

2m11.2593.4

Université de Montréal

Clonage et caractérisation du gène *SEC4* de *Candida albicans*

par

Martin Clément

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en biologie moléculaire

Janvier 1998

©Martin Clément, 1998



QH
506
U54
1998
V.007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Clonage et caractérisation du gène *SEC4* de *Candida albicans*

présenté par :

Martin Clément

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Marc Drolet

Dr Pierre Belhumeur

Dr Louis de Repentigny

Dr Guy Lemay

Mémoire accepté le : 02.04.1998

1. SOMMAIRE

Le produit du gène *SEC4* est une des composantes majeures de l'appareil de sécrétion chez *S. cerevisiae*. Plus spécifiquement, Sec4p jouerait un rôle très important en ce qui a trait au ciblage et à la fusion des vésicules de sécrétion aux sites d'exocytose localisés à la surface cellulaire. Récemment, l'implication génétique de *SEC4* avec le gène *RHO3* de *S. cerevisiae*, lequel est requis afin de maintenir la polarité cellulaire lors de la croissance de la cellule-fille à la surface de la cellule-mère, nous a incités à étudier le rôle de Sec4p au niveau des changements morphologiques observés chez la levure pathogène *Candida albicans*.

Par criblage d'une banque génomique, nous avons cloné l'homologue du gène *SEC4* de *S. cerevisiae* chez *Candida albicans*. Le produit de ce gène est une protéine de 210 acides aminés, démontrant une homologie de 75% avec le gène *SEC4* de *S. cerevisiae*. Des tests de complémentation fonctionnelle ont démontré que le gène Ca*SEC4* peut compenser la perte de fonction du gène *SEC4* de *S. cerevisiae* observée chez le mutant thermosensible *sec4-8*, lorsque ce dernier est incubé à température restrictive. Finalement, par l'analyse de « Northern blot », nous avons démontré que l'ARNm Ca*SEC4* est exprimé de façon ubiquitaire chez les différentes formes de croissance observées chez *Candida albicans*.

En conclusion, nous avons cloné et caractérisé le gène *SEC4* de *Candida albicans*. L'expression ubiquitaire de l'ARNm Ca*SEC4* au niveau des différentes

morphologies retrouvées chez *Candida albicans* et *Candida dubliniensis* indique que CaSec4p doit jouer un rôle essentiel, peu importe la forme de croissance de ces pathogènes.

2. TABLE DES MATIÈRES

1. SOMMAIRE	iii
2. TABLE DES MATIÈRES.....	v
3. LISTE DES FIGURES.....	vii
4. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
4.1.SÉCRÉTION DES PROTÉINES.....	2
4.1.1. LE TRANSPORT VÉSICULAIRE	4
4.1.1.1. Manteau protéique	5
4.1.1.2. Modèles qui ont aidé à la dissection du transport vésiculaire	6
4.1.2. FUSION MEMBRANAIRE : PRINCIPES GÉNÉRAUX	8
4.1.2.1. Hypothèse des SNAREs	11
4.1.2.2. Fusion au niveau de la membrane plasmique	14
4.1.2.3. La GTPase Sec4p	15
4.1.2.4. Protéines modifiant l'activité de Sec4p.....	17
4.1.2.5. Protéines associées aux vésicules de sécrétion.....	19
4.1.2.6. Protéines associées à la membrane plasmique.....	20
4.1.2.7. Le complexe Exocyst.....	22
4.1.2.8. Modèle de la fusion avec la membrane plasmique	23
4.2. POLARISATION CELLULAIRE ET SÉCRÉTION	28
4.3. CANDIDA ALBICANS	34
5. ARTICLE.....	40
5.1. Abstract.....	43

5.2. Introduction.....	44
5.3. Materials & Methods.....	47
5.4. Results & Discussion.....	51
5.5. Conclusion.....	58
5.6. Acknowledgements	59
5.7. References.....	60
6. DISCUSSION.....	65
7. REMERCIEMENTS.. ..	72
8. RÉFÉRENCES.....	74

3. LISTE DES FIGURES

Revue de la littérature

Figure 1 :	Particule de fusion de 20S retrouvée au niveau des synapses.....	13
Figure 2 :	Modèle de la fusion membranaire au niveau de la membrane plasmique des vésicules de sécrétion dérivées du compartiment trans de l'appareil de Golgi.....	27
Figure 3 :	Les cellules de levure suivent un programme de bourgeonnement spécifique des états haploïde et diploïde.....	29
Figure 4 :	Cytosquelette d'actine chez <i>S. cerevisiae</i>	31
Figure 5 :	Transition « levure/hyphe » chez <i>Candida albicans</i>	36
Figure 6 :	Cytosquelette d'actine chez <i>Candida albicans</i>	38

Article

Figure 7 :	CaSEC4 gene structure.....	52
------------	----------------------------	----

- Figure 8 : Comparison of the predicted *Candida albicans* Sec4 (CaSEC4) and *S. cerevisiae* Sec4 (ScSEC4) proteins.....53
- Figure 9 : Northern blot hybridization analysis of CaSEC4 RNA in *Candida* strains grown under various conditions.....55
- Figure 10 : Complementation of the *S.cerevisiae* sec4-8 ts mutation by CaSEC4.....57

REVUE DE LA LITTÉRATURE

4. REVUE DE LA LITTÉRATURE

4.1. SÉCRÉTION DES PROTÉINES

La sécrétion fut initialement découverte chez les cellules de mammifères (Palade, 1975). Depuis ce temps, ce même processus fut étudié chez plusieurs autres eucaryotes plus simples et démontre que la sécrétion est une fonction biologique conservée au cours de l'évolution (Rothman, 1994). Toutefois, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'appareil de sécrétion occupe seulement une petite portion au niveau du cytoplasme comparativement à celui d'une cellule de mammifère spécialisée pour cette fonction (Pringle *et al.*, 1997). Dans toutes les cellules eucaryotes, des vésicules de transport, dérivées du trans-Golgi, acheminent continuellement de nouveaux composants à la membrane plasmique par le processus d'exocytose. De plus, les cellules sécrètent divers types de molécules par le processus d'exocytose. Dans les organes spécialisés des eucaryotes supérieurs, nous retrouvons deux principales voies d'exocytose. Premièrement, certaines cellules libèrent de façon continue le contenu des différentes vésicules de sécrétion. Il s'agit alors d'une voie de sécrétion constitutive. Par contre, d'autres cellules stockent de grandes quantités de leurs produits dans des vésicules de sécrétion particulières qui ne fusionnent avec la membrane plasmique que lors d'une stimulation de la cellule par un signal extracellulaire. La voie de sécrétion constitutive fonctionne dans toutes les cellules, alors que la voie de sécrétion contrôlée existe essentiellement dans les cellules spécialisées dans la sécrétion rapide et sur commande, telles que les cellules acineuses du pancréas (Gumbiner *et Kelly*, 1982 ; Alberts *et al.*, 1989). Aussi, une cellule de mammifère qui sécrète de grandes quantités

d'enzymes de digestion ou d'hormones peptidiques ne doit pas augmenter sa surface membranaire, afin de respecter les contraintes imposées par la couche de cellules épithéliales (Pringle *et al.*, 1997). Dans de telles circonstances, le transport vésiculaire vers la membrane plasmique doit être de même amplitude que le transport vésiculaire rétrograde (de la membrane plasmique vers les endosomes).

Par contre, *S. cerevisiae* est une levure qui se reproduit par bourgeonnement et la cellule-fille se forme à partir d'une petite excroissance au niveau de la membrane plasmique. Par conséquent, la fonction principale de l'appareil de sécrétion est de générer et de délivrer de nouvelles protéines et membranes au niveau du site de bourgeonnement (Tkacz *et Lampen*, 1972 ; Field *et Schekman*, 1980). Pour cette raison, seul le processus de sécrétion constitutif est retrouvé chez *S. cerevisiae*. Dans des conditions nutritionnelles optimales, *S. cerevisiae* tend à maximiser sa vitesse de croissance et par ce fait même, la vitesse du transport vésiculaire vers la membrane plasmique (Preuss *et al.*, 1992 ; Pringle *et al.*, 1997). Ces différences majeures observées entre les levures et les eucaryotes supérieurs pourraient expliquer les variations biologiques des appareils de sécrétion. Quoiqu'il en soit, les mécanismes fondamentaux gouvernant la sécrétion ont été conservés au cours de l'évolution (Rothman, 1994).

