural and catalytic importance of this residue raised questions concerning the functional status of the deviant Walker A motif in the N-terminal NBD of fungal *PDR/CDR* transporters (185-GRPGAGCS instead of GX₄GKS/T). Still, *PDR/CDR* efflux pumps are not inactive since they can confer MDR when expressed alone in heterologous systems and they possess nucleotide triphosphatase activities (Decottignies *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2001; Smriti *et al.*, 2002).

Interestingly, a mutagenesis screen of *Pdr5p* showed that a Cys to Tyr replacement in the divergent Walker A motif of NBD1 did not affect the multidrug resistance profile

(Egner *et al.*, 1998). A recent study using *C. albicans* Cdr1p has shown that both the C193K and K901C mutations, in the P-loops of NBD1 and NBD2 respectively, cause severe defects in ATPase activity (Jha *et al.*, 2004). However, these two substitutions have differential effects on antifungal drug resistance and rhodamine efflux by Cdr1p; the mutation of the conserved NBD2 Lys being the most deleterious. These results indicated an asymmetric contribution of NBD1 and NBD2 to Cdr1p function (Jha *et al.*, 2004). Although Cdr1p and Cdr2p are 84% identical at the amino acid level and cause overlapping resistance to azole antifungal agents (Sanglard *et al.*, 1997), we and others have shown that the two efflux pumps have distinct and even opposite activities regarding oxidative agents and some drugs like FK520 or caspofungin (Gauthier *et al.*, 2003; Schuetzler-Muehlbauer *et al.*, 2003b). It is therefore possible that Cdr1p and Cdr2p differ in their catalytic mechanisms. In the present paper, we investigated the ATP binding and hydrolysis properties of *C. albicans* Cdr2p, using a heterologous expression system that enables to assess the separate ATP binding capabilities of NBD1 and NBD2. We also assessed the roles of the Walker A motif Cys191 and Lys899 residues by site directed mutagenesis.

III. Experimental

Strains, culture conditions and reagents

The *S. cerevisiae* strain TY310 was used throughout this study (*MAT α pdr1 pdr3::URA3 pdr5 Δ ::TRP1 ura3-52 ade2-101 trp1-81 lys2-801 his3- Δ 200 leu2::PET56*) and has been described elsewhere (Talibi et Raymond, 1999). Yeast transformation was performed by the lithium acetate procedure. Transformants were grown in synthetic dextrose (SD) medium lacking leucine (SD -Leu) or lacking leucine and histidine (SD -Leu -His) for plasmid selection. Isolated clones were used throughout this study. Yeast cultures were routinely grown at 30 °C. *Escherichia coli* strain MC1061 was used for plasmid propagation, while strain XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA) was used in the site-directed mutagenesis procedure. Standard Luria-Bertani medium was used for bacterial cultures, which were grown at 37 °C. One hundred μ g/ml of ampicillin was used for plasmid selection in bacterial strains. Unless otherwise noted, all reagents were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON). 8-azido- $[\alpha$ -³²P]adenosine triphosphate ($[\alpha$ -³²P]8N₃ATP; 4–12 Ci/mmol) was purchased from Affinity Labeling Technologies (Lexington, KY).

Plasmid construction and site-directed mutagenesis of *CDR2*

Plasmids p423GPD and p425GPD have been described elsewhere (Funk *et al.*, 2002) and were kindly provided by Dr. Martin Funk (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, Germany). Construction of the expression vector p425GPD-*CDR2* has been described elsewhere (Gauthier *et al.*, 2003). In the alternative genetic code of *C. albicans*, CTG codons are decoded as serine instead of leucine. We previously mutated the CTG codons at positions +61 and +1894 of our cloned allele of *CDR2* to TCT codons, which specify serines in *S. cerevisiae*, and found no significant differences between the serine and leucine Cdr2p variants (Gauthier *et al.*, 2003). We used the leucine Cdr2p variant (L21/L632) throughout this paper. The C191K and K899C mutations were generated using the QuikChange® PCR-based site-directed mutagenesis procedure (Stratagene). The pGEM/*Nde*I-0.8 and pGEM/*Pst*I-2.8 templates used in the mutagenic PCR reactions were described previously (Gauthier *et al.*, 2003). These two plasmids

containing the 0.8-kb *NdeI* and 2.8-kb *PstI* fragments comprising the N- and C-terminal Walker A motifs of *CDR2*, respectively, were submitted to separate PCR reactions using *Pfu Turbo* DNA polymerase (Stratagene) and the mutagenic pairs of oligonucleotides: 5'-GGGGAGACCCGGTGCTGGTAAATCCACATTGTAAAGACC-3' and 5'-GGTCTTTAACAATGTGGATTTACCAGCACCGGGTCTCCCC-3' or 5'-GATGGGAGCATCTGGTGCTGGTGTACCACATTATTGAATTGTTTATC-3' and 5'-GATAACAATTCAATAATGTGGTACAACCAGCACCCAGATGCTCCCATC-3', which incorporate the mutations ⁵⁷¹TGT (Cys 191) to AAA (Lys) and ²⁶⁹⁵AAG (Lys 899) to TGT (Cys). The mutated 0.8-kb *NdeI* and 2.8-kb *PstI* fragments were excised from the pGEM backbone and used to replace the corresponding fragment in p425GPD-*CDR2* cut with *NdeI* or *PstI*, generating plasmids p425GPD-*CDR2*^{C191K} and p425GPD-*CDR2*^{K899C}, respectively. The C191K/K899C double mutant was generated by replacing the 2.8-kb *PstI* wild-type fragment of p425GPD-*CDR2*^{C191K} with the mutated fragment from pGEM/*PstI*-2.8^{K899C}, yielding p425GPD-*CDR2*^{C191K/K899C}. The C191A and K899A mutants were also generated by the QuikChange® PCR-based strategy, but using the complete p425GPD-*CDR2* expression plasmid as template. The primers used were 5'-GGGGAGACCCGGTGCTGGTGCTTCCACATTGTAAAGACC-3' and 5'-GGTCTTTAACAATGTGGAAGCACCCAGCACCGGGTCTCCCC-3' for the C191A mutation or 5'-GATGGGAGCATCTGGTGCTGGTGTACTACATTGTTGAATTGTTTATC-3' and 5'-GATAACAATTCAACAATGTAGTAGCACCCAGCACCCAGATGCTCCCATC-3' for the K899A mutation. The latter primer set was based on the *CDR1* gene sequence and therefore introduces two silent codon changes (²⁶⁹⁸ACC to ACT and ²⁷⁰⁴TTA to TTG). Automated sequencing of the inserts was performed using a series of internal primers to confirm the codon changes and the absence of additional mutations.

The cloning strategy used to express *Cdr2p* as two separate halves (plasmid p425GPD-*CDR2*¹⁻⁸⁵⁵ encodes the N-terminal half; p423GPD-*CDR2*⁸⁵⁶⁻¹⁴⁹⁹ encodes the C-terminal half) has been described previously (Gauthier *et al.*, 2003). The C191K- and K899C-mutated halves were constructed by amplifying p425GPD-*CDR2*^{C191K} with primers 5'-CGGTAGGTATTGATTGTAATTC-3' and 5'-

GACTAGTCTTATTCACGGTTTTCTGGG-3', and by amplifying p425GPD-CDR2^{K899C} with primers 5'- GACTAGTCATGATATTTTTCTGGAGAG-3' and 5'- CAGGTTGTCTAACTCCTTCC-3', to obtain the N- and C-halves from the mutated templates (the introduced *SpeI* sites are underlined and the stop and start codons are shown in bold). The resulting PCR products were gel-purified, digested with *SpeI*, and cloned into the *SpeI* site of p425GPD and p423GPD, yielding plasmids p425GPD-CDR2^{(1-855)C191K} and p423GPD-CDR2^{(856-1499)K899C}. The C191A- and K899A-mutated halves were obtained by amplifying p425GPD-CDR2¹⁻⁸⁵⁵ or p423GPD-CDR2⁸⁵⁶⁻¹⁴⁹⁹ with the primer sets described above for the full-length *CDR2* C191A and K899A mutants. The inserts were entirely sequenced, ruling out the presence of mutations introduced by PCR. The TY310 yeast strain was transformed with different combinations of these plasmids and cultured in SD - Leu -His selective medium. Clones from isolated single colonies were selected based on their expression levels of full-length Cdr2p or half-proteins.

Membrane extraction and immunodetection

Total (crude) membrane proteins were prepared as previously described except that GTED-20 buffer (20 % glycerol, 10 mM Tris pH 7.5, 0.5 mM EDTA) was used to solubilize the final crude membrane pellets (Gauthier *et al.*, 2003). All experimental steps for protein preparation were carried out at 2-4 °C and in the presence of the protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma) at 1 mM, leupeptin, pepstatin, and aprotinin (Roche Diagnostics), each at 1 µg/ml. Cdr2p-enriched fractions were obtained by sucrose gradient centrifugation by adapting a previously described method (Losko *et al.*, 2001). The gradients were prepared in SW41Ti tubes by gently layering 3.6 ml of STED-55 (55% sucrose in 10 mM Tris pH 7.5, 0.5 mM EDTA), STED-40 (40% sucrose) and STED-30 (30% sucrose). The tubes were capped and slowly tilted horizontally. After 3-5 h of diffusion at 4 °C, the tubes were slowly turned upright and loaded with 5 mg of crude membrane preparations diluted to 750 µl with STED-20. The gradients were spun at 35 000 rpm (151 000 x g) for 15-17h in a Beckman SW41Ti rotor with slow acceleration/deceleration settings. The first 10.5 ml were discarded, while the 1 ml fraction located at the bottom of the tube was diluted 1:4 with 3 ml of cold TE buffer (10 mM Tris pH 7.5, 0.5 mM EDTA) and spun at 57 000 rpm (200 000 x g) for 45 min in a Sorvall

RP80AT rotor. The Cdr2p-enriched fractions were resuspended in GTED-20. Western blotting with the anti-Cdr2p (R2a) or the generic anti-Cdrp (RXb) polyclonal antibodies was performed as described (Gauthier *et al.*, 2003). The Coomassie stains and Western blots shown in this report are representative of at least three independent experiments using different batches of membrane extracts.

Antifungal compounds and susceptibility testing

Fluconazole (FLC, a gift from Pfizer Canada, Montreal, QC) was dissolved in water at 5 mg/ml (16.3 mM). Rhodamine 6G (Rh6G) was dissolved at 9.58 mg/ml (20 mM) in ethanol. The drug resistance assays were performed in liquid medium as previously described (Gauthier *et al.*, 2003). The microtiter plates were incubated at 30 °C in a humid chamber for 48 h for cells expressing full-length Cdr2p (in SD -Leu medium) or 72 h for cells co-expressing the Cdr2p halves (in SD -Leu -His).

Rhodamine accumulation

Overnight cultures were diluted 1:5 with selective medium (final volume of 25 ml) and incubated 3-4 h at 30 °C in a shaker. The volume required for one O.D.₆₀₀ (optical density unit at 600 nm) of cells was centrifuged in 15 ml Falcon tubes (5 min at 3000 rpm in a Sorvall H1000B rotor) and the resulting pellets were resuspended in 1 ml of filtered selective medium containing 2.5 µg/ml Rh6G. After 1 h of incubation in the dark in a rotating shaker, the samples were briefly vortexed and diluted 1:50 in ice-cold filtered PBS. The intracellular rhodamine fluorescence was quantified by a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, San Jose CA) with the FL1 detector set at 497 volt and the amplifier gain at 1.00 in logarithmic mode. The values presented for each sample are the mean fluorescence intensities (arbitrary units) from 10 000 events.

Photoaffinity labeling with [α -³²P]8N₃ATP and immunoprecipitation (IP)

Crude membrane proteins (25 µg) were incubated with [α -³²P]8N₃ATP in 25 µl of labeling buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂ and the four protease inhibitors listed above) for 5 min on ice-water (2 °C). The samples were UV-irradiated at 254 nm (1800 UV Stratalinker, Stratagene) for 5 min on ice. Un-incorporated [³²P] nucleotides

were removed by centrifuging the samples in a TLA120.1 rotor (Beckman) at $245,000 \times g$ for 25 min (3°C) and gently washing the membrane pellets with 100 μl of ice-cold labeling buffer. The samples were solubilized with 20 μl of Laemmli buffer (2 \times) and separated by SDS-PAGE using 7.5% gels. The gels were fixed, dried and exposed to a PhosphorImager cassette (Molecular Dynamics) and autoradiographed using BioMax MS films (Kodak) with two intensifying screens at -80°C .

For photolabeling followed by IP, 250 μg of crude membrane proteins were incubated with 15 μM [α - ^{32}P]8N₃ATP in 50 μl of labeling buffer. After a 5 min incubation in the dark at 2°C and 5 min of UV cross-linking on ice, the samples were incubated for 15 min on ice in 200 μl of lysis buffer A (1% SDS, 50 mM Tris pH 7.4) and then diluted with 750 μl of lysis buffer B (1.25% Triton X-100, 190 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4). The remaining steps were performed as described elsewhere (Gauthier *et al.*, 2003). Immune complexes were separated by SDS-PAGE and the dried gels were autoradiographed as mentioned above.

Colorimetric ATPase assay

The ATPase activity of Cdr2p was measured as the oligomycin-sensitive release of inorganic phosphate, using a protocol described elsewhere (Nakamura *et al.*, 2001). Briefly, 5 μg of Cdr2p-enriched fractions were pre-incubated in 47.5 μl of ATPase assay buffer (75 mM MES-Tris pH 7.5, 75 mM KNO₃, 0.3 mM ammonium molybdate, 7.5 mM NaN₃) for 1 min at 37°C , with or without 20 μM oligomycin, in microtiter plates. The assay was performed at 37°C , which corresponds to the normal operating temperature for Cdr2p in *C. albicans* cells. The reaction was started by the addition of MgATP (12.5 μl of 28.8 mM sodium ATP and 33.6 mM MgSO₄, yielding final concentrations of 6 and 7 mM respectively) and allowed to proceed for 30 min at 37°C . The reaction was stopped with 65 μl of freshly prepared developing reagent (1.6% ascorbic acid, 1% SDS, 1.2% ammonium molybdate). Ammonium molybdate was prepared as a 12 % (w/v) solution in 6M H₂SO₄. After 10 min of color development at R^oT, the absorbance at 750 nm was read. Potassium phosphate diluted in ATPase assay buffer (0.025-2 mM) was used as a standard for inorganic phosphate. In each experiment, the samples were assayed in duplicate. Values

shown are the difference between the ATPase activities in the presence and absence of oligomycin. The quantity of inorganic phosphate at the 0 min time point is also subtracted from the given values.

IV. Results

Expression and functional analysis of wild-type (WT) and mutant Cdr2p in *S. cerevisiae*

We used our previously described heterologous expression system in yeast to perform a structure-function analysis of the *C. albicans* Cdr2p ABC transporter (Gauthier *et al.*, 2003). The atypical Cys191 of the NBD1 Walker A motif was changed to Lys or Ala by site-directed mutagenesis, yielding mutants C191K and C191A. In addition, we mutated the conserved Lys899 of the NBD2 Walker A motif to Cys or Ala, yielding mutants K899C and K899A. We also constructed the double mutant C191K/K899C. The WT and mutant *CDR2* genes were cloned under the control of the strong constitutive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GPD*) promoter in the multicopy vector p425GPD (Funk *et al.*, 2002). The drug-hypersensitive *pdr5* knockout *S. cerevisiae* TY310 strain (Talibi et Raymond, 1999) was transformed with the resulting constructs. The levels of WT and mutant Cdr2p were determined in crude membranes by Coomassie staining (Figure 3-1A) and immunoblotting, using a Cdr2p-specific antibody (data not shown). The membranes from TY310 cells transformed with the empty vector were used as a negative control (CTL). Similar levels of WT, single and double mutant Cdr2p proteins were detected in total membranes, with the exception of the C191A mutant, which was expressed at twice the amount of WT Cdr2p (Figure 3-1A). An indirect immunofluorescence analysis was performed using confocal microscopy and demonstrated that WT and mutant Cdr2p were located at the cell periphery (data not shown). These results indicated that the introduced mutations do not affect the expression level or the sub-cellular localization of Cdr2p and that these single and double mutants could be compared to the WT protein in functional assays.

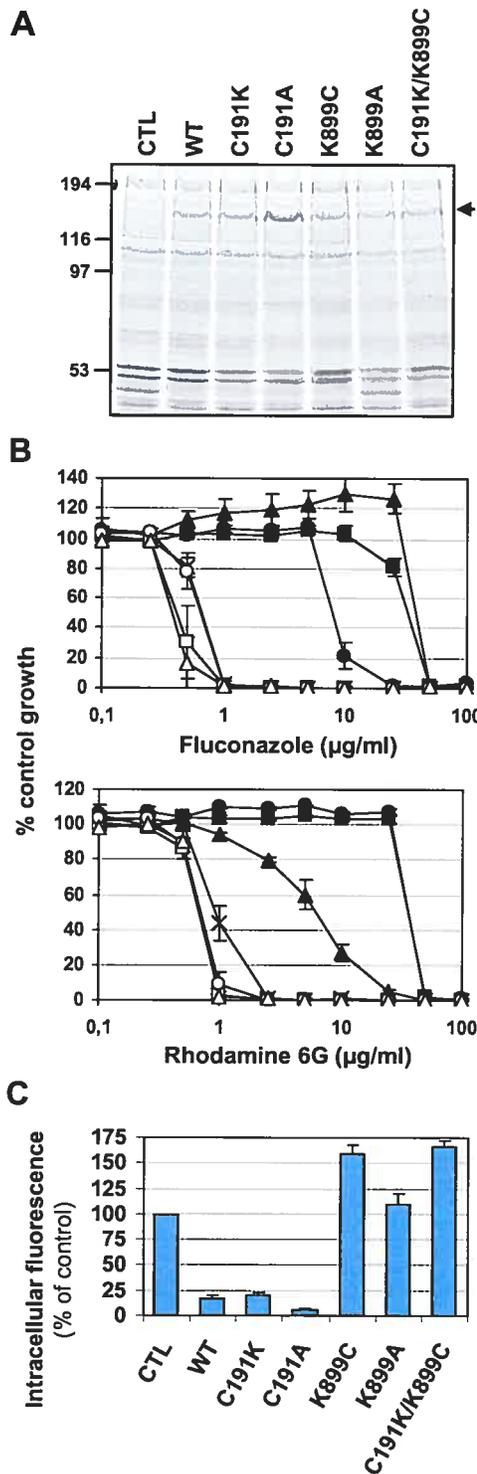


Figure 3-1 : Expression of wild-type (WT) and mutant *C. albicans* *CDR2* in *S. cerevisiae* and evaluation of Cdr2p activity in the transformed yeast cells. (A) Crude membranes (20 µg of protein) prepared from *S. cerevisiae* TY310 cells transformed with p425GPD (empty vector control, CTL), p425GPD-*CDR2* (WT) or p425GPD-*CDR2* containing the C191K, C191A, K899C and K899A mutations were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. An arrowhead indicates the position of the Cdr2p band which identity was confirmed by Western blotting (data not shown). Molecular mass markers are shown (in kDa) on the left. (B) Drug resistance assay. Yeast transformants described in A; CTL (x), WT *CDR2* (■), C191K (●), C191A (▲), K899C (□), K899A (○) or the double mutant C191K/K899C (△) were analyzed by liquid microdilution assay for their ability to grow in the presence of increasing concentrations of fluconazole or rhodamine 6G (Rh6G) following a 48 h incubation. Cell growth is presented as the percentage of growth in drug-containing medium relative to the growth in drug-free (control) medium. Values represent the means ± standard deviations (S.D.) of four independent experiments performed in duplicate. (C) Rhodamine accumulation assay. Exponentially growing cultures of the transformants described in A were incubated for 1 h in synthetic dextrose (-Leu) medium containing 2.5 µg/ml of Rh6G. The cells were diluted in cold PBS and intracellular rhodamine fluorescence was quantified by flow cytometry. Values represent the means ± S.D. of at least four independent experiments.

The expression of *CDR2* in TY310 cells results in an MDR phenotype, which can be quantified by measuring cellular growth after prolonged exposure to antifungal drugs. A liquid microdilution assay was therefore used to assess the *in vivo* consequences of the introduced mutations on the drug resistance activity of Cdr2p. The C191K mutant was less resistant to fluconazole than WT Cdr2p, while it was as resistant as the WT to rhodamine 6G (Figure 3-1B). Inversely, the C191A mutant showed a level of resistance to fluconazole that was comparable to the WT strain, when the slightly higher expression level of the Cdr2p C191A strain is taken into account. This C191A mutation has a negative impact on Rh6G resistance, thus showing a drug-specific effect of these mutations at Cys191. In sharp contrast, mutations of the conserved Walker A Lys899 completely abolished drug resistance. In addition, Cdr2p cannot function with the Cys and Lys residues swapped from one NBD to the other, as the double mutant C191K/K899C is inactive. Cells carrying single or double Cdr2p Lys899 mutant variants showed a slight but significant hypersensitivity to Rh6G when compared to the empty vector (CTL) strain.

In addition to the drug resistance assay, Rh6G can be used in a simple accumulation assay as an alternate way of measuring the activity of Cdr2p *in vivo*. When normalized for protein levels (Figure 3-1A), yeast cells expressing WT, C191K or C191A *CDR2* showed similar Rh6G pumping activities (a five-fold decrease in fluorescence as compared to control cells; Figure 3-1C). This decreased Rh6G accumulation in *CDR2* WT and C191K mutant cells correlates with their Rh6G resistance phenotype (Figure 3-1B), while the reduced Rh6G resistance of the C191A mutant observed in the microdilution test was not reflected in the accumulation assay with the tested conditions. This discrepancy could be explained by the following facts: i) the two assays differ significantly with respect to the duration of drug exposure (48h vs 1h), ii) they measure very different outcomes (inhibition of cellular growth vs drug efflux) and iii) 80% of the C191A mutant cells survived the two-day incubation with 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of Rh6G, the concentration used in the Rh6G accumulation assay. Cells expressing either the single K899C, K899A or double C191K/K899C mutant showed increased Rh6G accumulation as compared to CTL cells (Figure 3-1C), which correlates with their hypersensitivity to Rh6G (Figure 3-1B). Thus, a considerable difference

is observed between the effects of mutating Cys191 in NBD1 or Lys899 in NBD2, with the Cdr2p NBD1 mutants being still active and the NBD2 mutants being totally inactive.

ATP binding by WT and mutant Cdr2p

Photoaffinity labeling with the ATP analog [α - 32 P]8N₃ATP has been extensively used to evaluate the nucleotide binding capabilities of different ABC proteins, including Cdr1p (Urbatsch *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2000; Orelle *et al.*, 2003; Shukla *et al.*, 2003). We used this approach to characterize ATP binding by Cdr2p under non-hydrolyzing conditions. Crude membrane extracts were incubated with increasing concentrations of [α - 32 P]8N₃ATP for 5 min on ice-water, UV cross-linked, washed and separated by gel electrophoresis. Figure 3-2A shows that Cdr2p binds this photoactive analogue of ATP. The binding of [α - 32 P]8N₃ATP was i) saturated at 5 μ M and above, ii) competed by the addition of a 10-fold molar excess of non-radioactive ATP (Figure 3-2A, lane 6), iii) dependent upon Mg²⁺ and iv) occurred to a lesser extent in the presence of Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺, but not with Ca²⁺ or Cu²⁺ (data not shown).

To assess the effect of the Walker A mutations on ATP binding by Cdr2p, we tested the Cdr2p mutants under the same conditions as for the WT protein. We found that at sub-saturating concentrations of [α - 32 P]8N₃ATP, the C191K mutation increased the binding of [α - 32 P]8N₃ATP by approximately two-fold as compared to the WT protein, even in the context of the double C191K/K899C mutant (Figure 3-2B and 2C). Labeling of the K899C mutant was similar to that observed for the WT protein while the levels of [α - 32 P]8N₃ATP binding were slightly reduced for the C191A and K899A mutants. These results indicate that i) Cdr2p can bind an ATP analog; ii) mutation of the Cys191 to Lys or Ala in NBD1 show different, but modest effects on [α - 32 P]8N₃ATP binding by Cdr2p; and iii) mutations of the conserved Lys899 which abrogate Cdr2p activity (K899C, K899A) have no striking effect on [α - 32 P]8N₃ATP binding. The fact that nucleotide binding is preserved in the mutant proteins suggests that their global structure is not altered and that the loss of substrate transport by the Lys899 mutants is attributable to impaired catalytic step(s) subsequent to nucleotide binding.

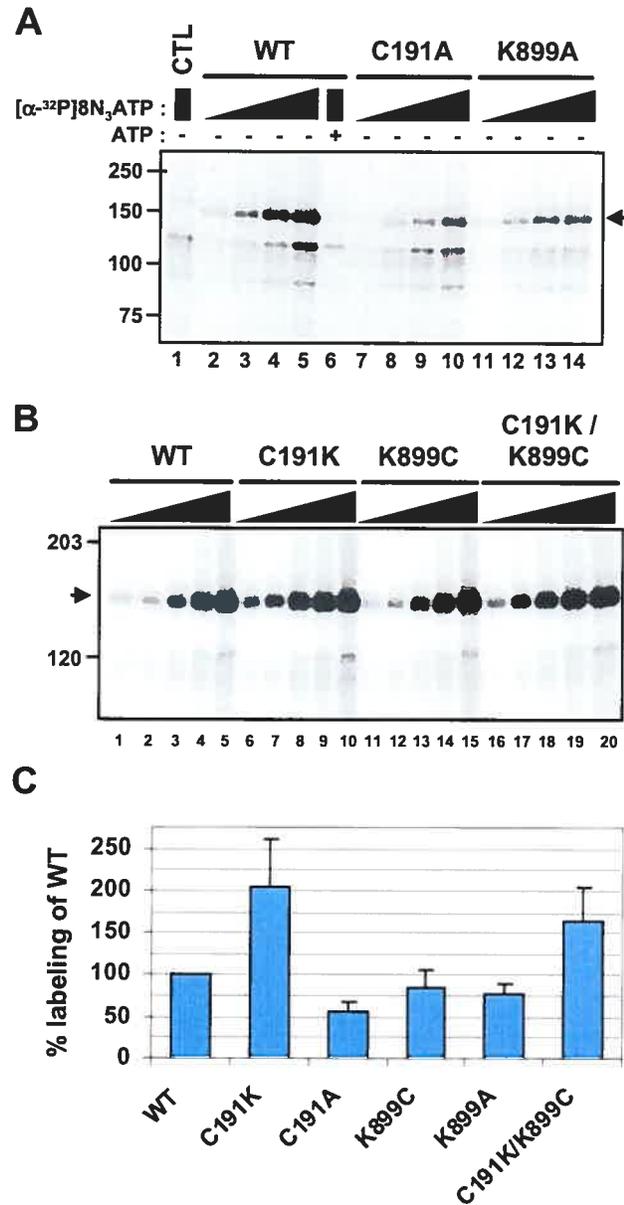


Figure 3-2 : ATP binding by WT and mutant Cdr2p. (A) Crude membranes (25 μ g) were incubated for 5 min at 2 $^{\circ}$ C (ice-water mix) with increasing concentrations of [α - 32 P]8N $_3$ ATP (0.2, 0.5, 1 and 2 μ M), then UV cross-linked and separated by SDS-PAGE. In lane 6, the membrane sample containing WT Cdr2p was pre-incubated for 3 min at 2 $^{\circ}$ C with 20 μ M ATP. The protein extracts from the C191A strain were diluted 1:1 with extracts from the CTL strain to normalize for Cdr2p content. An autoradiograph of the dried gel is shown. Molecular mass markers are shown (in kDa) on the left. The arrowhead indicates the position of Cdr2p. Similar results were obtained in three independent experiments. (B) Crude membrane samples were photolabeled as in (A), but with [α - 32 P]8N $_3$ ATP concentrations of 0.2, 0.5, 1, 2 and 5 μ M (grey triangles). (C) Quantification of the radioactivity incorporated in the Cdr2p bands, labeled with 0.5 μ M [α - 32 P]8N $_3$ ATP,

using the PhosphorImager system and ImageQuant software. Results shown are the mean intensities \pm S.D. of three independent experiments, expressed as a percentage of the signal from WT Cdr2p (set at 100%).

Characterization of the Walker A mutations in co-expressed Cdr2p half-transporters

We previously showed that co-expression of the *CDR2* N- and C-terminal halves (amino acids 1-855 and 856-1499, respectively) reconstitutes an active transporter, with approximately 50% drug resistance activity as compared to the full-length Cdr2p whereas the two halves are unable to confer multidrug resistance when expressed individually (Gauthier *et al.*, 2003). We exploited this co-expression system to evaluate the relative contributions of each WT NBD to ATP binding by Cdr2p and to assess the consequences of the introduced mutations on the ATP binding by each NBD. A Western blot analysis using the polyclonal antisera R2a and RXb that specifically detect the N- and C-halves, respectively, revealed similar protein levels for the co-expressed WT or mutant Cdr2p halves in crude membranes of *S. cerevisiae* cells (Figure 3-3A). The N-half migrated as a doublet, perhaps due to post-translational modifications. The drug resistance phenotypes of the co-expressed *CDR2* halves carrying the different mutations were roughly similar to those observed with the same mutations in full-length *CDR2*: C191K reduced the fluconazole resistance by about half while the K899C and K899A mutations rendered the transporter inactive and even caused drug hypersensitivity, for unknown reasons (Figure 3-3B). Altogether, these findings indicated that this co-expression system was appropriate to study ATP binding by each NBD and to assess more precisely the effects of the Walker A mutations on each NBD.

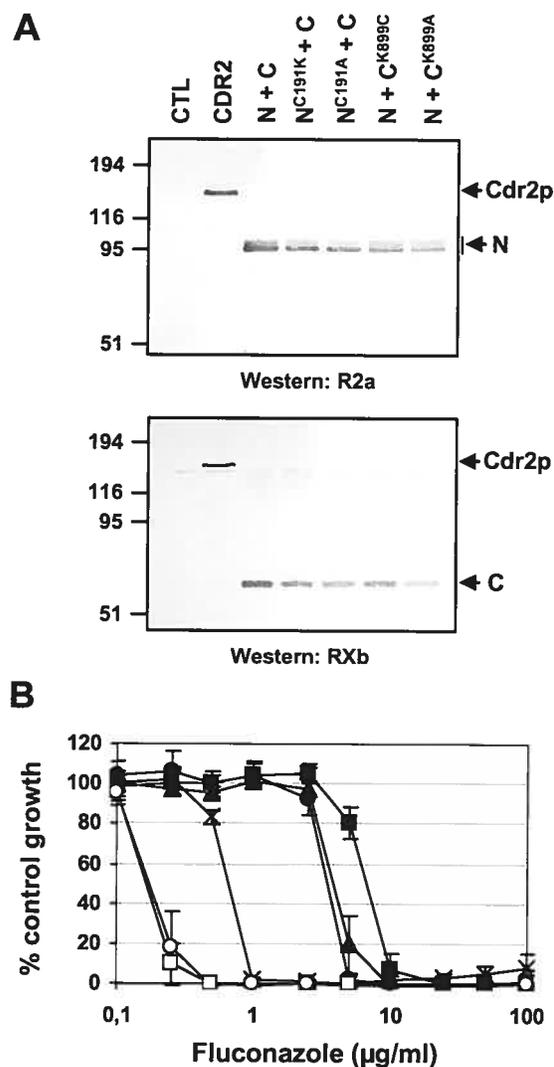


Figure 3-3 : Expression levels and drug resistance profiles of WT and mutant *CDR2* expressed as two half-proteins. (A) Crude membrane proteins (12.5 µg) from TY310 cells transformed with either the full-length *CDR2* gene (*CDR2*) or co-transformed with the WT or mutated N- and C-terminal halves (N + C) were analyzed by Western blotting using the N-terminal specific R2a (upper panel) or the C-terminal specific RXb (lower panel) polyclonal antibodies. Arrowheads indicate the positions of the N- and C-halves. Molecular mass markers are shown (in kDa) on the left. (B) The yeast transformants shown in A; CTL (x), N + C (■), N^{C191K} + C (●), N^{C191A} + C (▲), N + C^{K899C} (□) and N + C^{K899A} (○) were incubated for 72 h with increasing amounts of fluconazole. Cell growth is presented as the percentage of growth in drug-containing medium relative to the growth in drug-free (control) medium. Values represent the means ± S.D. of three independent experiments performed in duplicate.

ATP binding by the WT and mutant Cdr2p-halves

Photoaffinity labeling of crude membrane extracts from TY310 cells expressing the Cdr2p-halves (or the full-length protein as a control) was performed under non-hydrolyzing conditions, using [α - 32 P]8N₃ATP followed by IP with either the R2a or RXb antibodies (Figure 3-4). Both antibodies have a similar capacity to immunoprecipitate their target polypeptides, as judged by the intensities of [α - 32 P]8N₃ATP-labeled full-length Cdr2p (compare Figures 3-4A and 4B, lane CDR2). Our results showed that the WT N-half of Cdr2p binds [α - 32 P]8N₃ATP (lane N + C; Figure 3-4A). Importantly, the C191K mutation strongly enhanced photolabeling of the N-half, by about four-fold. These results show that the increased [α - 32 P]8N₃ATP binding by the C191K mutant full-length transporter (Figure 3-2B) occurs primarily at the mutated NBD1. Neither the C191A mutation nor the NBD2 mutations significantly affected [α - 32 P]8N₃ATP binding by NBD1. In all the samples, the C-half (NBD2) of Cdr2p showed very low levels of photolabeling with [α - 32 P]8N₃ATP (Figure 3-4B). This weak binding by NBD2 was not significantly modulated by mutations at Lys899, but the C191K mutation in NBD1 caused a slight positive allosteric effect on [α - 32 P]8N₃ATP binding by NBD2 (lane N^{C191K} + C; Figure 3-4B). In summary, these results indicate that the NBD1 of Cdr2p can bind ATP despite its divergent Walker A motif. The weak labeling of NBD2 can be interpreted in three different ways: i) NBD2 has a very low affinity for ATP, ii) NBD2 cannot be photolabeled by the 8-azido-ATP analog, or iii) NBD2 binds ATP, but the turnover rate is very rapid and it is not slowed down by the incubation on ice-water mix (2°C). We believe that the two first possibilities are unlikely since the K899C mutation abrogates the activity of this ABC transporter and because [α - 32 P]8N₃ATP has been used to photolabel many ABC transporters, including Cdr1p (Shukla *et al.*, 2003).