La maturation des protéines de sécrétion vers la membrane plasmique peut être divisée en trois grandes étapes. Premièrement, les protéines sont synthétisées sur les ribosomes cytoplasmiques et par la suite, transloquées dans la lumière du réticulum

endoplasmique en présence d'un peptide signal (Blobel *et* Sabatini, 1971 ; Milstein *et al.*, 1972 ; von Heijne, 1985, 1990). Ce processus peut être co-translationnel pour certaines protéines et post-translationnel pour d'autres (Hansen *et al.*, 1986 ; Rothblatt *et* Meyers, 1986 ; Waters *et* Blobel, 1986 ; Walter *et* Blobel, 1980, 1981). Dans un deuxième temps, les protéines destinées à être sécrétées se retrouvent dans des vésicules de transport qui bourgeonnent de la membrane du réticulum endoplasmique et fusionnent avec la membrane de la face cis de l'appareil de Golgi. Finalement, des vésicules post-Golgi vont se former et se diriger vers la membrane cytoplasmique, afin de libérer leur contenu et d'apporter de nouveaux constituants membranaires (Palade, 1975). Chez *S. cerevisiae*, le ciblage des vésicules de sécrétion au site de bourgeonnement à la surface cellulaire est contrôlé par des éléments du cytosquelette (Novick *et* Botstein, 1985).

4.1.1. LE TRANSPORT VÉSICULAIRE

Le transport vésiculaire entre les différents compartiments de l'appareil de sécrétion a été découvert en 1975 par Palade et collaborateurs (Palade, 1975). Les différentes vésicules responsables de ce transport peuvent être distinguées par le contenu qu'elles transportent, mais aussi par le type de protéines qui s'assemblent autour de celles-ci lors de leur bourgeonnement au niveau du compartiment donneur. Dans les systèmes les mieux caractérisés, le transport peut se diviser en deux grandes étapes. Premièrement, la vésicule se forme suite à l'association de protéines particulières autour de celle-ci, formant ainsi un manteau protéique. Ce processus est nécessaire afin d'induire la courbure que doit adopter la membrane plasmique lors de la

formation de la vésicule et afin de sélectionner le contenu qu'elle devra transporter. Dans un deuxième temps, les vésicules sont transportées vers un compartiment cible et fusionnent avec ce dernier. Le choix de la cible dépend des différentes classes de protéines présentes à la fois sur la membrane du compartiment cible et à la surface des vésicules de transport (Pringle *et al.*, 1997).

4.1.1.1. Manteau protéique

Il existe trois classes de manteaux protéiques connues à la surface des vésicules de transport. La première classe de protéines capables de former un manteau protéique est composée de clathrine et de protéines adaptatrices formant un complexe AP (Adapter Protein complex ; Pearse *et Robinson*, 1990). Les vésicules entourées de ce manteau protéique sont appelées les vésicules recouvertes de clathrine. Ces dernières sont responsables du transport vésiculaire vers les lysosomes. La deuxième classe de vésicules de transport fut découverte lors des essais de reconstitution *in vitro* du transport intra-Golgi (Rothman, 1994). Le complexe protéique formant le manteau à la surface de ces vésicules nommées COPI (coatamer proteins I) est composé de sept sous-unités différentes soit : α -COP, β -COP, β' -COP, γ -COP, δ -COP, ε -COP et ζ -COP et d'une petite protéine G de 20 kDa appelée Arf1p (ADP ribosylation factor 1 ; Serafini *et al.*, 1991 ; Waters *et al.*, 1991). Ces vésicules sont impliquées dans le transport intra-Golgi, mais aussi dans le trafic antérograde et rétrograde entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Bednarek *et al.*, 1995). Finalement, il y a les protéines COPII qui tapissent l'extérieur des vésicules contrôlant le transport antérograde entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Barlowe *et al.*,

1994). Le manteau de ces dernières est composé de deux complexes protéiques soit, les complexes Sec13p/Sec31p et Sec23p/Sec24p, ainsi que d'une protéine G apparentée à Arf1p appelée Sar1p (Salama *et al.*, 1993 ; Barlowe *et al.*, 1994). Les composantes du manteau protéique qui devraient se former autour des vésicules de sécrétion qui bourgeonnent au niveau du compartiment trans-Golgi n'ont pas encore été identifiées. Récemment, Harsay et collaborateurs ont démontré la présence de deux classes de vésicules de sécrétion en ce qui a trait à leurs densités (Harsay *et Bretscher*, 1995). Si la formation des vésicules de sécrétion nécessite l'association de protéines différentes afin de former des manteaux protéiques différents, ce qui expliquerait leur différence de densité, il est peu probable qu'une seule mutation ait la capacité de prévenir la formation des deux types de manteaux protéiques à la surface des vésicules de sécrétion. Cela pourrait expliquer pourquoi aucun mutant de sécrétion n'a été isolé pour l'étape de la formation des vésicules de transport au niveau du trans-Golgi lors du criblage génétique réalisé par Novick et collaborateurs (Novick *et al.*, 1980).

4.1.1.2. Modèles qui ont aidé à la dissection du transport vésiculaire

La compréhension du transport vésiculaire a grandement été facilitée par la découverte des mutants *sec* chez *S. cerevisiae* et par les essais de reconstitution du transport vésiculaire *in vitro* (Novick *et al.*, 1980; Baker *et al.*, 1988; Ruohola *et al.*, 1988). Un premier criblage génétique réalisé par Novick et collaborateurs a permis d'identifier 23 groupes de gènes capables de renverser l'accumulation d'invertase et de phosphatase acide, des protéines normalement sécrétées, chez différents mutants ayant

un défaut au niveau de la sécrétion (Novick *et al.*, 1980). L'analyse morphologique approfondie de ces mutants *sec* a amené à diviser la famille de gènes en deux classes : ceux nécessaires à la formation des vésicules de transport et ceux impliqués dans leur fusion membranaire avec leurs compartiments cibles (Kaiser *et Schekman*, 1990).

Une autre approche basée sur la reconstitution du transport *in vitro* a permis d'établir une corrélation parfaite entre les essais de transport réalisés *in vitro* et les événements observés *in vivo*. Le modèle est basé sur le fait que des groupements oligosaccharidiques marqués radioactivement ne peuvent être ajoutés sur des précurseurs protéiques qu'au niveau de l'appareil de Golgi. En utilisant des membranes du réticulum endoplasmique partiellement purifiées comme compartiment donneur et d'autres enrichies en membranes de l'appareil de Golgi, ils ont démontré que 25 à 50% de la quantité totale du précurseur du facteur- α introduit de façon exogène était modifié en présence de protéines cytoplasmiques et d'ATP (Baker *et al.*, 1988; Ruohola *et al.*, 1988). Le facteur- α est une phéromone peptidique normalement sécrétée par les cellules haploïdes α chez *S. cerevisiae* (Herskowitz, 1988). Pour devenir marqués radioactivement, les précurseurs du facteur- α ajoutés aux membranes devaient d'abord être transloqués dans la lumière du réticulum endoplasmique, puis transportés vers les compartiments de l'appareil de Golgi, afin que les groupements oligosaccharidiques radioactifs soient transférés sur les molécules du facteur- α . Cette même approche fut utilisée pour étudier le processus de formation des vésicules de sécrétion indépendamment de la fusion de ces dernières avec leurs compartiments cibles. En effet, ils ont démontré que des mutants incapables de former des vésicules de transport *in vivo* avaient également un défaut au niveau de leur bourgeonnement *in vitro*.

Parallèlement, d'autres mutants montrant une accumulation de vésicules de transport *in vivo* présentaient également un défaut en ce qui a trait au processus de fusion membranaire *in vitro* (Rexach *et Schekman*, 1991; Oka *et Nakano*, 1994; Rexach *et al.*, 1994).

4.1.2. FUSION MEMBRANAIRE : PRINCIPES GÉNÉRAUX

Les vésicules de transport qui bourgeonnent au niveau des compartiments donneurs doivent fusionner avec la membrane des compartiments cibles. Ce processus de fusion membranaire qui survient au niveau de la membrane plasmique est similaire à celui retrouvé pour la fusion des vésicules de transport dérivées du réticulum endoplasmique avec la membrane du compartiment cis-Golgi. Aussi, ces deux modèles de fusion membranaire tirent profit des connaissances déjà établies pour la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique au niveau des terminaisons nerveuses des neurones (Söllner *et al.*, 1993 ; Bennett *et al.*, 1992 ; Inoue *et al.*, 1992 ; Oylar *et al.*, 1989 ; Trimble *et al.*, 1988 ; Baumert *et al.*, 1989 ; Schiavo *et al.*, 1992). Le processus de fusion membranaire nécessite la présence de composantes cytoplasmiques et membranaires.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques couplés à des essais de reconstitution du transport vésiculaire intra-golgi *in vitro*, avec des préparations membranaires de cellules de mammifères, a révélé la présence d'étapes distinctes au niveau de la maturation des vésicules de transport. Lorsque de faibles concentrations de l'agent alkylant N-éthylmaleimide (NEM) sont ajoutées à ces essais, une accumulation de vésicules,

dépourvues de manteaux protéiques, au niveau de la membrane du compartiment cible est observée (Malhotra *et al.*, 1988). L'effet du NEM peut être renversé par l'ajout d'extraits cytoplasmiques frais. Cette dernière observation a permis d'isoler un facteur de fusion cytoplasmique sensible au NEM appelé NSF (NEM-Sensitive Factor ; Block *et al.*, 1988). La séquence protéique de NSF est homologue avec celle de la protéine Sec18p de *S. cerevisiae* (Wilson *et al.*, 1989). Le gène *SEC18* fut initialement isolé par l'analyse morphologique des mutants *sec* ayant un défaut en ce qui a trait au transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Novick *et al.*, 1980). D'une façon remarquable, un extrait cytoplasmique de souches de levures sauvages est capable de fournir l'activité NSF nécessaire à la réalisation des essais de reconstitution du transport intra-Golgi *in vitro*, alors que l'extrait cytoplasmique d'une souche mutante pour le gène *SEC18* est dépourvu d'activités NSF (Paquet *et al.*, 1986). Ces observations, combinées aux travaux d'autres laboratoires, ont amené à conclure que la protéine NSF/Sec18p est un facteur général de fusion retrouvé chez différentes espèces vivantes et qu'elle est impliquée non seulement dans le transport intra-Golgi, mais aussi dans toutes les étapes du transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (Diaz *et al.*, 1989; Beckers *et al.*, 1989; Graham *et al.*, 1991).

Le produit du gène *SEC18* de *S. cerevisiae* est une protéine essentielle de 84 kDa qui existe sous forme d'homotrimère (Whiteheart *et al.*, 1994). Chacun des monomères peut être divisé en trois domaines distincts: la région N-terminale et les deux domaines de liaison à l'ATP, soit D1 et D2. Des études de mutagenèse ont démontré que le domaine D2 est responsable de la formation du complexe trimérique, alors que le

domaine ATPasique de D1 fournit l'activité NSF nécessaire à la fusion membranaire (Whiteheart *et al.*, 1994). Le facteur NSF est capable de s'associer aux membranes, seulement en présence d'un autre facteur cytoplasmique appelé SNAP (Soluble NSF Attachment Proteins ; Clary *et al.*, 1990; Clary *et Rothman*, 1990; Wilson *et al.*, 1992). Chez les mammifères, trois protéines ayant une activité SNAP ont été identifiées: α -SNAP, β -SNAP et γ -SNAP (Whiteheart *et al.*, 1993). Chacune de ces protéines est capable d'attacher NSF à la membrane de l'appareil de Golgi (Clary *et al.*, 1990).

Chez *S. cerevisiae*, une activité SNAP a été découverte dans des extraits cytoplasmiques de souches sauvages. Cette activité disparaît lorsqu'on utilise des souches mutantes pour le gène *SEC17* (Griff *et al.*, 1992). *SEC17* est un gène essentiel qui code pour une protéine de 34 kDa homologue à la protéine α -SNAP retrouvée chez les cellules de mammifères (Griff *et al.*, 1992). De plus, le gène *SEC17* est capable de fournir l'activité SNAP nécessaire à la fusion membranaire dans les essais de reconstitution du transport intra-Golgi *in vitro* effectués sur des préparations membranaires de cellules de mammifères (Griff *et al.*, 1992). Des essais de co-immunoprécipitation ont démontré que les protéines Sec17p et Sec18p font parties d'un même complexe et que la formation de celui-ci nécessite la présence d'un récepteur membranaire saturable (Wilson *et al.*, 1992). Les produits des gènes SNAPs sont capables de lier les membranes de l'appareil de Golgi en l'absence du facteur NSF, et l' α -SNAP et la β -SNAP compétitionnent pour les mêmes sites sur des préparations membranaires de l'appareil de Golgi. Ces observations ont amené à conclure que les SNAPs doivent d'abord se lier à des récepteurs membranaires appelés SNAREs (SNAP

Receptor), afin que le facteur NSF puisse venir s'y attacher et former le complexe NSF/SNAP/SNARE (Wilson *et al.*, 1992).

4.1.2.1. Hypothèse des SNAREs

Les facteurs protéiques NSF, SNAP et SNAREs forment un complexe membranaire essentiel au processus de fusion membranaire et l'hydrolyse de l'ATP, présumément par la composante protéique SNAP, serait responsable du réarrangement des SNAREs et de la dissociation de la protéine NSF de ce complexe (Morgan *et al.*, 1994). L'utilisation d'analogues d'ATP non-hydrolysables introduits dans des extraits membranaires de cerveaux de bovins a permis la purification d'une particule de coefficient de sédimentation de 20S composée des protéines syntaxine, VAMP/synaptobrevine et SNAP-25 (Synaptosome-Associated Protein of 25 kDa), en plus des facteurs généraux de fusion NSF et SNAP (Figure 1A ; Söllner *et al.*, 1993 ; Bennett *et al.*, 1992 ; Inoue *et al.*, 1992 ; Ojler *et al.*, 1989 ; Trimble *et al.*, 1988 ; Baumert *et al.*, 1989 ; Schiavo *et al.*, 1992). La syntaxine et la VAMP/synaptobrevine sont des protéines transmembranaires associées respectivement à la membrane plasmique présynaptique et vésiculaire au niveau des neurones, alors que la protéine SNAP-25 est ancrée à la membrane plasmique présynaptique via une modification lipidique sur des résidus cystéines particuliers (Figure 1A ; Hess *et al.*, 1992).

Les facteurs protéiques NSF et SNAP sont exprimés de façon ubiquitaire et sont impliqués dans tous les processus de fusion membranaire retrouvés entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Pour ces raisons, ils sont considérés comme des facteurs généraux de fusion et n'ont aucun rôle en ce qui a trait à la spécificité des fusions entre les membranes des différents compartiments intracellulaires. Par contre, l'expression des protéines VAMP, synaptobrevin et SNAP-25 est spécifique aux synapses. Ces observations ont amené à proposer l'hypothèse des SNAREs (Söllner *et al.*, 1993 ; Rothman, 1994). Dans ce modèle, toutes les cellules eucaryotes auraient des familles de récepteurs membranaires différentes capables de lier la protéine SNAP et qui se retrouveraient à la fois sur la membrane des vésicules de transport (v-SNAREs) et sur la membrane des compartiments cibles (t-SNAREs). L'association de ces récepteurs, basée sur leur spécificité d'interaction, serait essentielle au processus de fusion membranaire et serait déterminante en ce qui a trait à la spécificité des fusions membranaires. Par conséquent, nous devrions retrouver au niveau du cis-Golgi une famille de t-SNARE qui s'associerait spécifiquement à une famille de v-SNARE retrouvée uniquement au niveau des vésicules de transport dérivées du réticulum endoplasmique. Il en serait ainsi avec d'autres familles de t-SNARE et de v-SNARE pour les autres étapes de fusion membranaire qui surviendraient entre le réticulum endoplasmique et la surface membranaire (Figure 1B).