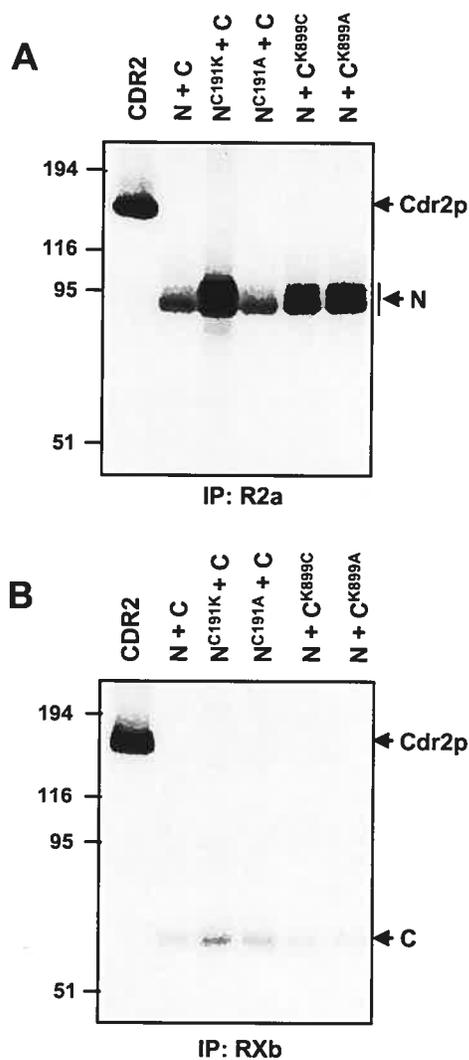


Figure 3-4 : ATP binding by the Cdr2p half-proteins. Crude membranes (250 μ g) were incubated for 5 min at 2 °C with 15 μ M [α -³²P]8N₃ATP. The samples were UV cross-linked and immunoprecipitated (IP) with either the R2a (A) or the RXb (B) antibodies. The immune complexes were separated by SDS-PAGE. The dried gels were autoradiographed for 2 days. Arrowheads indicate the positions of full-length Cdr2p, the N- or the C-half. Similar results were obtained in two independent experiments. Molecular mass markers are shown (in kDa) on the left.

ATPase activity of Cdr2p and the effects of the Walker A mutations on ATP hydrolysis

To evaluate the effects of the Walker A mutations on the ATPase activity of Cdr2p, we measured the oligomycin-sensitive release of inorganic phosphate by a colorimetric method. Crude membrane extracts contain many contaminating *S. cerevisiae* ATPases. In order to specifically measure the ATPase activity of Cdr2p, we performed a sucrose gradient fractionation of the crude membrane extracts. The fraction located at the bottom of the gradient was highly enriched in Cdr2p and an *S. cerevisiae* protein migrating at about 110 kDa, most likely corresponding to the plasma membrane proton ATPase Pma1p (Figure 3-5A). The assay was performed at pH 7.5, to minimize the activity of Pma1p (optimal pH of 6.0) and because it is the optimal pH for assessing the ATPase activities of other transporters of the yeast *PDR/CDR* family (Decottignies *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2001; Wada *et al.*, 2002). We measured the release of inorganic phosphate in this fraction after 30 min of incubation at 37 °C, in the absence versus the presence of oligomycin, a compound that does not affect the ATPase activity of Pma1p and that was shown to be a specific inhibitor of Pdr5p and Cdr1p (Decottignies *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2001). Cdr2p-enriched fractions showed a four-fold higher oligomycin-sensitive ATPase activity as compared to fractions from control cells (Figure 3-5B). This result confirms that Cdr2p can hydrolyze ATP. When subtracting the activity from control fractions, the deduced basal ATPase activity of Cdr2p is 61 nmol Pi/min/mg, which is comparable to that of *C. albicans* Cdr1p overexpressed in a similar heterologous system (about 40 nmol Pi/min/mg) (Nakamura *et al.*, 2001). The C191K and C191A mutants showed ATPase activities comparable to the WT protein (88 and 89 nmol Pi/min/mg, respectively), while the K899C and K899A mutations abolished ATP hydrolysis (Figure 3-5B). This latter result correlates with the complete loss of drug resistance activity displayed by these mutants (Figure 3-1B) and confirms that this conserved lysine in NBD2 plays a critical role in nucleotide hydrolysis.

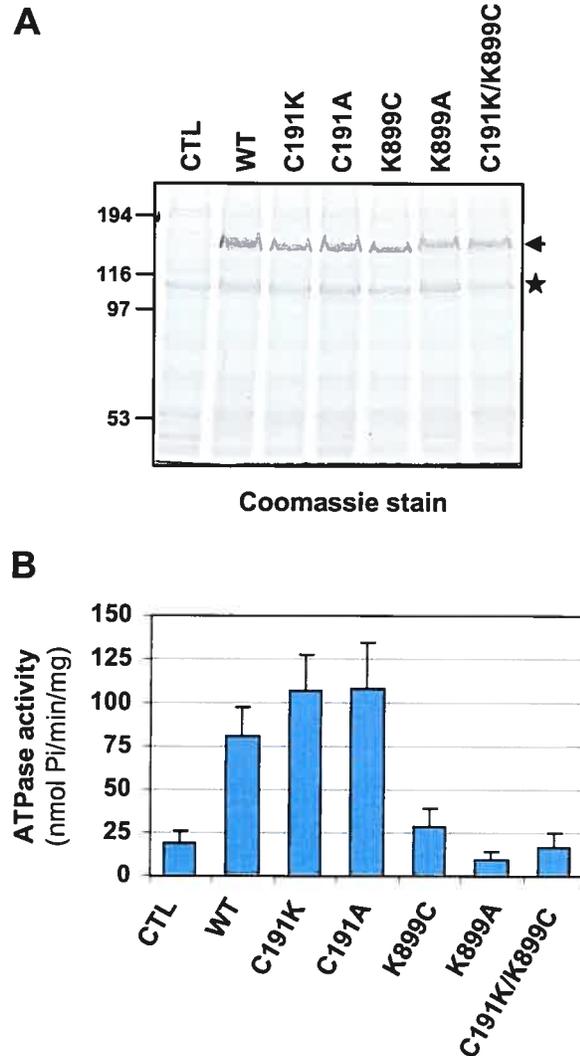


Figure 3-5 : ATPase activities of WT and Cdr2p mutant proteins in enriched membrane fractions. (A) Cdr2p-enriched fractions were prepared from crude membranes using a sucrose gradient centrifugation procedure. These fractions were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (10 μ g of protein per lane). The arrowhead indicates the positions of Cdr2p, while the star indicates the position of an *S. cerevisiae* membrane protein. (B) The oligomycin-sensitive ATPase activity of Cdr2p was determined by the colorimetric release of inorganic phosphate. Cdr2p-enriched fractions (5 μ g) were incubated for 30 min at 37 $^{\circ}$ C with or without 20 μ M oligomycin (see details in the Experimental section). In both A and B, the fractions from the C191A strain were diluted 1:1 with fractions from the CTL strain. Values shown are the means \pm S.D. of at least three independent experiments.

V. Discussion

NBD1 and NBD2 of fungal *PDR/CDR* transporters are functionally and structurally asymmetric

In this report, we provide evidence that the two NBDs of *C. albicans* Cdr2p contribute positively, but asymmetrically to transporter function. We had previously shown that co-expression of both the N- and C-halves of Cdr2p is required for antifungal drug resistance although each half can bind substrates independently, suggesting that the two halves possess unique molecular properties and that their interaction is required for efficient catalysis and drug translocation (Gauthier *et al.*, 2003). Here, we demonstrate that each half binds [α - 32 P]8N₃ATP, albeit to different extents, indicating that a functional nucleotide-binding site is present in each half, despite the divergent N-terminal Walker A loop. Like what has been observed with many ABC transporters, mutation of the conserved Walker A Lys (in NBD2 of Cdr2p) had a drastic effect. Indeed, the ATPase and drug resistance activities were abolished in the K899C and K899A mutants, while the capacity to bind [α - 32 P]8N₃ATP was maintained, regardless of the presence of a Cys or Lys at position 191. The conserved Lys residue in NBD2 is therefore essential for hydrolysis and drug efflux (as monitored indirectly by the rhodamine accumulation and drug resistance assays). The inactivity of the double mutant C191K/K899C clearly shows that the atypical Cys191 of NBD1 and the typical Lys899 of NBD2 are not functionally interchangeable. Since Cdr2p is functional with a Cys, Lys or Ala at position 191 in NBD1, we can conclude that this fungal ABC transporter has a loose requirement for amino acids at that position in the N-terminal ATP-binding loop. This proposition is supported by the finding that the divergent NBD1 Cys of Pdr5p can be mutated to Tyr without loss of function (Egner *et al.*, 1998). However, the C191K and C191A mutations significantly lowered the level of resistance to fluconazole and rhodamine, respectively, indicating that Cys191 is not essential for Cdr2p-mediated drug resistance, but yields an optimal MDR phenotype. At the molecular level, the C191K mutation, which restores the consensus Walker A motif in NBD1, increased the binding of [α - 32 P]8N₃ATP by NBD1, but had no major impact on ATP hydrolysis or rhodamine accumulation. Taken together, our mutagenesis study of the

divergent Cys191 in NBD1 and the typical Lys899 at the corresponding position in NBD2 confirmed a functional asymmetry for the NBDs of fungal *PDR/CDR* efflux pumps.

In contrast to NBD1, NBD2 showed a very weak photolabeling with [α - ^{32}P]8N₃ATP (Figure 3-4B) that was not affected by the presence or absence of the N-half (data not shown). This novel finding can be attributed to a low affinity of NBD2 for ATP or to a peculiar structure of the NBD2 ATP binding pocket that does not allow efficient UV-crosslinking with 8-azido-ATP. For the reasons outlined in the “Results” section, we rather believe that NBD2 possess a high turnover rate, even in cold temperature, which lowers the active site occupancy and therefore causes the weak photolabeling of the C-half. The fact that mutations of Lys899 completely inactivate Cdr2p indicates that NBD1 cannot power drug transport when the integrity of NBD2 is compromised, although the isolated NBD1 shows intrinsic ATPase activity in vitro (Jha *et al.*, 2003a). This outlines a communication between the two NBDs and suggests they probably associate according to the “ATP sandwich” dimer model (Smith *et al.*, 2002). More experiments are needed to resolve the issue of the weak binding of [α - ^{32}P]8N₃ATP by NBD2. In either case, our results highlight important structural differences between the active sites of NBD1 and NBD2 of Cdr2p.

Comparison of our results with those from other studies

An analogous mutagenesis study of *C. albicans* Cdr1p was published (Jha *et al.*, 2004). Using a GFP-tagged Cdr1p variant, these authors found that mutating the NBD2 Lys to Cys inactivated Cdr1p, like what we observed for Cdr2p. This finding confirms that in the CDR subgroup, an intact Walker A motif in NBD2 is critical for transporter activity. Similar to our results with the Cdr2p C191K mutant, the C193K mutation lowered the antifungal drug resistance activity of Cdr1p against fluconazole and other azoles. However, the Cdr1p C193K mutant had strongly diminished ATPase activity (22% of WT). This result is surprising since the authors show that the same mutant is still active in a rhodamine efflux assay. Our Cdr2p C191K mutant showed a similar level of ATPase activity than WT Cdr2p. Along with the major functional differences between Cdr1p and Cdr2p we have described in a previous paper (Gauthier *et al.*, 2003), other possible explanations for the discrepancies between our results and those Jha and coll. include the

use of a totally different *S. cerevisiae* expression system and the presence of a GFP tag which is known to affect the substrate specificity of Cdr1p (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003b).

In human MDR1/P-glycoprotein (P-gp), it was found that either the K433C or K1076C single mutants had a very weak drug-stimulated ATPase activity (12% of WT) (Loo *et al.*, 2002). The two NBDs of P-gp are much more symmetrical in predicted structure (60% amino acid identity) than the *C. albicans* Cdr2p NBDs (26% identity). Therefore, it appears that Lys and Cys cannot perform equivalent functions in the Walker A loop of ABC transporters that contain structurally similar NBDs.

Evolutionary aspects and molecular modeling of the asymmetric Cdr2p NBDs

The P-loop Lys to Cys substitution is uniquely found in the N-terminal NBD of full-length *PDR/CDR*-type ABC proteins from fungal organisms belonging to the Ascomycota phylum and in *Dictyostelium*, belonging to the Mycetozoa group. Anjard and Loomis suggested that the ancestor of crown organisms carried two homologous full-length *PDR* genes; the one carrying this mutation was retained in fungi, while the other was kept in plants (Anjard et Loomis, 2002). Both types were retained in *Dictyostelium*. *PDR*-type ABC transporters are absent in bacteria and only half-size *PDR* genes are found in the animal lineage (the ABCG subgroup). The uncommon Walker A motif Cys is accompanied by other substitutions in the Walker B, Q- and His-loop motifs of NBD1 and with an atypical ABC signature motif in NBD2. This observation guided an early proposition of the NBD head-to-tail dimerization model (Jones et George, 1999). The functional differences between NBD1 and NBD2 of Cdr2p are further supported by our homology modeling analysis of a predicted NBD1•NBD2 dimer with two ATP molecules bound at the dimer interface (data not shown). In this model, the side-chain amino group of the conserved Lys899 contacts the γ -phosphate of the bound nucleotide in NBD2 while the side-chain of Cys191 points away from the bound nucleotide in NBD1. In agreement with the “ATP sandwich dimer” model (Smith *et al.*, 2002), the ABC signature sequence of NBD2 (999-LNVEQ), which considerably deviates from the consensus “LSGGQ” signature sequence, makes important stabilizing contacts with the ATP bound by the divergent Walker A loop

of NBD1. In our computer-generated model, the NBD1 signature sequence (301-VSGGE) does not contact the NBD2-bound ATP. Thus, it is likely that after an initial deleterious mutation, intragenic compensatory substitutions have been selected during evolution to maintain the capacity of NBD1 to bind nucleotides. Still, for this subgroup of medically important ABC transporters, the relative contributions of NBD1 and NBD2 in the catalytic mechanism remain elusive.

VI. Acknowledgements

The authors would like to thank Brian Wilkes for molecular modeling of the Cdr2p NBDs, Isabelle Carrier and Philippe Gros for helpful advice with the photolabeling experiments, André Veillette for providing access to laboratory equipment and Sandra Weber for expert editorial assistance.

This work was supported by a research grant to M.R. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MT-15679). C.G. is a recipient of a CIHR scholarship and M.R. is a senior scientist from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. La caractérisation du fonctionnement des transporteurs ABC Cdr1p et Cdr2p de *C. albicans*

A. La spécificité des transporteurs Cdrp pour les agents antifongiques, tel que définie par la résistance cellulaire

Jusqu'à maintenant, quatre transporteurs ABC appartenant au sous-groupe PDR ont été décrits chez *C. albicans* (Cdr1p – Cdr4p) (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997; Balan *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1998b). Bien que ceux-ci soient étonnamment semblables entre eux au niveau de la séquence et de la structure prédite (54 à 84% identiques en acides aminés; a.a.), seuls Cdr1p et Cdr2p sont impliqués dans la résistance aux médicaments antifongiques et autres composés cytotoxiques. La régulation transcriptionnelle diffère beaucoup entre ces quatre gènes et contribue de façon importante aux différences fonctionnelles observées (Lyons et White, 2000). Sachant que Cdr4p ne contribue pas à la résistance, mais ce transporteur est tout de même exprimé chez certaines souches résistantes (Franz *et al.*, 1998b; Lyons et White, 2000; Maebashi *et al.*, 2001) et considérant les différences fonctionnelles entre Cdr1p et Cdr2p (Chapitre 2), nous pouvons alors supposer que la capacité de conférer le phénotype MDR et la spécificité pour les substrats sont des propriétés qui sont encodées par un nombre limité d'a.a. Les transporteurs Cdrp sont formés d'environ 1500 a.a. et leur séquence primaire diverge surtout dans les 100 premiers a.a. (portion N-terminale précédant le NBD1; 40% d'identité entre Cdr1p et Cdr2p, 20% entre Cdr4p et Snq2p). Cependant, à part un signal « RGD » d'attachement à la membrane, aucun motif connu ne peut être repéré dans cette portion de la protéine. La fonction de cette portion N-terminale est donc inconnue. Les hélices transmembranaires formant les TMD sont connues comme étant impliquées dans la reconnaissance et la liaison des substrats chez les transporteurs ABC (Chap. 1, section II.A.2). En comparant les TMD des transporteurs Cdrp, on trouve un niveau d'homologie assez variable mais beaucoup plus bas que celui des NBD (66 à 99%). Par exemple, le TMD1 (comprenant les six premiers segments transmembranaires) de Cdr2p est 73% identique à celui de Cdr1p, alors que celui de Cdr3p l'est à 49% (données non-publiées). Ces différences en a.a. affecteraient l'activité de transport non seulement via une

modification de l'affinité des TMD pour les substrats, mais également la localisation subcellulaire du transporteur, ses modifications post-traductionnelles (ex : phosphorylation, glycosylation) et sa dégradation via endocytose suite à une ubiquitination. Je discuterai des modifications post-traductionnelles chez les transporteurs Cdrp un peu plus loin dans ce chapitre (section I.E).

Deux types de méthodes peuvent être utilisées pour évaluer le spectre d'activité des transporteurs Cdrp vis-à-vis les composés antifongiques; soit les méthodes directes et indirectes. Les méthodes directes incluent : i) les tests de liaison par photomarquage d'extraits protéiques contenant des niveaux élevés du transporteur avec des substrats photoactivables et radioactifs, suivi d'une séparation des protéines marquées par électrophorèse, ii) les tests de liaison de substrat en utilisant un transporteur purifié suivi d'une mesure du changement de fluorescence, soit la fluorescence intrinsèque du transporteur ou celle du substrat, iii) les tests de transport de substrats radioactifs ou fluorescents par des transporteurs purifiés et reconstitués dans des vésicules lipidiques, et iv) la cristallisation du transporteur en présence d'un substrat, suivi de la détermination de la structure tridimensionnelle. Ces méthodes directes permettent une quantification précise des paramètres biochimiques de l'interaction protéine-substrat et peuvent révéler la composition des sites de liaison aux substrats. Cependant, la purification de protéines membranaires est laborieuse et les tests de liaison sont restreints à un nombre limité de substrats photoactivables, radioactifs ou fluorescents. L'application des méthodes directes pour caractériser la spécificité des transporteurs Cdrp est le sujet de la section suivante (I.B).

Les méthodes indirectes se basent principalement sur des tests de sensibilité/résistance cellulaire de souches manipulées génétiquement face à différents composés cytotoxiques. Lorsque la délétion ou la surexpression d'un transporteur entraîne un changement de sensibilité de la levure modifiée face à un composé toxique par rapport à la souche parentale non modifiée, on émet alors l'hypothèse que le transporteur a modifié la concentration intracellulaire du composé et donc, que ce dernier est un substrat pour cette pompe (Sanglard *et al.*, 1996). Sans données additionnelles, il faut aussi considérer

que l'effet puisse être indirect, c'est-à-dire que la délétion ou la surexpression du transporteur affecte l'activité d'un autre déterminant de sensibilité au composé en question. La méthode de délétion des transporteurs *CDR*, un-à-un ou en combinaison, suivi d'une évaluation des niveaux de sensibilité aux antifongiques des souches mutantes a été utilisée précédemment. Les résultats qui en ont découlés sont décrits au Chapitre 1, section II.C. Cette technique permet d'évaluer la spécificité du/des transporteur(s) pour un grand nombre de composés, mais elle est limitée par i) l'absence de phénotype suite à la délétion de *CDR2*, puisque ce gène n'est pas exprimé chez les souches de laboratoire sensibles aux azoles (Sanglard *et al.*, 1997) et ii) l'atténuation du phénotype de sensibilité à cause de la présence d'effecteurs de résistance qui complètent l'absence des transporteurs Cdr1p et Cdr2p, tel que CaMdr1p (Ben^R) (Sanglard *et al.*, 1996). Une deuxième approche consiste à exprimer ces transporteurs de manière hétérologue chez *S. cerevisiae* et à quantifier la résistance cellulaire qui en découle. Le génome haploïde et la disponibilité des outils génétiques pour cet organisme modèle (ex : génome entièrement séquencé et annoté depuis 1997, banques de mutants de délétion, auxotrophies multiples, grande variété de vecteurs d'expression, etc...) facilitent grandement les manipulations moléculaires et permettent un meilleur contrôle des paramètres génétiques. La définition de la spécificité des transporteurs par des tests de résistance est aussi limitée par les composés présentant une toxicité cellulaire aux concentrations inférieures à leur limite de solubilité. La rhodamine 123, par exemple, est un substrat connu des transporteurs Cdr1p et Cdr2p, mais dont la toxicité est trop faible pour être utilisé dans les tests de résistance (Chapitre 2 et (Clark *et al.*, 1996)). Ces problèmes peuvent être palliés par l'utilisation des méthodes directes de transport ou de liaison, décrites au paragraphe précédant. Il est à noter que les tests de transport (accumulation ou expulsion) effectués *in vivo* avec des cellules entières doivent aussi être considérés comme des méthodes indirectes, puisqu'ils ne démontrent pas nécessairement une interaction physique entre le transporteur et le substrat.

L'identification de *CDR1* et *CDR2* a été possible grâce à la complémentation fonctionnelle d'une mutation *pdr5* chez *S. cerevisiae* (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). Une évaluation initiale de la spécificité des deux transporteurs pour les agents antifongiques avaient été présentée dans cette dernière étude et faisait usage de tests de

résistance (Sanglard *et al.*, 1997). Mais tel que mentionné au Chapitre 1 (sections I.D.2 et II.C), les niveaux de résistance sont fortement dépendants de la quantité de protéine exprimée, et dans cette étude, les niveaux de Cdr1p et Cdr2p n'avaient pas été quantifiés par ces auteurs, ce qui rendait impossible la comparaison des spectres d'activité. Néanmoins, un fait intéressant ressort de cette étude; alors que l'ARNm de *CDR2* n'est pas détectable chez les souches de laboratoire de *C. albicans* sensibles aux azoles (ex : CAF2-1), la transformation de *S. cerevisiae* avec un plasmide multi-copie Yep24 comprenant un fragment génomique qui inclut l'ORF de *CDR2* (issu du *C. albicans* SC5314, souche parentale de CAF2-1) avec ses éléments régulateurs environnants (3 Kb en amont plus 2 Kb en aval) entraîne un phénotype MDR (Sanglard *et al.*, 1997). Ceci indique que le promoteur de *CDR2*, peut être activé par un régulateur de *S. cerevisiae*.

Afin de pouvoir étudier ces transporteurs biochimiquement et comparer précisément leurs différentes spécificités, il était nécessaire d'élaborer un système d'expression hétérologue qui produit des niveaux élevés de la protéine d'intérêt et qui minimise la présence de transporteurs ABC homologues. Nous avons alors choisi des plasmides épisomaux et multicopies, pouvant être répliqués autant chez *E. coli* que *S. cerevisiae*, et qui contiennent un promoteur fort et constitutif chez la levure, celui de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD) (Mumberg *et al.*, 1995). Les régions codantes de *CDR1* et *CDR2* ont été insérées dans ces vecteurs. Ceux-ci peuvent contenir différents marqueurs d'auxotrophie, permettant ainsi des études de co-expression. Nous avons utilisé la souche *S. cerevisiae* (TY310) qui a été construite dans notre laboratoire et dans laquelle le transporteur ABC *PDR5* a été éliminé par remplacement allélique (Talibi et Raymond, 1999). Les régulateurs clés du réseau PDR, *PDR1* et *PDR3*, sont également inactivés dans cette souche, réduisant ainsi substantiellement l'expression d'autres transporteurs ABC et effecteurs de la résistance multiple aux drogues (Figure 1-10). Un anticorps générique anti-Cdrp (RXb) a été développé par notre laboratoire afin de quantifier et de comparer les niveaux de protéines Cdr1p et Cdr2p exprimées. Ces outils m'ont donc permis de déterminer, à l'aide de tests de résistance, que Cdr1p possède une plus grande capacité que Cdr2p à transporter le fluconazole (FLC) et l'itraconazole (ITC; Figure 2-1). Cependant, Cdr2p présente un niveau d'activité similaire à celui de Cdr1p face au kétoconazole (KTC)

et à la rhodamine 6G (Rh6G). Des découvertes importantes ont été réalisées avec ce système hétérologue. Entre autres, Cdr2p module la sensibilité des cellules à différents agents oxydatifs (hypersensibilité au H₂O₂ et résistance au diamide), alors que Cdr1p n'a aucun effet quantifiable face à ces composés (voir section I.E). Aussi, l'expression de Cdr1p et de Cdr2p entraîne des effets opposés face à un agent immunosuppresseur, le FK520, qui inhibe l'activité de Cdr1p, mais pas celle de Cdr2p (voir section I.D). Par contre, l'expression forcée des formes actives de *CDR1* ou de *CDR2* dans la souche TY310 induit une toxicité cellulaire, ce qui nous oblige à sélectionner des clones qui survivent malgré une charge abondante de transporteurs membranaires. Des résultats préliminaires indiquent que le vecteur d'expression serait intégré au génome chez ces clones. Aussi, malgré la triple mutation *pdr1 pdr3 pdr5* de la souche TY310, on ne peut exclure que d'autres effecteurs de résistance et/ou d'autres transporteurs ABC puisse avoir un effet sur les phénotypes que nous avons mesurés. En effet, la toxicité provoquée par l'expression de *CDR1* et de *CDR2* témoigne probablement qu'une voie de réponse au stress pourrait être activée chez ces transformants.

Parallèlement, d'autres systèmes d'expression ont été développés pour étudier les transporteurs Cdrp. Plusieurs groupes de recherche utilisent une souche *S. cerevisiae* nommée « AD12345678 », « AD1-8 μ » ou simplement « AD » et qui contient un allèle hyperactif du facteur *PDR1* (*pdr1-3*) qui cause une forte induction du promoteur de *PDR5*, menant à la surexpression de ce transporteur à la membrane plasmique (Decottignies *et al.*, 1994; Decottignies *et al.*, 1998). Cependant, *PDR5* et six autres transporteurs ABC ont été retirés du génome de cette souche, soit *PDR10*, *PDR11*, *PDR15*, *SNQ2*, *YOR1*, *YCF1*, ainsi que le facteur de transcription *PDR3* (Decottignies *et al.*, 1998). Ainsi, en intégrant une copie du gène *CDR1* au locus de *PDR5* dans cette souche, Nakamura et coll. ont pu obtenir une expression élevée de Cdr1p à la membrane, et donc caractériser la spécificité pour les antifongiques, l'activité NTPase et le transport du [³H]-FLC et du Rh6G pour cette pompe de *C. albicans*, tout en minimisant la contribution des protéines ABC endogènes de *S. cerevisiae* (Nakamura *et al.*, 2001). De plus, cette étude démontre que la surexpression de *CDR1* était suffisante pour obtenir un phénotype MDR. L'équipe du Dr Prasad utilise aussi cette souche AD, mais en insérant le gène *CDR1* couplé au marqueur *GFP* dans un

plasmide centromérique, avec le promoteur de *PDR5* en amont (Shukla *et al.*, 2003). Les résultats de cette étude sont discutés dans les paragraphes suivants. Les avantages du système « AD » par rapport au nôtre sont : i) l'élimination de la possibilité d'interférence par les transporteurs ABC endogènes de *S. cerevisiae* et ii) l'absence de toxicité causée par la surexpression de *CDR1* ou de *CDR2* (Tsao S., communication personnelle), ce qui provient probablement du fait que l'allèle *pdr1-3* est accompagné de modifications génétiques qui atténuent les effets négatifs de la surexpression d'un transporteur membranaire actif sur la viabilité des cellules.

Une autre équipe a développé une souche similaire à la souche « AD ». Cette souche *S. cerevisiae* YMM-ABC8 comporte des délétions pour huit transporteurs ABC de type PDR ou reconnus comme étant impliqués dans la résistance, soit *pdr5 pdr10 pdr11 pdr12 pdr15 snq2 ynr070w yor1* (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003a). Elle est dérivée d'une souche de laboratoire (YPH499) qui ne possède pas l'allèle *pdr1-3*. Ces auteurs ont utilisé les plasmides pDS243 et pDS246 (Sanglard *et al.*, 1997) qui contiennent respectivement les gènes *CDR1* et *CDR2*, sous le contrôle de leur propre promoteur, et ils ont ajouté la protéine fluorescente GFP en position C-terminale des deux gènes. Ce groupe a déterminé pour la première fois que les spectres d'activité de Cdr1p et Cdr2p incluent le voriconazole et que Cdr2p est localisé à la membrane plasmique (comme Cdr1p) (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003a). Une seconde étude montre que Cdr2p cause la résistance à la caspofungine, avec une efficacité beaucoup plus grande que Cdr1p, et que cette activité de Cdr2p peut être observée autant avec un système hétérologue (*S. cerevisiae* YYM4; *pdr5 snq2*) qu'avec des souches cliniques de *C. albicans* (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003b). Cette découverte est importante puisque la caspofungine représente une nouvelle classe d'agent fongicide, destinée à une utilisation de plus en plus fréquente en milieu clinique. Par contre, une étude récente indique que cette activité de Cdr2p vis-à-vis la caspofungine est variable selon la méthode de détection (milieu solide versus liquide) et selon l'espèce de levure évaluée (*S. cerevisiae* versus *C. albicans*) (Niimi *et al.*, 2006). Finalement, l'expression contrôlée des transporteurs Cdrp chez *C. albicans* est également possible et a été utilisée pour étudier Cdr1p et Cdr3p (Balan *et al.*, 1997; Niimi *et al.*, 2004b). Brièvement, la souche hôte doit comporter la délétion du gène à l'étude et le

vecteur d'expression contient soit un promoteur fort et constitutif (tel que celui de l'alcool déshydrogénase, *ADH*) ou un promoteur contrôlable selon la source carbone (ex : *GALI*, *HEXI*).

Le mécanisme de reconnaissance des substrats chez les transporteurs ABC est un sujet particulièrement intéressant. Les études portant sur la P-gp des mammifères et sur Pdr5p, l'homologue de Cdr1p et Cdr2p chez *S. cerevisiae*, apportent des éléments de réponse face à la spécificité extrêmement large des transporteurs de type MDR. Notamment, des mutations ponctuelles localisées principalement (mais pas exclusivement) dans les TMD ainsi que dans les boucles intra-/extra-cytoplasmiques des transporteurs ABC modulent leur affinité vis-à-vis un ou plusieurs substrats (Ambudkar *et al.*, 1999; Tutulan-Cunita *et al.*, 2005a; Frelet et Klein, 2006). Ainsi, il est prédit que le mécanisme de transport implique une interaction directe protéine-ligand (Langton *et al.*, 2005). En se basant sur la similarité de séquence avec P-gp et Pdr5p et sur une étude de mutagenèse aléatoire portant sur Pdr5p (Egner *et al.*, 1998), Shukla et coll. ont effectué plusieurs mutations dans Cdr1p qui affectent son fonctionnement (Shukla *et al.*, 2003; Shukla *et al.*, 2004a). Par exemple, l'élimination de la Phe774 (Δ F774) du TM6 entraîne une perte générale de résistance face à différents antifongiques, corrélée avec une rétention intracellulaire de Cdr1p, qui peut être corrigée par l'ajout de substrats dans le milieu de culture (Shukla *et al.*, 2003). Parallèlement, la mutation de cet a.a. pour une alanine (F774A) résulte en une diminution sélective d'activité pour le FLC, le cycloheximide et le nystatin (Shukla *et al.*, 2003). Aussi, la mutation de la Thr1351 (T1351F), localisée dans le TM11, entraîne une réduction globale de la résistance de Cdr1p et affecte plus spécifiquement la synergie entre le FLC et un inhibiteur (FK520) (Shukla *et al.*, 2004a). Cette mutation, calquée sur celle effectuée précédemment dans Pdr5p (Egner *et al.*, 1998; Egner *et al.*, 2000), n'affecte cependant ni la localisation de Cdr1p, ni son activité ATPase, ni la liaison du dérivé de l'ATP [α -³²P]8N₃ATP ou autres composés photoactivables pouvant agir comme substrats (Shukla *et al.*, 2004a). Finalement, une analyse par substitution d'alanine du TM11 de Cdr1p a dévoilé que les mutations de sept résidus dans ce segment affectent de manière différentielle la résistance face à certains substrats (Saini *et al.*, 2005). Ces découvertes impliquent donc que les segments transmembranaires des

transporteurs Cdrp, et plus particulièrement les TM6 et TM11, sont impliqués dans la détermination de la spécificité pour les substrats. Le TM6 et les résidus adjacents sont fortement conservés chez les transporteurs fongiques PDR/CDR, à un tel point que cette région est utilisée dans la banque Pfam pour définir ce sous-groupe de transporteurs ABC (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF06422>). Il est important de noter que les études de Shukla et Saini sur Cdr1p ont été effectuées avec une fusion Cdr1p-GFP. Bien que la GFP permette de localiser facilement le transporteur par microscopie confocale, les résultats obtenus avec une telle protéine chimérique doivent être considérés avec précaution. En effet, Schuetzer-Muehlbauer et coll. ont démontré que l'ajout de la GFP modifie la capacité de Cdr1p à conférer la résistance à la caspofungine, mais n'altère pas ses propriétés face aux azoles ou à la terbinafine (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003b).

La construction de protéines chimériques a été utilisée par l'équipe du Dr Prasad, qui a déterminé que le TM12 de Cdr1p peut être échangé avec celui de Cdr3p, sans aucune perte de fonction (Saini *et al.*, 2006). On peut interpréter ce résultat de deux façons; soit que le TM12 n'est pas responsable des différences fonctionnelles entre Cdr1p et Cdr3p, ou bien que le TM12 de Cdr3p possède la capacité de reconnaître/liar les substrats de Cdr1p, mais que d'autres aspects structuraux de Cdr3p empêchent celui-ci d'expulser les médicaments antifongiques. Cette approche est donc peu informative. Les chimères résultantes doivent être correctement localisées dans la cellule, sans être dégradées prématurément, et ce type d'étude doit être complété par une mutagenèse dirigée, couplé avec une modélisation moléculaire.

En conclusion, l'évaluation de la résistance cellulaire conférée par l'expression de Cdr1p ou de Cdr2p dans un système hétérologue est une façon indirecte, mais très sensible de déterminer la spécificité du transporteur face à différents xénobiotiques. La mutagenèse (aléatoire ou dirigée) des transporteurs Cdrp exprimés dans des systèmes hétérologues, couplée à des tests de résistance, continuera de fournir de l'information quant à l'interaction de ces protéines avec les médicaments antifongiques et autres substrats biologiques.