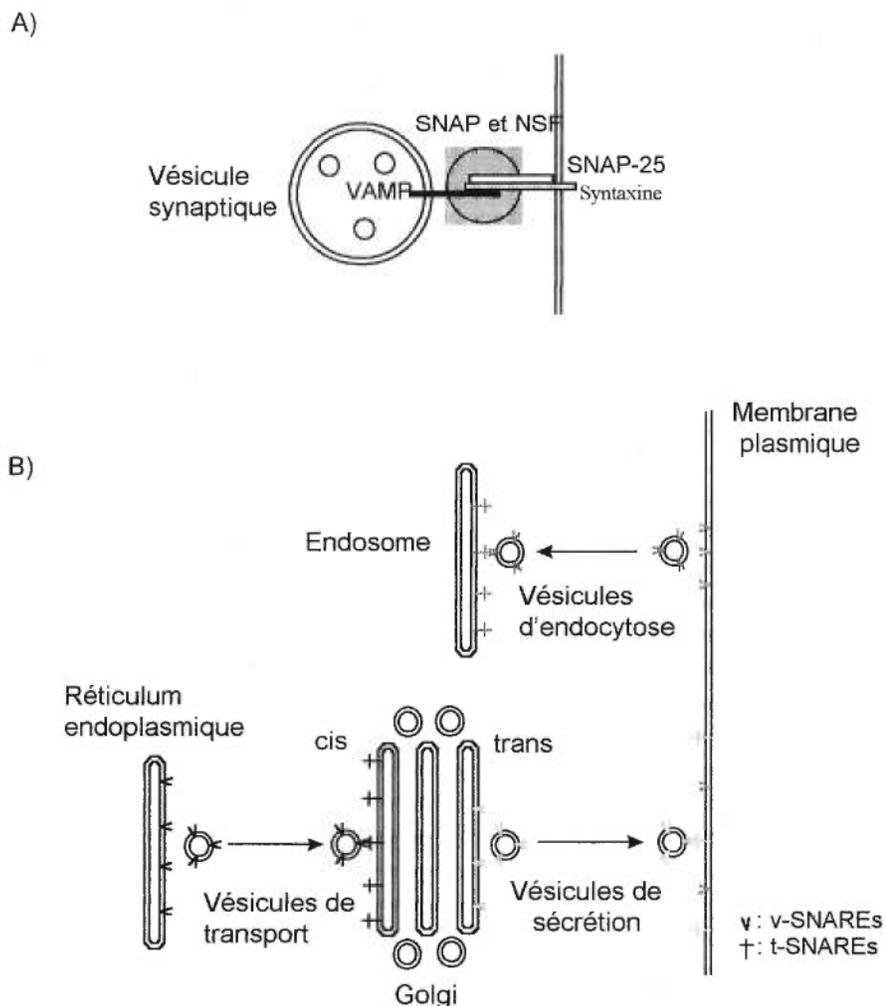


FIGURE 1. (A) Particule de fusion de 20S retrouvée au niveau des synapses. Elle est composée des facteurs généraux de fusion SNAP et NSF et des protéines VAMP (v-SNARE), Syntaxine et SNAP-25 (t-SNAREs) retrouvées spécifiquement au niveau des neurones. (B) Hypothèse des SNAREs. Schéma simplifié montrant la localisation des différents t-SNAREs et v-SNAREs parmi les différents compartiments intracellulaires. L'association de ces derniers basée sur leur spécificité d'interaction (même ton de gris) serait déterminante en ce qui a trait à la spécificité des fusions membranaires. Schéma inspiré de Rothman, 1994.

4.1.2.2. Fusion au niveau de la membrane plasmique

Contrairement au transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, aucun essai de reconstitution du transport vésiculaire entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique n'a été développé. Par conséquent, le rôle précis de chacun des gènes impliqués à ce niveau est difficile à déterminer. Quoiqu'il en soit, différentes approches ont tout de même permis d'établir un modèle concernant la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique.

Parmi les différentes protéines nécessaires à la fusion membranaire entre les vésicules de sécrétion et la membrane plasmique, nous retrouvons la petite protéine G Sec4p, faisant partie de la famille des GTPases Rab et les protéines modifiant son activité (Novick *et al.*, 1980 ; Salminen *et Novick*, 1987 ; Nair *et al.*, 1990 ; Moya *et al.*, 1993 ; Garrett *et al.*, 1994 ; Walworth *et al.*, 1992). Parmi celles-ci, nous retrouvons son facteur d'échange Sec2p, la protéine Dss4p qui stimule la vitesse de dissociation du GDP et du GTP sur Sec4p, la protéine Sec19p qui diminue la vitesse de dissociation du GDP sur cette dernière et finalement, une protéine capable de stimuler l'activité GTPasique intrinsèque de Sec4p appelé Sec4p-GAP. Nous retrouvons également sur la membrane des vésicules de sécrétion les protéines Snc1p et Snc2p, qui agissent à titre de v-SNAREs et sur la membrane plasmique, les protéines Sso1p, Sso2p et Sec9p jouant le rôle des t-SNAREs (Gerst *et al.*, 1992 ; Protopopov *et al.*, 1993 ; Aalto *et al.*, 1993 ; Novick *et al.*, 1981 ; Brennwald *et al.* 1994). L'association des v-SNAREs et des t-SNAREs, en plus des facteurs généraux de fusion Sec17p et Sec18p, forme un complexe des SNAREs essentiel au processus de fusion membranaire. Finalement, un

autre complexe protéique, appelé Exocyst, associé à la membrane plasmique et composé au moins des protéines Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p et Exo70p est non seulement essentiel au processus de fusion membranaire, mais semble jouer également un rôle important en ce qui a trait à la détermination du site d'exocytose à la surface cellulaire chez *S. cerevisiae* (Bowser *et Novick*, 1991 ; Bowser *et al.*, 1992 ; TerBush *et al.*, 1996).

4.1.2.3. La GTPase Sec4p

Le produit du gène *SEC4* est une protéine G de 24 kDa appartenant à la famille des GTPases Rab. Cette famille consiste en de petites protéines G partageant des caractéristiques communes (Rossi *et al.*, 1991). Parmi les membres de cette famille, nous retrouvons la protéine Ypt1p, impliquée dans l'étape de la fusion membranaire au niveau du compartiment cis-Golgi de vésicules de transport dérivées du réticulum endoplasmique (Gallwitz *et al.*, 1983 ; Schmitt *et al.*, 1986 ; Segev *et Botstein*, 1987). *SEC4* fut identifié par sa capacité de supprimer, lorsqu'il est présent en multicopies, l'accumulation de vésicules post-Golgi observée chez le mutant thermosensible *sec15-1* incubé à température restrictive (Salminen *et Novick*, 1987). Son importance au niveau de l'étape finale de la voie de la sécrétion fut découverte par sa capacité de supprimer non seulement le mutant *sec15-1*, mais également les mutants *sec1-1*, *sec2-41*, *sec5-24*, *sec8-9*, *sec10-2* et *sec19-1*, chez lesquels un blocage au niveau de l'étape finale de la voie de la sécrétion pouvait être observé à leur température restrictive. D'ailleurs,

chez les mutants *sec4* un blocage post-Golgi peut être observé (Salminen *et Novick*, 1987).

Tout comme la GTPase Ypt1p, l'ajout de groupement géranylgeranyl sur l'extrémité C-terminal de Sec4p est essentiel à son attachement aux membranes. En effet, la délétion des deux cystéines situées à l'extrémité C-terminale de Sec4p la rend soluble et non fonctionnelle, dû à son incapacité de s'attacher aux membranes (Walworth *et al.*, 1989 ; Jiang *et al.*, 1993). La localisation de Sec4p dépend de son état de liaison en nucléotides (GDP ou GTP). Sec4p-GTP est retrouvé à la surface des vésicules de sécrétion dérivées du compartiment trans-Golgi. L'hydrolyse du GTP par Sec4p serait couplée à son association à la face cytoplasmique de la membrane plasmique, puisque Sec4p-GDP est généralement retrouvée associée à la membrane plasmique. Une petite fraction de Sec4p est également retrouvée sous forme soluble non associée aux membranes (Goud *et al.*, 1988). Par conséquent, la protéine Sec4p a un cycle de localisation entre les vésicules de sécrétion, la membrane plasmique et le cytoplasme qui est couplé à son état de liaison en nucléotides (Goud *et al.*, 1988 ; Novick *et al.*, 1988).

Par analogie aux autres GTPases, l'activité GTPasique de Sec4p est très faible et doit être augmentée par une GAP (GTPase Activating Protein). Une protéine pouvant stimuler la vitesse d'hydrolyse du GTP par Sec4p d'un facteur de 3.5 a été localisée aux membranes, mais n'a pas été isolée (Walworth *et al.*, 1992). Sec4p a autant d'affinité pour le GDP que pour le GTP, mais la vitesse de dissociation du GDP est environ cent

fois plus grande que pour celle du GTP (Kabcenell *et al.*, 1990). Différentes protéines peuvent influencer l'état de liaison en nucléotides de Sec4p et parmi les plus importantes, nous retrouvons les protéines Sec2p, Dss4p et Gdi1p/Sec19p. Sec4p agirait à titre d'interrupteur moléculaire, suivant son état de liaison en nucléotides, et positionnerait adéquatement les v-SNAREs et des t-SNAREs afin qu'ils puissent interagir de façon optimale (Section 4.1.2.8. ; Brennwald *et al.*, 1994).