B. Caractérisation des sites de liaison aux substrats chez les transporteurs Cdrp et considérations structurales

Afin de caractériser plus précisément l'interaction physique des transporteurs Cdrp avec les drogues antifongiques, nous avons évalué la capacité de Cdr1p et Cdr2p à être photomarqués par le [125 I]iodoaryl azido-rhodamine123 (IAARh123 ; Fig. 2-2 et 2-3). Nous avons également déterminé que Cdr1p et Cdr2p peuvent lier l' [3 H]azidopine, une dihydropyridine analogue au vérapamil, un modulateur de la P-gp. L'azidopine et le IAARh123 avaient été utilisés précédemment pour caractériser les sites de liaison aux substrats chez les transporteurs humains P-gp et MRP1, ainsi que le transporteur bactérien LmrA (Bruggemann *et al.*, 1992; Nare *et al.*, 1994; Daoud *et al.*, 2000; Alqawi *et al.*, 2003). On peut ainsi déduire que l'aptitude à lier ces deux composés a été maintenue au cours de l'évolution chez les transporteurs ABC de type MDR. Par contre, la pré-incubation de P-gp ou de LmrA avec un excès molaire de certains composés anticancer et modulateurs de P-gp révèle des différences dans la composition de leur site de liaison au IAARh123 (Alqawi *et al.*, 2003). Par exemple, l'inhibition du photomarquage à l'IAARh123 par la Rh6G est plus marquée chez LmrA que P-gp, tandis que la cyclosporine A, la réserpine et la quinine sont tous plus efficaces à prévenir la liaison de l'IAARh123 par P-gp que par LmrA. J'ai utilisé une approche similaire de compétition du photomarquage au IAARh123 par différents substrats connus de Cdr1p et de Cdr2p (Figure 4-1 ; données non-publiées). Il est intéressant de constater que certains composés préviennent efficacement la liaison du IAARh123 (CV, ITC, KTC, Rh6G et Rh123), alors que d'autres substrats connus de Cdr1p/Cdr2p semblent inefficaces (17 β -estradiol, FK520, FPZ et FLC). De plus, les azoles lipophiles ITC et KTC présentent des différences significatives dans leur inhibition du photomarquage de Cdr1p versus Cdr2p, indiquant des différences subtiles dans l'interaction ces deux protéines avec l'ITC et le KTC (Figure 4-1). Shukla et coll. ont confirmé que Cdr1p (et Cdr1p-GFP) pouvait lier l' [3 H]azidopine, en plus d'un autre composé qui agit comme substrat pour la P-gp, le [125 I]iodoaryl azido-prazosin (IAAP) (Shukla *et al.*, 2003). Alors que le photomarquage par l' [3 H]azidopine est inhibé par l'ajout de miconazole, la liaison du IAAP est spécifiquement inhibée par le nystatin. Ni le cycloheximide, ni l'anisomycine ne peuvent entrer en compétition avec la liaison de ces deux composés photoactivables (Shukla *et al.*, 2003). Ces résultats, combinés

avec ceux mentionnés à la section précédente et dans les paragraphes qui suivent, renforcent l'idée que Cdr1p et Cdr2p possèderaient plus d'un site de liaison aux substrats, tel que déterminé pour Pdr5p.

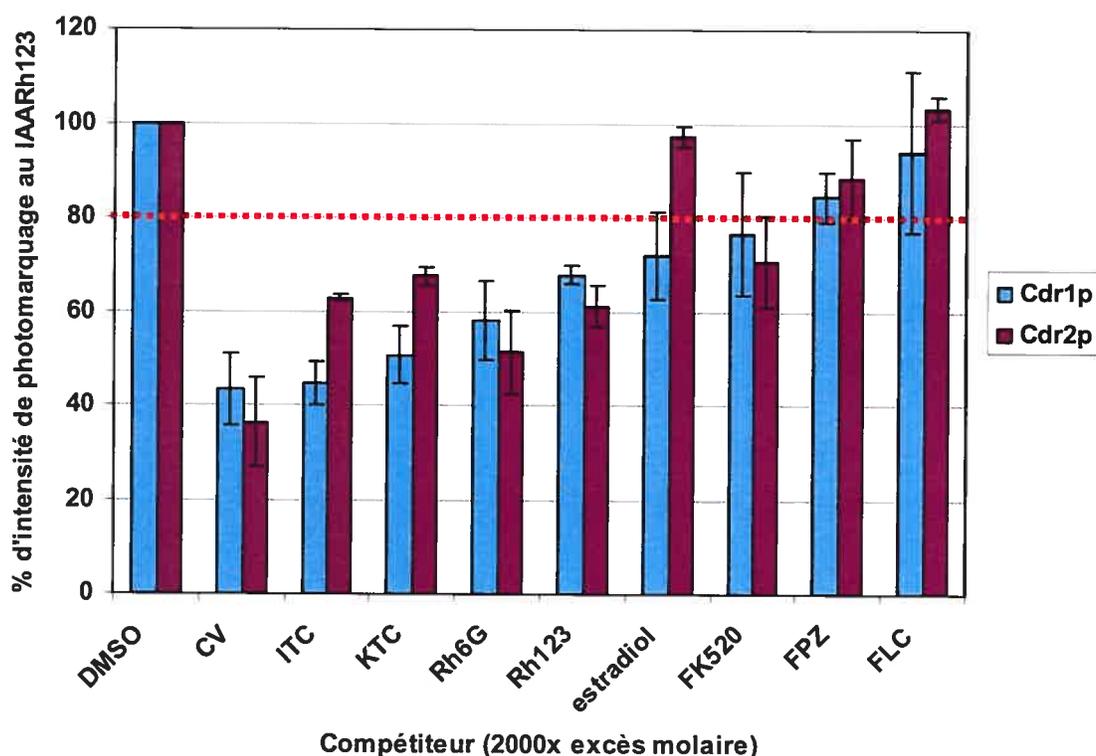


Figure 4-1 : Compétition de la liaison du IAARh123 par Cdr1p et Cdr2p avec différents composés. 50 μg d'extraits membranaires totaux provenant des transformants *S.c.* TY310 *CDR1* ou *CDR2* ont été incubés pendant 30 min à température de la pièce ($T^{\circ}\text{P}$) avec 200 μM de compétiteur. Par la suite, 0.1 μM de IAARh123 a été ajouté et l'incubation a été poursuivie pour 30 min à $T^{\circ}\text{P}$ et à l'obscurité. Après avoir refroidi la réaction pendant 10 min sur glace, les échantillons ont été irradiés aux rayons UV pendant 10 min sur glace. Les échantillons ont été solubilisés et séparés par SDS-PAGE. La radioactivité incorporée dans les gels séchés a été quantifiée par PhosphoImager. Une diminution d'intensité de photomarquage de moins de 20% est considérée comme non-spécifique, suite à la quantification de la radioactivité provenant d'une protéine non-identifiée de *S. cerevisiae* (environ 55 kDa). Les résultats présentés sont les moyennes \pm écart-type de deux à quatre expériences indépendantes. Abréviations : crystal violet (CV), fluphénazine (FPZ), diméthyl sulphoxide (DMSO; solvant/contrôle négatif).

Il était connu que le photomarquage d'un transporteur ABC entier suivi d'un clivage chimique ou protéolytique partiel résultait en deux fragments marqués, correspondant aux deux moitiés de la protéine (Bruggemann *et al.*, 1992; Daoud *et al.*, 2000). En utilisant une digestion protéolytique plus poussée et une identification immunologique des fragments marqués, il a été possible de délimiter les sites de liaison à l'IAAP et à l' $[^3\text{H}]$ azidopine chez la P-gp dans les environs du TM5, TM6, TM11 et TM12 (Greenberger, 1998; Safa, 1999). Les segments transmembranaires correspondants de MRP1 participent à la liaison de l'IAARh123 (Daoud *et al.*, 2001). Il avait également été démontré que les deux TMD de la P-gp peuvent interagir avec les substrats en absence des NBD (Loo et Clarke, 1999). Notre démonstration de la contribution indépendante des deux moitiés de Cdr2p à la liaison de l'IAARh123 (Figure 2-3) présente des répercussions importantes à la compréhension du mécanisme de reconnaissance des substrats chez les transporteurs ABC. En effet, ce résultat, couplé à ceux mentionnés plus haut pour P-gp et MRP1, indique que chaque TMD d'un transporteur de type MDR peut reconnaître et lier un substrat d'une manière indépendante de l'autre TMD (et des NBD), et donc, qu'il contient tous les déterminants moléculaires nécessaires à la liaison des substrats.

Les recherches de John Golin ont été très informatives quant aux caractéristiques des molécules qui déterminent leur probabilité d'être reconnues comme substrats pour Pdr5p (Golin *et al.*, 2000; Golin *et al.*, 2003; Hanson *et al.*, 2005). En utilisant des molécules simples aux propriétés déterminées, ces auteurs ont établi que la taille d'une molécule est un facteur beaucoup plus important que son hydrophobicité ou sa charge électrique en vue d'une reconnaissance par Pdr5p. Le volume optimal d'un substrat est d'environ 200 \AA^3 (Golin *et al.*, 2003). Ces auteurs déduisent également que Pdr5p possède trois sites de liaison aux substrats, possédant des caractéristiques qui leurs sont propres. Le chloramphénicol, le clotrimazole, la rhodamine 6G et l'IAAP interagissent au site « 1 », tandis que le tritylimidazole et les chlorures de trialkylétain partagent le site « 2 » (Golin *et al.*, 2003; Hanson *et al.*, 2005). Il a été déterminé qu'une propriété commune aux molécules interagissant au site « 1 » serait la présence de trois groupements électronégatifs « accepteurs » de pont hydrogène, alors que les substrats du site « 2 » possèdent au moins

un groupement électronégatif (Hanson *et al.*, 2005). Le site « 3 » de Pdr5p est défini par l'interaction du tetrapropylétain, probablement via des interactions hydrophobes (Golin *et al.*, 2003). Par contre, l'arrangement spatial de ces sites et leur localisation dans le transporteur ne sont pas encore déterminés. Nos résultats de la liaison de l'IAARh123 par les deux moitiés de Cdr2p de manière indépendante l'une de l'autre suggèrent la présence de deux sites de type « 1 », puisque ce composé est un analogue de la rhodamine possédant au moins trois groupements électronégatifs (Nare *et al.*, 1994). L'identification des régions de Cdr2p contribuant à ces sites pourrait se faire de façon similaire à celle décrite au paragraphe précédant, c'est-à-dire par immunodétection ou spectrométrie de masse des fragments peptidiques radioactifs obtenus suite à une protéolyse du Cdr2p marqué à l'IAARh123.

Une étape importante vient d'être franchie dernièrement avec la publication de la structure 3D d'un transporteur ABC avec son substrat naturel, soit *S. thyphimurium* MsbA avec le lipopolysaccharide (LPS) (Reyes et Chang, 2005). Notre observation que chaque moitié de Cdr2p lie une molécule d'IAARh123 corrèle très bien avec cette structure du demi-transporteur MsbA en état « post-hydrolytique », puisque le dimère MsbA est complexé avec deux molécules de LPS, chacune étant attachée à la face externe d'un TMD (Figure 1-7e). Les auteurs proposent un modèle de « substrate flipping » selon lequel la tête polaire de la molécule (le sucre) serait reconnue par MsbA et emprisonnée par les TMD dans une cavité interne. La partie hydrophobe du LPS (la queue lipidique) serait ensuite pivotée, en étant traînée à travers la bicouche de la membrane pour se retrouver au niveau du feuillet externe de la membrane dans la conformation cristallisée, soit une position inversée du LPS, maintenue par la face extérieure des TMD et les boucles extracellulaires (Reyes et Chang, 2005). Ce modèle est fort intéressant et en accord avec l'activité de translocation des phospholipides attribuée à la P-gp (Borst *et al.*, 2000), l'homologue de MsbA chez les eucaryotes. Ce modèle devra cependant être validé expérimentalement. Les données structurales à moyenne résolution obtenues récemment pour la P-gp indique un arrangement des TMD qui est différent, mais pas totalement contradictoire, par rapport à celui de MsbA (Rosenberg *et al.*, 2005). Ainsi, les prochaines études cristallographiques de transporteurs ABC seront particulièrement intéressantes, surtout celles qui seront effectuées

sur des transporteurs complets, en présence de lipides et de substrats. La description récente du processus de purification pour Cdr1p sera assurément fort utile pour la caractérisation future du fonctionnement et de la structure chez ce sous-groupe de transporteurs, autant par des techniques spectroscopiques (fluorescence, infrarouge ou résonance magnétique nucléaire) que par la cristallisation (Shukla *et al.*, 2006).

Il avait été observé précédemment par microscopie électronique qu'en absence de nucléotides, les TMD de P-gp et de CFTR sont disposés chacun en demi-cercle, produisant une cavité centrale à double pore (Rosenberg *et al.*, 2003; Rosenberg *et al.*, 2004). La possibilité qu'une cavité centrale puisse être responsable du paradoxe de la semi-spécificité des transporteurs ABC de type MDR doit aussi être considérée. En effet, l'étude cristallographique de la portion C-terminale de BmrR, le régulateur d'une pompe MFS de *B. subtilis*, montre que des liens électrostatiques et van der Waals spécifiques à chaque ligand sont effectués à l'intérieur d'une cavité unique, qui peut elle-même démontrer une certaine flexibilité dans sa conformation (Zheleznova *et al.*, 1999). Un résidu acide, chargé négativement (Glu), est également important pour la reconnaissance générale des substrats cationiques (Neyfakh, 2001). Les transporteurs ABC fongiques du sous-groupe PDR/CDR possèdent également des résidus Glu et Asp conservés dans les TM2, TM3, TM6, TM9 ainsi que dans les boucles extracellulaires entre les TM5-6 et TM11-12. L'implication de ces résidus dans la liaison des substrats cationiques serait donc à vérifier, notamment par mutagenèse dirigée.

Récemment, une analyse par microscopie électronique de particules contenant une forme hautement purifiée de Pdr5p reconstituée dans des liposomes a dévoilé pour la première fois une image tridimensionnelle d'un transporteur ABC de levure (Ferreira-Pereira *et al.*, 2003). Cependant, la faible résolution (25-Å) n'a permis d'avoir qu'une image globale de la forme du transporteur, qui se compare toutefois très bien à celles des demi-transporteurs ABC YvcC de *Bacillus subtilis* et MsbA d'*E.coli* (Chang et Roth, 2001; Chami *et al.*, 2002). Les observations importantes de cette structure sont : i) l'orientation perpendiculaire adoptée par les deux lobes correspondants aux NBD qui sont disposés assez près l'un de l'autre, sans toutefois se toucher, et ii) Pdr5p aurait tendance à se

dimériser lors de sa purification (Ferreira-Pereira *et al.*, 2003). Ce dernier effet peut être simplement dû à des interactions protéines-protéines plus favorables pour cet agencement lors du processus de reconstitution. Néanmoins, un criblage par la techniques du « double hybride » a dévoilé que la portion N-terminale de Pdr5p (comprenant le NBD1) pouvait interagir physiquement avec elle-même (Subba *et al.*, 2002). Tel qu'expliqué dans l'Introduction, nous savons qu'un NBD purifié et inactivé par mutagénèse va avoir tendance à se dimériser en présence d'ATP (Smith *et al.*, 2002). Donc, si on émet l'hypothèse que le NBD1 des transporteurs PDR/CDR possède une faible activité ATPase (voir section II), il est logique d'entrevoir que l'expression forcée du NBD1 de Pdr5p dans une cellule (où l'ATP est présent) pourrait provoquer une association NBD1•NBD1. D'autre part, il est intéressant de noter que l'homologue de Pdr5p chez l'humain en terme structural et fonctionnel, le demi-transporteur ABCG2, est aussi connu pour se retrouver en état de tétramère *in vivo*, ce qui est équivalent à une forme d'homodimère pour Pdr5p (Xu *et al.*, 2004; Bhatia *et al.*, 2005). Il serait alors important de vérifier si les transporteurs fongiques de type PDR/CDR forment effectivement des homo- ou hétérodimères *in vivo* par des techniques d'électrophorèse ou de filtration par gel en conditions non-dénaturantes et/ou par co-immunoprécipitation en ajoutant des épitopes distincts à un même transporteur ou à des transporteurs différents. Une autre technique permettant de déterminer l'interaction physique de protéines ou de domaines protéiques est le transfert d'énergie par résonance, que ce soit en utilisant des sonde fluorescentes (FRET) ou enzymatiques (BRET) (Boute *et al.*, 2002). La détermination de la structure quaternaire des transporteurs PDR/CDR permettra, entre autres, de mieux comprendre la composition du site de liaison aux substrats.

C. L'interaction des transporteurs Cdrp avec les lipides

Il existe une interaction étroite entre les transporteurs ABC causant le phénotype MDR et les différents lipides contenus dans la membrane plasmique (Borst *et al.*, 2000; Ferte, 2000). D'un côté, ces protéines membranaires doivent fonctionner *in vivo* dans cet environnement lipidique qui est très dynamique. La P-gp serait notamment localisée dans des micro-domaines membranaires distincts des radeaux lipidiques et cavéoles classiques

(Demeule *et al.*, 2000; Radeva *et al.*, 2005). D'un autre côté, la plupart des composés cytotoxiques expulsés par les transporteurs ABC sont hydrophobes et les variations dans la fluidité de la membrane affectent assurément la diffusion passive, donc la sensibilité de la cellule, à ces composés. La situation devient encore plus complexe chez les levures lorsqu'on considère que i) les transporteurs ABC du sous-groupe PDR/CDR pourraient agir *in vivo* comme translocateurs de phospholipides (Decottignies *et al.*, 1998; Dogra *et al.*, 1999; Smriti *et al.*, 2002), ii) des souches cliniques de *C. albicans* résistantes aux azoles démontrent une composition lipidique altérée par rapport aux souches sensibles (Loffler *et al.*, 2000; Kohli *et al.*, 2002), iii) les antifongiques azolés ciblent une enzyme principale dans la synthèse de l'ergostérol (un analogue du cholestérol) et iv) un des mécanismes de résistance dont l'action peut s'ajouter à celle des transporteur est la modification de la voie de synthèse de l'ergostérol (Chap. 1, section I.D.2.b).

Dans un premier temps, il a été établi que 96% du phosphatidyléthanolamine (PE) est localisé dans le feuillet interne de la membrane plasmique chez *C. albicans* et que la délétion homozygote de *CDR1* (et de *CDR2*) augmente cette distribution asymétrique (Dogra *et al.*, 1999). Ce groupe de recherche a ensuite présenté des résultats indiquant que Cdr1p, Cdr2p et Cdr3p agissent comme translocateurs généraux de phospholipides et ce, d'une façon énergie-dépendante, autant dans un système d'expression hétérologue (*S. cerevisiae*), qu'avec des mutants de délétion *C. albicans cdr1*, *cdr1/cdr2* ou *cdr3* (Smriti *et al.*, 2002). Les trois transporteurs diffèrent dans la direction du mouvement des lipides qu'ils entraînent. Ainsi, alors que Cdr1p et Cdr2p transfèrent les trois types principaux de phospholipides (PE, phosphatidylsérine et phosphatidylcholine) du feuillet interne au feuillet externe (activité « floppase »), Cdr3p dirigerait ces phospholipides dans le sens inverse (externe à interne; « flippase ») (Smriti *et al.*, 2002). De plus, l'activité floppase de Cdr1p (mais pas l'activité flippase de Cdr3p) est affectée négativement par trois médicaments antifongiques. Il y aurait donc une corrélation entre l'activité floppase (interne-à-externe) de Cdr1p/Cdr2p et leur capacité d'expulser les drogues antifongiques à l'extérieur de la cellule (Smriti *et al.*, 2002). Il faut cependant considérer que ces auteurs ont fait usage d'analogues de phospholipides marqués avec une sonde fluorescente (le 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl). Or, il est connu que Pdr5p confère la résistance à ce

marqueur fluorescent (Kolaczowski *et al.*, 1998) et donc, que ce composé peut en soi être un substrat pour les pompes PDR/CDR. Ceci jette alors un doute sur la capacité des protéines Cdrp à effectuer le « flip-flop » des phospholipides, puisque ces transporteurs exprimés de manière hétérologue pourraient interagir uniquement avec la sonde fluorescente et non pas la portion lipidique.

Il est connu que l'augmentation de la fluidité de la membrane chez des mutants *erg* de *S. cerevisiae* entraînent une augmentation de la diffusion des drogues antifongiques (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Il faut remarquer que chez *S. cerevisiae*, cette diffusion passive peut aussi être altérée par d'autres facteurs comme Pdr16p et Pdr17p, des protéines de transfert du phosphatidylinositol (PITP) homologues à Sec14p (van den Hazel *et al.*, 1999). *PDR16* chez *C. albicans* est co-régulé positivement avec *CDR1* et *CDR2* et son rôle dans la résistance aux azoles est présentement à l'étude dans notre laboratoire (De Deken et Raymond, 2004; Saidane *et al.*, 2006). Mukhopadhyay et coll. ont ensuite déterminé que ces changements dans la composition et la fluidité de la membrane du *C. albicans*, plus spécifiquement les proportions de sphingolipide et d'ergostérol, peuvent affecter le fonctionnement de Cdr1p via une mauvaise localisation subcellulaire (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Prasad *et al.*, 2005). Sachant que i) la tête polaire de certains sphingolipides de levures est constituée de phosphatidylinositol, le substrat de Pdr16p, ii) les radeaux lipidiques et autres micro-domaines membranaires spécialisés du *C. albicans* sont principalement formés de sphingolipides et d'ergostérol (Martin et Konopka, 2004), et que iii) Cdr1p pourrait être préférentiellement localisé dans ces microdomaines (Pasrija *et al.*, 2005), on peut donc proposer un lien entre l'activité de Pdr16p et Cdr1p. Par exemple, l'activation transcriptionnelle de *PDR16*, observée en parallèle avec celle de *CDR1* et *CDR2* dans une souche ayant acquise une mutation dans le régulateur *TAC1* (Coste *et al.*, 2006), pourrait avoir comme conséquence d'augmenter la quantité et/ou la qualité des micro-domaines hébergeant la quantité accrue de Cdr1p/Cdr2p. Une hypothèse similaire a déjà été présentée pour le cas des cellules cancéreuses surexprimant P-gp (Lavie et Liscovitch, 2000). Cependant, ce modèle est très simpliste. En effet, les mécanismes par lesquels les PITP, comme Pdr16p, modulent le transport membranaire et la signalisation par les lipides sont encore mal définis (Phillips *et al.*, 2006).

D'autres membres du sous-groupe PDR chez la levure (Aus1p et Pdr11p) ainsi que les homologues structuraux des PDR/CDR chez l'humain (ABCG1, -G2, -G4, -G5 et -G8) sont vraisemblablement impliqués dans le transport des stérols (Li et Prinz, 2004; Wang *et al.*, 2004). ABCG2 est reconnu principalement pour son rôle dans le phénotype MDR dans différents cancers (Stefkova *et al.*, 2004), mais il peut aussi interagir avec le phosphatidylsérine, les hormones stéroïdiennes et le cholestérol (Woehlecke *et al.*, 2003; Janvilisri *et al.*, 2003). Tel que mentionné au début de cette section, un lien étroit semble exister chez certains transporteurs ABC entre leur capacité à conférer le phénotype MDR et à transporter des molécules lipidiques. Avec les données dont nous disposons présentement, on ne peut pas réfuter l'hypothèse que certains transporteurs MDR (P-gp, Pdr5p, Cdr1p, etc...) soient à l'origine des translocateurs de lipides. Ainsi, ces transporteurs MDR qui semblent dédiés à la détoxification cellulaire pourrait tout simplement confondre des xénobiotiques hydrophobes pour des lipides naturels (Borst *et al.*, 2000; Tannert *et al.*, 2003). Le fait que la délétion de ces gènes ne modifie pas grandement la croissance cellulaire (en absence de produits toxiques) indique que leur activité « flip-flop » serait redondante avec d'autres transporteurs de lipides ou que cette activité n'est pas essentielle à la survie des cellules.

D. L'interaction des transporteurs Cdrp avec les agents immunosuppresseurs et la voie de signalisation du calcium

Les molécules immunosuppressives tacrolimus (FK506), ascomycine (FK520) et la cyclosporine A (CsA) peuvent non seulement agir comme substrats de la P-gp et de Pdr5p, mais peuvent aussi interférer avec l'activité de ces transporteurs (Arceci *et al.*, 1992; Saeki *et al.*, 1993; Raymond *et al.*, 1994; Rao et Scarborough, 1994; Kralli et Yamamoto, 1996; Egner *et al.*, 1998; Demeule *et al.*, 1998; Egner *et al.*, 2000). Maesaki et coll. ont démontré que le FK506 présentait une synergie avec l'itraconazole pour inhiber la croissance d'une souche clinique de *C. albicans* qui surexprime *CDR1* et que cet effet était corrélé avec une augmentation considérable de l'accumulation intracellulaire d'itraconazole en présence du FK506 (Maesaki *et al.*, 1998). Selon Marchetti et coll., le FK506 ou la cyclosporine

peuvent rendre le FLC fongicide contre *C. albicans*, plutôt que fongistatique (Marchetti *et al.*, 2000). Notre étude, présentée au Chapitre 2, confirme effectivement qu'un analogue du FK506 (le FK520) démontre une synergie antifongique lorsque combiné avec les azoles ou même avec la rhodamine 6G, chez des transformants de *S. cerevisiae* qui surexpriment *CDR1* (Figures 2-5 et données non-publiées). Globalement, ces études suggéraient une inhibition par le FK506/520 du transport des azoles par Cdr1p. Toutefois, j'ai démontré que *CDR2* n'est pas affecté par cette combinaison. L'insensibilité de Cdr2p à l'inhibition par le FK506 a été confirmée avec un système d'expression hétérologue différent (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003a). Sachant que *CDR2* est toujours surexprimé avec *CDR1* chez les souches résistantes de *Candida* spp., cette découverte pose donc une mise en garde aux stratégies visant à combiner des analogues non-immunosuppresseurs du FK506 ou de la CsA avec des médicaments azolés pour le traitement d'infections fongiques (Odom *et al.*, 1997; Cardenas *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2000).

Des études mettent toutefois en doute l'interaction directe entre les transporteurs fongiques PDR/CDR et le FK506 ou la cyclosporine (et leurs dérivés). Il était en effet connu que, chez les cellules de mammifères, le FK506 et la CsA sont liés respectivement par une peptidyl-prolyl isomérase (FK506 Binding Protein; FKBP) et par une cyclophiline, les complexes résultants étant ensuite responsables de l'inhibition de la calcineurine (Liu *et al.*, 1991). La calcineurine est une phosphatase fortement conservée chez les eucaryotes. Sa fonction dépend de la calmoduline (protéine qui lie le calcium) et elle est une composante clé dans la voie d'homéostasie du calcium et de la réponse immunitaire chez les mammifères (Hemenway et Heitman, 1999). Une étude génétique élégante a permis de définir un modèle pour la voie de signalisation du calcium chez *S. cerevisiae*, de l'effet des antagonistes de la calcineurine (ex : FK506, CsA) ou de la calmoduline (ex : fluphénazine) sur cette voie et sur la tolérance aux agents fongistatiques (Edlind *et al.*, 2002). La « tolérance » à un agent antifongique se distingue de la résistance par la capacité des levures désignées comme sensibles face à ce composé à poursuivre leur croissance à un rythme lent, mais constant, sur une période prolongée en présence d'une concentration d'antifongique supérieure à la concentration minimale inhibitrice (MIC). Ce phénomène s'appelle « trailing growth » en anglais. Le modèle élaboré dans cette étude se décrit de la

façon suivante : une perturbation de la membrane plasmique ou des membranes internes (par exemple via l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol par un traitement aux azoles ou à la terbinafine) entraîne un influx du calcium dans la cellule provenant de sources extracellulaires ou de réserves intracellulaires. Suite à la liaison au calcium, la calmoduline active la calcineurine. Cette dernière serait responsable entre autres de la déphosphorylation du facteur de transcription Crz1p, qui est alors transféré au noyau pour activer la transcription de ses gène-cibles incluant la glucane synthase Fks2p et les perméases de calcium Pmc1p et Pmr1p localisées au Golgi (Edlind *et al.*, 2002). L'implication de cette voie de signalisation dans la survie du *C. albicans*, *C. glabrata* et du *C. neoformans* après un stress à la membrane a été confirmée par différents groupes (Fox *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2002; Sanglard *et al.*, 2003a; Kaur *et al.*, 2004). Cependant, il n'est pas clair comment l'activation de la calcineurine entraîne la tolérance aux azoles et autres inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol, car ni *CRZ1* ni *CRZ2* sont impliqués dans ces phénotypes chez *C. albicans* et les gènes effecteurs situés en aval de cette voie ne sont pas connus (Karababa *et al.*, 2006). Certains chercheurs soutiennent que les transporteurs ABC Pdr5p, Cdr1p ou Cdr2p n'interviennent pas ou n'auraient tout au plus qu'un rôle mineur dans la synergie entre les inhibiteurs de la calcineurine (FK506/CsA) et les inhibiteurs de l'ergostérol, puisque cette synergie n'est pas abolie chez les levures dans lesquelles les gènes encodant ces transporteurs sont délétés (Edlind *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2003). Les effets de mutations inactivatrices de la calcineurine sont beaucoup plus prononcés sur cette synergie que la délétion des transporteurs ABC (Cruz *et al.*, 2002; Edlind *et al.*, 2002; Sanglard *et al.*, 2003a).

La discussion au Chapitre 2 du présent ouvrage explique clairement notre opinion sur cette controverse (Gauthier *et al.*, 2003). Aux points énumérés, se rajoutent les observations récentes de Shukla et Saini démontrant que certaines mutations ponctuelles (T1351F, T1355A, L1358A et G1362A) localisées dans le TM11 de Cdr1p ont pour effet d'annuler la synergie du FK520 avec le FLC (Shukla *et al.*, 2004a; Saini *et al.*, 2005). La mutation T1351F annule également la synergie du FK520 avec le cycloheximide, un autre substrat de Cdr1p dont le mode d'action (inhibition de la synthèse protéique) n'est pas prédit d'avoir un impact rapide sur l'intégrité de la membrane, causant un influx de calcium

qui activerait la calcineurine. Enfin, le FK506/520 interfère efficacement avec l'efflux du Rh6G par Cdr1p (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003a; Shukla *et al.*, 2004a). Nous ne remettons pas en question que la synergie antifongique des azoles avec les inhibiteurs de calcineurine s'explique par une interférence de l'activation de la voie de signalisation du calcium en réponse à un stress membranaire. Par contre, nos résultats et ceux mentionnés ci-haut suggèrent que le FK506/520 pourrait agir comme substrat de Cdr1p et Cdr2p, et que la surexpression de ces deux transporteurs dans les souches cliniques de *C. albicans* module l'efficacité de cette synergie azole+FK506/520. Alternativement, l'inhibition de Cdr1p par le FK506/520 pourrait être un effet indirect, si l'on considère que chez la plante *Arabidopsis thaliana*, une protéine de liaison au FK506, l'immunophiline FKBP42 (TWD1), s'associe physiquement avec la portion C-terminale de certains transporteurs ABC de type P-gp et MRP et est capable de moduler leur activité (Geisler *et al.*, 2004).

L'interaction entre le FK520 et les transporteurs Cdr1p/Cdr2p s'est complexifiée d'un cran lorsque nous avons présenté d'une part que l'expression de *CDR1* dans *S. cerevisiae* entraîne une hypersensibilité au FK520 et d'autre part, que *CDR2* confère la résistance à ce composé (Figure 2-4). Ce résultat montrait pour la première fois que malgré la grande similarité entre ces deux transporteurs ABC, ceux-ci peuvent avoir une activité opposée face à un même composé. Nous avons par la suite testé un transformant *S. cerevisiae* qui exprime un mutant inactif de Cdr1p (K901A). Celui-ci est toujours hypersensible au FK506, indiquant que l'hypersensibilité aux inhibiteurs de calcineurine dépend de la présence de Cdr1p, mais n'est pas couplée à son activité ATPase (données non-publiées). Une étude récente propose que Pdr5p pourrait affecter indirectement l'homéostasie du calcium chez *S. cerevisiae*, probablement via une modification du contenu lipidique de la membrane ou une interaction avec un autre facteur affectant import/export du calcium (Tutulan-Cunita *et al.*, 2005b). Aussi, il avait été observé que l'expression de Cdr1p par *S. cerevisiae* entraîne une hypersensibilité à un peptide antifongique, cet effet étant corrélé avec une augmentation d'échange de proton par le transformant *CDR1* (Milewski *et al.*, 2001). Finalement, il est connu que la délétion du NBD de LmrA, une pompe à efflux de *Lactococcus lactis* similaire à la P-gp, occasionne un renversement de la direction de transport du bromure d'ethidium (EtBr; import au lieu d'export), transformant

cette protéine ABC en un symporteur à proton (Venter *et al.*, 2003). L'inversion du transport par LmrA peut également survenir avec la protéine pleine longueur si la cellule est dépourvue d'ATP intracellulaire et si la concentration externe d'EtBr est augmentée. En pareilles conditions, l'import du EtBr se fait en conjonction avec une synthèse nette d'ATP par LmrA (Balakrishnan *et al.*, 2004). Nous pouvons donc proposer ce mécanisme hypothétique pour expliquer l'hypermotilité des transformants *CDR1* : la présence du FK520 dans la levure occasionne directement ou indirectement un blocage de l'activité hydrolytique de Cdr1p, ce qui inverse alors la direction du transport de cette protéine, entraînant alors une augmentation de la concentration intracellulaire de ce composé (considérant que le FK520 est un substrat de Cdr1p), à un niveau qui devient toxique pour *S. cerevisiae*. Il est évident que ce phénomène, fort complexe, mérite d'être confirmé chez *C. albicans*, notamment par des tests d'accumulation intracellulaire à l'aide d'un dérivé radioactif du FK506 (ex : [³H]-FK506 ou [³H]-FK520), effectués avec une souche mutante *cdr2* qui surexprime *CDR1*.

E. Autres caractéristiques et rôles biologiques potentiels des transporteurs Cdrp de *C. albicans*

Les quatre gènes *CDR* caractérisés à ce jour sont tous plus similaires entre eux qu'aux autres membres du sous-groupe PDR/CDR chez les mycètes. Ils sont également tous plus similaires à *PDR5* qu'aux autres gènes *PDR* de *S. cerevisiae*. On peut donc déduire que les transporteurs *CDR1-4* sont issus du même gène ancestral, suivi de plusieurs duplications et une dérive évolutive. Leur maintien dans le génome de *C. albicans* de quatre homologues distincts de *PDR5* suggère qu'ils jouent des rôles différents ou du moins, partiellement redondants lorsqu'il est question de Cdr1p et de Cdr2p. Alors qu'il peut paraître évident que Cdr1p et Cdr2p fonctionnent *in vivo* chez *C. albicans* comme « détoxificateurs » d'une manière analogue à Pdr5p, les résultats présentés au Chapitre 2 laissent présager qu'ils puissent avoir des fonctions biologiques additionnelles et différentes l'un de l'autre. Il suffit de considérer les différences importantes dans leur régulation basale de *CDR1* et *CDR2* (Sanglard *et al.*, 1997), leur activité différentielle face

au FK506/520 et aux agents oxydatifs (Chapitre 2) et leur activité potentielle de translocateurs de phospholipides (floppases) (Smriti *et al.*, 2002).

Il existe très peu d'information sur les rôles de Cdr3p et Cdr4p (Balan *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1998b). Tel que mentionné plus haut et dans l'Introduction, ces deux transporteurs ne semblent pas impliqués dans la résistance aux antifongiques et Cdr3p pourrait agir comme flippase de phospholipides (Smriti *et al.*, 2002). Nous avons initialement inclus *CDR3* dans l'étude présentée au Chapitre 2, mais l'avons retiré des analyses puisqu'un important fragment protéolytique provenant de la portion N-terminale de Cdr3p (environ 67 kDa) était régulièrement détecté dans notre système hétérologue (données non-publiées). De plus, une fusion *CDR3-GFP* exprimée dans *S. cerevisiae* a permis de déterminer que Cdr3p n'est pas localisé à la membrane plasmique, mais se retrouve diffus dans le cytoplasme (R. Prasad, communication personnelle). La localisation intracellulaire de Cdr3p chez *C. albicans* n'a d'ailleurs pas encore été déterminée. Il est intéressant de remarquer que malgré le clivage d'une importante portion, Cdr3p pouvait lier le IAARh123 et l' ^3H]azidopine, avec une efficacité similaire à celles de Cdr1p et de Cdr2p, indiquant que la capacité de fonctionner comme pompe à efflux n'est pas uniquement déterminée par la capacité de reconnaître et de lier les composés cytotoxiques (données non-publiées). Grâce à un alignement de séquence avec les autres membres de la famille Cdrp, Cdr3p se distingue par une extension de 17 a.a. en position C-terminale. Cependant, aucun motif connu ne se retrouve dans cette extension (données non-publiées). L'expression spécifique aux cellules opaques de *CDR3*, tel qu'observé chez la souche WO-1 (Balan *et al.*, 1997), suggère que ce transporteur pourrait avoir un rôle à jouer dans cette transition phénotypique, ou alors fonctionner comme transporteur d'une molécule encore inconnue, qui est spécifique aux cellules opaques (Lockhart *et al.*, 2003). La transition phénotypique « white-opaque » étant nécessaire à la conjugaison (« mating »), *CDR3* et *CDR4* pourraient donc avoir une influence sur ces processus se déroulant à faible température, par exemple chez les cellules de *C. albicans* colonisant la peau (Magee et Magee, 2004; Soll, 2004). Cette hypothèse sera assurément analysée en détail dans les années à venir et nécessite la délétion de *CDR3* et/ou *CDR4* chez des souches capables d'effectuer cette transition phénotypique.