4.1.2.4. Protéines modifiant l'activité de Sec4p

L'existence de protéines de mammifères capables de diminuer la vitesse de relâchement du GDP sur Sec4p a permis de cloner le gène *GDI1* (GDP-Dissociation Inhibitor 1) de *S. cerevisiae* (Kabcenell *et al.*, 1990). Le produit de ce gène est une protéine de 50 kDa capable non seulement de diminuer cette vitesse, mais également capable de stimuler le relâchement de Sec4p-GDP associée à la membrane plasmique, suggérant ainsi un rôle pour cette protéine au niveau du recyclage de Sec4-GDP associée à la membrane plasmique vers les vésicules de transport (Garrett *et al.*, 1994). La perte de la fonction de la protéine Gdi1p suggère qu'elle pourrait agir à différentes étapes, puisque le transport vésiculaire est bloqué à différents stades au niveau de la voie de la sécrétion. En effet, la protéine Gdi1p est également capable de diminuer la vitesse de dissociation du GDP sur la protéine Ypt1p. D'ailleurs, par des essais de complémentation, Garrett et collaborateurs ont démontré que le gène *GDI1* est identique au gène *SEC19* (Garrett *et al.*, 1994). Ce dernier fut initialement identifié par le criblage génétique réalisé par Novick et collaborateurs dû à un blocage observé au niveau du

transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi chez des mutants *sec19* (Novick *et al.*, 1980). Quoiqu'il en soit, ce blocage peut facilement masquer le rôle porté par cette protéine au niveau des étapes ultérieures du transport vésiculaire vers la membrane plasmique.

Une autre protéine capable d'altérer l'état de liaison en nucléotides de Sec4p est le produit du gène *DSS4* (Moya *et al.*, 1993). Ce gène code pour une protéine de 17 kDa retrouvée à la fois associée aux membranes et libre dans le cytoplasme (Collins *et al.*, 1997). *DSS4* est un gène non-essentiel, mais la délétion de ce dernier est létale en combinaison avec d'autres mutations retrouvées au niveau de plusieurs gènes agissant à l'étape finale du transport vésiculaire entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Moya *et al.*, 1993). Des essais *in vitro* ont démontré que Dss4p est capable de stimuler la vitesse de dissociation du GDP et du GTP sur Sec4p. Récemment, il a été démontré que la surexpression de Dss4p peut supprimer la létalité associée à des mutants dominants de Sec4p. Cette suppression serait dû au fait que Dss4p s'associerait fortement avec les formes mutantes de *SEC4*, séquestrant ainsi ces protéines mutantes ayant des effets toxiques pour la cellule (Collins *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que Dss4p pourrait agir comme une GDS (Guanine nucleotide Dissociation Stimulator) *in vivo* sur la protéine Sec4p.

SEC2 fut initialement isolé par le criblage génétique réalisé par Novick et collaborateurs (Novick *et al.*, 1980). Récemment, un rôle pour Sec2p a été proposé en ce qui a trait au couplage entre l'activation de Sec4p (forme GTP) et le ciblage polarisé des vésicules de sécrétions vers le site d'exocytose (Walch-Solimena *et al.*, 1997). La

majorité de Sec4p est concentrée au niveau du bourgeon en croissance dans des souches sauvages et mutantes pour les gènes agissant tardivement au niveau de la voie de la sécrétion. Toutefois, chez des mutants *sec2*, Sec4p se retrouve dispersée aléatoirement au niveau de la cellule-mère et du bourgeon en croissance. Cette dispersion n'est pas le résultat d'une mauvaise association de Sec4p aux membranes des vésicules de sécrétion, puisque chez des mutants *sec2*, Sec4p est toujours associée à ces dernières (Walch-Solimena *et al.*, 1997). La majorité de Sec2p est cytoplasmique, mais une petite fraction est capable de s'associer aux vésicules de sécrétion d'une façon dépendante de Sec4p. D'ailleurs, Sec2p interagit directement avec Sec4p préférentiellement sous forme libre et est capable de catalyser l'échange du GDP pour le GTP sur cette dernière (Walch-Solimena *et al.*, 1997). Ces observations suggèrent que Sec2p s'associerait aux vésicules de sécrétion une fois que Sec4p serait attachée et en collaboration avec cette dernière, Sec2p pourrait contribuer à la polarisation du transport des vésicules de sécrétion vers le site d'exocytose.

4.1.2.5. Protéines associées aux vésicules de sécrétion

Selon l'hypothèse des SNAREs, nous devrions retrouver des protéines associées aux vésicules de sécrétion et celles-ci devraient être différentes de celles retrouvées sur les vésicules de transport dérivées de réticulum endoplasmique. En effet, les produits des gènes *SNC1* et *SNC2* sont des protéines de 13 kDa localisées sur la membrane des vésicules post-Golgi et sont homologues à la famille de VAMP/synaptobrevin retrouvée sur la membrane des vésicules présynaptiques au niveau des neurones (Gerst *et al.*,

1992 ; Protopopov *et al.*, 1993). Les produits des gènes *SNC1* et *SNC2* ont 79% d'identité et la délétion d'un seul de ces derniers ne cause aucun phénotype observable en ce qui a trait au défaut de transport entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Toutefois, une accumulation de vésicules post-Golgi est observée lorsque des doubles délétions des gènes *SNC1* et *SNC2* sont effectuées simultanément. Les protéines Snc1p et Snc2p sont capables de former un complexe avec les protéines Sso1, Sso2 et Sec9p localisées sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique, ce qui laisse entrevoir la possibilité que les protéines Snc1p et Snc2p agiraient à titre de v-SNAREs sur les vésicules de sécrétion dérivées de l'appareil de Golgi.

4.1.2.6. Protéines associées à la membrane plasmique

Du côté de la membrane plasmique, nous retrouvons les produits des gènes *SSO1* et *SSO2* qui sont des protéines de 39 kDa faisant parties de la famille de la syntaxine (Aalto *et al.*, 1993). Ces gènes furent initialement isolés par leurs capacités de supprimer les mutants *sec1* lorsque présents en plusieurs copies. Tout comme les gènes *SNC1* et *SNC2*, la délétion soit de *SSO1* ou de *SSO2* ne présente aucun phénotype observable au niveau du transport vésiculaire post-Golgi, alors que la double délétion est létale. De plus, des mutants conditionnels pour les gènes SSOs démontrent une accumulation de vésicules de transport dérivées de l'appareil de Golgi.

Également associée à la face cytoplasmique de la membrane plasmique, la protéine Sec9p joue un rôle essentiel dans le transport vésiculaire entre l'appareil de

Golgi et la membrane plasmique (Novick *et al.*, 1981 ; Brennwald *et al.*, 1994). *SEC9* fut initialement isolé lors du criblage génétique réalisé par Novick et collaborateurs, puisque des mutants de ce gène présentaient un défaut au niveau du transport vésiculaires post-Golgi (Novick *et al.*, 1980). Le produit du gène essentiel *SEC9* est une protéine de 74 kDa, dont la partie C-terminale a beaucoup d'homologie avec la protéine SNAP-25 retrouvée au niveau des terminaisons nerveuses des neurones (Brennwald *et al.*, 1994). Des études de co-immunoprécipitation ont démontré que Sec9p fait partie d'un complexe protéique comprenant les protéines Snc1p, Snc2p, Sso1p et Sso2p. D'ailleurs, ce complexe n'est détectable qu'en présence d'ATP non-hydrolysable, supportant donc l'hypothèse de la formation d'un complexe des SNAREs entre les protéines Sso1p, Sso2p, Snc1p, Snc2p et Sec9p, nécessitant la présence de Sec17p et Sec18p (Brennwald *et al.*, 1994).

Finalement, le gène *SEC1* est également requis pour le transport vésiculaire entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Ce gène est le premier à avoir été identifié par le criblage génétique réalisé par Novick et collaborateurs (Novick *et al.*, 1980). Le gène essentiel *SEC1* récemment caractérisé encoderait une protéine hydrophile de 83 kDa, homologue à la protéine n-Sec1p retrouvée au niveau des neurones. Elle interagirait avec des éléments du cytosquelette (Egerton *et al.*, 1993).

4.1.2.7. Le complexe Exocyst

Chez *S. cerevisiae*, au moins 15 protéines sont impliquées spécifiquement au niveau du transport vésiculaire entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Parmi celles-ci, au moins 8 sont membres d'un complexe protéique de 1-2 millions Da, localisé au site d'exocytose au niveau de l'apex du bourgeon en croissance à la surface cellulaire. Comme ce complexe n'est retrouvé qu'au niveau du site d'exocytose à la surface cellulaire, il est appelé le complexe Exocyst (TerBush *et al.*, 1996). Les protéines identifiées dans de ce dernier sont les produits des gènes *SEC3*, *SEC5*, *SEC6*, *SEC8*, *SEC10*, *SEC15* et *EXO70* (TerBush *et Novick*, 1995 ; TerBush *et al.*, 1996). Des mutations au niveau de chacun de ces gènes affectent l'intégrité du complexe et par conséquent, le transport vésiculaire entre le compartiment trans-Golgi et la membrane plasmique (Bowser *et al.*, 1992 ; TerBush *et Novick*, 1995 ; TerBush *et al.*, 1996).

Les produits des gènes essentiels *SEC6*, *SEC8* et *SEC15* sont des protéines ayant respectivement des poids moléculaires de 85 kDa, 122 kDa et 105 kDa (Salminen *et Novick*, 1989 ; Bowser *et al.*, 1992 ; Potenza *et al.*, 1992). Les gènes *SEC8* et *SEC15* ont une forte interaction génétique avec *SEC4*, bien que le produit de ce dernier ne fasse partie du complexe Exocyst et que des mutants *sec4* n'affectent pas la formation de ce complexe (TerBush *et Novick*, 1995). *SEC3* code pour une protéine hydrophile de 154 kDa et qui est non essentielle. Toutefois, des mutants *sec3* poussent plus lentement et des souches de levures diploïdes et homozygotes pour des mutations au niveau du gène *sec3* présentent un défaut quant à la sélection du site de bourgeonnement à la

membrane plasmique (Finger *et* Novick, 1997). Récemment, il a été démontré que *SEC3* est identique au gène *PSL1* (Haarer *et al.*, 1996, Finger *et* Novick, 1997). Ce dernier fut cloné lors d'un criblage réalisé par Haarer et collaborateurs, dans le but d'identifier des mutations qui seraient létales en combinaison avec la mutation *pfy1-111*. Le gène *PFY1* code pour une protéine pouvant lier l'actine (Magdolen *et al.*, 1988). Ces résultats suggèrent une inter-dépendance entre le cytosquelette d'actine et le choix du site d'exocytose à la surface cellulaire, et ce lien pourrait être dépendant de la présence du complexe Exocyst localisé à l'apex des bourgeons en croissance.

4.1.2.8. Modèle de la fusion avec la membrane plasmique

Une des nombreuses questions qui demeure toujours sans réponse au niveau du mécanisme de la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique est comment une vésicule de sécrétion peut être transportée adéquatement au site d'exocytose. L'implication des petites GTPases dans plusieurs étapes du transport vésiculaire chez les levures et les mammifères laisse suggérer qu'elles pourraient répondre à cette question (Ferro-Novick *et* Novick, 1993 ; Nuoffer *et* Balch, 1994). Dans le but de vérifier cette hypothèse, Novick et Brennwald ont construit une protéine chimérique Sec4p/Ypt1p (Brennwald *et* Novick, 1993 ; Dunn *et al.*, 1993). Ils ont démontré que cette protéine était alors maintenant capable d'agir à la fois comme les protéines Ypt1p et Sec4p. Par conséquent, si Sec4p est impliquée dans la spécificité du transport vésiculaire vers la membrane plasmique, elle n'est pas la seule déterminante.

La conservation de structures entre les différentes GTPases pourrait également laisser supposer leur implication au niveau de la spécificité des fusions (Bourne *et al.*, 1990, 1991). Plusieurs GTPases, tel que le facteur d'élongation de la traduction bactérien EF-Tu, semblent être impliquées au niveau de la reconnaissance intermoléculaire en apportant les conditions optimales à leurs interactions (Bourne, 1988 ; Thompson, 1988). Selon l'hypothèse des SNAREs, l'interaction entre les protéines membranaires à la fois présentes sur les vésicules de sécrétion (Snc1p et Snc2p) et sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique (Sso1p, Sso2p et Sec9p) apporterait la spécificité nécessaire à la fusion des vésicules de sécrétion au niveau du site d'exocytose (Söllner *et al.*, 1993 ; Rothman, 1994). Basé sur le modèle du facteur d'élongation EF-Tu, Sec4p pourrait positionner correctement les protéines Snc1p et Snc2p présentes sur la membrane des vésicules de sécrétion, afin qu'elles puissent interagir de façon optimale avec celles retrouvées sur la membrane plasmique. Bien qu'il existe des évidences en faveur de cette hypothèse, aucune interaction directe entre Sec4p et les v-SNAREs/t-SNAREs n'a été découverte, laissant supposer que d'autres facteurs pourraient contrôler l'interaction entre Sec4p et les SNAREs (Goud *et al.*, 1988 ; Lian *et Ferro-Novick*, 1993 ; Sogaard *et al.*, 1994 ; Couve *et Gerst*, 1994 ; Brennwald *et al.*, 1994).

Par sa localisation au site d'exocytose, il est possible que le complexe Exocyst puisse être un de ces facteurs (TerBush *et al.*, 1995 ; Pfeffer, 1996). Toutefois, des mutations thermosensibles au niveau des produits des gènes *SEC3*, *SEC5*, *SEC6*, *SEC8*, *SEC10* et *SEC15* n'affectent pas la localisation de Sec4p (TerBush *et al.*, 1995).

Quoiqu'il en soit, le complexe Exocyst pourrait néanmoins créer un lien entre les SNAREs et Sec4p, mais d'autres facteurs seraient requis pour le transport polarisé et le ciblage des vésicules de sécrétion au site d'exocytose, là où se trouve le complexe Exocyst. Le produit du gène *SEC2* est essentiel à la localisation de Sec4p au niveau du bourgeon en croissance à la surface de la cellule-mère et de plus, un double mutant *sec2/sec6* démontre les mêmes caractéristiques qu'un simple mutant *sec2* (Walch-Solimena *et al.*, 1997). D'ailleurs, Salminen et Novick ont observé que la surexpression du gène *SEC15* dans un mutant *sec2* ne démontre pas d'accumulation vésiculaire au niveau du bourgeon en croissance, normalement observé dans une souche sauvage *SEC2* (Salminen *et Novick*, 1989). Ces résultats suggèrent que Sec2p agirait probablement avant le complexe Exocyst, et en coopération avec Sec4p localisée sur les vésicules de sécrétion, pourrait faciliter la polarisation du transport vésiculaire vers le site d'exocytose. Nair et collaborateurs ont démontré que Sec2p semble faire partie d'un complexe protéique d'une taille supérieure à 500 kDa (Nair *et al.*, 1990). Par conséquent, Sec2p n'agirait pas seule, mais avec d'autres facteurs caractérisés (ou non) pour leurs implications au niveau du transport vésiculaire vers la membrane plasmique.

Le modèle du transport vésiculaire vers la membrane plasmique qui en découle serait le suivant (Figure 2). Une vésicule de sécrétion porterait à sa surface Sec4p-GDP, Snc1p et Snc2p et serait transportée au site d'exocytose à la surface de la cellule-mère (1). Le ciblage de ces vésicules de transport au niveau du site d'exocytose serait facilité par Sec2p, qui catalyserait l'échange du GDP pour du GTP sur Sec4p (2) et par des éléments du cytosquelette. Une fois rendu à la membrane plasmique, l'hydrolyse du GTP

sur Sec4p, catalysée par une GAP (GTPase Activating Protein) membranaire (3), permettrait l'association spécifique entre les v-SNAREs (Snc1p et Snc2p) et les t-SNAREs (Sso1p, Sso2p et Sec9p). Cette association serait facilitée par la présence du complexe Exocyst, qui d'ailleurs serait également responsable de la sélection du site d'exocytose (4). Une fois attachés à la membrane plasmique, les facteurs généraux de fusion, soit Sec17p/SNAP et Sec18p/NSF, viendraient stabiliser l'association des v-SNAREs et des t-SNAREs (5). L'hydrolyse de l'ATP, présumément par la composante Sec17p/SNAP, permettrait la fusion entre les deux membranes (6). Suite à cette fusion, Sec4p-GDP se retrouverait associée à la membrane plasmique (7) et son recyclage vers les vésicules de sécrétion serait catalysé par la protéine Sec19p/Gdi1p (8).