Le séquençage du génome entier de *C. albicans* a permis de déterminer la présence de 9 transporteurs ABC appartenant au sous-groupe PDR/CDR (Braun *et al.*, 2005; Gaur *et al.*, 2005a). *CDR5* (*CDR11/CDR99*) est encodé par deux ORF interrompus. En fusionnant les séquences en a.a. de ces deux ORF, on obtient un transporteur qui est encore plus similaire à Cdr1p et Cdr2p que Cdr3p ou Cdr4p (données non-publiées; voir Tableau 1-4 et Chap.1 section II.C.1). Ainsi, il serait important d'analyser l'implication de *CDR5*, et aussi celles de *CaSNQ2* et des deux homologues de *ScYOL075c* dans la résistance multiple aux agents antifongiques.

Un domaine encore relativement inexploré est l'analyse des différentes modifications post-traductionnelles chez les transporteurs Cdrp et la possibilité d'une régulation différentielle à ce niveau. La migration sur gel et l'immunodétection de Cdr1p et Cdr2p provenant d'extraits membranaires de *C. albicans* démontrent généralement plusieurs bandes, pouvant être attribuées à diverses modifications post-traductionnelles. Ceci est particulièrement évident pour la moitié N-terminale de Cdr2p (Figures 2-3, 3-3 et 3-4). Il a été déterminé que la phosphorylation de Cdr1p et Pdh1p de *C. glabrata* par la protéine kinase A est importante pour leur activité (Wada *et al.*, 2002). Notamment, la déphosphorylation et la mutation de sites consensus de phosphorylation dans le NBD1 présentaient des effets différentiels sur CgCdr1p et CgPdh1p (Wada *et al.*, 2005). Il est donc permis de supposer un impact similaire de la phosphorylation sur les activités d'hydrolyse et de transport pour CaCdr1p et CaCdr2p chez *C. albicans*. Pdr5p est également phosphorylé par la caséine kinase I (Decottignies *et al.*, 1999). Des résultats obtenus avec Pdr5p de *Kluyveromyces lactis* laissent supposer que sa déphosphorylation puisse être effectuée par la phosphatase Sit4p (Chen, 2001). *SIT4* est impliqué dans les changements phénotypiques et la virulence chez *C. albicans* (Lee *et al.*, 2004), ainsi que dans le système ubiquitine-protéasome chez *S. cerevisiae* (Singer *et al.*, 2003). Sachant que la dégradation et le recyclage de Pdr5p sont contrôlés entre autres par ce système phylogénétiquement conservé, on peut alors penser qu'une régulation similaire s'effectue chez *C. albicans* (Plempner *et al.*, 1998; Moye-Rowley, 2005). Une autre modification courante pour les protéines membranaires est la glycosylation. Alors que Cdr1p possède

deux sites consensus de N-glycosylation dans les boucles extracellulaires entre les TM5-6 et les TM11-12, ces sites sont absents de Cdr2p. Par contre, il a été démontré chez la P-gp des mammifères que la mutation des sites de glycosylation n'affecte pas l'activité du transporteur (Urbatsch *et al.*, 2001), ce qui jette un doute sur l'importance de cette différence entre Cdr1p et Cdr2p.

Les rôles de Cdr1p et de Cdr2p dans la formation des biofilms et la résistance de ces structures aux agents antifongiques sont encore mal compris (voir Chap. 1 section I.D.3). Ce sujet a été discuté en détail dans la revue suivante; (Mukherjee *et al.*, 2005a). En résumé, il est probable qu'une augmentation de la transcription de *CDR1* et *CDR2* joue un rôle dans la phase initiale de la formation du biofilm, soit lors de l'adhérence des cellules à la matrice. Cependant, d'autres mécanismes doivent être avancés pour expliquer le maintien des niveaux élevés de résistance dans le biofilm mature, par exemple la modification du contenu en ergostérol. Récemment, il a été déterminé que la transcription de *CDR1* et *CDR2* est activée par le farnésol (Enjalbert et Whiteway, 2005). Cette molécule de signalisation agit dans le système de « quorum-sensing » afin de contrôler la prolifération des cellules selon la densité de la population. Il faut rappeler qu'une molécule qui active la transcription d'un gène ABC n'est pas nécessairement un substrat pour ce transporteur. Donc même si le farnésol n'est pas un substrat pour Cdr1p ou Cdr2p, l'activation des deux gènes (*CDR1/CDR2*) par cette molécule suggère un lien étroit entre les deux transporteurs, le quorum-sensing et la formation de biofilm par *C. albicans* (Hogan, 2006). Cdr1p et Cdr2p peuvent également transporter des hormones stéroïdiennes (Krishnamurthy *et al.*, 1998c). Les niveaux de transcription de *CDR1* et *CDR2*, ainsi que leur homologue humain ABCG2, peuvent être modulés par l'estrogène (Cheng *et al.*, 2006; Krishnamurthy et Schuetz, 2006). Ceci pourrait suggérer un rôle de ces transporteurs dans la réaction du *C. albicans* aux variations hormonales de son hôte naturel, soit les mammifères.

Au Chapitre 2, nous avons également proposé un impact de l'activité de Cdr2p sur la réponse au stress oxydatif, qui est causé *in vivo* suite à la phagocytose du *C. albicans* ou à la libération de cytokines par les cellules du système immunitaire. Notons que des

résultats préliminaires dans notre laboratoire suggèrent une communication croisée possible entre les voies de signalisation dirigée par Cap1p et Tac1p. Cap1p est l'homologue de Yap1p chez *C. albicans* et ces facteurs sont connus pour leur implication dans la réponse au stress oxydatif (Alarco et Raymond, 1999; Wang *et al.*, 2006), alors que Tac1p est le facteur dominant dans le contrôle transcriptionnel de *CDR1* et *CDR2* (Coste *et al.*, 2004). Il reste à déterminer si des molécules telles que le H₂O₂ et le diamide peuvent être directement transportées par Cdr2p. Des données non-publiées avec les mutants C191K et K899C indiquent que la résistance au diamide dépend de l'activité ATPase de Cdr2p, tandis que l'hypersensibilité au H₂O₂ conférée par *CDR2* est indépendante de cette activité. Il est donc plausible que le diamide soit un substrat reconnu et transporté directement par Cdr2p, tandis que le phénotype d'hypersensibilité au H₂O₂ serait un effet indirect. En fait, l'implication des transporteurs dans la réaction du *C. albicans* au stress oxydatif est un sujet encore inexploré (Lorenz *et al.*, 2004; Fradin *et al.*, 2005). Ici encore, un lien pourrait exister entre la résistance au stress oxydatif et le « quorum-sensing » (Westwater *et al.*, 2005), ce qui rend encore plus intéressante l'analyse de la contribution des transporteurs ABC dans ces processus.

II. La caractérisation des NBD de Cdr1p et Cdr2p et les conséquences de la divergence de leurs motifs de liaison à l'ATP

L'énergie nécessaire à la translocation des substrats chez les transporteurs ABC provient de l'hydrolyse de l'ATP par les domaines de liaison des nucléotides (NBD) cytoplasmiques. La première structure à haute résolution d'un NBD (HisP) a été publiée en 1998 et nous a montré une architecture bilobée (Hung *et al.*, 1998). Le lobe I est formé de feuillets β et contient le site de liaison à l'ATP, alors que le lobe II est formé essentiellement d'hélices α (Figure 1-5). Au cours des années subséquentes, cet agencement tridimensionnel fut confirmé par au moins dix-huit structures de NBD de protéines ABC différentes, provenant autant d'organismes bactériens qu'eucaryotiques (Figure 4-2). Cette forte conservation au niveau de la structure de ce domaine indique que son rôle et son fonctionnement auraient également été conservés au cours de l'évolution. De plus, le mécanisme hydrolytique des NBD serait non seulement conservé chez les

transporteurs ABC, mais il serait aussi similaire à celui opérant chez plusieurs hélicases telles que RecA, l'hélicase T7 et le facteur d'élongation eIF4A (Geourjon *et al.*, 2001). On peut ainsi postuler que cette conservation de relations structure-fonction devrait s'appliquer également aux NBD des transporteurs Cdrp de *C. albicans*.

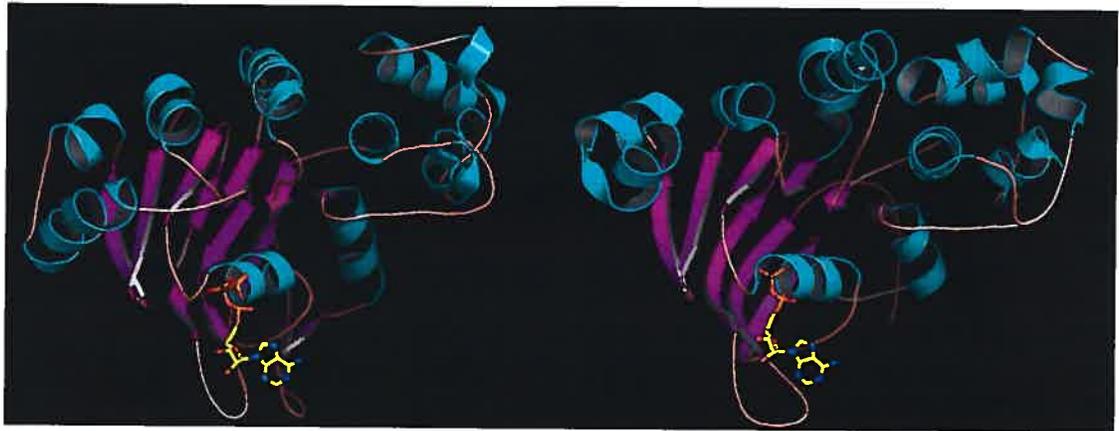


Figure 4-2 : Conservation de la structure tertiaire des NBD. La structure du NBD HisP (à gauche; PDB # 1b0u) de l'importeur de l'histidine chez *Salmonella typhimurium* est fortement similaire à celle du NBD de TAP1 (à gauche; PDB # 1jj7) qui forme avec TAP2 l'exporteur des peptides antigéniques chez *Homo sapiens*. Figure produite avec le logiciel PyMOL v.0.98 (DeLano Scientific LLC).

Au niveau de la séquence primaire, trois motifs consensus définissent l'appartenance à la superfamille des protéines ABC, soit la boucle de liaison aux phosphates nommée Walker A ou P-loop (GxxxxGKS/T), le motif Walker B ($\phi\phi\phi\phi$ DE ; ϕ représentant n'importe quel a.a. hydrophobe) (Walker *et al.*, 1982) et la « signature ABC » (LSGGQ) (Hyde *et al.*, 1990; Schneider et Hunke, 1998). Deux acides aminés sont également fortement conservés chez les protéines de la superfamille ABC, soit une glutamine située à mi-chemin entre les motifs Walker A et signature, ainsi qu'une histidine située en aval du motif Walker B, formant respectivement la boucle glutamine (Q-loop) et la boucle histidine (H-loop) (Linton et Higgins, 1998; Hopfner *et al.*, 2000). Les fonctions jouées par ces motifs sont décrits au Chapitre 1, section II.A.2 (voir Figures 1-5 et 1-6). Brièvement, le motif Walker A forme une boucle de liaison aux phosphates typique (P-loop), nécessaire à la stabilisation et l'orientation de la chaîne triphosphate de l'ATP via

une série de ponts hydrogènes, alors que l'acide aspartique du motif Walker B coordonne la position d'un ion Mg^{++} , cofacteur essentiel à l'hydrolyse de l'ATP (Davidson et Chen, 2004). La forme spatiale du P-loop et ses interactions moléculaires avec les phosphates du trinuécléotide sont étonnamment bien conservées chez une grande diversité d'ATPases, GTPases et kinases (Saraste *et al.*, 1990; Smith et Rayment, 1996; Leipe *et al.*, 2002; Ramakrishnan *et al.*, 2002; Leipe *et al.*, 2003)

A. Origine évolutive des gènes *CDR* et de la cystéine atypique

Chez les transporteurs ABC de levures impliqués dans la résistance aux agents antifongiques, comme Pdr5p, Cdr1p et Cdr2p, la lysine du motif Walker A est remplacée par une cystéine dans le NBD1 (Figure 1-11) (Balzi *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). Cette substitution est intrigante puisque des mutations conservatives et non-conservatives de cette lysine réduisent considérablement ou abolissent les activités ATPase et de transport de plusieurs protéines ABC (Azzaria *et al.*, 1989; Berkower et Michaelis, 1991; Muller *et al.*, 1996; Davidson et Sharma, 1997; Urbatsch *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2000; van Veen *et al.*, 2000; Vergani *et al.*, 2003).

La substitution de la lysine du motif Walker A pour une cystéine semble présente uniquement chez deux types d'organismes, soit les levures du phylum des Ascomycètes et le protozoaire amibien *Dictyostelium discoideum*. Chez ces organismes, la substitution est toujours positionnée dans le NBD situé en position N-terminale (NBD1; Figure 1-11) et elle se retrouve seulement dans les transporteurs pleine-longueur. Chez *D. discoideum*, il y a 21 gènes ABC de type PDR (ABCG), dont 15 sont des transporteurs pleine-longueur (Anjard et Loomis, 2002). Ceux-ci peuvent être séparés en deux groupes distincts. Le groupe 1 contient les gènes PDR qui s'apparentent à ceux des plantes, tandis que le groupe 2 rassemble les homologues des PDR de levures, ces derniers contenant la cystéine atypique dans le NBD1. Enfin, les demi-transporteurs ABCG de *D. discoideum* (groupe 3) sont semblables à ceux retrouvés chez les Animaux et les Plantes. Ainsi, il est possible que l'ancêtre commun aux Eucaryotes ait possédé les trois types de transporteurs PDR/ABCG, tout comme la situation actuelle chez *D. discoideum*. Cependant, au cours de l'évolution,

les gènes PDR du groupe 2 (pleine-longueur, cystéine atypique) n'ont été maintenus que chez les Ascomycètes et certaines amibes. Les Animaux n'auraient conservés que les demi-transporteurs. Alternativement, si l'on tient compte des faits suivants; i) *Dictyostelium* est phylogénétiquement plus éloigné des levures que les Animaux (Baldauf et Palmer, 1993; Baldauf *et al.*, 2000), et ii) d'autres substitutions pour cette lysine (Arg ou Gln) sont également apparues chez des transporteurs ABC bactériens (perméases spécialisées dans l'import de sucres) (Jones et George, 1999), il est également possible que cette mutation Lys (codon AAA ou AAG) à Cys (codon UGU ou UGC) soit apparue indépendamment au moins deux fois au cours de l'évolution. Quant à la configuration génétique dite « inversée » des PDR/CDR pleine-longueur, des analyses de séquence laissent supposer qu'elle serait apparue suite à la copie de la région centrale d'un transporteur complet de type ABCA (TMD1-NBD1-TMD2-NBD2), suivi d'une fusion de deux copies de ce gène ancestral (Dean *et al.*, 2001; Anjard et Loomis, 2002). Une analyse phylogénétique plus fine serait nécessaire afin de déterminer de quelle façon et à quel moment sont apparues les substitutions de Lys à Cys au cours de l'évolution.

B. Asymétrie fonctionnelle des NBD

Nous avons donc évalué les conséquences fonctionnelles de cette substitution chez le transporteur Cdr2p (Chapitre 3). Notre étude de mutagenèse a dévoilé que les deux NBD de Cdr2p contribuent positivement au fonctionnement du transporteur, mais avec une forte asymétrie. Nous avons montré que, malgré cette Cys191 atypique du motif Walker A, le NBD1 de Cdr2p est capable de lier un dérivé photoactivable de l'ATP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$). Étonnamment, le NBD2, qui possède les séquences consensus Walker A et B, n'est pas photomarqué de manière efficace par ce dérivé de l'ATP. Ce résultat sous-tend une différence structurale importante entre les deux NBD de ce transporteur. Cependant, un résultat préliminaire de fractionnement des extraits membranaires par gradient de sucrose nous indiquait que seulement une faible proportion de la moitié C-terminale de Cdr2p (NBD2+TMD2) migrerait dans la fraction au fond du gradient, soit celle où on retrouve la plus grande quantité de la moitié N-terminale ou la protéine pleine-longueur. Ce phénomène se produit également chez les cellules qui co-expriment la moitié N-terminale

avec la moitié C-terminale. Par contre, un marquage métabolique, suivi d'une co-immunoprécipitation dévoile sans aucun doute une interaction physique entre les moitiés N- et C-terminales (données non-publiées). Ceci suggère que seulement une portion de la moitié C-terminale de Cdr2p qui est synthétisée dans les cellules *S. cerevisiae* TY310 serait adéquatement localisée à la membrane plasmique. Malheureusement, des expériences d'immunofluorescence indirecte utilisant l'anticorps générique RXb, qui est dirigé contre la portion C-terminale de Cdr2p, n'ont pas été concluantes. Le fait qu'une fraction des demi-protéines C-terminales synthétisées ait acquis la conformation tertiaire appropriée est appuyé par sa capacité à lier le substrat IAARh123 et par la capacité du transporteur reconstitué (N+C) à conférer la résistance, avec la même spécificité pour les antifongiques que le transporteur entier (Figure 2-3). Ainsi, la faible capacité du NBD2 à être photomarké par le $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$ peut non seulement être interprétée comme étant le reflet d'une faible affinité pour ce dérivé, mais également comme le résultat du photomarkage efficace d'une très faible proportion des moitiés C-terminale produites par la cellule.

L'étude présentée au Chapitre 3 montre que la mutation de la lysine conservée du NBD2 pour une cystéine (K899C) a pour effet d'abolir la résistance aux composés antifongiques et l'activité ATPase de Cdr2p, sans toutefois affecter la liaison du $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$, dans le contexte de la protéine pleine-longueur. Ce résultat indique une communication allostérique et une forte coopération entre les deux NBD, puisque le NBD1 intact de ce mutant K899C n'est pas suffisant pour activer le transport des substrats. Cette conclusion a été initialement déduite grâce à la mutagenèse des lysines conservées présentent dans les motifs Walker A de la P-gp (Azzaria *et al.*, 1989) et a été validée par la suite avec différents transporteurs ABC (voir la section précédente). Par contre, les mutations Ala et Lys de la cystéine atypique du NBD1 (C191A et C191K) n'entraîne pas de perte d'activité appréciable chez Cdr2p. Ceci indique que les deux domaines de liaison à l'ATP de Cdr2p possèdent des éléments structuraux qui sont non seulement distincts l'un de l'autre, mais aussi de la plupart des NBD des transporteurs ABC ayant été étudiés à ce jour. De plus, Pdr5p et Cdr1p diffèrent des autres transporteurs ABC par le fait que leur activité hydrolytique n'est pas stimulée par la présence de substrat (Decottignies *et al.*,

1994; Nakamura *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 2003). Par contre, dans ces études, Pdr5p et Cdr1p étaient en présence de molécules lipidiques et celles-ci pourraient agir comme substrats pouvant activer l'hydrolyse (voir section I.C). Ainsi, même s'il est prédit que le cycle catalytique des transporteurs Cdrp diverge de modèle général « ATP switch » (Figure 1-9 et (Higgins et Linton, 2004)), deux de nos observations avec Cdr2p indiquent néanmoins que son fonctionnement procède selon les principes fondamentaux de ce modèle, soit l'interdépendance des deux NBD de Cdr2p (mise en évidence par la mutation K899C et la co-expression des moitiés qui est nécessaire à la formation d'un transporteur actif) ainsi que la liaison du substrat par chaque moitié de Cdr2p (exprimées indépendamment, donc inactives), indiquant que la liaison du substrat ne nécessite pas, et peut donc précéder, l'interaction entre les deux NBD et l'hydrolyse subséquente de l'ATP.

Deux méthodes sont couramment utilisées pour évaluer l'activité ATPase des transporteurs ABC. La première méthode, nommée « test colorimétrique », est basée sur la quantification du phosphate inorganique relâché par le transporteur ABC (purifié ou présent en grande quantité dans un extrait protéique), suite à une réaction d'hydrolyse en utilisant le Mg•ATP comme substrat. La détection du phosphate s'effectue par une réaction colorimétrique (voir les sections « Experimental » et « Results » du Chap. 3). Lorsque le transporteur ABC n'est pas purifié, un inhibiteur spécifique est ajouté à certains échantillons afin de distinguer l'activité du transporteur des protéines ATPases contaminantes. La différence d'activité ATPase en absence versus en présence de cet inhibiteur est considérée comme l'activité spécifique du transporteur. Le phosphate initialement présent dans les solutions ou l'extrait protéique est quantifié au temps « 0 min » et est soustrait de l'activité spécifique du transporteur. L'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) est souvent utilisé comme inhibiteur d'ATPase chez les transporteurs ABC (Urbatsch *et al.*, 1995). Cependant, il a été déterminé que même si les activités ATPases de Pdr5p et Cdr1p sont partiellement sensibles au vanadate, l'oligomycine est aussi un inhibiteur efficace et très spécifique à ce type de protéine, résultant en une meilleure discrimination avec l'activité ATPase de la pompe à proton membranaire Pma1p (Decottignies *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2001). L'oligomycine est un antibiotique de type macrolide (peptide cyclique) qui se lie à l'ATP synthétase, ce qui bloque le

métabolisme mitochondrial. Ce composé inhibe de manière compétitive le transport de la Rh6G par Pdr5p, ce qui suggère une interaction directe avec ce transporteur ABC (Kolaczowski *et al.*, 1996). En utilisant le protocole développé pour Cdr1p, nous avons découvert une activité ATPase oligomycine-dépendante pour Cdr2p, dont l'intensité est similaire à celle rapportée pour Cdr1p (Figure 3-5) (Nakamura *et al.*, 2001). Ainsi, comme Pdr5p et Cdr1p, Cdr2p est également une ATPase active, malgré la présence de résidus atypiques dans ses deux NBD (Figure 1-11). De plus, nos résultats indiquent que la Cys191 n'est pas essentielle à l'activité hydrolytique de Cdr2p, puisque les mutants C191K et C191A hydrolysent l'ATP aussi efficacement que le Cdr2p sauvage. Il n'a pas été possible, avec ce test colorimétrique, de quantifier l'activité ATPase chez des extraits de membranes contenant les moitiés de Cdr2p, qu'elles soient exprimées seules ou en combinaison. Ainsi, avec les conditions actuelles, ce test ne nous permet pas de déterminer la contribution relative de chaque NBD à l'activité ATPase de Cdr2p.

Une deuxième méthode permettant de mesurer l'activité hydrolytique d'un transporteur ABC est le test de blocage des nucléotides (nucleotide-trapping). Le vanadate est utilisé régulièrement dans ce genre de test (Urbatsch *et al.*, 1995). Par contre, le fluorure de béryllium (BeFx) s'est montré supérieur au vanadate dans le cas de Cdr2p (données non-publiées). Le BeFx est un analogue chimique du phosphate, et tout comme l'ion vanadate, il prend la position du γ -phosphate relâché suite à l'hydrolyse de l'ATP et a pour effet de stabiliser l'ADP dans le site actif (Sankaran *et al.*, 1997). Ce test s'effectue en conditions d'hydrolyse avec le dérivé photoactivable $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$ comme substrat. Les complexes stabilisés protéine• $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ADP}$ •BeFx subissent un lavage par centrifugation, suivi d'un photomarquage aux rayons UV et d'une migration sur gel. En absence de BeFx, le $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ADP}$ se dissocie plus rapidement de l'ATPase, ce qui cause un signal radioactif moins intense. Ce test de nucleotide-trapping est très sensible, puisque qu'en théorie, il permet de détecter un seul événement d'hydrolyse et il bloque le transporteur dans un état post-hydrolytique, ce qui peut être utile pour vérifier d'autres paramètres biochimiques durant cette étape précise du cycle catalytique (ex : la liaison des substrats). Aussi, la séparation sur gel permet de visualiser l'activité hydrolytique de la protéine d'intérêt, sans avoir recours à sa purification. Nous avons déterminé que le Cdr2p sauvage possède une

activité de nucleotide-trapping (à 37°C) qui est dépendante du BeFx et du Mg^{++} , et qui est diminuée à 4°C ou en présence d'oligomycine (données non-publiées). Cependant, les différents mutants Cdr2p qui sont inactifs selon les tests de résistance, d'accumulation de Rh6G ou le test d'ATPase colorimétrique (K899C, K899A) possèdent également une activité de nucleotide/BeFx-trapping qui est similaire au Cdr2p sauvage (de 70±20% à plus de 100%). Une telle disparité a été observée auparavant avec des mutants inactifs de la P-gp qui possèdent une activité en nucleotide-trapping. Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène; i) une étape du cycle catalytique subséquente à l'hydrolyse est déficiente chez ces mutants, par exemple une capacité réduite à relâcher le nucléotide diphosphate, ou ii) ces mutants peuvent effectuer un premier cycle catalytique, mais ne peuvent entrer dans un deuxième cycle, réduisant ainsi grandement l'activité ATPase et le transport des substrats (Sauna *et al.*, 2002; Carrier *et al.*, 2003). Dans notre cas, en considérant que i) le NBD2 de Cdr2p ne puisse être photomarké efficacement par le $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$, malgré des motifs traditionnels de liaison aux nucléotides et ii) des mutations de la Lys899 conservée du NBD2 inactivent le transporteur, nous suggérons que même si ce dérivé peut être utilisé par Cdr2p, il ne représente pas adéquatement les interactions moléculaires entre l'ATP naturel et Cdr2p. Une hypothèse alternative serait que le NBD2 possède une très forte activité ATPase qui n'est pas ralentie de façon significative à 4°C ou par le BeFx.

Malgré les limites du test de nucleotide-trapping pour étudier l'hydrolyse de l'ATP par Cdr2p, l'intérêt principal de cette technique est sa capacité d'évaluer indépendamment les deux moitiés de Cdr2p, ces dernières ayant des poids moléculaires différents. La Figure 4-3A montre que la co-expression des deux-moitiés est nécessaire pour détecter le blocage du $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ADP}$ au NBD1 (colonnes N vs N+C ; données non-publiées). Ce résultat suggère que le NBD1 sauvage possède une activité ATPase qui est dépendante de la présence du NBD2. La faible efficacité du photomarkage de la moitié C-terminale par le $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$ rendait impossible la visualisation de l'hydrolyse au NBD2 par cette technique (Figure 4-3B). Ce test de nucleotide-trapping dévoile aussi une conséquence intéressante de la mutation C191K au niveau moléculaire. En effet, cette mutation, qui rétabli la séquence consensus du motif Walker A, cause une rétention du nucléotide

radioactif au NBD1 de manière indépendante du BeFx, autant dans le contexte d'une mutation simple ou double (Figure 4-3A, colonnes N*+C et N*+C*, - BeFx). La mutation C191A ne cause pas cet effet (données non publiées). Un phénomène similaire avait été observé précédemment avec des variantes mutées de P-gp, MRP1 et BmrA, chez lesquelles le résidu Glu suivant le motif Walker B est muté pour Gln ou Asp (Sauna *et al.*, 2002; Carrier *et al.*, 2003; Orelle *et al.*, 2003; Payen *et al.*, 2003). Une étude plus poussée de ces mutations chez P-gp démontre que celles-ci ont plutôt tendance à affecter la formation de l'interface normale entre les deux NBD, ce qui réduit la cinétique (turnover) de l'activité ATPase (Tomblin *et al.*, 2004a; Tomblin *et al.*, 2004b). Alors que le double mutant C191K/K899C est totalement inactivé (ATPase, accumulation de Rh6G et résistance), la mutation simple C191K au NBD1 n'entraîne pas de perte importante d'activité ATPase, ni de transport de Rh6G, mais affecte partiellement la résistance au fluconazole (Figures 3-1 et 3-5). Même si nous n'avons pas déterminé expérimentalement si le nucléotide retenu a été hydrolysé ou non ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ADP}$ ou $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$), nous pouvons néanmoins conclure que i) la rétention constitutive de nucléotide par le NBD1 C191K n'explique pas à elle seule la perte d'activité du Cdr2p C191K/K899C et ii) un changement d'affinité pour les nucléotides aux NBD1 (augmentation par la mutation C191K et diminution pour C191A) entraîne une modification dans l'interaction de Cdr2p avec ses substrats, probablement via un changement dans la communication NBD-TMD. La mutation K899C semble affecter négativement le « trapping » au NBD1 sauvage (Figure 4-3A, colonne N+C*). Cependant, compte tenu que les niveaux de trapping au NBD1 ne corrèlent pas avec l'activité ATPase de Cdr2p tel que quantifiée par le test colorimétrique avec l'ATP naturel, il serait hasardeux d'utiliser ce résultat pour expliquer la perte totale d'activité causée par la mutation K899C au NBD2.

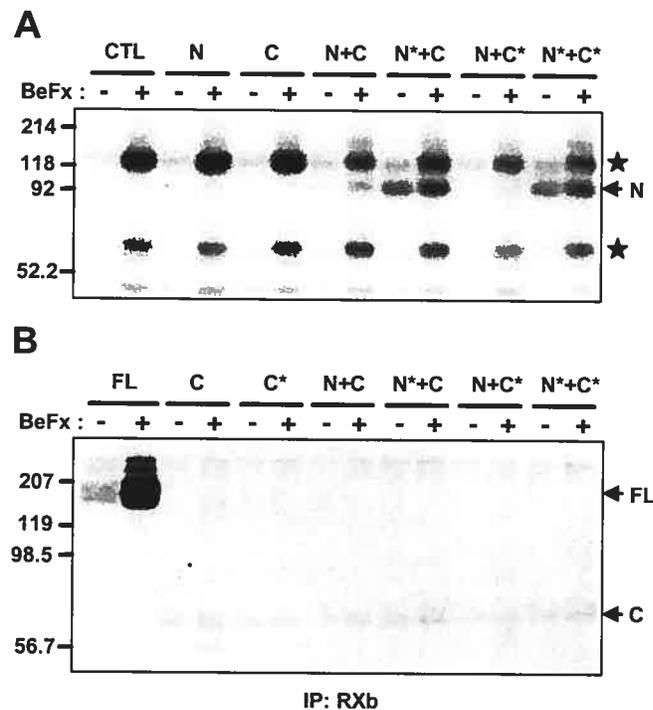


Figure 4-3 : Blocage des nucléotides di-phosphates par le béryllium fluoride (BeFx-trapping). Une augmentation du signal en présence de BeFx indique une hydrolyse du $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$ en $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ADP}$ par la protéine marquée. **(A)** BeFx-trapping à la moitié N-terminale de Cdr2p. Des extraits de membranes totales (25 μg) provenant de la souche contrôle (CTL), de cellules exprimant le Cdr2p sauvage pleine-longueur (FL) ou les moitiés N- et/ou C-terminales (N* contient la mutation C191K; C* contient la mutation K899C) ont été pré-incubés dans une solution de marquage avec (+) ou sans (-) BeFx pendant 3 min à 37 °C. La réaction fut initiée par l'ajout de 10 μM de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$, poursuivie pendant 10 min à 37 °C et stoppée en plaçant les tubes sur eau-glace (2 °C). Les nucléotides radioactifs non-incorporés ont été retirés suite à une centrifugation à haute vitesse. Les culots de protéines ont été nettoyés, puis solubilisés avec de la solution fraîche et ensuite irradiés aux rayons UV. Les protéines marquées furent séparées par SDS-PAGE (gel 10%). La flèche indique la position de la moitié N-terminale. Les étoiles indiquent des protéines ATPase endogènes de *S. cerevisiae* dont une qui migre à la position attendue pour la moitié C-terminale de Cdr2p (environ 73 kDa). **(B)** BeFx-trapping à la moitié C-terminale. Les échantillons ont été manipulés comme en A, mais avec 250 μg de protéines membranaires et 15 μM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$. Après lavage et photomarquage, les échantillons ont été soumis à une immunoprécipitation (IP) avec l'anticorps RXb (anti-Cdrp générique, reconnaissant la portion COOH de Cdr2p). Les complexes immuns ont été séparés par SDS-PAGE (gel 7.5%).

On sait que les NBD des transporteurs ABC sont identiques à plus de 30% des bactéries jusqu'à l'homme (Figure 1-5 et 4-1). De plus, plusieurs transporteurs ABC fonctionnent avec deux copies du même NBD (les deux sous-unités étant encodées par le même polypeptide). Avec 26% d'identité en a.a., les deux NBD des protéines PDR/CDR présentent un niveau d'homologie parmi les plus faibles dans la superfamille des transporteurs ABC. En plus de la substitution Lys à Cys dans le motif A du NBD1, les protéines fongiques PDR/CDR possèdent d'autres déviations importantes dans le motif B du même NBD1 (IQCWDN au lieu de $\phi\phi\phi\phi$ DE; voir Figure 1-11). La Gln étant un résidu hydrophile et non hydrophobe, alors que l'Asn occupe la position d'un Glu fortement conservé, qui serait impliqué dans la réaction catalytique (Orelle *et al.*, 2003; Tomblin *et al.*, 2004a). Parallèlement, le motif signature du NBD2 présente aussi d'importantes substitutions (LNVEQ au lieu de LSGGQ), dont la deuxième glycine du motif consensus qui est particulièrement importante, puisqu'invariablement conservée. La mutagenèse dirigée de cette glycine occasionne une perte totale d'activité ATPase chez une variété de protéines ABC (Schmees *et al.*, 1999; Loo *et al.*, 2002; Szentpetery *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004b). Pourtant, les transporteurs PDR/CDR sont clairement actifs. Selon les connaissances actuelles sur la structure et le fonctionnement des transporteurs ABC (Oswald *et al.*, 2006), il est difficile de concevoir, d'un point de vue moléculaire, comment s'effectue la liaison et l'hydrolyse des nucléotides chez ces pompes à efflux fongiques.

La présence de résidus atypiques dans les motifs impliqués dans l'interaction avec l'ATP est surprenante, mais pas exceptionnelle. En effet, un petit groupe de transporteurs ABC bactériens (importeurs de sucres, ex : RbsA, AraG, XylG) possède soit une glutamine ou une arginine à la place de la lysine dans le motif Walker A du NBD situé en position C-terminale (NBD2). Comme dans le cas des transporteurs ABC fongiques du sous-groupe PDR/CDR, la dégénérescence des motifs A et B dans un NBD est invariablement associée à des déviations importantes dans le motif signature de l'autre NBD du même transporteur. Cette observation a mené à un premier modèle de dimérisation des NBD (Jones et George, 1999), fort semblable à celui qui a été observé expérimentalement grâce aux structures 3D de Rad50 et de MJ0796 (Hopfner *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002). L'agencement des déviations dans les motifs importants pour l'interaction avec l'ATP chez ces transporteurs

corrèle donc très bien avec la formation d'une dimérisation des deux NBD dans la configuration « ATP sandwich » (Smith *et al.*, 2002). Cette dimérisation dans laquelle le motif signature (lobe II) vient compléter le site de liaison contenu dans le NBD adjacent suite à la liaison de deux molécules d'ATP (voir Figure 1-6) a non seulement été observée lors de la cristallisation de transporteurs ABC complets (Locher *et al.*, 2002; Chang, 2003), mais elle est aussi supportée par des données biochimiques (Qu et Sharom, 2001; Fetsch et Davidson, 2002; Loo *et al.*, 2002). Cet agencement qu'adoptent les NBD lors du cycle catalytique explique à la fois la nécessité pour un transporteur ABC d'avoir deux NBD fonctionnels, ainsi que l'observation d'une forte coopérativité entre les deux NBD (Azzaria *et al.*, 1989; Senior et Bhagat, 1998) et est en accord avec le postulat d'un mécanisme catalytique fonctionnant en alternance (Senior *et al.*, 1995; Higgins et Linton, 2004; Tomblin *et al.*, 2005). Notre caractérisation de l'interaction de Cdr2p avec la rhodamine et l'ATP, particulièrement dans le contexte de la co-expression de ses deux moitiés, indique effectivement que les deux NBD coopèrent étroitement et que l'intégrité du motif A dans le NBD2 est particulièrement importante pour l'activité enzymatique du transporteur.

C. Purification du NBD1 de Cdr1p et mutagenèse Cys/Lys chez Cdr1p

En utilisant une technique similaire à celle ayant permis la caractérisation de l'activité hydrolytique de Pdr5p et de Yor1p (Decottignies *et al.*, 1994; Decottignies *et al.*, 1998), une activité NTPase a pu être démontrée pour Cdr1p lorsque cette protéine est surexprimée de manière hétérologue dans la souche AD1-8 de *S. cerevisiae* dans laquelle sept transporteurs ABC endogènes ont été délétés (Nakamura *et al.*, 2001). Comme pour Pdr5p, l'activité NTPase de Cdr1p est maximale à pH 7.5 et est sensible à l'oligomycine. Une publication du laboratoire du Dr Prasad présentait le résultat d'un test d'hydrolyse d'ATP montrant une quantité plus importante de phosphate inorganique libérée par les membranes de transformants *CDR1*, *CDR2* et *CDR3* par rapport aux membranes provenant de la souche contrôle (Smriti *et al.*, 2002). Cependant, les niveaux de protéines n'ont pas été comparés, ce qui rend difficile la comparaison d'activité enzymatique entre ces trois transporteurs. Alors que ces études confirmaient que les transporteurs Cdrp possèdent effectivement une activité hydrolytique malgré un motif Walker A divergent, elles ne

fournissaient pas d'information quant aux contributions relatives des deux NBD à cette activité et au processus de transport des agents antifongiques.

Durant la préparation du manuscrit présenté au Chapitre 3, le NBD1 de Cdr1p a été exprimé chez *E. coli* et purifié par le groupe du Dr Prasad. Les auteurs de cette étude ont montré que ce domaine isolé (a.a. 2-512) peut lier un dérivé fluorescent de l'ATP (TNP-ATP) et peut hydrolyser l'ATP *in vitro* (Jha *et al.*, 2003a). De plus, la mutation de la Cys193 (correspondant à la Cys191 de Cdr2p) pour une alanine résulte en une perte quasi-complète de l'ATPase (diminution de 95%), sans toutefois affecter la liaison du TNP-ATP. Cette activité ATPase du NBD1 isolé, mesurée en absence des TMD et d'un environnement lipidique, est de 2 à 3 fois plus faible que celle du transporteur Cdr1p complet. Cette découverte entre en contradiction avec nos résultats de résistance aux antifongiques qui indiquent que le NBD1 et le NBD2 doivent être réunis pour que Cdr2p soit actif (Figure 2-3), ainsi qu'avec notre test d'ATPase colorimétrique qui n'indique aucune activité spécifique pour la moitié N-terminale de Cdr2p (données non-publiées). Si l'on tient compte du modèle de la dimérisation en « ATP sandwich », l'hydrolyse par le NBD1 purifié de Cdr1p impliquerait une homodimérisation de ce domaine (NBD1•NBD1). Cet événement pourrait se produire artificiellement *in vitro* en absence des domaines transmembranaires, mais pour que deux NBD1 puissent interagir *in vivo*, une dimérisation du transporteur Cdr1p complet serait nécessaire. Cette possibilité a d'ailleurs été évoquée pour Pdr5p (Subba *et al.*, 2002; Ferreira-Pereira *et al.*, 2003) et ABCG2 (Xu *et al.*, 2004). Une association Cdr1p•Cdr2p pourrait être possible, mais ne serait assurément pas obligatoire, puisque i) l'expression hétérologue d'un seul gène est suffisante pour conférer des niveaux élevés de résistance et ii) notre résultat de la co-expression *CDR1+CDR2* (Figure 2-4b) montre un effet additif sur la résistance et non pas synergique. Il faut aussi considérer que nos expériences ont été effectuées avec les moitiés N- et C-terminales de Cdr2p et non pas avec les NBD isolés. Ainsi, la divergence des résultats obtenus avec le NBD1 isolé et le système de demi-transporteur (NBD1-TMD1) peut provenir d'un contrôle allostérique par le TMD, qui n'intervient pas lorsque ce domaine est absent. Dans un article suivant, Jha et coll. ont muté les cinq cystéines présentes dans le NBD1 de Cdr1p pour démontrer que seule Cys193 est importante pour l'ATPase intrinsèque du domaine purifié

et pour sa sensibilité au N-éthylmaléimide, un composé qui réagit spécifiquement avec les cystéines (Jha *et al.*, 2003b). Une modélisation moléculaire de la structure du NBD1 de Cdr1p a également été effectuée pour montrer que cette Cys193 se situerait à proximité de l'ATP (2.8 et 4.6 Å des β - et γ -phosphates, respectivement), indiquant que ce résidu pourrait interagir avec le nucléotide (Jha *et al.*, 2003b). Nous avons également effectué une modélisation des NBD de Cdr2p et nos conclusions sont quelque peu différentes (voir la section suivante).

Ces mêmes auteurs ont effectué une étude *in vivo* similaire à la nôtre, visant à examiner la contribution relative des deux NBD à l'interaction avec l'ATP et au transport dans la protéine Cdr1p complète (Jha *et al.*, 2004). Ils ont utilisé une fusion Cdr1p-GFP afin de caractériser les mutations C193K et K901C. Ces auteurs ont découvert, comme nous avec les mutations équivalentes chez Cdr2p, que les deux NBD répondent de façon asymétrique aux substitutions de ces résidus; la présence d'une cystéine dans le NBD2 (K901C) n'étant pas tolérée par Cdr1p. Tandis que cette conclusion générale supporte la nôtre, des différences importantes ont été obtenues entre le mutant Cdr1p C193K et Cdr2p C191K. En effet, chez Cdr1p, la mutation C193K diminue d'au moins 75% la résistance aux quatre composés testés (FLC, anisomycine, miconazole et cycloheximide) et diminue de 78% l'activité ATPase du transporteur (Jha *et al.*, 2004). En contraste, la mutation correspondante chez Cdr2p (C191K) n'affecte nullement l'activité ATPase (Figure 3-5) et diminue la sensibilité au FLC de 50% tout au plus, sans toutefois affecter la résistance à la Rh6G (Figure 3-1). Jha et coll. interprètent que la Cys193 est critique au fonctionnement de Cdr1p, alors que nous postulons que cette cystéine atypique n'est pas essentielle pour le transport des antifongiques chez le sous-groupe PDR/CDR (voir Discussion du Chapitre 3). Cette affirmation est supportée non seulement par les mutants Cdr2p C191K et C191A, qui conservent leur pleine capacité au niveau d'efflux de rhodamine et d'ATPase, mais également par un mutant Pdr5p C199Y, qui conserve un phénotype MDR semblable au Pdr5p sauvage (Egner *et al.*, 1998). Ainsi, soit Cdr1p et Cdr2p diffèrent dans leur mode de fonctionnement, cette hypothèse étant plausible selon notre étude présentée au Chapitre 2, soit la présence du marqueur GFP affecte les propriétés biochimiques de Cdr1p, tel que mentionné dans l'étude suivante (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003b).

D. Modélisation moléculaire

Des études spectroscopiques et cristallographiques ont permis d'attribuer trois rôles essentiels à la lysine du motif Walker A, soit; i) d'orienter la chaîne triphosphate du nucléotide dans une conformation permettant l'hydrolyse, ii) de stabiliser l'état transitoire de la réaction et iii) de maintenir la conformation de cette boucle de liaison aux phosphates (Byeon *et al.*, 1995; Krell *et al.*, 2001). L'azote de la chaîne principale de cette lysine, de même que le groupement amine de la chaîne latérale, établissent des interactions électrostatiques avec les phosphates β et γ de l'ATP (Figure 1-6 et (Hung *et al.*, 1998; Davidson et Chen, 2004)).

Pour obtenir une meilleure idée du rôle joué par la Cys191 dans Cdr2p et pour avoir un aperçu de la configuration des sites actifs au niveau atomique, nous avons effectué une modélisation moléculaire des deux NBD liant deux molécules d'ATP, dans un arrangement dimérique similaire à celui du mutant E171Q de MJ0796 (Figure 4-4). Cet exercice montre que même si les structures du NBD1 et NBD2 de Cdr2p ont été modélisées à partir de la même structure (soit HlyB; (Schmitt *et al.*, 2003)), les variations de séquences entre les deux domaines entraînent des différences majeures dans les interactions moléculaires au niveau des deux sites actifs (Figure 4-5). En effet, la molécule d'ATP qui est liée au NBD1 (composé des motifs A, B et H-loop divergents) est stabilisée par plusieurs ponts hydrogènes contribués par le motif signature divergent (LNVEQ) du NBD2, d'une façon similaire à la structure illustrée à la Figure 1-6. D'un autre côté, la séquence signature (VSSGE) du NBD1 semble trop éloignée pour interagir avec l'ATP lié par les résidus typiques du NBD2.

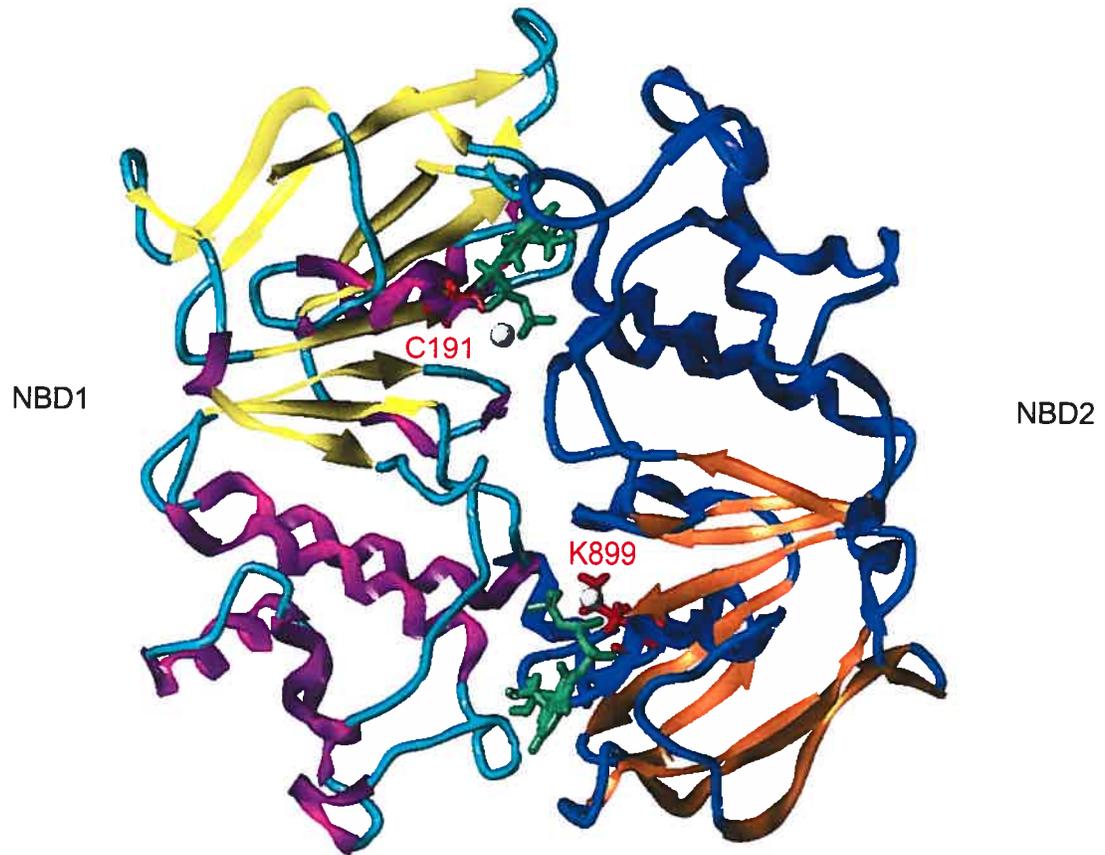


Figure 4-4 : Modélisation moléculaire des deux NBD de Cdr2p. Les structures tertiaires du NBD1 et du NBD2 ont chacune été modélées en utilisant le programme SYBYL v.6.9.1 (Tripos Assoc.) d'après les coordonnées de la structure du NBD de *E. coli* HlyB (Protein Data Bank # 1mt0; www.rcsb.org), à cause de la similarité de séquence entre ce domaine et ceux de Cdr2p. La configuration quaternaire des deux NBD est basée sur celui du mutant E171Q de *Methanococcus jannashii* MJ0796 (PDB # 1j2t). Une simulation thermodynamique a été effectuée afin de s'assurer de la stabilité du modèle. Les résidus C191 et K899 sont identifiés en rouge. Les deux molécules d'ATP sont colorées en vert. Les sphères grises représentent les atomes de Na⁺ obtenus lors de la cristallisation de MJ0796, mais qui serait normalement des atomes de Mg⁺⁺ *in vivo* (Smith *et al.*, 2002). Cette modélisation et la figure ont été produites par Brian Wilkes (IRCM; Laboratoire de biologie chimique et polypeptides, Dr Peter Schiller).

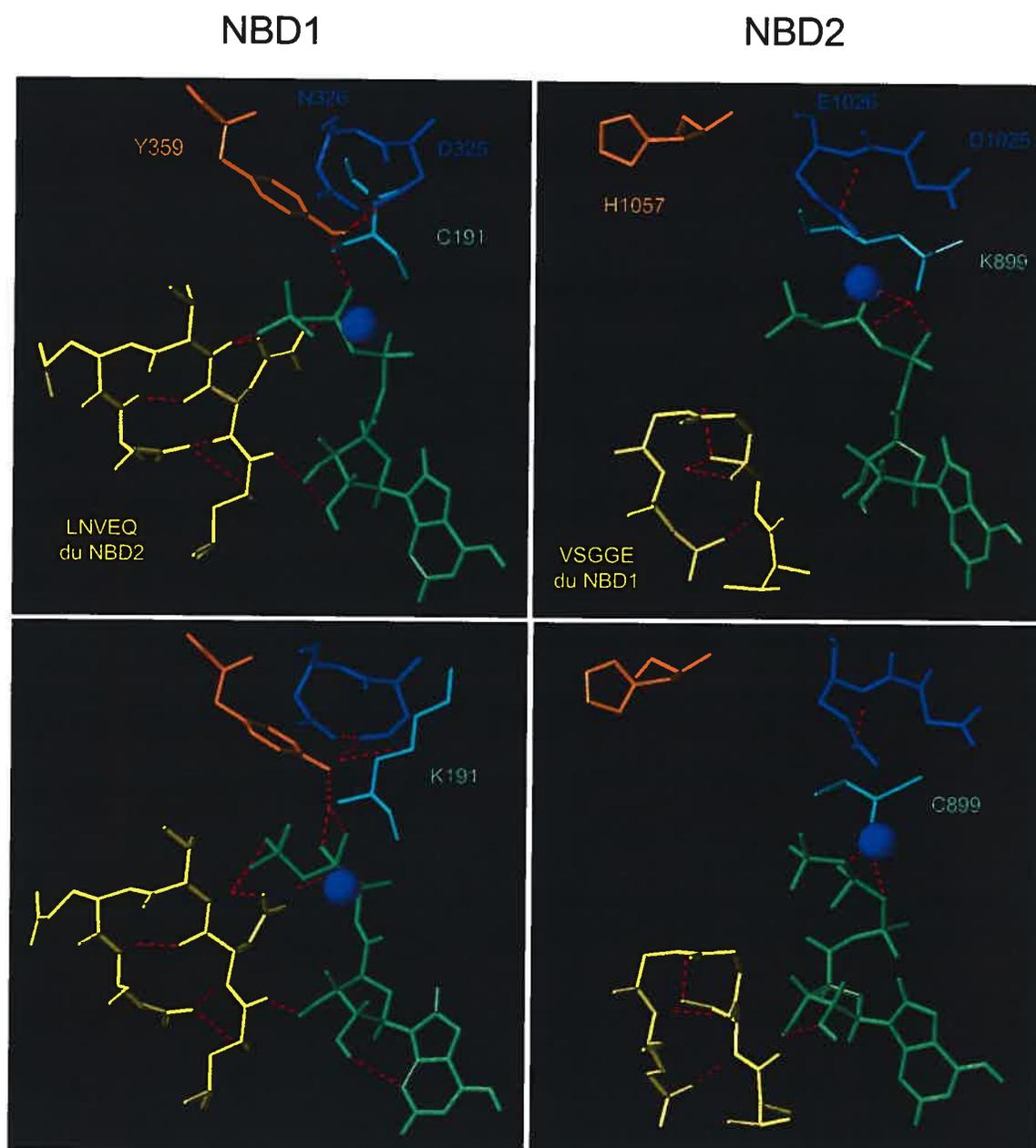


Figure 4-5 : Les interactions moléculaires aux sites actifs du NBD1 et NBD2 et l'impact des mutations C191K et K899C. Seulement les résidus importants sont représentés. L'ATP est en vert et le cation agissant comme cofacteur est en mauve (dans cette modélisation, un atome de Na⁺). Les lignes pointillées rouges représentent les ponts hydrogènes.

À première vue, il paraît étonnant que des liens électrostatiques typiques, tels que décrits pour la plupart des NBD cristallisés (Davidson et Chen, 2004; Oswald *et al.*, 2006), soient coordonnés par les résidus atypiques du NBD1, conjointement avec la signature divergente du NBD2, tandis que l'ATP lié au NBD2 semble si peu stabilisé par les résidus conservés qui forment ce site. Il ne faut pas oublier que sans purification de la protéine d'intérêt, cette modélisation *in silico* est un exercice purement théorique et que même si elle représente correctement la véritable structure tridimensionnelle des NBD des Cdr2p, elle ne montre qu'un état statique parmi plusieurs états transitoires adoptés au cours du cycle catalytique. Néanmoins, cette capacité du motif signature du NBD2 à stabiliser l'ATP au NBD1 et inversement, le manque relatif d'interaction au site du NBD2, corrélerent bien avec les résultats de photomarquage montrant une liaison plus forte du $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$ à la moitié N-terminale (NBD1), par rapport à la moitié C-terminale (NBD2 ; Figure 3-4). Il est important de noter la proximité de la Tyr359 atypique du NBD1 avec les phosphates β et γ . Cette tyrosine, qui est présente uniquement chez les transporteurs fongiques PDR/CDR, occupe la position normalement attribuée à l'histidine fortement conservée du H-loop. Un modèle très récent propose que cette histidine conservée du H-loop serait le résidu le plus important lors de l'hydrolyse de l'ATP, polarisant la molécule d'eau catalytique, alors que le glutamate suivant le motif Walker B agirait comme plateforme pour coordonner la position de l'histidine (Zaitseva *et al.*, 2005b; Hanekop *et al.*, 2006). Il est donc particulièrement intéressant de voir que dans le NBD1 de notre modélisation de Cdr2p, les résidus correspondants (Tyr359 et Asn326) semblent positionnés adéquatement pour accomplir ces rôles, alors que ce n'est pas le cas pour ceux du NBD2 (His1057 et Glu1026 ; Figure 4-5).

Pour ce qui est du rôle joué par la Cys191 atypique, notre modélisation ne fournit pas d'explication claire, puisque la chaîne latérale de ce résidu pointe dans la direction opposée aux phosphates de l'ATP (à plus de 90°). Les atomes de la chaîne principale de cette cystéine seraient donc plus importants au maintien de la configuration du P-loop et à la stabilisation de l'ATP que sa chaîne latérale et son groupement sulfhydryle. Ceci apporterait donc une explication quant à la faible exigence pour les acides aminés à cette

position dans le NBD1 de ce type de transporteur ABC. Contrairement à la Cys191, la chaîne latérale de la Lys899 est orientée près des phosphates de l'ATP au NBD2, d'une manière semblable aux lysines conservées dans les diverses structures publiées. Sans données biochimiques ou cristallographiques additionnelles, la raison de la perte d'hydrolyse des mutants K899C et K899A demeure également nébuleuse. Néanmoins, il est possible d'avancer l'explication suivante; alors que la Cys191 n'aurait qu'un rôle structural, la Lys899 conservée du NBD2 jouerait, en plus de son rôle structural, un rôle catalytique, comme par exemple la stabilisation d'un état transitoire intermédiaire. Cette hypothèse serait en accord avec l'étude cristallographique de Krell et coll. portant sur le mutant K15M de la shikimate kinase (Krell *et al.*, 2001).

E. Mécanisme catalytique potentiel

Les informations acquises dans le cadre de mon étude des NBD de Cdr2p et celles obtenues sur Cdr1p par l'équipe du Dr Prasad sont encore limitées et il est difficile, sur ces bases, de proposer un modèle solide du fonctionnement de ces transporteurs fongiques. Même pour la P-gp des mammifères, qui fait l'objet d'études biochimiques depuis plus de 20 ans, plusieurs aspects du modèle de translocation des substrats et de l'hydrolyse de l'ATP sont encore controversés (voir Chapitre 1, section II.A.3 et (Jones et George, 2004; Higgins et Linton, 2004; Callaghan *et al.*, 2006)). En effet, deux modèles d'association des NBD et d'hydrolyse d'ATP s'affrontent présentement; soit celui des sites catalytiques fonctionnant en alternance et celui de la « clampe processive ». Dans le premier modèle, proposé initialement par (Senior *et al.*, 1995) et confirmé par les résultats de (Tomblin *et al.*, 2005), les deux NBD s'associent uniquement lorsque deux ATP sont liés aux sites catalytiques. L'hydrolyse d'une première molécule d'ATP entraîne une dissociation partielle des NBD et le relâchement de l'ADP. Les NBD se dimérisent à nouveau suite à la liaison d'une nouvelle molécule d'ATP pour hydrolyser l'ATP qui était lié à l'autre site catalytique. La dissociation des NBD et l'échange de cet ADP pour l'ATP complètent le cycle. Dans le modèle de la clampe processive, la liaison de deux ATP entraîne également la dimérisation des NBD, mais ceux-ci restent en contact pendant l'hydrolyse séquentielle des deux molécules d'ATP. Les NBD se dissocient ensuite, suivi de la dissociation des

deux ADP. Ce deuxième modèle a été avancé par l'équipe du Dr Tampé (Janas *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003b; van der et Tampe, 2004) et est aussi supporté par les données de (Zaitseva *et al.*, 2005b). Ainsi, pour le moment, on ne peut que spéculer sur le mécanisme catalytique de transporteurs ABC contenant des NBD fortement asymétriques et comportant des motifs atypiques. De plus, l'observation que l'ajout de substrats aux transporteurs PDR/CDR n'induit aucune stimulation significative d'activité ATPase souligne vraisemblablement une divergence mécanistique importante vis-à-vis les autres transporteurs ABC de type MDR (Decottignies *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2001; Shukla *et al.*, 2006).

À l'heure actuelle, il nous est impossible de rejeter l'hypothèse qu'un des deux NBD des transporteurs PDR/CDR soit catalytiquement inactif, du point de vue de l'hydrolyse de l'ATP. Cette hypothèse étant basée sur les substitutions non-conservatives des résidus reconnus comme essentiels au mécanisme catalytique (Figure 1-11) (Jones et George, 1999; Orelle *et al.*, 2003; Zaitseva *et al.*, 2005a). Naturellement, les auteurs de ces publications pointent du doigt le NBD1 divergent. Par contre, mon étude de Cdr2p, montre que le NBD1 possède la capacité de lier un dérivé photoactivable de l'ATP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$) et qu'il possède la capacité d'hydrolyser le γ -phosphate de ce dérivé selon le test de « nucleotide-trapping ». D'autres chercheurs ont également montré une activité ATPase pour le NBD1 isolé de Cdr1p (Jha *et al.*, 2003a). D'un autre côté, il n'a pas été possible de visualiser l'hydrolyse au NBD2, à cause de la difficulté à photomarquer ce domaine avec le $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{8N}_3\text{ATP}$. Ce résultat peut simplement provenir du positionnement particulier des résidus dans ce domaine, qui empêche le groupement azido du dérivé d'établir un lien covalent suite au rayonnement UV, mais peut également représenter une véritable incapacité du NBD2 à lier l'ATP non-modifié (ou du moins, une affinité très faible du NBD2 pour l'ATP). Pourtant, la mutation de la lysine conservée du NBD2 (Lys899) a pour effet d'abolir l'activité ATPase du transporteur complet. Ainsi, serait-il possible que l'hydrolyse au NBD1 dépende uniquement de l'intégrité physique du NBD2 et d'une association avec celui-ci, sans que le NBD2 n'ait à lier et/ou hydrolyser l'ATP ? D'un autre côté, il se pourrait que le NBD1 doive lier fortement son nucléotide, afin de permettre l'association avec le NBD2 et subséquemment, une hydrolyse rapide au NBD2

(qui n'est pas quantifiable avec le dérivé [α - ^{32}P]8N₃ATP). Ce genre de modèle est d'ailleurs avancé pour expliquer les observations d'une asymétrie structurale et fonctionnelle chez les transporteurs humains MRP1 (Payen *et al.*, 2005), ABCG5/G8 (Zhang *et al.*, 2005) et ABCA4 (ABCR) (Ahn *et al.*, 2003). En effet, il a été déterminé pour ces transporteurs que les deux NBD n'avaient pas la même affinité pour les nucléotides, ni la même capacité à hydrolyser l'ATP. Également, la mutagenèse dirigée des motifs importants chez ces transporteurs ABC fournit essentiellement des résultats similaires aux nôtres, c'est-à-dire que les mutations de résidus conservés abolissent les activités d'ATPase et de transport des substrats, tandis que les mutations des résidus atypiques n'affectent que partiellement la fonction du transporteur (Zhang *et al.*, 2005; Payen *et al.*, 2005). Il est alors postulé, par exemple chez MRP1, que le rôle du site catalytique formé par les motifs atypiques (soit les motifs Walker A et B du NBD1, et complété par le motif signature du NBD2) serait de lier fortement l'ATP afin de permettre au NBD2 de lier, puis d'hydrolyser un autre ATP. Quant à savoir si le NBD1 doit hydrolyser et relâcher son nucléotide, suite à la libération de l'ADP et du P_i par le NBD2, pour redémarrer le cycle catalytique, cet aspect demeure spéculatif (Deeley *et al.*, 2006).

Un autre transporteur ABC humain dont les deux NBD sont fonctionnellement asymétriques est CFTR. En effet, il a été démontré que le NBD1 de CFTR lie préférentiellement le 8-azido-ATP (Szabo *et al.*, 1999). La liaison du nucléotide s'effectue au NBD1 en condition d'hydrolyse autant en présence qu'en absence de vanadate, alors que le blocage de nucléotide au NBD2 apparaît plus faiblement et uniquement en présence de vanadate. Ces observations ont été confirmées par d'autres chercheurs et un modèle similaire à celui de MRP1 a été élaboré pour CFTR, c'est-à-dire qu'une hydrolyse et un échange rapide du nucléotide se produirait au NBD2, alors que le photomarquage plus intense au NBD1 indique que l'activité hydrolytique à ce domaine serait négligeable (Aleksandrov *et al.*, 2002; Hanrahan et Wioland, 2004). Autant chez CFTR que les transporteurs Cdrp, l'absence de résidus conservés dans le NBD1, notamment le résidu carboxyl (Glu ou Asp) suivant le motif Walker B et l'histidine du « H-loop » pourrait expliquer la faible activité ATPase au NBD1 (Zaitseva *et al.*, 2005b). Ainsi, l'activité ATPase au NBD1 de CFTR ou de Cdr1p/Cdr2p qui est observée lorsque ce domaine est

isolé (Duffieux *et al.*, 2000; Jha *et al.*, 2003a), pourrait être artéfactuelle, notamment via une homodimérisation du NBD1. On peut évidemment postuler que le cycle catalytique des transporteurs Cdrp soit similaire à celui décrit pour MRP1 et CFTR, mais les résultats accumulés à jour pour ces protéines fongiques ne nous permettent pas de confirmer cette hypothèse. De plus, la découverte récente indiquant que CFTR fonctionne comme une adénylate kinase et non pas une ATPase (Gross *et al.*, 2006) nous rappelle que l'étude des transporteurs ABC peut nous dévoiler encore bien des surprises.

III. Implication clinique et conclusion générale

Depuis vingt-cinq ans, l'apparition du SIDA et certaines percées technologiques médicales ont eu pour conséquence d'augmenter dramatiquement les cas d'infections fongiques dues aux mycètes pathogènes et opportunistes, tels que le *Candida* spp. et l'*Aspergillus* spp. (Richardson, 2005). La persistance de taux élevés de morbidité et de mortalité associés aux infections fongiques systémiques, malgré l'introduction de nouveaux médicaments antifongiques, indique une nécessité pour l'établissement de nouvelles stratégies pour le traitement de ces infections. Une approche qui est présentement sous étude consiste à combiner deux agents antifongiques ayant des modes d'action différents (Mukherjee *et al.*, 2005b). L'administration simple ou combinée de médicaments antifongiques est malheureusement limitée par l'apparition de la résistance croisée (MDR) (White *et al.*, 1998; Sanglard et Odds, 2002). Bien que ce phénomène MDR soit de nature multifactorielle, un mécanisme moléculaire causal prédominant est l'expulsion des médicaments par l'action de certains transporteurs ABC. Ce mécanisme est fortement conservé, autant chez les cellules microbiennes que les cellules cancéreuses qui résistent à la chimiothérapie (Blackmore *et al.*, 2001). Il est donc extrêmement important d'étudier ce phénomène, afin de trouver des façons de l'interrompre ou de le contourner.

Mon étude des transporteurs ABC Cdr1p et Cdr2p de *C. albicans* a fait avancer les connaissances au niveau de leur structure et de leur fonctionnement. Le système d'expression hétérologue et les anticorps anti-Cdrp que notre laboratoire a développé m'ont permis d'étudier l'interaction de ces transporteur ABC avec différents substrats et d'évaluer la contribution de leurs différents domaines protéiques (TMD et NBD) au processus de transport. Grâce à diverses méthodes biochimiques et une approche de mutagenèse dirigée, j'ai pu établir l'existence de différences importantes autant dans le fonctionnement de Cdr1p et Cdr2p (Chapitre 2), que dans celui des NBD de Cdr2p (Chapitre 3).

La grande divergence des transporteurs PDR/CDR par rapport à leurs homologues humains indique que diverses stratégies d'inhibition sont envisageables. Celles-ci incluent le blocage des sites de liaisons aux drogues, de l'interface NBD1/NBD2, de la

communication NBD-TMD ou bien l'interférence avec les modifications post-traductionnelles qui déterminent l'activité et la dégradation de ces transporteurs ABC fongiques. La mise au point de certaines techniques (ex : la co-expression des deux moitiés de Cdr2p) et les résultats obtenus lors de mon analyse de ces transporteurs auront un impact certain sur la dissection du mode d'action d'inhibiteurs ou de nouveaux agents antifongiques. Plusieurs articles portant sur l'identification et la caractérisation d'inhibiteurs de Pdr5p et Cdr1p ont été publiés dans les cinq dernières années (Conseil *et al.*, 2000; Conseil *et al.*, 2003; Niimi *et al.*, 2004a; Yamamoto *et al.*, 2005; Hiraga *et al.*, 2005). De plus, de nouvelles propriétés applicables à la lutte aux infections fongiques (ex : améliorer les propriétés antifongiques du fluconazole ou interférer avec le phénotype MDR chez *Candida*) ont été découvertes pour différents médicaments établis, comme l'ibuprofène, le disulfirame et des dérivés du quinazolinone (Lemoine *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2004b; Pina-Vaz *et al.*, 2005). Ces études se basent sur l'hypothèse qu'une molécule qui inhibe Pdr5p de *S. cerevisiae*, ou Cdr1p de *C. albicans*, sera aussi efficace contre Cdr2p. Cependant, mes résultats avec le FK520 (Chapitre 2) et ceux de Schuetzer-Muehlbauer avec le FK506 et la propafénone GP382 montrent que Cdr2p échappe à une telle inhibition et qu'il est donc impératif lors de la caractérisation d'un inhibiteur potentiel de vérifier si Cdr2p est également affecté par la molécule (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003a).

L'importance médicale des transporteurs ABC est indéniable. Bien que nous soyons encore loin d'une compréhension complète et exacte du fonctionnement et des rôles des transporteurs *CDR*, les avancées récentes en génomique, protéomique et dans la purification/cristallisation de transporteurs ABC complets laissent présager des découvertes importantes dans les années à venir.

IV. Addenda

Lorsque cet ouvrage était en évaluation, l'équipe du Dr Geoffrey Chang, du Scripps Research Institute, a annoncé la rétraction des articles suivants :

- Chang G, Roth CB. *Science*. 2001. 293(5536):1793-800.
- Pornillos O, Chen YJ, Chen AP, Chang G. *Science*. 2005. 310(5756):1950-3.
- Reyes CL, Chang G. *Science*. 2005. 308(5724):1028-31.

Ainsi, les structures tridimensionnelles de MsbA présentées à la Figure 1-7, sont incorrectes à cause d'une erreur de conception dans un logiciel ayant servi à la production de ces modèles (Chang *et al.*, 2006). Cependant, cette rétraction n'a aucun impact sur nos résultats ou nos conclusions.