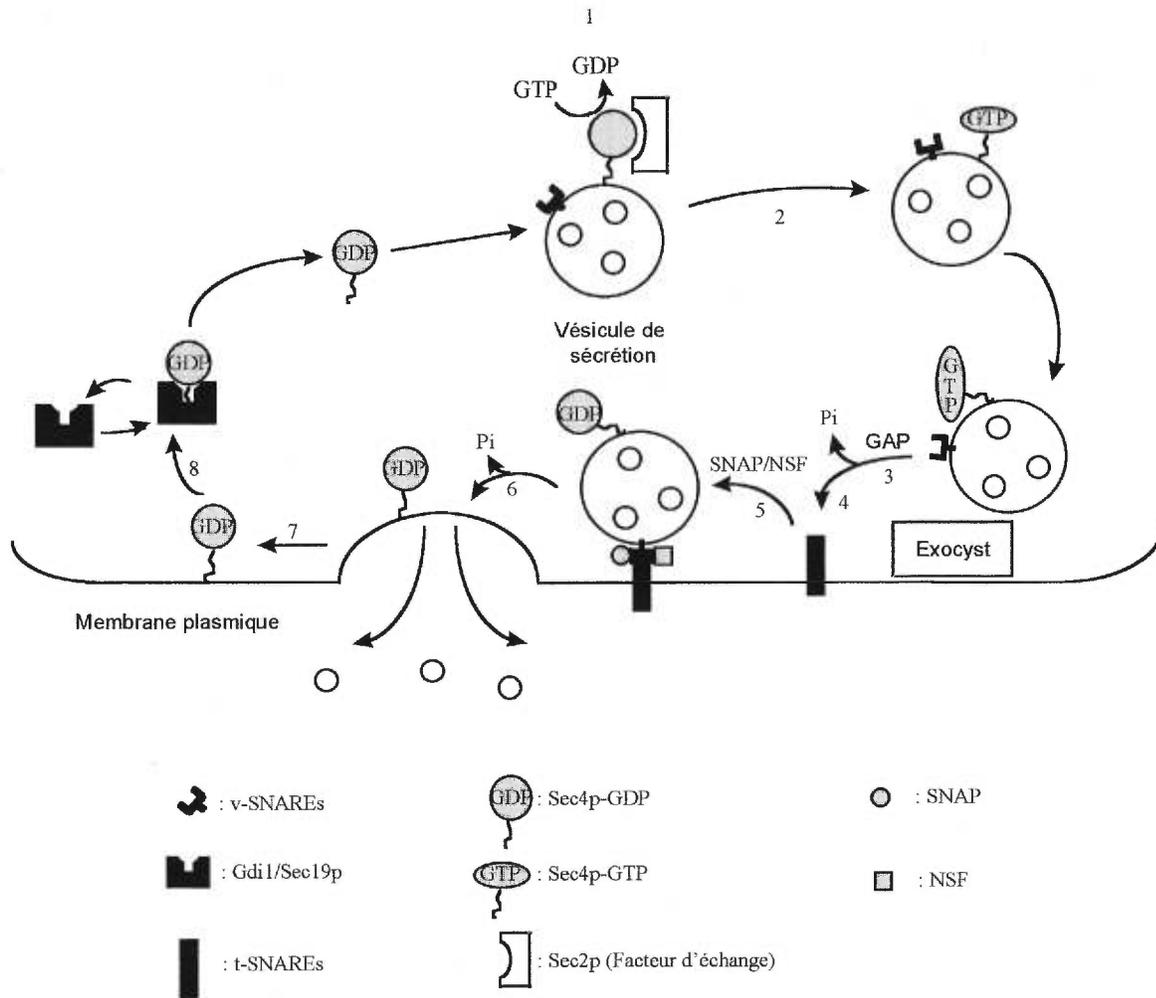


Figure 2. Modèle de la fusion membranaire au niveau de la membrane plasmique des vésicules de sécrétion dérivées du compartiment trans de l'appareil de Golgi. Les chiffres représentent les différentes étapes expliquées à la page précédente. Schéma inspiré de Novick *et al.*, 1993.

4.2. POLARISATION CELLULAIRE ET SÉCRÉTION

La levure à bourgeonnement *S. cerevisiae* est un organisme polarisé et pour cette raison, elle est devenue un modèle par excellence dans l'étude de la croissance et de la sécrétion polarisée. Cette levure se reproduit de façon asymétrique et la croissance du bourgeon à la surface de la cellule-mère est intimement reliée à la progression du cycle cellulaire (Roemer *et al.*, 1996 ; Drubin *et Nelson*, 1996). La sélection du site de bourgeonnement est déterminée par des programmes spécifiques des états haploïde et diploïde de la levure (Chant *et Pringle*, 1995). Une cellule haploïde bourgeonne de façon axiale et adjacente au site précédent de bourgeonnement, alors qu'une cellule diploïde le fait de façon bipolaire, adjacente ou opposée au site précédent de bourgeonnement (Figure 3 ;Chant *et Pringle*, 1995). À chaque fois qu'un bourgeon se détache de la cellule-mère, un dépôt de chitine est observé et ceci permet de visualiser les cicatrices de bourgeonnement laissées par les cellules-filles (Elorza *et al.*, 1983).

Lors de l'émergence du bourgeon à la surface de la cellule-mère, des changements dramatiques surviennent au niveau du cytosquelette et il y a établissement d'une polarité cellulaire (Kilmartin *et Adams*, 1984 ; Adams *et Pringle*, 1984). Parmi les éléments responsables de cette polarité, nous retrouvons principalement l'actine. Avant l'émergence du bourgeon, des amas d'actine se retrouvent concentrés au site d'évagination, alors que les filaments d'actine s'alignent dans l'axe cellule mère-fille.

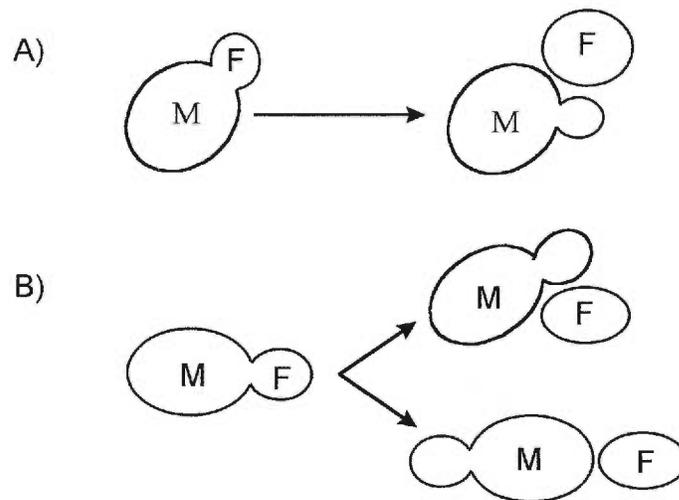


Figure 3. Les levures suivent un mode de bourgeonnement spécifique aux états haploïde et diploïde. (A) Une cellule haploïde $MATa$ ou $MAT\alpha$ suit un mode de bourgeonnement axial dans lequel chaque cellule-fille (F) se forme au site précédent de bourgeonnement sur la cellule-mère (M). (B) Une cellule diploïde $MATa/MAT\alpha$ démontre un mode de bourgeonnement bipolaire dans lequel la cellule-mère bourgeonne soit de façon adjacente ou opposée au site précédent de bourgeonnement. Schéma inspiré de Roemer *et al.*, 1996.

L'appareil de sécrétion s'oriente vers le site d'évagination afin d'apporter les constituants nécessaires au développement de la cellule-fille. Durant la croissance initiale du bourgeon, les amas d'actine se concentrent à l'apex de ce dernier et cette croissance apicale compte pour les deux tiers du volume final de la cellule-fille. Une fois que le bourgeon a atteint ce volume, les amas d'actine se dispersent au niveau du cortex de ce dernier et une croissance générale sur toute la surface du bourgeon est alors observée. À la fin du cycle cellulaire, l'actine se concentre ou forme une bande à la jonction cellule mère-fille, les vésicules de sécrétion sont dirigées vers ce septum et le processus de cytokinèse est observé (Figure 4 ; Kilmartin *et Adams*, 1984 ; Adams *et Pringle*, 1984 ; Novick *et Bolstein*, 1985). Par conséquent, le bourgeonnement à la surface de la cellule-mère est en quelque sorte un processus de sécrétion polarisé.