V. Références

- Anonyme.** 2004. Vaginitis Due to Vaginal Infections. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH.
<http://www.niaid.nih.gov/factsheets/vaginitis.htm>
- Anonyme.** 2005a. DBMD - Antibiotic resistance. National Center for Infectious Disease (NCID), CDC. <http://www.cdc.gov/drugresistance/community/>
- Anonyme.** 2005b. Human mycoses. Patterson, T. F. and McGinnis, M. R. (Ed.). DoctorFungus Corporation.
http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/human_index.htm
- Ahn, J., Beharry, S., Molday, L.L. et Molday, R.S.** 2003. Functional interaction between the two halves of the photoreceptor-specific ATP binding cassette protein ABCR (ABCA4). Evidence for a non-exchangeable ADP in the first nucleotide binding domain. *J Biol. Chem.* **278**:39600-39608.
- Ainsworth, G. C., Bisby, G. R. et Kirk, P. M.** 2001. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 9ième édition. CABI Bioscience Publishing, Wallingford, Oxon, UK
- Akache, B., MacPherson, S., Sylvain, M.A. et Turcotte, B.** 2004. Complex interplay among regulators of drug resistance genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem.* **279**:27855-27860.
- Akache, B. et Turcotte, B.** 2002. New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. *J Biol. Chem.* **277**:21254-21260.
- Akins, R.A.** 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **43**:285-318.
- Al Fattani, M.A. et Douglas, L.J.** 2004. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3291-3297.
- al Shawi, M.K. et Senior, A.E.** 1993. Characterization of the adenosine triphosphatase activity of Chinese hamster P-glycoprotein. *J Biol. Chem.* **268**:4197-4206.
- Alarco, A.M., Balan, I., Talibi, D., Mainville, N. et Raymond, M.** 1997. AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires *FLR1* encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J Biol. Chem.* **272**:19304-19313.
- Alarco, A.M. et Raymond, M.** 1999. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **181**:700-708.

- Albertson, G.D., Niimi, M., Cannon, R.D. et Jenkinson, H.F.** 1996. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2835-2841.
- Aleksandrov, A.A., Chang, X.B., Aleksandrov, L. et Riordan, J.R.** 2000. The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol (Lond)* **528**:259-265.
- Aleksandrov, L., Aleksandrov, A.A., Chang, X.B. et Riordan, J.R.** 2002. The first nucleotide binding domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a site of stable nucleotide interaction, whereas the second is a site of rapid turnover. *J Biol. Chem.* **277**:15419-15425.
- Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V. et Dean, M.** 1998. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* **58**:5337-5339.
- Alqawi, O., Poelarends, G., Konings, W.N. et Georges, E.** 2003. Photoaffinity labeling under non-energized conditions of a specific drug-binding site of the ABC multidrug transporter LmrA from *Lactococcus lactis*. *Biochem Biophys. Res Commun.* **311**:696-701.
- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I. et Gottesman, M.M.** 1999. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.* **39**:361-398.
- Anderson, J.B.** 2005. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:547-556.
- Anjard, C. et Loomis, W.F.** 2002. Evolutionary analyses of ABC transporters of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell* **1**:643-652.
- Arathoon, E.G.** 2001. Clinical efficacy of echinocandin antifungals. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**:685-691.
- Arceci, R.J., Stieglitz, K. et Bierer, B.E.** 1992. Immunosuppressants FK506 and rapamycin function as reversal agents of the multidrug resistance phenotype. *Blood* **80**:1528-1536.
- Arndt, C., Cruz, M.C., Cardenas, M.E. et Heitman, J.** 1999. Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **145 (Pt 8)**:1989-2000.
- Azzaria, M., Schurr, E. et Gros, P.** 1989. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the MDR1 gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol. Cell. Biol.* **9**:5289-97.

- Bachmann, S.P., Patterson, T.F. et Lopez-Ribot, J.L.** 2002. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin. Microbiol* **40**:2228-2230.
- Balakrishnan, L., Venter, H., Shilling, R.A. et van Veen, H.W.** 2004. Reversible transport by the ATP-binding cassette multidrug export pump LmrA: ATP synthesis at the expense of downhill ethidium uptake. *J. Biol. Chem.* **279**:11273-11280.
- Balan, I., Alarco, A.M. et Raymond, M.** 1997. The *Candida albicans* CDR3 gene codes for an opaque-phase ABC transporter. *J Bacteriol.* **179**:7210-7218.
- Baldauf, S.L. et Palmer, J.D.** 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:11558-11562.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I. et Doolittle, W.F.** 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**:972-977.
- Balzi, E., Chen, W., Ulaszewski, S., Capieaux, E. et Goffeau, A.** 1987. The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem.* **262**:16871-16879.
- Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L. et Goffeau, A.** 1994. *PDR5*, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator *PDR1*. *J. Biol. Chem.* **269**:2206-14.
- Band, J.D. et Maki, D.G.** 1979. Infections caused by arterial catheters used for hemodynamic monitoring. *Am. J. Med.* **67**:735-741.
- Baran, R., Gupta, A.K. et Pierard, G.E.** 2005. Pharmacotherapy of onychomycosis. *Expert. Opin. Pharmacother.* **6**:609-624.
- Barchiesi, F., Najvar, L.K., Luther, M.F., Scalise, G., Rinaldi, M.G. et Graybill, J.R.** 1996. Variation in fluconazole efficacy for *Candida albicans* strains sequentially isolated from oral cavities of patients with AIDS in an experimental murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1317-1320.
- Bauer, B.E., Wolfger, H. et Kuchler, K.** 1999. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**:217-236.
- Beck-Sague, C. et Jarvis, W.R.** 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J. Infect. Dis.* **167**:1247-1251.
- Becker, J.M., Henry, L.K., Jiang, W.D. et Koltin, Y.** 1995. Reduced virulence of *Candida albicans* mutants affected in multidrug resistance. *Infection and Immunity* **63**:4515-4518.

- Ben-Yaacov, R., Knoller, S., Caldwell, G.A., Becker, J.M. et Koltin, Y.** 1994. *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:648-652.
- Bennett, J.E., Izumikawa, K. et Marr, K.A.** 2004. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1773-1777.
- Bennett, R.J. et Johnson, A.D.** 2003. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J* **22**:2505-2515.
- Bennett, R.J. et Johnson, A.D.** 2005. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu. Rev Microbiol* **59**:233-255.
- Berkower, C. et Michaelis, S.** 1991. Mutational analysis of the yeast a-factor transporter *STE6*, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. *EMBO J.* **10**:3777-85.
- Berridge, G., Walker, J.A., Callaghan, R. et Kerr, I.D.** 2003. The nucleotide-binding domains of P-glycoprotein. Functional symmetry in the isolated domain demonstrated by N-ethylmaleimide labelling. *Eur. J Biochem.* **270**:1483-1492.
- Berrouane, Y.F., Herwaldt, L.A. et Pfaller, M.A.** 1999. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J. Clin. Microbiol.* **37**:531-537.
- Bhatia, A., Schafer, H.J. et Hrycyna, C.A.** 2005. Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: evaluation of the native protein and chimeric dimers. *Biochemistry* **44**:10893-10904.
- Bille, J., Marchetti, O. et Calandra, T.** 2005. Changing face of health-care associated fungal infections. *Curr. Opin. Infect Dis* **18**:314-319.
- Bishop, L., Agbayani, R., Jr., Ambudkar, S.V., Maloney, P.C. et Ames, G.F.** 1989. Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **86**:6953-6957.
- Bissinger, P.H. et Kuchler, K.** 1994. Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae STS1* gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *J Biol. Chem.* **269**:4180-4186.
- Blackmore, C.G., McNaughton, P.A. et van Veen, H.W.** 2001. Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. *Mol. Membr. Biol.* **18**:97-103.
- Bodey, G.P.** 1988. The emergence of fungi as major hospital pathogens. *J. Hosp. Infect.* **11 Suppl A**:411-426.

- Bodey, G.P., Mardani, M., Hanna, H.A., Boktour, M., Abbas, J., Girgawy, E., Hachem, R.Y., Kontoyiannis, D.P. et Raad, I.I.** 2002. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. *Am. J Med* **112**:380-385.
- Boiron, P., Drouhet, E., Dupont, B. et Improvisi, L.** 1987. Entry of ketoconazole into *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:244-248.
- Borst, P. et Elferink, R.O.** 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:537-592.
- Borst, P., Zelcer, N. et van Helvoort, A.** 2000. ABC transporters in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**:128-144.
- Borths, E.L., Poolman, B., Hvorup, R.N., Locher, K.P. et Rees, D.C.** 2005. In vitro functional characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC transporter for vitamin B12 uptake. *Biochemistry* **44**:16301-16309.
- Boute, N., Jockers, R. et Issad, T.** 2002. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends in Pharmacological Sciences* **23**:351-354.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**:248-254.
- Braun, B.R., van Het, H.M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., Inglis, D.O., Uhl, M.A., Hogues, H., Berriman, M., Lorenz, M., Levitin, A., Oberholzer, U., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Iouk, T., Zito, R., Frangeul, L., Tekaiia, F., Rutherford, K., Wang, E., Munro, C.A., Bates, S., Gow, N.A., Hoyer, L.L., Kohler, G., Morschhauser, J., Newport, G., Znaidi, S., Raymond, M., Turcotte, B., Sherlock, G., Costanzo, M., Ihmels, J., Berman, J., Sanglard, D., Agabian, N., Mitchell, A.P., Johnson, A.D., Whiteway, M. et Nantel, A.** 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS. Genet.* **1**:36-57.
- Breedveld, P., Beijnen, J.H. et Schellens, J.H.M.** 2005. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends in Pharmacological Sciences* **In Press, Corrected Proof**.
- Bruggemann, E.P., Currier, S.J., Gottesman, M.M. et Pastan, I.** 1992. Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein. *J Biol. Chem.* **267**:21020-21026.
- Bruno, V.M. et Mitchell, A.P.** 2005. Regulation of azole drug susceptibility by *Candida albicans* protein kinase CK2. *Mol. Microbiol.* **56**:559-573.

- Burns, D.N., Tuomala, R., Chang, B.H., Hershov, R., Minkoff, H., Rodriguez, E., Zorrilla, C., Hammill, H. et Regan, J.** 1997. Vaginal colonization or infection with *Candida albicans* in human immunodeficiency virus-infected women during pregnancy and during the postpartum period. Women and Infants Transmission Study Group. Clin Infect Dis **24**:201-210.
- Byeon, L., Shi, Z. et Tsai, M.D.** 1995. Mechanism of adenylate kinase. The "essential lysine" helps to orient the phosphates and the active site residues to proper conformations. Biochemistry **34**:3172-3182.
- Cagnoni, P.J., Walsh, T.J., Prendergast, M.M., Bodensteiner, D., Hiemenz, S., Greenberg, R.N., Arndt, C.A., Schuster, M., Seibel, N., Yeldandi, V. et Tong, K.B.** 2000. Pharmacoeconomic analysis of liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients. J. Clin. Oncol. **18**:2476-2483.
- Calabrese, D., Bille, J. et Sanglard, D.** 2000. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*FLU1*) conferring resistance to fluconazole. Microbiology **146** (Pt 11):2743-2754.
- Calderone, R. A.** 2002a. *Candida* and Candidiasis. 2ième édition. ASM Press, Washington, D.C. 472 p.
- Calderone, R. A.** 2002b. Taxonomy and biology of *Candida*, p. 15-27. Dans *Candida* and Candidiasis, 2ième édition. Calderone, R. A. (Ed.). ASM Press, Washington, D.C.
- Calderone, R.A. et Fonzi, W.A.** 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. **9**:327-335.
- Callaghan, R., Ford, R.C. et Kerr, I.D.** 2006. The translocation mechanism of P-glycoprotein. FEBS Letters **580**:1056-1063.
- Cannon, R.D., Fischer, F.J., Niimi, K., Niimi, M. et Arisawa, M.** 1998. Drug pumping mechanisms in *Candida albicans*. Nippon Ishinkin. Gakkai Zasshi **39**:73-78.
- Canuto, M.M. et Rodero, F.G.** 2002. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. The Lancet Infectious Diseases **2**:550-563.
- Cardenas, M.E., Cruz, M.C., Del Poeta, M., Chung, N., Perfect, J.R. et Heitman, J.** 1999. Antifungal activities of antineoplastic agents: *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study drug action. Clin. Microbiol. Rev. **12**:583-611.
- Carreras, C.W., Fu, H. et Santi, D.V.** 2001. An FKBP12 binding assay based upon biotinylated FKBP12. Anal. Biochem **298**:57-61.
- Carrier, I., Julien, M. et Gros, P.** 2003. Analysis of catalytic carboxylate mutants E552Q and E1197Q suggests asymmetric ATP hydrolysis by the two nucleotide-binding domains of P-glycoprotein. Biochemistry **42**:12875-12885.

- Chami, M., Steinfels, E., Orelle, C., Jault, J.M., Di Pietro, A., Rigaud, J.L. et Marco, S.** 2002. Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol.* **315**:1075-1085.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T. et Ghannoum, M.A.** 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* **183**:5385-5394.
- Chang, G.** 2003. Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol.* **330**:419-430.
- Chang, G. et Roth, C.B.** 2001. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **293**:1793-1800.
- Chang, G., Roth, C.B., Reyes, C.L., Pornillos, O., Chen, Y.J. et Chen, A.P.** 2006. Retraction. *Science* **314**:1875-.
- Chau, A.S., Mendrick, C.A., Sabatelli, F.J., Loebenberg, D. et McNicholas, P.M.** 2004. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2124-2131.
- Chen, C.G., Yang, Y.L., Shih, H.I., Su, C.L. et Lo, H.J.** 2004a. CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating *CDR1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4505-4512.
- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. et Roninson, I.B.** 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**:381-389.
- Chen, G.K., Lacayo, N.J., Duran, G.E., Wang, Y., Bangs, C.D., Rea, S., Kovacs, M., Cherry, A.M., Brown, J.M. et Sikic, B.I.** 2002. Preferential expression of a mutant allele of the amplified MDR1 (ABCB1) gene in drug-resistant variants of a human sarcoma. *Genes Chromosomes. Cancer* **34**:372-383.
- Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A.L. et Quijcho, F.A.** 2003a. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell* **12**:651-661.
- Chen, M., Abele, R. et Tampe, R.** 2003b. Peptides induce ATP hydrolysis at both subunits of the transporter associated with antigen processing. *J. Biol. Chem.* **278**:29686-29692.

- Chen, M., Abele, R. et Tampe, R.** 2004b. Functional non-equivalence of ATP-binding cassette signature motifs in the transporter associated with antigen processing (TAP). *J. Biol. Chem.* **279**:46073-46081.
- Chen, X.J.** 2001. Activity of the *Kluyveromyces lactis* Pdr5 multidrug transporter is modulated by the Sit4 protein phosphatase. *J Bacteriol.* **183**:3939-3948.
- Cheng, G., Yeater, K.M. et Hoyer, L.L.** 2006. Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eukaryotic Cell* **5**:180-191.
- Chu, S. et Herskowitz, I.** 1998. Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on *NDT80*. *Mol Cell* **1**:685-696.
- Clark, F.S., Parkinson, T., Hitchcock, C.A. et Gow, N.A.** 1996. Correlation between rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in *Candida* species: possible role for drug efflux in drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:419-425.
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M. et Deeley, R.G.** 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**:1650-1654.
- Coleman, D.C., Rinaldi, M.G., Haynes, K.A., Rex, J.H., Summerbell, R.C., Anaissie, E.J., Li, A. et Sullivan, D.J.** 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol.* **36 Suppl 1**:156-165.
- Coleman, S.T., Epping, E.A., Steggerda, S.M. et Moye-Rowley, W.S.** 1999. Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol Cell Biol.* **19**:8302-8313.
- Coleman, S.T., Tseng, E. et Moye-Rowley, W.S.** 1997. *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the *ATR1* structural gene. *J Biol. Chem.* **272**:23224-23230.
- Como, J.A. et Dismukes, W.E.** 1994. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N. Engl. J. Med.* **330**:263-272.
- Conseil, G., Decottignies, A., Jault, J.M., Comte, G., Barron, D., Goffeau, A. et Di Pietro, A.** 2000. Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **39**:6910-6917.
- Conseil, G., Perez-Victoria, J.M., Renoir, J.M., Goffeau, A. et Di Pietro, A.** 2003. Potent competitive inhibition of drug binding to the *Saccharomyces cerevisiae* ABC exporter Pdr5p by the hydrophobic estradiol-derivative RU49953. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**:131-134.
- Coste, A.T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J. et Sanglard, D.** 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 3:1639-1652.

- Coste, A.T., Turner, V., Ischer, F., Morschhauser, J., Forche, A., Selmecki, A., Berman, J., Bille, J. et Sanglard, D.** 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.
- Cowen, L.E., Sanglard, D., Calabrese, D., Sirjusingh, C., Anderson, J.B. et Kohn, L.M.** 2000. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. J Bacteriol. 182:1515-1522.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. et Diedrich, G.** 1999. The nature of the MHC class I peptide loading complex. Immunol Rev 172:21-28.
- Cruz, M.C., Del Poeta, M., Wang, P., Wenger, R., Zenke, G., Quesniaux, V.F., Movva, N.R., Perfect, J.R., Cardenas, M.E. et Heitman, J.** 2000. Immunosuppressive and nonimmunosuppressive cyclosporine analogs are toxic to the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* via cyclophilin-dependent inhibition of calcineurin. Antimicrob. Agents Chemother. 44:143-149.
- Cruz, M.C., Goldstein, A.L., Blankenship, J.R., Del Poeta, M., Davis, D., Cardenas, M.E., Perfect, J.R., McCusker, J.H. et Heitman, J.** 2002. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. EMBO J 21:546-559.
- Cui, Z., Hirata, D., Tsuchiya, E., Osada, H. et Miyakawa, T.** 1996. The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. J Biol. Chem. 271:14712-14716.
- Cui, Z., Shiraki, T., Hirata, D. et Miyakawa, T.** 1998. Yeast gene *YRR1*, which is required for resistance to 4-nitroquinoline N-oxide, mediates transcriptional activation of the multidrug resistance transporter gene *SNQ2*. Mol. Microbiol. 29:1307-1315.
- da Silva Ferreira, M.E., Capellaro, J.L., dos Reis Marques, E., Malavazi, I., Perlin, D., Park, S., Anderson, J.B., Colombo, A.L., Arthington-Skaggs, B.A., Goldman, M.H. et Goldman, G.H.** 2004. In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 48:4405-4413.
- Daoud, R., Julien, M., Gros, P. et Georges, E.** 2001. Major photoaffinity drug binding sites in multidrug resistance protein 1 (MRP1) are within transmembrane domains 10-11 and 16-17. J Biol. Chem. 276:12324-12330.
- Daoud, R., Kast, C., Gros, P. et Georges, E.** 2000. Rhodamine 123 binds to multiple sites in the multidrug resistance protein (MRP1). Biochemistry 39:15344-15352.

- Dassa, E. et Bouige, P.** 2001. The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* **152**:211-229.
- Daumke, O. et Knittler, M.R.** 2001. Functional asymmetry of the ATP-binding-cassettes of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains. *Eur J Biochem* **268**:4776-4786.
- Davidson, A.L. et Chen, J.** 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:241-268.
- Davidson, A.L. et Nikaido, H.** 1991. Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.* **266**:8946-8951.
- Davidson, A.L. et Sharma, S.** 1997. Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:5458-5464.
- De Backer, M.D., Ilyina, T., Ma, X.J., Vandoninck, S., Luyten, W.H.M.L. et Vanden Bossche, H.** 2001. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1660-1670.
- De Beule, K. et Van Gestel, J.** 2001. Pharmacology of itraconazole. *Drugs* **61 Suppl 1**:27-37.
- De Deken, X. et Raymond, M.** 2004. Constitutive activation of the *PDR16* promoter in a *Candida albicans* azole-resistant clinical isolate overexpressing *CDR1* and *CDR2*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2700-2703.
- de Micheli, M., Bille, J., Schueller, C. et Sanglard, D.** 2002. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol. Microbiol.* **43**:1197-1214.
- de Repentigny, L., Lewandowski, D. et Jolicoeur, P.** 2004. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol. Rev.* **17**:729-59, table.
- Dean, M., Rzhetsky, A. et Allikmets, R.** 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**:1156-1166.
- Decottignies, A. et Goffeau, A.** 1997. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* **15**:137-145.
- Decottignies, A., Grant, A.M., Nichols, J.W., de Wet, H., McIntosh, D.B. et Goffeau, A.** 1998. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol. Chem.* **273**:12612-12622.

- Decottignies, A., Kolaczowski, M., Balzi, E. et Goffeau, A.** 1994. Solubilization and characterization of the overexpressed *PDR5* multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. *J. Biol. Chem.* **269**:12797-803.
- Decottignies, A., Lambert, L., Catty, P., Degand, H., Epping, E.A., Moye-Rowley, W.S., Balzi, E. et Goffeau, A.** 1995. Identification and characterization of *SNQ2*, a new multidrug ATP binding cassette transporter of the yeast plasma membrane. *J Biol. Chem.* **270**:18150-18157.
- Decottignies, A., Owsianik, G. et Ghislain, M.** 1999. Casein kinase I-dependent phosphorylation and stability of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol. Chem.* **274**:37139-37146.
- Deeley, R.G., Westlake, C. et Cole, S.P.C.** 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol. Rev.* **86**:849-899.
- del Palacio, A., Sanz, F., Garcia-Bravo, M., Gimeno, C., Cuetera, S., Miranda, P. et Noriega, A.** 1991. Single dose treatment of vaginal candidosis: randomised comparison of amorolfine (50 mg and 100 mg) and clotrimazole (500 mg) in patients with vulvovaginal candidosis. *Mycoses* **34**:85-91.
- Del Poeta, M., Cruz, M.C., Cardenas, M.E., Perfect, J.R. et Heitman, J.** 2000. Synergistic antifungal activities of bafilomycin A(1), fluconazole, and the pneumocandin MK-0991/caspofungin acetate (L-743,873) with calcineurin inhibitors FK506 and L-685,818 against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:739-746.
- Delahodde, A., Delaveau, T. et Jacq, C.** 1995. Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol Cell Biol.* **15**:4043-4051.
- Delahodde, A., Pandjaitan, R., Corral-Debrinski, M. et Jacq, C.** 2001. Pse1p/Kap121p-dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1p. *Mol Microbiol* **39**:304-312.
- Delaveau, T., Delahodde, A., Carvajal, E., Subik, J. et Jacq, C.** 1994. *PDR3*, a new yeast regulatory gene, is homologous to *PDR1* and controls the multidrug resistance phenomenon. *Mol Gen. Genet.* **244**:501-511.
- Demeule, M., Jodoin, J., Gingras, D. et Beliveau, R.** 2000. P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries. *FEBS Lett* **466**:219-224.
- Demeule, M., Laplante, A., Murphy, G.F., Wenger, R.M. et Beliveau, R.** 1998. Identification of the cyclosporin-binding site in P-glycoprotein. *Biochemistry* **37**:18110-18118.

- Denning, D.W., Venkateswarlu, K., Oakley, K.L., Anderson, M.J., Manning, N.J., Stevens, D.A., Warnock, D.W. et Kelly, S.L.** 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1364-1368.
- DeRisi, J., van den, H.B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C. et Goffeau, A.** 2000. Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett* **470**:156-160.
- Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. et Ambudkar, S.V.** 1997. Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **94**:10594-10599.
- Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. et Ambudkar, S.V.** 1998. Photoaffinity labeling of human P-glycoprotein: effect of modulator interaction and ATP hydrolysis on substrate binding. *Methods Enzymol.* **292**:318-328.
- Diaz-Guerra, T.M., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M. et Rodriguez-Tudela, J.L.** 2003. A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1120-1124.
- Diederichs, K., Diez, J., Greller, G., Muller, C., Breed, J., Schnell, C., Vornrhein, C., Boos, W. et Welte, W.** 2000. Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J* **19**:5951-5961.
- Dismukes, W.E.** 2000. Introduction to antifungal drugs. *Clin. Infect. Dis.* **30**:653-657.
- Dixon, D.M., McNeil, M.M., Cohen, M.L., Gellin, B.G. et La Montagne, J.R.** 1996. Fungal infections: a growing threat. *Public Health Rep.* **111**:226-235.
- Doerrler, W.T., Gibbons, H.S. et Raetz, C.R.H.** 2004. MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**:45102-45109.
- Dogra, S., Krishnamurthy, S., Gupta, V., Dixit, B.L., Gupta, C.M., Sanglard, D. et Prasad, R.** 1999. Asymmetric distribution of phosphatidylethanolamine in *C. albicans*: possible mediation by *CDRI*, a multidrug transporter belonging to ATP binding cassette (ABC) superfamily. *Yeast* **15**:111-121.
- Douglas, C.M., D'Ippolito, J.A., Shei, G.J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J.A., Li, W., Abruzzo, G.K., Flattery, A., Bartizal, K., Mitchell, A. et Kurtz, M.B.** 1997. Identification of the *FKS1* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2471-2479.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K. et Ross, D.D.** 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **95**:15665-15670.

- Duffieux, F., Annereau, J.P., Boucher, J., Miclet, E., Pamard, O., Schneider, M., Stoven, V. et Lallemand, J.Y.** 2000. Nucleotide-binding domain 1 of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: production of a suitable protein for structural studies. *Eur J Biochem* **267**:5306-5312.
- Dumont, F.J.** 2000. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr. Med Chem.* **7**:731-748.
- Edgar, R. et Bibi, E.** 1999. A single membrane-embedded negative charge is critical for recognizing positively charged drugs by the *Escherichia coli* multidrug resistance protein MdfA. *EMBO J* **18**:822-832.
- Edlind, T., Smith, L., Henry, K., Katiyar, S. et Nickels, J.** 2002. Antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by calcium signalling. *Mol Microbiol* **46**:257-268.
- Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N. et Wenzel, R.P.** 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: A three-year analysis. *Clin Infect Dis* **29**:239-244.
- Eggimann, P., Garbino, J. et Pittet, D.** 2003a. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis.* **3**:685-702.
- Eggimann, P., Garbino, J. et Pittet, D.** 2003b. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect. Dis.* **3**:772-785.
- Egner, R., Bauer, B.E. et Kuchler, K.** 2000. The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Mol Microbiol* **35**:1255-1263.
- Egner, R. et Kuchler, K.** 1996. The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole. *FEBS Lett* **378**:177-181.
- Egner, R., Mahe, Y., Pandjaitan, R. et Kuchler, K.** 1995. Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **15**:5879-5887.
- Egner, R., Rosenthal, F.E., Kralli, A., Sanglard, D. et Kuchler, K.** 1998. Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Mol. Biol. Cell* **9**:523-543.
- Ellis, D.** 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob. Chemother.* **49** Suppl 1:7-10.

- Enjalbert, B. et Whiteway, M.** 2005. Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth. *Eukaryotic Cell* **4**:1203-1210.
- Erjavec, Z. et Verweij, P.E.** 2002. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resistance Updates* **5**:3-10.
- Ferreira-Pereira, A., Marco, S., Decottignies, A., Nader, J., Goffeau, A. et Rigaud, J.L.** 2003. Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *J Biol. Chem.* **278**:11995-11999.
- Ferte, J.** 2000. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem* **267**:277-294.
- Fetsch, E.E. et Davidson, A.L.** 2002. Vanadate-catalyzed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **99**:9685-9690.
- Fling, M.E., Kopf, J., Tamarkin, A., Gorman, J.A., Smith, H.A. et Koltin, Y.** 1991. Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol Gen. Genet.* **227**:318-329.
- Fonzi, W. et Irwin, M.** 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**:717-728.
- Fox, D.S., Cruz, M.C., Sia, R.A., Ke, H., Cox, G.M., Cardenas, M.E. et Heitman, J.** 2001. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **39**:835-849.
- Fradin, C., de Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C. et Hube, B.** 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**:397-415.
- Franz, R., Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Ruhnke, M. et Morschhauser, J.** 1998a. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:3065-3072.
- Franz, R., Michel, S. et Morschhauser, J.** 1998b. A fourth gene from the *Candida albicans* CDR family of ABC transporters. *Gene* **220**:91-98.
- Frelet, A. et Klein, M.** 2006. Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Letters* **580**:1064-1084.
- Frerich, W. et Gad, A.** 1977. The frequency of *Candida* infections in pregnancy and their treatment with clotrimazole. *Curr. Med. Res. Opin.* **4**:640-644.

- Fridkin, S.K. et Jarvis, W.R.** 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:499-511.
- Funk, M., Niedenthal, R., Mumberg, D., Brinkmann, K., Ronicke, V. et Henkel, T.** 2002. Vector systems for heterologous expression of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **350**:248-257.
- Gao, C., Wang, L., Milgrom, E. et Shen, W.-C.W.** 2004. On the mechanism of constitutive Pdr1p activator-mediated *PDR5* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for enhanced recruitment of coactivators and altered nucleosome structures. *J. Biol. Chem.* **279**:42677-42686.
- Gao, M., Cui, H.R., Loe, D.W., Grant, C.E., Almquist, K.C., Cole, S.P. et Deeley, R.G.** 2000. Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J. Biol. Chem.* **275**:13098-13108.
- Garcia, O., Bouige, P., Forestier, C. et Dassa, E.** 2004. Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATP-binding cassette (ABC) systems. *J. Mol. Biol.* **343**:249-265.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M. et d'Enfert, C.** 2004. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic Cell* **3**:536-545.
- Gaur, M., Choudhury, D. et Prasad, R.** 2005a. Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**:3-15.
- Gaur, N.A., Manoharlal, R., Saini, P., Prasad, T., Mukhopadhyay, G., Hofer, M., Morschhauser, J. et Prasad, R.** 2005b. Expression of the *CDR1* efflux pump in clinical *Candida albicans* isolates is controlled by a negative regulatory element. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **332**:206-214.
- Gaur, N.A., Puri, N., Karnani, N., Mukhopadhyay, G., Goswami, S.K. et Prasad, R.** 2004. Identification of a negative regulatory element which regulates basal transcription of a multidrug resistance gene *CDR1* of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **4**:389-399.
- Gauthier, C., Weber, S., Alarco, A.M., Alqawi, O., Daoud, R., Georges, E. et Raymond, M.** 2003. Functional similarities and differences between *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1543-1554.
- Geisler, M., Girin, M., Brandt, S., Vincenzetti, V., Plaza, S., Paris, N., Kobae, Y., Maeshima, M., Billion, K., Kolukisaoglu, U.H., Schulz, B. et Martinoia, E.** 2004. *Arabidopsis* immunophilin-like TWD1 functionally interacts with vacuolar ABC transporters. *Mol. Biol. Cell* **15**:3393-3405.

- Georgopapadakou, N.H. et Walsh, T.J.** 1994. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **264**:371-373.
- Georgopapadakou, N.H. et Walsh, T.J.** 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:279-291.
- Geourjon, C., Orelle, C., Steinfels, E., Blanchet, C., Deleage, G., Di Pietro, A. et Jault, J.M.** 2001. A common mechanism for ATP hydrolysis in ABC transporter and helicase superfamilies. *Trends Biochem. Sci* **26**:539-544.
- Ghannoum, M.A. et Rice, L.B.** 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:501-517.
- Girmenia, C., Venditti, M. et Martino, P.** 2003. Fluconazole in combination with flucytosine in the treatment of fluconazole-resistant *Candida* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**:227-231.
- Goa, K.L. et Barradell, L.B.** 1995. Fluconazole. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients. *Drugs* **50**:658-690.
- Goldman, B.S. et Kranz, R.G.** 2001. ABC transporters associated with cytochrome c biogenesis. *Research in Microbiology* **152**:323-329.
- Goldway, M., Teff, D., Schmidt, R., Oppenheim, A.B. et Koltin, Y.** 1995. Multidrug resistance in *Candida albicans* - disruption of the BenR gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:422-426.
- Golin, J., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M., Habib, A.D., Sczepanski, J., Ziccardi, W. et May, L.** 2003. Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux. *J Biol. Chem.* **278**:5963-5969.
- Golin, J., Barkatt, A., Cronin, S., Eng, G. et May, L.** 2000. Chemical specificity of the *PDR5* multidrug resistance gene product of *Saccharomyces cerevisiae* based on studies with tri-*n*-alkyltin chlorides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:134-138.
- Goshorn, A.K. et Scherer, S.** 1989. Genetic analysis of prototrophic natural variants of *Candida albicans*. *Genetics* **123**:667-673.
- Gottesman, M.M.** 2002. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **53**:615-627.
- Graybill, J.R., Montalbo, E., Kirkpatrick, W.R., Luther, M.F., Revankar, S.G. et Patterson, T.F.** 1998. Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2938-2942.

- Greenberger, L.M.** 1993. Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 and 12. *J Biol. Chem.* **268**:11417-11425.
- Greenberger, L.M.** 1998. Identification of drug interaction sites in P-glycoprotein. *Methods Enzymol.* **292**:307-317.
- Grimard, V., Vigano, C., Margolles, A., Wattiez, R., van Veen, H.W., Konings, W.N., Ruyschaert, J.M. et Goormaghtigh, E.** 2001. Structure and dynamics of the membrane-embedded domain of LmrA investigated by coupling polarized ATR-FTIR spectroscopy and (1)H/(2)H exchange. *Biochemistry* **40**:11876-11886.
- Gros, P., Croop, J. et Housman, D.** 1986. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* **47**:371-380.
- Gross, C.H., Abdul-Manan, N., Fulghum, J., Lippke, J., Liu, X., Prabhakar, P., Brennan, D., Willis, M.S., Faerman, C., Connelly, P., Raybuck, S. et Moore, J.** 2006. Nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, an ABC transporter, catalyze adenylate kinase activity but not ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **281**:4058-4068.
- Guarro, J., Gene, J. et Stchigel, A.M.** 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:454-500.
- Hallstrom, T.C., Katzmann, D.J., Torres, R.J., Sharp, W.J. et Moye-Rowley, W.S.** 1998. Regulation of transcription factor Pdr1p function by an Hsp70 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **18**:1147-1155.
- Hanekop, N., Zaitseva, J., Jenewein, S., Holland, I.B. et Schmitt, L.** 2006. Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB. *FEBS Lett* **580**:1036-1041.
- Hanna, M., Brault, M., Kwan, T., Kast, C. et Gros, P.** 1996. Mutagenesis of transmembrane domain 11 of P-glycoprotein by alanine scanning. *Biochemistry* **35**:3625-3635.
- Hanrahan, J.W. et Wioland, M.A.** 2004. Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. *Proc Am Thorac Soc* **1**:17-21.
- Hanson, L., May, L., Tuma, P., Keeven, J., Mehl, P., Ferenz, M., Ambudkar, S.V. et Golin, J.** 2005. The role of hydrogen bond acceptor groups in the interaction of substrates with Pdr5p, a major yeast drug transporter. *Biochemistry* **44**:9703-9713.
- Haria, M. et Bryson, H.M.** 1995. Amorolfine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of onychomycosis and other superficial fungal infections. *Drugs* **49**:103-120.

- Harlow, E. et Lane, D.** 1988. Antibodies: a laboratory manual. 1^{ière} édition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. 726 p.
- Hatanaka, H., Kino, T., Miyata, S., Inamura, N., Kuroda, A., Goto, T., Tanaka, H. et Okuhara, M.** 1988. FR-900520 and FR-900523, novel immunosuppressants isolated from a *Streptomyces*. II. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot. (Tokyo)* **41**:1592-1601.
- Hawser, S.P. et Douglas, L.J.** 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun.* **62**:915-921.
- Hawser, S.P. et Douglas, L.J.** 1995. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2128-2131.
- Hazen, K.C.** 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:462-478.
- Hellauer, K., Akache, B., MacPherson, S., Sirard, E. et Turcotte, B.** 2002. Zinc cluster protein Rdr1p is a transcriptional repressor of the *PDR5* gene encoding a multidrug transporter. *J Biol. Chem.* **277**:17671-17676.
- Hemenway, C.S. et Heitman, J.** 1999. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys.* **30**:115-151.
- Henry, K.W., Cruz, M.C., Katiyar, S.K. et Edlind, T.D.** 1999. Antagonism of azole activity against *Candida albicans* following induction of multidrug resistance genes by selected antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1968-1974.
- Henry, K.W., Nickels, J.T. et Edlind, T.D.** 2000. Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2693-2700.
- Hernaiz, M.L., Gil, C., Pla, J. et Nombela, C.** 1998. Induced expression of the *Candida albicans* multidrug resistance gene *CDR1* in response to fluconazole and other antifungals. *Yeast* **14**:517-526.
- Hiemenz, J.W. et Walsh, T.J.** 1996. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. *Clin. Infect. Dis.* **22 Suppl 2**:S133-S144.
- Higgins, C.F.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:67-113.
- Higgins, C.F.** 1995. The ABC of channel regulation. *Cell* **82**:693-696.
- Higgins, C.F.** 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* **152**:205-210.

- Higgins, C.F., Haag, P.D., Nikaido, K., Ardeshir, F., Garcia, G. et Ames, G.F.** 1982. Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature* **298**:723-727.
- Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., Holland, I.B., Gray, L., Buckel, S.D., Bell, A.W. et .** 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**:448-450.
- Higgins, C.F. et Linton, K.J.** 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol Biol.* **11**:918-926.
- Hipfner, D.R., Deeley, R.G. et Cole, S.P.** 1999. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**:359-376.
- Hiraga, K., Yamamoto, S., Fukuda, H., Hamanaka, N. et Oda, K.** 2005. Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys. Res Commun.* **328**:1119-1125.
- Hitchcock, C.A., Pye, G.W., Troke, P.F., Johnson, E.M. et Warnock, D.W.** 1993. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1962-1965.
- Hogan, D.A.** 2006. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic Cell* **5**:613-619.
- Holland, I.B. et Blight, M.A.** 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **293**:381-399.
- Holyoak, C.D., Thompson, S., Ortiz, C.C., Hatzixanthis, K., Bauer, B., Kuchler, K., Piper, P.W. et Coote, P.J.** 2000. Loss of *CMK1* Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase in yeast results in constitutive weak organic acid resistance, associated with a post-transcriptional activation of the *PDR12* ATP-binding cassette transporter. *Mol Microbiol* **37**:595-605.
- Hope, W.W., Taberner, L., Denning, D.W. et Anderson, M.J.** 2004. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4377-4386.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P. et Tainer, J.A.** 2000. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101**:789-800.
- Horsburgh, C.R., Jr. et Kirkpatrick, C.H.** 1983. Long-term therapy of chronic mucocutaneous candidiasis with ketoconazole: experience with twenty-one patients. *Am. J Med* **74**:23-29.

- Hou, Y.X., Cui, L., Riordan, J.R. et Chang, X.B.** 2002. ATP binding to the first nucleotide-binding domain of multidrug resistance protein MRP1 increases binding and hydrolysis of ATP and trapping of ADP at the second domain. *J Biol. Chem.* **277**:5110-5119.
- Huang, D.B., Ostrosky-Zeichner, L., Wu, J.J., Pang, K.R. et Tyring, S.K.** 2004. Therapy of common superficial fungal infections. *Dermatologic Therapy* **17**:517-522.
- Hull, C.M. et Johnson, A.D.** 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**:1271-1275.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F. et Kim, S.H.** 1998. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**:703-707.
- Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E. et Higgins, C.F.** 1990. Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**:362-365.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. et Kimura, A.** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* **153**:163-168.
- Iwatani, W., Arika, T. et Yamaguchi, H.** 1993. Two mechanisms of butenafine action in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:785-788.
- Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., Gompf, S., van der, D.C. et Tampe, R.** 2003. The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J Biol Chem.* **278**:26862-26869.
- Janvilisri, T., Venter, H., Shahi, S., Reuter, G., Balakrishnan, L. et van Veen, H.W.** 2003. Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem.* **278**:20645-20651.
- Jarvis, W.R., Edwards, J.R., Culver, D.H., Hughes, J.M., Horan, T., Emori, T.G., Banerjee, S., Tolson, J., Henderson, T., Gaynes, R.P. et .** 1991. Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am. J. Med.* **91**:185S-191S.
- Jessup, C.J., Ryder, N.S. et Ghannoum, M.A.** 2000. An evaluation of the in vitro activity of terbinafine. *Med Mycol.* **38**:155-159.
- Jha, S., Dabas, N., Karnani, N., Saini, P. et Prasad, R.** 2004. ABC multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans* has divergent nucleotide-binding domains which display functional asymmetry. *FEMS Yeast Res.* **5**:63-72.
- Jha, S., Karnani, N., Dhar, S.K., Mukhopadhyay, K., Shukla, S., Saini, P., Mukhopadhyay, G. et Prasad, R.** 2003a. Purification and characterization of the

- N-terminal nucleotide binding domain of an ABC drug transporter of *Candida albicans*: uncommon cysteine 193 of Walker A is critical for ATP hydrolysis. *Biochemistry* **42**:10822-10832.
- Jha, S., Karnani, N., Lynn, A.M. et Prasad, R.** 2003b. Covalent modification of cysteine 193 impairs ATPase function of nucleotide-binding domain of a *Candida* drug efflux pump. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**:869-875.
- Johnson, E.M., Richardson, M.D. et Warnock, D.W.** 1984. In-vitro resistance to imidazole antifungals in *Candida albicans*. *J Antimicrob. Chemother.* **13**:547-558.
- Jones, P.M. et George, A.M.** 1999. Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**:187-202.
- Jones, P.M. et George, A.M.** 2004. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol. Life Sci.* **61**:682-699.
- Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N. et Magee, P.T.** 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:7329-7334.
- Juliano, R.L. et Ling, V.** 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **455**:152-162.
- Karababa, M., Valentino, E., Pardini, G., Coste, A.T., Bille, J. et Sanglard, D.** 2006. *CRZ1*, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **59**:1429-1451.
- Karnani, N., Gaur, N.A., Jha, S., Puri, N., Krishnamurthy, S., Goswami, S.K., Mukhopadhyay, G. et Prasad, R.** 2004. SRE1 and SRE2 are two specific steroid-responsive modules of *Candida* drug resistance gene 1 (*CDR1*) promoter. *Yeast* **21**:219-239.
- Karpowich, N., Martsinkevich, O., Millen, L., Yuan, Y.R., Dai, P.L., MacVey, K., Thomas, P.J. et Hunt, J.F.** 2001. Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure. (Camb.)* **9**:571-586.
- Katiyar, S.K. et Edlind, T.D.** 2001. Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. *Med Mycol* **39**:109-116.
- Katzmann, D.J., Epping, E.A. et Moye-Rowley, W.S.** 1999. Mutational disruption of plasma membrane trafficking of *Saccharomyces cerevisiae* Yor1p, a homologue of mammalian multidrug resistance protein. *Mol Cell Biol.* **19**:2998-3009.
- Katzmann, D.J., Hallstrom, T.C., Voet, M., Wysock, W., Golin, J., Volckaert, G. et Moye-Rowley, W.S.** 1995. Expression of an ATP-binding cassette transporter-

encoding gene (*YORI*) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **15**:6875-6883.

- Kaufman, D.** 2004. Fungal infection in the very low birthweight infant. *Curr. Opin. Infect Dis* **17**:253-259.
- Kaur, R., Castano, I. et Cormack, B.P.** 2004. Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1600-1613.
- Kelly, S.L., Lamb, D.C. et Kelly, D.E.** 1999a. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol Lett.* **180**:171-175.
- Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Loeffler, J. et Einsele, H.** 1996. Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. *Lancet* **348**:1523-1524.
- Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U. et Einsele, H.** 1997. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett.* **400**:80-82.
- Kelly, S.L., Lamb, D.C., Loeffler, J., Einsele, H. et Kelly, D.E.** 1999b. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**:174-179.
- Kerr, I.D.** 2002. Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1561**:47-64.
- Klein, M., Mamnun, Y.M., Eggmann, T., Schuller, C., Wolfger, H., Martinoia, E. et Kuchler, K.** 2002. The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett* **520**:63-67.
- Kohli, A., Gupta, V., Krishnamurthy, S., Hasnain, S.E. et Prasad, R.** 2001. Specificity of drug transport mediated by *CaMDR1*: a major facilitator of *Candida albicans*. *J Biosci.* **26**:333-339.
- Kohli, A., Smriti, Mukhopadhyay, K., Rattan, A. et Prasad, R.** 2002. *In vitro* low-level resistance to azoles in *Candida albicans* is associated with changes in membrane lipid fluidity and asymmetry. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1046-1052.
- Kolaczowska, A. et Goffeau, A.** 1999. Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist. Updat.* **2**:403-414.
- Kolaczowski, M., Kolaczowska, A., Luczynski, J., Witek, S. et Goffeau, A.** 1998. *In vivo* characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters

and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.* **4**:143-158.

- Kolaczkowski, M., van der, R.M., Cybularz-Kolaczowska, A., Soumillion, J.P., Konings, W.N. et Goffeau, A.** 1996. Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol. Chem.* **271**:31543-31548.
- Kontoyiannis, D.P.** 2000. Efflux-mediated resistance to fluconazole could be modulated by sterol homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob. Chemother.* **46**:199-203.
- Kontoyiannis, D.P. et Lewis, R.E.** 2002. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *The Lancet* **359**:1135-1144.
- Kosower, N.S. et Kosower, E.M.** 1995. Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol.* **251**:123-133.
- Kralli, A. et Yamamoto, K.R.** 1996. An FK506-sensitive transporter selectively decreases intracellular levels and potency of steroid hormones. *J Biol. Chem.* **271**:17152-17156.
- Krell, T., Maclean, J., Boam, D.J., Cooper, A., Resmini, M., Brocklehurst, K., Kelly, S.M., Price, N.C., Laphorn, A.J. et Coggins, J.R.** 2001. Biochemical and X-ray crystallographic studies on shikimate kinase: the important structural role of the P-loop lysine. *Protein Sci.* **10**:1137-1149.
- Kren, A., Mamnun, Y.M., Bauer, B.E., Schuller, C., Wolfger, H., Hatzixanthis, K., Mollapour, M., Gregori, C., Piper, P. et Kuchler, K.** 2003. War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Mol Cell Biol.* **23**:1775-1785.
- Krishnamurthy, P. et Schuetz, J.D.** 2006. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **46**:381-410.
- Krishnamurthy, S., Chatterjee, U., Gupta, V., Prasad, R., Das, P., Snehlata, P., Hasnain, S.E. et Prasad, R.** 1998a. Deletion of transmembrane domain 12 of *CDR1*, a multidrug transporter from *Candida albicans*, leads to altered drug specificity: expression of a yeast multidrug transporter in baculovirus expression system. *Yeast* **14**:535-550.
- Krishnamurthy, S., Gupta, V., Prasad, R., Panwar, S.L. et Prasad, R.** 1998b. Expression of *CDR1*, a multidrug resistance gene of *Candida albicans*: transcriptional activation by heat shock, drugs and human steroid hormones. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**:191-197.
- Krishnamurthy, S., Gupta, V., Snehlata, P. et Prasad, R.** 1998c. Characterisation of human steroid hormone transport mediated by Cdr1p, a multidrug transporter of

Candida albicans, belonging to the ATP-binding cassette super family. FEMS Microbiol. Lett. **158**:69-74.

- Kuchler, K. et Thorner, J.** 1992. Functional expression of human MDR1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U. S. A **89**:2302-2306.
- Kullberg, B. J. et Filler, S. G.** 2002. Candidemia, p. 327-340. Dans *Candida* and Candidiasis, 2ième édition. Calderone, R. A. (Ed.). ASM Press, Washington, D.C.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.
- Lage, H.** 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. Int. J Antimicrob. Agents **22**:188-199.
- Lamb, D.C., Corran, A., Baldwin, B.C., Kwon-Chung, J. et Kelly, S.L.** 1995. Resistant P45051A1 activity in azole antifungal tolerant *Cryptococcus neoformans* from AIDS patients. FEBS Lett. **368**:326-330.
- Lamb, D.C., Kelly, D.E., White, T.C. et Kelly, S.L.** 2000. The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes drug resistance through reduced affinity. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:63-67.
- Lamping, E., Tanabe, K., Niimi, M., Uehara, Y., Monk, B.C. et Cannon, R.D.** 2005. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *sec6-4* mutation and tools to create *S. cerevisiae* strains containing the *sec6-4* allele. Gene **361**:57-66.
- Langton, K.P., Henderson, P.J. et Herbert, R.B.** 2005. Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? Nat. Prod. Rep. **22**:439-451.
- Latge, J.P.** 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin. Microbiol. Rev. **12**:310-350.
- Laverdiere, M., Hoban, D., Restieri, C. et Habel, F.** 2002. In vitro activity of three new triazoles and one echinocandin against *Candida* bloodstream isolates from cancer patients. J Antimicrob. Chemother. **50**:119-123.
- Lavie, Y. et Liscovitch, M.** 2000. Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences. Glycoconjugate Journal **17**:253-259.
- Le Crom, S., Devaux, F., Marc, P., Zhang, X., Moye-Rowley, W.S. et Jacq, C.** 2002. New insights into the pleiotropic drug resistance network from genome-wide characterization of the *YRR1* transcription factor regulation system. Mol Cell Biol. **22**:2642-2649.

- Lee, C.M., Nantel, A., Jiang, L., Whiteway, M. et Shen, S.H.** 2004. The serine/threonine protein phosphatase *SIT4* modulates yeast-to-hypha morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **51**:691-709.
- Lees, N.D., Skaggs, B., Kirsch, D.R. et Bard, M.** 1995. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Lipids* **30**:221-226.
- Leipe, D.D., Koonin, E.V. et Aravind, L.** 2003. Evolution and classification of P-loop kinases and related proteins. *J Mol Biol.* **333**:781-815.
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. et Aravind, L.** 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* **317**:41-72.
- Lemoine, R.C., Glinka, T.W., Watkins, W.J., Cho, A., Yang, J., Iqbal, N., Singh, R., Madsen, D., Lolans, K., Lomovskaya, O., Oza, U. et Dudley, M.N.** 2004. Quinazolinone-based fungal efflux pump inhibitors. Part 1: Discovery of an (N-methylpiperazine)-containing derivative with activity in clinically relevant *Candida* spp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**:5127-5131.
- Leppert, G., McDevitt, R., Falco, S.C., Van Dyk, T.K., Ficke, M.B. et Golin, J.** 1990. Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* **125**:13-20.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G. et Cole, S.P.** 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**:216-237.
- Lewis, R.E.** 2005. Antifungal therapy cost analysis. Patterson, T. F. and McGinnis, M. R. (Ed.). DoctorFungus Corporation. <http://www.doctorfungus.org/thedrugs/cost1.htm>
- Li, Y. et Prinz, W.A.** 2004. ATP-binding cassette (ABC) transporters mediate nonvesicular, raft-modulated sterol movement from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**:45226-45234.
- Li, Z.S., Szczyпка, M., Lu, Y.P., Thiele, D.J. et Rea, P.A.** 1996. The yeast cadmium factor protein (*YCF1*) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol. Chem.* **271**:6509-6517.
- Lilic, D.** 2002. New perspectives on the immunology of chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr. Opin. Infect Dis* **15**:143-147.
- Lin, T., Trent, J.M., Milliken, D., Shimm, D.S., Donaldson, R. et Hill, A.B.** 1997. Increased frequency of P-glycoprotein gene amplification in colchicine-resistant Rat-1 clones transformed by v-src. *Cancer Genet. Cytogenet.* **96**:157-165.
- Linton, K.J. et Higgins, C.F.** 1998. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **28**:5-13.

- Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. et Schreiber, S.L.** 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**:807-815.
- Liu, R. et Sharom, F.J.** 1996. Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. *Biochemistry* **35**:11865-11873.
- Locher, K.P., Lee, A.T. et Rees, D.C.** 2002. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**:1091-1098.
- Lockhart, S.R., Zhao, R., Daniels, K.J. et Soll, D.R.** 2003. {alpha}-pheromone-induced "shmooing" and gene regulation require white-opaque switching during *Candida albicans* mating. *Eukaryotic Cell* **2**:847-855.
- Loffler, J., Einsele, H., Hebart, H., Schumacher, U., Hrastnik, C. et Daum, G.** 2000. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**:59-63.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. et Clarke, D.M.** 2002. The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing Walker A sequence. *J Biol. Chem.* **277**:41303-41306.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. et Clarke, D.M.** 2003. Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding. *J Biol. Chem.* **278**:13603-13606.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. et Clarke, D.M.** 2004. Disulfide cross-linking analysis shows that transmembrane segments 5 and 8 of human P-glycoprotein are close together on the cytoplasmic side of the membrane. *J Biol. Chem.* **279**:7692-7697.
- Loo, T.W. et Clarke, D.M.** 1994. Mutations to amino acids located in predicted transmembrane segment 6 (TM6) modulate the activity and substrate specificity of human P-glycoprotein. *Biochemistry* **33**:14049-14057.
- Loo, T.W. et Clarke, D.M.** 1995. Covalent modification of human P-glycoprotein mutants containing a single cysteine in either nucleotide-binding fold abolishes drug-stimulated ATPase activity. *J Biol. Chem.* **270**:22957-22961.
- Loo, T.W. et Clarke, D.M.** 1999. The transmembrane domains of the human multidrug resistance P-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface. *J Biol. Chem.* **274**:24759-24765.
- Loo, T.W. et Clarke, D.M.** 2000. The packing of the transmembrane segments of human multidrug resistance P-glycoprotein is revealed by disulfide cross-linking analysis. *J Biol. Chem.* **275**:5253-5256.

- Lopez-Ribot, J.L., McAtee, R.K., Lee, L.N., Kirkpatrick, W.R., White, T.C., Sanglard, D. et Patterson, T.F.** 1998. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2932-2937.
- Lopez-Ribot, J.L., McAtee, R.K., Perea, S., Kirkpatrick, W.R., Rinaldi, M.G. et Patterson, T.F.** 1999. Multiple resistant phenotypes of *Candida albicans* coexist during episodes of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1621-1630.
- Lorenz, M.C., Bender, J.A. et Fink, G.R.** 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell* **3**:1076-1087.
- Lortholary, O. et Dupont, B.** 1997. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:477-504.
- Losko, S., Kopp, F., Kranz, A. et Kolling, R.** 2001. Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter *STE6* into the yeast vacuole is blocked in the *doa4* Mutant. *Mol. Biol. Cell* **12**:1047-1059.
- Lott, T.J., Fundyga, R.E., Kuykendall, R.J. et Arnold, J.** 2005. The human commensal yeast, *Candida albicans*, has an ancient origin. *Fungal. Genet. Biol.* **42**:444-451.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M. et Kelly, S.** 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol. Med* **8**:76-81.
- Lyons, C.N. et White, T.C.** 2000. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2296-2303.
- Mackenzie, S.M., Brooker, M.R., Gill, T.R., Cox, G.B., Howells, A.J. et Ewart, G.D.** 1999. Mutations in the *white* gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochim. Biophys. Acta* **1419**:173-185.
- MacPherson, S., Akache, B., Weber, S., De Deken, X., Raymond, M. et Turcotte, B.** 2005. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1745-1752.
- Maebashi, K., Kudoh, M., Nishiyama, Y., Makimura, K., Uchida, K., Mori, T. et Yamaguchi, H.** 2002. A novel mechanism of fluconazole resistance associated with fluconazole sequestration in *Candida albicans* isolates from a myelofibrosis patient. *Microbiol Immunol.* **46**:317-326.
- Maebashi, K., Niimi, M., Kudoh, M., Fischer, F.J., Makimura, K., Niimi, K., Piper, R.J., Uchida, K., Arisawa, M., Cannon, R.D. et Yamaguchi, H.** 2001. Mechanisms of fluconazole resistance in *Candida albicans* isolates from Japanese AIDS patients. *J Antimicrob. Chemother.* **47**:527-536.

- Maesaki, S., Marichal, P., Hossain, M.A., Sanglard, D., Vanden Bossche, H. et Kohno, S.** 1998. Synergic effects of tacrolimus and azole antifungal agents against azole-resistant *Candida albicans* strains. *J Antimicrob. Chemother.* **42**:747-753.
- Maesaki, S., Marichal, P., Vanden Bossche, H., Sanglard, D. et Kohno, S.** 1999. Rhodamine 6G efflux for the detection of *CDR1*-overexpressing azole-resistant *Candida albicans* strains. *J Antimicrob. Chemother.* **44**:27-31.
- Magee, P.T. et Magee, B.B.** 2004. Through a glass opaquely: the biological significance of mating in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* **7**:661-665.
- Mahe, Y., Lemoine, Y. et Kuchler, K.** 1996a. The ATP binding cassette transporters *PDR5* and *SNQ2* of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids *in vivo*. *J Biol. Chem.* **271**:25167-25172.
- Mahe, Y., Parle-McDermott, A., Nourani, A., Delahodde, A., Lamprecht, A. et Kuchler, K.** 1996b. The ATP-binding cassette multidrug transporter *SNQ2* of *Saccharomyces cerevisiae*: a novel target for the transcription factors *PDR1* and *PDR3*. *Mol Microbiol* **20**:109-117.
- Maligie, M.A. et Selitrennikoff, C.P.** 2005. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3){beta}-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2851-2856.
- Mamnun, Y.M., Schuller, C. et Kuchler, K.** 2004. Expression regulation of the yeast *PDR5* ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase. *FEBS Lett* **559**:111-117.
- Mamnun, Y.M., Pandjaitan, R., Mahe, Y., Delahodde, A. et Kuchler, K.** 2002. The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **46**:1429-1440.
- Manciu, L., Chang, X.B., Buysse, F., Hou, Y.X., Gustot, A., Riordan, J.R. et Ruyschaert, J.M.** 2003. Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J. Biol. Chem.* **278**:3347-3356.
- Marchetti, O., Moreillon, P., Entenza, J.M., Vouillamoz, J., Glauser, M.P., Bille, J. et Sanglard, D.** 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**:1565-1570.
- Marchetti, O., Moreillon, P., Glauser, M.P., Bille, J. et Sanglard, D.** 2000. Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2373-2381.
- Marco, F., Pfaller, M.A., Messer, S.A. et Jones, R.N.** 1998. Activity of MK-0991 (L-743,872), a new echinocandin, compared with those of LY303366 and four other

antifungal agents tested against blood stream isolates of *Candida* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **32**:33-37.

- Marichal, P., Vanden Bossche, H., Odds, F.C., Nobels, G., Warnock, D.W., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Fay, S. et Mose-Larsen, P.** 1997. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2229-2237.
- Marr, K.** 2004. Combination antifungal therapy: where are we now, and where are we going? *Oncology (Williston. Park)* **18**:24-29.
- Marr, K.A.** 2000. The changing spectrum of candidemia in oncology patients: therapeutic implications. *Curr. Opin. Infect Dis* **13**:615-620.
- Marr, K.A., Lyons, C.N., Ha, K., Rustad, T.R. et White, T.C.** 2001. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:52-59.
- Martens, J.A., Genereaux, J., Saleh, A. et Brandl, C.J.** 1996. Transcriptional activation by yeast Pdr1p is inhibited by its association with Ngg1p/Ada3p. *J. Biol. Chem.* **271**:15884-15890.
- Martin, C., Higgins, C.F. et Callaghan, R.** 2001. The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry* **40**:15733-15742.
- Martin, S.W. et Konopka, J.B.** 2004. Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**:675-684.
- Martino, P., Girmenia, C., Micozzi, A., De Bernardis, F., Boccanera, M. et Cassone, A.** 1994. Prospective study of *Candida* colonization, use of empiric amphotericin B and development of invasive mycosis in neutropenic patients. *Eur. J Clin Microbiol. Infect Dis* **13**:797-804.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B. et Schulz, B.** 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* **214**:345-355.
- Martins, M.D., Lozano-Chiu, M. et Rex, J.H.** 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**:1291-1294.
- Mateus, C., Crow, S.A., Jr. et Ahearn, D.G.** 2004. Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3358-3366.

- Mathieu, M.C., Lapierre, I., Brault, K. et Raymond, M.** 2001. Aromatic hydrocarbon receptor AhR-Arnt nuclear translocator- and p53-mediated induction of the murine multidrug resistance *mdr1* gene by 3-methylcholanthrene and benzo(a)pyrene in hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **276**:4819-4827.
- Mehta, R.T., Hopfer, R.L., Gunner, L.A., Juliano, R.L. et Lopez-Berestein, G.** 1987. Formulation, toxicity, and antifungal activity in vitro of liposome-encapsulated nystatin as therapeutic agent for systemic candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:1897-1900.
- Mendez, C. et Salas, J.A.** 2001. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Research in Microbiology* **152**:341-350.
- Milewski, S., Mignini, F., Prasad, R. et Borowski, E.** 2001. Unusual susceptibility of a multidrug-resistant yeast strain to peptidic antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:223-228.
- Miyahara, K., Mizunuma, M., Hirata, D., Tsuchiya, E. et Miyakawa, T.** 1996. The involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p in cation resistance. *FEBS Lett* **399**:317-320.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T. et Bates, S.E.** 1999. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transporter genes. *Cancer Res* **59**:8-13.
- Miyazaki, H., Miyazaki, Y., Geber, A., Parkinson, T., Hitchcock, C., Falconer, D.J., Ward, D.J., Marsden, K. et Bennett, J.E.** 1998. Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, *PDH1*, in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1695-1701.
- Moody, J.E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J.F. et Thomas, P.J.** 2002. Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol. Chem.* **277**:21111-21114.
- Mora-Duarte, J., Betts, R., Rotstein, C., Colombo, A.L., Thompson-Moya, L., Smietana, J., Lupinacci, R., Sable, C., Kartsonis, N., Perfect, J. et the Caspofungin Invasive Candidiasis Study Group.** 2002. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* **347**:2020-2029.
- Moran, G.P., Sanglard, D., Donnelly, S.M., Shanley, D.B., Sullivan, D.J. et Coleman, D.C.** 1998. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1819-1830.

- Moran, Gary P., Sullivan, Derek J. et Coleman, David C.** 2002. Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogens, p. 37-53. Dans *Candida* and Candidiasis, 2ième édition. Calderone, R. A. (Ed.). ASM Press, Washington, D.C.
- Mourez, M., Hofnung, M. et Dassa, E.** 1997. Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J* **16**:3066-3077.
- Moye-Rowley, W.S.** 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell* **2**:381-389.
- Moye-Rowley, W.S.** 2005. Retrograde regulation of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **354**:15-21.
- Muhlbacher, J.M.** 1991. Naftifine: a topical allylamine antifungal agent. *Clin Dermatol.* **9**:479-485.
- Mukherjee, P.K., Zhou, G., Munyon, R. et Ghannoum, M.A.** 2005a. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol* **43**:191-208.
- Mukherjee, P.K., Chandra, J., Kuhn, D.M. et Ghannoum, M.A.** 2003. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and Immunity* **71**:4333-4340.
- Mukherjee, P.K., Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A. et Ghannoum, M.A.** 2005b. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:163-194.
- Mukhopadhyay, K., Kohli, A. et Prasad, R.** 2002. Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3695-3705.
- Mukhopadhyay, K., Prasad, T., Saini, P., Pucadyil, T.J., Chattopadhyay, A. et Prasad, R.** 2004. Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1778-1787.
- Muller, M., Bakos, E., Welker, E., Varadi, A., Germann, U.A., Gottesman, M.M., Morse, B.S., Roninson, I.B. et Sarkadi, B.** 1996. Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein. *J. Biol. Chem.* **271**:1877-1883.
- Mumberg, D., Muller, R. et Funk, M.** 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**:119-122.

- Murillo, L.A., Newport, G., Lan, C.Y., Habelitz, S., Dungan, J. et Agabian, N.M.** 2005. Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **4**:1562-1573.
- Murphy, J.W.** 1991. Mechanisms of natural resistance to human pathogenic fungi. *Annu. Rev Microbiol* **45**:509-538.
- Nakamura, K., Niimi, M., Niimi, K., Holmes, A.R., Yates, J.E., Decottignies, A., Monk, B.C., Goffeau, A. et Cannon, R.D.** 2001. Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3366-3374.
- Nare, B., Prichard, R.K. et Georges, E.** 1994. Characterization of rhodamine 123 binding to P-glycoprotein in human multidrug-resistant cells. *Mol Pharmacol.* **45**:1145-1152.
- Neyfakh, A.A.** 2001. The ostensible paradox of multidrug recognition. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:151-154.
- Nguyen, D.T., Alarco, A.M. et Raymond, M.** 2001. Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol. Chem.* **276**:1138-1145.
- Nguyen, M.H., Peacock, J.E., Jr., Morris, A.J., Tanner, D.C., Nguyen, M.L., Snyderman, D.R., Wagener, M.M., Rinaldi, M.G. et Yu, V.L.** 1996. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am. J. Med.* **100**:617-623.
- Niimi, K., Harding, D.R., Parshot, R., King, A., Lun, D.J., Decottignies, A., Niimi, M., Lin, S., Cannon, R.D., Goffeau, A. et Monk, B.C.** 2004a. Chemosensitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1256-1271.
- Niimi, K., Maki, K., Ikeda, F., Holmes, A.R., Lamping, E., Niimi, M., Monk, B.C. et Cannon, R.D.** 2006. Overexpression of *Candida albicans* *CDR1*, *CDR2*, or *MDR1* does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1148-1155.
- Niimi, M., Niimi, K., Takano, Y., Holmes, A.R., Fischer, F.J., Uehara, Y. et Cannon, R.D.** 2004b. Regulated overexpression of *CDR1* in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *J Antimicrob. Chemother.* **54**:999-1006.
- Nikaido, H.** 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:516-523.
- Noel, T., Francois, F., Paumard, P., Chastin, C., Brethes, D. et Villard, J.** 2003. Flucytosine-fluconazole cross-resistance in purine-cytosine permease-deficient

Candida lusitanae clinical isolates: indirect evidence of a fluconazole uptake transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1275-1284.

- Nolte, F.S., Parkinson, T., Falconer, D.J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R. et Wingard, J.R.** 1997. Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B- resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:196-199.
- Nourani, A., Papajova, D., Delahodde, A., Jacq, C. et Subik, J.** 1997a. Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain. *Mol Gen. Genet.* **256**:397-405.
- Nourani, A., Wesolowski-Louvel, M., Delaveau, T., Jacq, C. et Delahodde, A.** 1997b. Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol Cell Biol.* **17**:5453-5460.
- Nucci, M. et Marr, K.A.** 2005. Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* **41**:521-526.
- Odds, F.C.** 1993. Itraconazole--a new oral antifungal agent with a very broad spectrum of activity in superficial and systemic mycoses. *J. Dermatol. Sci.* **5**:65-72.
- Odds, F.C., Brown, A.J. et Gow, N.A.** 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**:272-279.
- Odom, A., Del Poeta, M., Perfect, J. et Heitman, J.** 1997. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:156-161.
- Offner, F., Krcmery, V., Boogaerts, M., Doyen, C., Engelhard, D., Ribaud, P., Cordonnier, C., de Pauw, B., Durrant, S., Marie, J.P., Moreau, P., Guiot, H., Samonis, G., Sylvester, R. et Herbrecht, R.** 2004. Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4808-4812.
- Ogawa, A., Hashida-Okado, T., Endo, M., Yoshioka, H., Tsuruo, T., Takesako, K. et Kato, I.** 1998. Role of ABC transporters in aureobasidin A resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:755-761.
- Onyewu, C., Blankenship, J.R., Del Poeta, M. et Heitman, J.** 2003. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:956-964.
- Orelle, C., Dalmas, O., Gros, P., Di Pietro, A. et Jault, J.M.** 2003. The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP

hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *J. Biol. Chem.* **278**:47002-47008.

- Orlowski, S., Mir, L.M., Belehradec, J., Jr. et Garrigos, M.** 1996. Effects of steroids and verapamil on P-glycoprotein ATPase activity: progesterone, desoxycorticosterone, corticosterone and verapamil are mutually non-exclusive modulators. *Biochem. J* **317** (Pt 2):515-522.
- Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K.A., Rex, J.H. et Cohen, S.H.** 2003a. Amphotericin B: time for a new "gold standard". *Clin Infect Dis* **37**:415-425.
- Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J.H., Pappas, P.G., Hamill, R.J., Larsen, R.A., Horowitz, H.W., Powderly, W.G., Hyslop, N., Kauffman, C.A., Cleary, J., Mangino, J.E. et Lee, J.** 2003b. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3149-3154.
- Ostrosky-Zeichner, L.** 2005. Candidiasis: General Overview. Patterson, T. F. and McGinnis, M. R. (Ed.). DoctorFungus Corporation. http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/candida/Candida_index.htm
- Oswald, C., Holland, I.B. et Schmitt, L.** 2006. The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **372**:385-399.
- Parella, F.J., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J. et Holmberg, S.D.** 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine* **338**:853-860.
- Panwar, S.L., Krishnamurthy, S., Gupta, V., Alarco, A.M., Raymond, M., Sanglard, D. et Prasad, R.** 2001. *CaALK8*, an alkane assimilating cytochrome P450, confers multidrug resistance when expressed in a hypersensitive strain of *Candida albicans*. *Yeast* **18**:1117-1129.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. et Saier, M.H., Jr.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol. Rev* **62**:1-34.
- Pappas, P.G., Bradsher, R.W., Kauffman, C.A., Cloud, G.A., Thomas, C.J., Campbell, G.D., Jr., Chapman, S.W., Newman, C. et Dismukes, W.E.** 1997. Treatment of blastomycosis with higher doses of fluconazole. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. *Clin. Infect. Dis.* **25**:200-205.
- Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J. et Edwards, J.E.** 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **38**:161-189.
- Park, S., Kelly, R., Kahn, J.N., Robles, J., Hsu, M.J., Register, E., Li, W., Vyas, V., Fan, H., Abruzzo, G., Flattery, A., Gill, C., Chrebet, G., Parent, S.A., Kurtz, M., Teppler, H., Douglas, C.M. et Perlin, D.S.** 2005. Specific substitutions in the

echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3264-3273.

- Parkinson, T., Falconer, D.J. et Hitchcock, C.A.** 1995. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1696-1699.
- Pasrija, R., Prasad, T. et Prasad, R.** 2005. Membrane raft lipid constituents affect drug susceptibilities of *Candida albicans*. *Biochem Soc Trans.* **33**:1219-1223.
- Patzlaff, J.S., van der Heide, T. et Poolman, B.** 2003. The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA. *J. Biol. Chem.* **278**:29546-29551.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H. et Skurray, R.A.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**:575-608.
- Payen, L., Gao, M., Westlake, C., Theis, A., Cole, S.P. et Deeley, R.G.** 2005. Functional interactions between nucleotide binding domains and leukotriene C4 binding sites of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Mol Pharmacol.* **67**:1944-1953.
- Payen, L.F., Gao, M., Westlake, C.J., Cole, S.P.C. et Deeley, R.G.** 2003. Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *J. Biol. Chem.* **278**:38537-38547.
- Perea, S., Lopez-Ribot, J.L., Wickes, B.L., Kirkpatrick, W.R., Dib, O.P., Bachmann, S.P., Keller, S.M., Martinez, M. et Patterson, T.F.** 2002. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1695-1703.
- Perea, S. et Patterson, T.F.** 2002. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin. Infect. Dis.* **35**:1073-1080.
- Perea, S., Lopez-Ribot, J.L., Kirkpatrick, W.R., McAtee, R.K., Santillan, R.A., Martinez, M., Calabrese, D., Sanglard, D. et Patterson, T.F.** 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**:2676-2684.
- Perepnikhatka, V., Fischer, F.J., Niimi, M., Baker, R.A., Cannon, R.D., Wang, Y.K., Sherman, F. et Rustchenko, E.** 1999. Specific chromosome alterations in fluconazole-resistant mutants of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**:4041-4049.
- Petrovic, S., Pascolo, L., Gallo, R., Cupelli, F., Ostrow, J.D., Goffeau, A., Tiribelli, C. et Bruschi, C.V.** 2000. The products of *YCF1* and *YLL015w (BPT1)* cooperate for

the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**:561-571.

- Pfaller, M.A.** 1996. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* **22 Suppl 2**:S89-S94.
- Pfaller, M.A. et Diekema, D.J.** 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4419-4431.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Boyken, L., Messer, S.A., Tendolkar, S., Hollis, R.J. et Goldstein, B.P.** 2005. Effectiveness of anidulafungin in eradicating *Candida* species in invasive candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4795-4797.
- Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Fluit, A.C., Verhoef, J., Sader, H.S., Messer, S.A., Houston, A., Coffman, S. et Hollis, R.J.** 1999. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species in the European SENTRY Program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **35**:19-25.
- Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Sader, H.S., Hollis, R.J. et Messer, S.A.** 1998a. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1886-1889.
- Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Sader, H.S., Messer, S.A., Houston, A., Coffman, S. et Hollis, R.J.** 2000. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:747-751.
- Pfaller, M.A., Marco, F., Messer, S.A. et Jones, R.N.** 1998b. In vitro activity of two echinocandin derivatives, LY303366 and MK-0991 (L-743,792), against clinical isolates of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, and other filamentous fungi. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **30**:251-255.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Boyken, L., Huynh, H., Hollis, R.J. et Diekema, D.J.** 2002. In vitro activities of 5-fluorocytosine against 8,803 clinical isolates of *Candida* spp.: global assessment of primary resistance using National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility testing methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3518-3521.
- Phillips, S.E., Vincent, P., Rizzieri, K.E., Schaaf, G., Bankaitis, V.A. et Gaucher, E.A.** 2006. The diverse biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins in eukaryotes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**:21-49.

- Pierard, G.E., Arrese, J.E. et Pierard-Franchimont, C.** 2000. Itraconazole. *Expert Opin. Pharmacother.* **1**:287-304.
- Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L. et Samuels, A.L.** 2004. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**:702-704.
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Costa-de-Oliveira, S., Ricardo, E. et Mardh, P.A.** 2005. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *J Antimicrob. Chemother.* **56**:678-685.
- Pinjon, E., Jackson, C.J., Kelly, S.L., Sanglard, D., Moran, G., Coleman, D.C. et Sullivan, D.J.** 2005. Reduced azole susceptibility in genotype 3 *Candida dubliniensis* isolates associated with increased *CdCDR1* and *CdCDR2* expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1312-1318.
- Piper, P., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Muhlbauer, M., Coote, P. et Kuchler, K.** 1998. The *PDR12* ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J* **17**:4257-4265.
- Plempner, R.K., Egner, R., Kuchler, K. et Wolf, D.H.** 1998. Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol. Chem.* **273**:32848-32856.
- Podust, L.M., Poulos, T.L. et Waterman, M.R.** 2001. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (*CYP51*) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:3068-3073.
- Polak, A.** 1993. Combination of amorolfine with various antifungal drugs in dermatophytosis. *Mycoses* **36**:43-49.
- Prasad, R., Dewergifosse, P., Goffeau, A. et Balzi, E.** 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* **27**:320-329.
- Prasad, T., Saini, P., Gaur, N.A., Vishwakarma, R.A., Khan, L.A., Haq, Q.M. et Prasad, R.** 2005. Functional analysis of *CalPT1*, a sphingolipid biosynthetic gene involved in multidrug resistance and morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3442-3452.
- Puri, N., Krishnamurthy, S., Habib, S., Hasnain, S.E., Goswami, S.K. et Prasad, R.** 1999. *CDR1*, a multidrug resistance gene from *Candida albicans*, contains multiple regulatory domains in its promoter and the distal AP-1 element mediates its induction by miconazole. *FEMS Microbiol Lett* **180**:213-219.

- Qu, Q. et Sharom, F.J.** 2001. FRET analysis indicates that the two ATPase active sites of the P-glycoprotein multidrug transporter are closely associated. *Biochemistry* **40**:1413-1422.
- Raad, I., Hanna, H., Boktour, M., Girgawy, E., Danawi, H., Mardani, M., Kontoyiannis, D., Darouiche, R., Hachem, R. et Bodey, G.P.** 2004. Management of central venous catheters in patients with cancer and candidemia. *Clin Infect Dis* **38**:1119-1127.
- Radeva, G., Perabo, J. et Sharom, F.J.** 2005. P-glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains. *FEBS J* **272**:4924-4937.
- Ramachandra, M., Ambudkar, S.V., Chen, D., Hrycyna, C.A., Dey, S., Gottesman, M.M. et Pastan, I.** 1998. Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry* **37**:5010-5019.
- Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T.F., Wickes, B.L. et Lopez-Ribot, J.L.** 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob. Chemother.* **49**:973-980.
- Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P. et Lopez-Ribot, J.L.** 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot. Cell* **4**:633-638.
- Ramakrishnan, C., Dani, V.S. et Ramasarma, T.** 2002. A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein Eng* **15**:783-798.
- Rao, U.S. et Scarborough, G.A.** 1994. Direct demonstration of high affinity interactions of immunosuppressant drugs with the drug binding site of the human P-glycoprotein. *Mol Pharmacol.* **45**:773-776.
- Raymond, M., Dignard, D., Alarco, A.M., Mainville, N., Magee, B.B. et Thomas, D.Y.** 1998. A Ste6p/P-glycoprotein homologue from the asexual yeast *Candida albicans* transports the a-factor mating pheromone in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **27**:587-598.
- Raymond, M., Gros, P., Whiteway, M. et Thomas, D.Y.** 1992. Functional complementation of yeast *ste6* by a mammalian multidrug resistance *mdr* gene. *Science* **256**:232-234.
- Raymond, M., Ruetz, S., Thomas, D.Y. et Gros, P.** 1994. Functional expression of P-glycoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* confers cellular resistance to the immunosuppressive and antifungal agent FK520. *Mol Cell Biol.* **14**:277-286.
- Rex, J.H., Pfaller, M.A., Galgiani, J.N., Bartlett, M.S., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M.A., Lancaster, M., Odds, F.C., Rinaldi, M.G., Walsh, T.J. et Barry, A.L.** 1997. Development of interpretive breakpoints for antifungal

susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clin. Infect. Dis. **24**:235-247.

- Rex, J.H., Rinaldi, M.G. et Pfaller, M.A.** 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:1-8.
- Rex, J.H. et Walsh, T.J.** 1999. Estimating the true cost of amphotericin B. Clin. Infect. Dis. **29**:1408-1410.
- Rex, J.H., Walsh, T.J. et Anaissie, E.J.** 1998. Fungal infections in iatrogenically compromised hosts. Adv. Intern. Med **43**:321-371.
- Rex, J.H., Walsh, T.J., Sobel, J.D., Filler, S.G., Pappas, P.G., Dismukes, W.E. et Edwards, J.E.** 2000. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis **30**:662-678.
- Reyes, C.L. et Chang, G.** 2005. Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP-vanadate and lipopolysaccharide. Science **308**:1028-1031.
- Richardson, M.D.** 2005. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. J Antimicrob. Chemother. **56 Suppl 1**:i5-i11.
- Richter, S.S., Galask, R.P., Messer, S.A., Hollis, R.J., Diekema, D.J. et Pfaller, M.A.** 2005. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. J. Clin. Microbiol. **43**:2155-2162.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. et .** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science **245**:1066-1073.
- Robey, R.W., Honjo, Y., Morisaki, K., Nadjem, T.A., Runge, S., Risbood, M., Poruchynsky, M.S. et Bates, S.E.** 2003. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. Br. J Cancer **89**:1971-1978.
- Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczowski, M., Carvajal, E., Balzi, E. et Goffeau, A.** 2001. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Microbiol Biotechnol **3**:207-214.
- Rose, H.D.** 1978. Venous catheter-associated candidemia. Am. J. Med. Sci. **275**:265-269.
- Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Ford, R.C. et Higgins, C.F.** 1997. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. J Biol. Chem. **272**:10685-10694.

- Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Modok, S., Higgins, C.F. et Ford, R.C.** 2005. Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J Biol. Chem.* **280**:2857-2862.
- Rosenberg, M.F., Kamis, A.B., Aleksandrov, L.A., Ford, R.C. et Riordan, J.R.** 2004. Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol. Chem.* **279**:39051-39057.
- Rosenberg, M.F., Kamis, A.B., Callaghan, R., Higgins, C.F. et Ford, R.C.** 2003. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol. Chem.* **278**:8294-8299.
- Rosenberg, M.F., Velarde, G., Ford, R.C., Martin, C., Berridge, G., Kerr, I.D., Callaghan, R., Schmidlin, A., Wooding, C., Linton, K.J. et Higgins, C.F.** 2001. Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J* **20**:5615-5625.
- Ruetz, S.** 1998. Yeast secretory vesicle system for expression and functional characterization of P-glycoproteins. *Methods Enzymol.* **292**:382-396.
- Ruetz, S. et Gros, P.** 1994. Functional expression of P-glycoproteins in secretory vesicles. *J Biol. Chem.* **269**:12277-12284.
- Ruhnke, Markus.** 2002. Skin and mucous membrane infections, p. 307-325. Dans *Candida and Candidiasis*, 2ième édition. Calderone, R. A. (Ed.). ASM Press, Washington, D.C.
- Rustad, T.R., Stevens, D.A., Pfaller, M.A. et White, T.C.** 2002. Homozygosity at the *Candida albicans* *MTL* locus associated with azole resistance. *Microbiology* **148**:1061-1072.
- Ryder, N.S.** 1992. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br. J Dermatol.* **126 Suppl 39**:2-7.
- Ryder, N.S., Frank, I. et Dupont, M.C.** 1986. Ergosterol biosynthesis inhibition by the thiocarbamate antifungal agents tolnaftate and tolciolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:858-860.
- Ryder, N.S. et Leitner, I.** 2001. Synergistic interaction of terbinafine with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. *Med Mycol.* **39**:91-95.
- Ryder, N.S., Wagner, S. et Leitner, I.** 1998. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1057-1061.

- Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R. et Komano, T.** 1993. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol. Chem.* **268**:6077-6080.
- Safa, A.R.** 1998. Photoaffinity labels for characterizing drug interaction sites of P-glycoprotein. *Methods Enzymol.* **292**:289-307.
- Safa, A.R.** 1999. Photoaffinity analogs for multidrug resistance-related transporters and their use in identifying chemosensitizers. *Drug Resist. Updat.* **2**:371-381.
- Safa, A.R.** 2004. Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators. *Curr. Med Chem. Anti. - Canc. Agents* **4**:1-17.
- Safa, A.R., Glover, C.J., Sewell, J.L., Meyers, M.B., Biedler, J.L. et Felsted, R.L.** 1987. Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J Biol. Chem.* **262**:7884-7888.
- Saidane, S., Weber, S., De, D., X, St Germain, G. et Raymond, M.** 2006. *PDR16*-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **60**:1546-1562.
- Saier, M.H., Jr.** 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol. Rev* **64**:354-411.
- Saini, P., Gaur, N.A. et Prasad, R.** 2006. Chimeras of the ABC drug transporter Cdr1p reveal functional indispensability of transmembrane domains and nucleotide-binding domains, but transmembrane segment 12 is replaceable with the corresponding homologous region of the non-drug transporter Cdr3p. *Microbiology* **152**:1559-1573.
- Saini, P., Prasad, T., Gaur, N.A., Shukla, S., Jha, S., Komath, S.S., Khan, L.A., Haq, Q.M. et Prasad, R.** 2005. Alanine scanning of transmembrane helix 11 of Cdr1p ABC antifungal efflux pump of *Candida albicans*: identification of amino acid residues critical for drug efflux. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:77-86.
- Sangeorzan, J.A., Bradley, S.F., He, X.G., Zarins, L.T., Ridenour, G.L., Tiballi, R.N. et Kauffman, C.A.** 1994. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients - colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *American Journal of Medicine* **97**:339-346.
- Sanglard, D. et Bille, J.** 2002. Current understanding of the modes of action of and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections, p. 349-383. Dans *Candida* and Candidiasis, 2ième édition. Calderone, R. A. (Ed.). ASM Press, Washington, D.C.
- Sanglard, D., Ischer, F. et Bille, J.** 2001. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1174-1183.

- Sanglard, D., Ischer, F., Calabrese, D., Majcherczyk, P.A. et Bille, J.** 1999. The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2753-2765.
- Sanglard, D., Ischer, F., Koymans, L. et Bille, J.** 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:241-253.
- Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J. et Bille, J.** 2003a. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol* **48**:959-976.
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. et Bille, J.** 1996. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2300-2305.
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. et Bille, J.** 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143**:405-416.
- Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M. et Bille, J.** 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2378-2386.
- Sanglard, D. et Odds, F.C.** 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2**:73-85.
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D. et Bille, J.** 2003b. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2404-2412.
- Sankaran, B., Bhagat, S. et Senior, A.E.** 1997. Inhibition of P-glycoprotein ATPase activity by beryllium fluoride. *Biochemistry* **36**:6847-6853.
- Santos, M.A., Cheesman, C., Costa, V., Moradas-Ferreira, P. et Tuite, M.F.** 1999. Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in *Candida* spp. *Mol Microbiol* **31**:937-947.
- Santos, M.A. et Tuite, M.F.** 1995. The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res* **23**:1481-1486.
- Santos, M.A.S., Moura, G., Massey, S.E. et Tuite, M.F.** 2004. Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends in Genetics* **20**:95-102.

- Saraste, M., Sibbald, P.R. et Wittinghofer, A.** 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**:430-434.
- Sauna, Z.E. et Ambudkar, S.V.** 2000. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **97**:2515-2520.
- Sauna, Z.E. et Ambudkar, S.V.** 2001. Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol. Chem.* **276**:11653-11661.
- Sauna, Z.E., Muller, M., Peng, X.H. et Ambudkar, S.V.** 2002. Importance of the conserved Walker B glutamate residues, 556 and 1201, for the completion of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein (ABCB1). *Biochemistry* **41**:13989-14000.
- Schmees, G., Stein, A., Hunke, S., Landmesser, H. et Schneider, E.** 1999. Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur. J Biochem.* **266**:420-430.
- Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M.A., Holland, I.B. et Stubbs, M.T.** 2003. Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol.* **330**:333-342.
- Schmitt, L. et Tampe, R.** 2002. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**:754-760.
- Schneider, E. et Hunke, S.** 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:1-20.
- Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Egner, R., Ecker, G. et Kuchler, K.** 2003a. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:291-300.
- Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Krapf, G., Enzinger, S., Presterl, E. et Kuchler, K.** 2003b. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol. Microbiol.* **48**:225-235.
- Selmecki, A., Bergmann, S. et Berman, J.** 2005. Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol Microbiol* **55**:1553-1565.
- Senior, A.E., al Shawi, M.K. et Urbatsch, I.L.** 1995. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **377**:285-289.

- Senior, A.E. et Bhagat, S.** 1998. P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. *Biochemistry* **37**:831-836.
- Servos, J., Haase, E. et Brendel, M.** 1993. Gene *SNQ2* of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. *Mol Gen. Genet.* **236**:214-218.
- Shani, N., Jimenez-Sanchez, G., Steel, G., Dean, M. et Valle, D.** 1997. Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum. Mol. Genet.* **6**:1925-1931.
- Sharma, K.G., Mason, D.L., Liu, G., Rea, P.A., Bachhawat, A.K. et Michaelis, S.** 2002. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell* **1**:391-400.
- Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A. et Sibley, C.M.** 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:40-79.
- Sheppard, D.N. et Welsh, M.J.** 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**:23-45.
- Sheps, J.A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D.L. et Ling, V.** 2004. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol* **5**:R15-.
- Sherman, F.** 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**:3-21.
- Shukla, S., Ambudkar, S.V. et Prasad, R.** 2004a. Substitution of threonine-1351 in the multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans* results in hypersusceptibility to antifungal agents and threonine-1351 is essential for synergic effects of calcineurin inhibitor FK520. *J Antimicrob. Chemother.* **54**:38-45.
- Shukla, S., Rai, V., Banerjee, D. et Prasad, R.** 2006. Characterization of Cdr1p, a major multidrug efflux protein of *Candida albicans*: purified protein is amenable to intrinsic fluorescence analysis. *Biochemistry* **45**:2425-2435.
- Shukla, S., Saini, P., Smriti, Jha, S., Ambudkar, S.V. et Prasad, R.** 2003. Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter Cdr1p. *Eukaryot. Cell* **2**:1361-1375.
- Shukla, S., Sauna, Z.E., Prasad, R. et Ambudkar, S.V.** 2004b. Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**:520-525.
- Silver, R.P., Prior, K., Nsahlai, C. et Wright, L.F.** 2001. ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Research in Microbiology* **152**:357-364.

- Singer, T., Haefner, S., Hoffmann, M., Fischer, M., Ilyina, J. et Hilt, W.** 2003. Sit4 phosphatase is functionally linked to the ubiquitin-proteasome system. *Genetics* **164**:1305-1321.
- Singh, N.** 2001. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin. Infect. Dis.* **33**:1692-1696.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. et Soll, D.R.** 1987. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* **169**:189-197.
- Smith, C.A. et Rayment, I.** 1996. Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys. J* **70**:1590-1602.
- Smith, D.B. et Johnson, K.S.** 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene* **67**:31-40.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J. et Hunt, J.F.** 2002. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell* **10**:139-149.
- Smolinski, K.N., Shah, S.S., Honig, P.J. et Yan, A.C.** 2005. Neonatal cutaneous fungal infections. *Curr. Opin. Pediatr.* **17**:486-493.
- Smriti, Krishnamurthy, S., Dixit, B.L., Gupta, C.M., Milewski, S. et Prasad, R.** 2002. ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators. *Yeast* **19**:303-318.
- Smriti, Krishnamurthy, S.S. et Prasad, R.** 1999. Membrane fluidity affects functions of Cdr1p, a multidrug ABC transporter of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* **173**:475-481.
- Sobel, J.D.** 1997. Vaginitis. *N. Engl. J. Med.* **337**:1896-1903.
- Sobel, J.D.** 2002. Treatment of vaginal *Candida* infections. *Expert. Opin. Pharmacother.* **3**:1059-1065.
- Sokol-Anderson, M.L., Brajtburg, J. et Medoff, G.** 1986. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect. Dis.* **154**:76-83.
- Soll, D.R.** 2004. Mating-type locus homozygosis, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays* **26**:10-20.
- St Germain, G., Laverdiere, M., Pelletier, R., Bourgault, A.M., Libman, M., Lemieux, C. et Noel, G.** 2001. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to

- 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada. *J Clin. Microbiol.* **39**:949-953.
- Stefkova, J., Poledne, R. et Hubacek, J.A.** 2004. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* **53**:235-243.
- Sturley, S.L.** 2000. Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1529**:155-163.
- Subba, R.G., Bachhawat, A.K. et Gupta, C.M.** 2002. Two-hybrid-based analysis of protein-protein interactions of the yeast multidrug resistance protein, Pdr5p. *Funct. Integr. Genomics* **1**:357-366.
- Sudbery, P., Gow, N. et Berman, J.** 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**:317-324.
- Syed, T.A. et Maibach, H.I.** 2000. Butenafine hydrochloride: for the treatment of interdigital tinea pedis. *Expert Opin. Pharmacother.* **1**:467-473.
- Szabo, K., Szakacs, G., Hegedus, T. et Sarkadi, B.** 1999. Nucleotide occlusion in the human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: Different patterns in the two nucleotide binding domains. *J. Biol. Chem.* **274**:12209-12212.
- Szentpetery, Z., Kern, A., Liliom, K., Sarkadi, B., Varadi, A. et Bakos, E.** 2004. The role of the conserved glycines of ATP-binding cassette signature motifs of MRP1 in the communication between the substrate-binding site and the catalytic centers. *J Biol. Chem.* **279**:41670-41678.
- Taglicht, D. et Michaelis, S.** 1998. *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. *Methods Enzymol.* **292**:130-162.
- Talibi, D. et Raymond, M.** 1999. Isolation of a putative *Candida albicans* transcriptional regulator involved in pleiotropic drug resistance by functional complementation of a *pdr1 pdr3* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**:231-240.
- Tamai, I. et Safa, A.R.** 1991. Azidopine noncompetitively interacts with vinblastine and cyclosporin A binding to P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *J Biol. Chem.* **266**:16796-16800.
- Tannert, A., Pohl, A., Pomorski, T. et Herrmann, A.** 2003. Protein-mediated transbilayer movement of lipids in eukaryotes and prokaryotes: the relevance of ABC transporters. *Int. J Antimicrob. Agents* **22**:177-187.
- Taylor, B.N., Fichtenbaum, C., Saavedra, M., Slavinsky, I.J., Swoboda, R., Wozniak, K., Arribas, A., Powderly, W. et Fidel Jr, P.L.** 2000. *In vivo* virulence of *Candida albicans* isolates causing mucosal infections in people infected with the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **182**:955-959.

- Tiffany, K.F., Smith, P.B. et Benjamin, D.K., Jr.** 2005. Neonatal candidiasis: prophylaxis and treatment. *Expert. Opin. Pharmacother.* **6**:1647-1655.
- Tomblin, G., Bartholomew, L.A., Tyndall, G.A., Gimi, K., Urbatsch, I.L. et Senior, A.E.** 2004a. Properties of P-glycoprotein with mutations in the "catalytic carboxylate" glutamate residues. *J Biol. Chem.* **279**:46518-46526.
- Tomblin, G., Bartholomew, L.A., Urbatsch, I.L. et Senior, A.E.** 2004b. Combined mutation of catalytic glutamate residues in the two nucleotide binding domains of P-glycoprotein generates a conformation that binds ATP and ADP tightly. *J. Biol. Chem.* **279**:31212-31220.
- Tomblin, G., Muharemagic, A., White, L.B. et Senior, A.E.** 2005. Involvement of the "occluded nucleotide conformation" of P-glycoprotein in the catalytic pathway. *Biochemistry* **44**:12879-12886.
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Sakata, K., Kakinuma, Y. et Igarashi, K.** 1999. Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *J Biol. Chem.* **274**:3265-3267.
- Tommasini, R., Evers, R., Vogt, E., Mornet, C., Zaman, G.J., Schinkel, A.H., Borst, P. et Martinoia, E.** 1996. The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* **93**:6743-6748.
- Tutulan-Cunita, A.C., Mikoshi, M., Mizunuma, M., Hirata, D. et Miyakawa, T.** 2005a. Mutational analysis of the yeast multidrug resistance ABC transporter Pdr5p with altered drug specificity. *Genes Cells* **10**:409-420.
- Tutulan-Cunita, A.C., Ohnishi, T., Mizunuma, M., Hirata, D. et Miyakawa, T.** 2005b. Involvement of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p ATP-binding cassette transporter in calcium homeostasis. *Biosci. Biotechnol Biochem* **69**:857-860.
- Uhl, M.A., Biery, M., Craig, N. et Johnson, A.D.** 2003. Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C. albicans*. *EMBO J* **22**:2668-2678.
- Ulloa, M. et Hanlin, R. T.** 2000. Illustrated dictionary of mycology. 1ième édition. APS Press, St-Paul, MN. 448 p.
- Urbatsch, I.L., Beaudet, L., Carrier, I. et Gros, P.** 1998. Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry* **37**:4592-4602.
- Urbatsch, I.L., Julien, M., Carrier, I., Rousseau, M.E., Cayrol, R. et Gros, P.** 2000. Mutational analysis of conserved carboxylate residues in the nucleotide binding sites of P-glycoprotein. *Biochemistry* **39**:14138-14149.

- Urbatsch, I.L., Sankaran, B., Weber, J. et Senior, A.E.** 1995. P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J. Biol. Chem.* **270**:19383-19390.
- Urbatsch, I.L., Tyndall, G.A., Tomblin, G. et Senior, A.E.** 2003. P-glycoprotein catalytic mechanism: studies of the ADP-vanadate inhibited state. *J Biol. Chem.* **278**:23171-23179.
- Urbatsch, I.L., Wilke-Mounts, S., Gimi, K. et Senior, A.E.** 2001. Purification and characterization of N-glycosylation mutant mouse and human P-glycoproteins expressed in *Pichia pastoris* cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**:171-177.
- van Burik, J.A. et Magee, P.T.** 2001. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:743-772.
- Van Cutsem, J., Van Gerven, F., Van de Ven, M.A., Borgers, M. et Janssen, P.A.** 1984. Itraconazole, a new triazole that is orally active in aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**:527-534.
- van den Hazel, H.B., Pichler, H., Matta, M.A.d.V., Leitner, E., Goffeau, A. et Daum, G.** 1999. *PDR16* and *PDR17*, two homologous genes of *Saccharomyces cerevisiae*, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. *J. Biol. Chem.* **274**:1934-1941.
- van der, D.C. et Tampe, R.** 2004. How do ABC transporters drive transport? *Biol Chem.* **385**:927-933.
- van Veen, H.W., Higgins, C.F. et Konings, W.N.** 2001. Multidrug transport by ATP binding cassette transporters: a proposed two-cylinder engine mechanism. *Res Microbiol* **152**:365-374.
- van Veen, H.W., Margolles, A., Muller, M., Higgins, C.F. et Konings, W.N.** 2000. The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO J.* **19**:2503-2514.
- van Veen, H.W., Callaghan, R., Soceneantu, L., Sardini, A., Konings, W.N. et Higgins, C.F.** 1998. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* **391**:291-295.
- Vanden Bossche, H., Marichal, P., Gorrens, J., Bellens, D., Moereels, H. et Janssen, P.A.** 1990. Mutation in cytochrome P-450-dependent 14 α -demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. *Biochem. Soc. Trans.* **18**:56-59.
- Vanden Bossche, H., Marichal, P., Odds, F.C., Le Jeune, L. et Coene, M.C.** 1992. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2602-2610.

- Venkateswarlu, K., Denning, D.W., Manning, N.J. et Kelly, S.L. 1995. Resistance to fluconazole in *Candida albicans* from AIDS patients correlated with reduced intracellular accumulation of drug. *FEMS Microbiol Lett.* **131**:337-341.
- Venkateswarlu, K., Denning, D.W., Manning, N.J. et Kelly, S.L. 1996. Reduced accumulation of drug in *Candida krusei* accounts for itraconazole resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2443-2446.
- Venkateswarlu, K., Taylor, M., Manning, N.J., Rinaldi, M.G. et Kelly, S.L. 1997. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:748-751.
- Venter, H., Shilling, R.A., Velamakanni, S., Balakrishnan, L. et van Veen, H.W. 2003. An ABC transporter with a secondary-active multidrug translocator domain. *Nature* **426**:866-870.
- Verdon, G., Albers, S.V., Dijkstra, B.W., Driessen, A.J. et Thunnissen, A.M. 2003. Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus*: nucleotide-free and nucleotide-bound conformations. *J Mol Biol.* **330**:343-358.
- Vergani, P., Nairn, A.C. et Gadsby, D.C. 2003. On the mechanism of MgATP-dependent gating of CFTR Cl⁻ channels. *J. Gen. Physiol* **121**:17-36.
- Vermes, A., Guchelaar, H.J. et Dankert, J. 2000. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob. Chemother.* **46**:171-179.
- Vigano, C., Grimard, V., Margolles, A., Goormaghtigh, E., van Veen, H.W., Konings, W.N. et Ruyschaert, J.M. 2002. A new experimental approach to detect long-range conformational changes transmitted between the membrane and cytosolic domains of LmrA, a bacterial multidrug transporter. *FEBS Lett* **530**:197-203.
- Wada, S., Niimi, M., Niimi, K., Holmes, A.R., Monk, B.C., Cannon, R.D. et Uehara, Y. 2002. *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters show phosphorylation-dependent pumping properties. *J. Biol. Chem.* **277**:46809-46821.
- Wada, S., Tanabe, K., Yamazaki, A., Niimi, M., Uehara, Y., Niimi, K., Lamping, E., Cannon, R.D. et Monk, B.C. 2005. Phosphorylation of *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporter Cdr1p regulates drug efflux activity and ATPase stability. *J Biol. Chem.* **280**:94-103.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. et Gay, N.J. 1982. Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases, and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **8**:945-951.

- Wang, E.J., Lew, K., Casciano, C.N., Clement, R.P. et Johnson, W.W. 2002. Interaction of common azole antifungals with P-glycoprotein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:160-165.
- Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F. et Tall, A.R. 2004. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *PNAS* **101**:9774-9779.
- Wang, Y., Cao, Y.Y., Jia, X.M., Cao, Y.B., Gao, P.H., Fu, X.P., Ying, K., Chen, W.S. et Jiang, Y.Y. 2006. Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. *Free Radic. Biol Med* **40**:1201-1209.
- Wehrschutz-Sigl, E., Jungwirth, H., Bergler, H. et Hogenauer, G. 2004. The transporters Pdr5p and Snq2p mediate diazaborine resistance and are under the control of the gain-of-function allele *PDR1-12*. *Eur J Biochem* **271**:1145-1152.
- Wemmie, J.A. et Moye-Rowley, W.S. 1997. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* ATP-binding cassette transporter protein Ycf1p. *Mol Microbiol* **25**:683-694.
- Wemmie, J.A., Szczypka, M.S., Thiele, D.J. et Moye-Rowley, W.S. 1994. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J Biol. Chem.* **269**:32592-32597.
- Wendler, F., Bergler, H., Prutej, K., Jungwirth, H., Zisser, G., Kuchler, K. et Hogenauer, G. 1997. Diazaborine resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals a link between *YAPI* and the pleiotropic drug resistance genes *PDR1* and *PDR3*. *J. Biol. Chem.* **272**:27091-27098.
- Westwater, C., Balish, E. et Schofield, D.A. 2005. *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot Cell* **4**:1654-1661.
- Wheat, J., MaWhinney, S., Hafner, R., McKinsey, D., Chen, D., Korzun, A., Shakan, K.J., Johnson, P., Hamill, R., Bamberger, D., Pappas, P., Stansell, J., Koletar, S., Squires, K., Larsen, R.A., Cheung, T., Hyslop, N., Lai, K.K., Schneider, D., Kauffman, C., Saag, M., Dismukes, W. et Powderly, W. 1997. Treatment of histoplasmosis with fluconazole in patients with acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Acquired Immunodeficiency Syndrome Clinical Trials Group and Mycoses Study Group. *Am. J. Med.* **103**:223-232.
- Whelan, W.L. 1987. The genetic basis of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Crit Rev. Microbiol* **15**:45-56.
- White, T.C. 1997. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected

- with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1482-1487.
- White, T.C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L.F. et Stevens, D.A.** 2002. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1704-1713.
- White, T.C., Marr, K.A. et Bowden, R.A.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382-402.
- Wiederhold, N.P. et Lewis, R.E.** 2003. The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **12**:1313-1333.
- Winston, D.J., Hathorn, J.W., Schuster, M.G., Schiller, G.J. et Territo, M.C.** 2000. A multicenter, randomized trial of fluconazole versus amphotericin B for empiric antifungal therapy of febrile neutropenic patients with cancer. *Am. J Med* **108**:282-289.
- Wirsching, S., Michel, S., Kohler, G. et Morschhauser, J.** 2000a. Activation of the multiple drug resistance gene *MDR1* in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol.* **182**:400-404.
- Wirsching, S., Michel, S. et Morschhauser, J.** 2000b. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol* **36**:856-865.
- Woehlecke, H., Pohl, A., Alder-Baerens, N., Lage, H. et Herrmann, A.** 2003. Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2). *Biochem J* **376**:489-495.
- Wolfger, H., Mahe, Y., Parle-McDermott, A., Delahodde, A. et Kuchler, K.** 1997. The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes PDR10 and PDR15 are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators. *FEBS Lett* **418**:269-274.
- Wolfger, H., Mamnun, Y.M. et Kuchler, K.** 2001. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol* **152**:375-389.
- Wolfger, H., Mamnun, Y.M. et Kuchler, K.** 2004. The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. *J Biol. Chem.* **279**:11593-11599.
- Xiao, L., Madison, V., Chau, A.S., Loebenberg, D., Palermo, R.E. et McNicholas, P.M.** 2004. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:568-574.

- Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S. et Zhang, J.T.** 2004. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.* **279**:19781-19789.
- Yamamoto, S., Hiraga, K., Abiko, A., Hamanaka, N. et Oda, K.** 2005. A new function of isonitrile as an inhibitor of the Pdr5p multidrug ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **330**:622-628.
- Yamamura, D.L., Rotstein, C., Nicolle, L.E. et Ioannou, S.** 1999. Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Disease Registry, 1992-1994. *Fungal Disease Registry of the Canadian Infectious Disease Society. CMAJ.* **160**:493-499.
- Yan, C., Lee, L.H. et Davis, L.I.** 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J* **17**:7416-7429.
- Yang, X., Talibi, D., Weber, S., Poisson, G. et Raymond, M.** 2001. Functional isolation of the *Candida albicans* *FCR3* gene encoding a bZip transcription factor homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Yap3p. *Yeast* **18**:1217-1225.
- Yeo, S.F. et Wong, B.** 2002. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:465-484.
- Yuan, Y.R., Blecker, S., Martsinkevich, O., Millen, L., Thomas, P.J. et Hunt, J.F.** 2001. The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol. Chem.* **276**:32313-32321.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Benabdelhak, H., Holland, I.B. et Schmitt, L.** 2005a. Functional characterization and ATP-induced dimerization of the isolated ABC-domain of the haemolysin B transporter. *Biochemistry* **44**:9680-9690.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I.B. et Schmitt, L.** 2005b. H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J.* **24**:1901-1910.
- Zhang, D.W., Graf, G.A., Gerard, R., Cohen, J.C. et Hobbs, H.H.** 2005. Functional asymmetry of nucleotide binding domains in *abcg5* and *abcg8*. *J. Biol. Chem.*:M512277200-.
- Zhang, X., Cui, Z., Miyakawa, T. et Moye-Rowley, W.S.** 2001. Cross-talk between transcriptional regulators of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem.* **276**:8812-8819.
- Zhang, X., de Micheli, M., Coleman, S.T., Sanglard, D. et Moye-Rowley, W.S.** 2000. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol. Microbiol.* **36**:618-629.

- Zheleznova, E.E., Markham, P.N., Neyfakh, A.A. et Brennan, R.G.** 1999. Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter. *Cell* **96**:353-362.
- Zuniga, F.A., Shi, G., Haller, J.F., Rubashkin, A., Flynn, D.R., Iserovich, P. et Fischbarg, J.** 2001. A three-dimensional model of the human facilitative glucose transporter Glut1. *J. Biol. Chem.* **276**:44970-44975.