Les premières évidences d'un lien entre le cytosquelette d'actine et la sécrétion sont venues suite à l'étude des mutants *act1* qui présentaient une accumulation intracellulaire d'invertase et de vésicules de sécrétion dérivés de l'appareil de Golgi (Novick *et Bolstein*, 1985). Depuis ce temps, plusieurs autres évidences ont démontré une interdépendance entre le cytosquelette d'actine et la sécrétion. Par exemple, Johnston et collaborateurs ont observé une désorganisation du cytosquelette d'actine et une accumulation de vésicules de sécrétion chez des mutants *myo2* (Johnston *et al.*, 1991). D'ailleurs, des interactions génétiques ont été observées entre le gène *MYO2* et les gènes agissant tardivement au niveau de la sécrétion soit, *SEC1* et *SEC6* (Govindan *et al.*, 1995). Des mutants *sec1* et *sec6* accumulent rapidement des vésicules de sécrétion

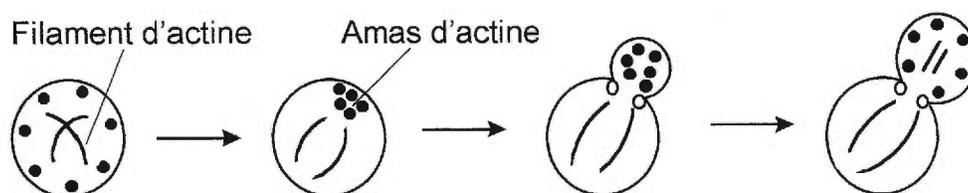


Figure 4. Cytosquelette d'actine chez *S. cerevisiae*. Lors de l'émergence du bourgeon, la polarité cellulaire est établie et le cytosquelette d'actine est réorganisé. Les amas et filaments d'actine se concentrent au site de bourgeonnement, au niveau duquel les vésicules de sécrétion sont transportées afin d'apporter les composants nécessaires à l'apparition de la cellule-fille. Schéma inspiré d'Anderson et Soll, 1986.

au niveau du cytoplasme de la cellule-fille, démontrant ainsi que ces gènes agissent tardivement dans la voie de la sécrétion. Par contre, des mutants *myo2* accumulent préférentiellement une classe de vésicules de sécrétion dans le cytoplasme de la cellule-mère (Govindan *et al.*, 1995). Le produit du gène *MYO2* est une protéine essentielle à la viabilité et à la croissance de la surface cellulaire chez *S. cerevisiae*. Myo2p est homologue aux membres de la famille des myosines de classe V (Johnston *et al.*, 1991). Ces dernières sont des protéines « motrices » agissant sur les filaments d'actine et ont été impliquées dans le transport vésiculaire chez plusieurs organismes vivants (Titus, 1993). Ces observations sont en accord avec le rôle de la protéine Myo2p dans le transport de certaines classes de vésicules de sécrétion via les filaments d'actine.

Chez *S. cerevisiae*, les GTPases Cdc42p, Rho3p et Rho4p, faisant partie de la famille des GTPases Rho/Rac, participent au développement et au maintien de la polarisation lors du processus de bourgeonnement (Adams *et al.*, 1990 ; Johnson *et Pringle*, 1990 ; Matsui *et Toh-E*, 1992a,b ; Imai *et al.*, 1996). La perte de la fonction de la protéine Cdc42p perturbe le cytosquelette d'actine et les cellules dépourvues de la fonction de cette dernière deviennent grosses, arrondies et sans bourgeon (Adams *et al.*, 1990 ; Johnson *et Pringle*, 1990 ; Ziman *et Johnson*, 1994). Par contre, les cellules qui portent l'allèle activé *CDC42*^{val-12} initient la formation de bourgeons de façon indépendante au cycle cellulaire et deviennent également grosses, mais avec plusieurs bourgeons à leur surface (Ziman *et al.*, 1991). Ces résultats suggèrent que Cdc42p agirait au niveau de l'établissement de la polarisation nécessaire à l'émergence des bourgeons. Des interactions génétiques entre *RHO3* et *CDC42* ont été rapportées

récemment, suggérant que Rho3p serait également impliquée au niveau de la polarisation cellulaire (Matsui *et Toh-E*, 1992b). *RHO3* n'est pas un gène essentiel, mais des cellules dépourvues de ce gène croissent très lentement et ce défaut de croissance s'accroît davantage chez un double mutant de délétion *rho3 rho4* (Matsui *et Toh-E*, 1992a). Le gène *RHO4* n'est pas essentiel et des mutants de délétion de ce dernier ont un taux normale de croissance. Des cellules des doubles mutants *rho3 rho4* sont grosses, arrondies et démontrent une délocalisation des amas d'actine ; la présence de bourgeons à la surface cellulaire peut être aussi observée (Matsui *et Toh-E*, 1992b). Ces observations suggèrent que les produits des gènes *RHO3* et *RHO4* seraient impliqués dans le maintien de la polarisation nécessaire à la croissance des bourgeons à la surface des cellules-mères. Récemment, des interactions génétiques ont été démontrées entre *RHO3* et *SEC4*, ce qui confirme davantage l'implication des éléments du cytosquelette au niveau de la sécrétion (Imai *et al.*, 1996).

Parmi les différents gènes de sécrétion qui affectent le mode de bourgeonnement à la surface cellulaire, nous retrouvons *SEC3*, *SEC4* et *SEC9* (Finger *et Novick*, 1997). Des allèles mutantes de ces gènes présentent un mode de bourgeonnement aléatoire à la surface de cellules diploïdes. De plus, des cellules haploïdes et diploïdes portant ces allèles mutantes sont déformées et démontrent une délocalisation des dépôts de chitine, ce qui laisse suggérer que ces mutants ont un défaut au niveau de la structure du cytosquelette. La perte chronique de la fonction de la protéine Sec3p cause une altération au niveau de la structure de l'actine, alors que la perte des protéines Sec4p et Sec9p est sans effet sur la structure du cytosquelette (Finger *et Novick*, 1997).

Récemment, la découverte d'une interaction génétique entre les gènes *PFY1* et *SEC3*, combiné à la découverte de la protéine Sec3p comme une des composantes du complexe Exocyst, laisse entrevoir la présence d'un lien entre le cytosquelette d'actine et le choix du site d'exocytose à la surface de la cellule mère (Haarer *et al.*, 1996 ; Finger *et Novick*, 1997 ; TerBush *et al.*, 1996).

4.3. *CANDIDA ALBICANS*

Les infections à champignons opportunistes sont devenues au cours des vingt dernières années une cause majeure de morbidité et de mortalité chez les individus immunodéprimés tels les patients atteints de néoplasie hématologiques, infectés par le virus VIH ou receveurs de greffes d'organes ou de moelle osseuse (Anaissie, 1992 ; Fox, 1993 ; Richardson, 1991). Parmi les infections fongiques opportunistes, la candidose occupe le premier rang tant par son incidence que par la morbidité et la mortalité qui lui sont associées. Plus précisément, le principal agent responsable des candidoses est le *Candida albicans*, une levure imparfaite et diploïde retrouvée dans la plupart des flores digestives et vaginales des individus normaux (Odds, 1994). L'augmentation du nombre de patients en état d'immunosuppression a entraîné une recrudescence de cas d'infections opportunistes à champignons (Fox, 1993). L'utilisation massive antifongiques, comme les dérivés azolés, a eu deux effets : premièrement, une apparition de souches résistantes à ces composés et deuxièmement, un changement au niveau du spectre des espèces pathogènes ou prédominantes lors d'infections à *Candida* spp. (Boken *et al.*, 1993 ; Hitchcock *et al.*, 1993 ; Odds, 1994 ; Ryley *et al.*,

1984 ; Sanglard *et al.*, 1995 ; Vanden Bossche *et al.*, 1994 ; Pfaller *et al.*, 1992). Il y a donc conséquemment un réel besoin de développer de nouveaux composés antifongiques (Nombela *et al.*, 1992 ; Tuite, 1992).

C. albicans est une levure pathogène polymorphe. Elle est capable de se différencier et d'adopter plusieurs morphologies différentes et réversibles. Parmi les plus importantes, citons la transition « levure/hyphe » et la transition « white/opaque » (Shepherd, 1991 ; Bedell *et al.*, 1979 ; Odds, 1988 ; Slutsky *et al.*, 1987). Au niveau de la transition « levure/hyphe », les cellules « levure » s'apparentent beaucoup à celles retrouvées chez *S. cerevisiae* (Figure 5A). Au niveau de la forme « hyphe/filamenteuse », les cellules forment de longs filaments à structure coenocyte éventuellement cloisonnés et plus ou moins ramifiés (Figure 5B). Un second type de transition, appelé « white/opaque » peut être observé à haute fréquence chez la souche de *C. albicans* WO-1 (Slutsky *et al.*, 1987). Les cellules des colonies blanchâtres « white » ont sensiblement les mêmes caractéristiques que celles retrouvées chez *S. cerevisiae* (Figure 5A). Au niveau du phénotype « opaque », les cellules sont plus grosses, allongées et incapables de former des structures filamenteuses. Les colonies formées par ces cellules sont aplaties et grisâtres/opagues (Slutsky *et al.*, 1987). De telles transitions morphologiques peuvent être induites en réponse à différentes conditions environnementales tel que le pH, la température et la composition du milieu (Shepherd, 1991 ; Bedell *et al.*, 1979 ; Odds, 1988).

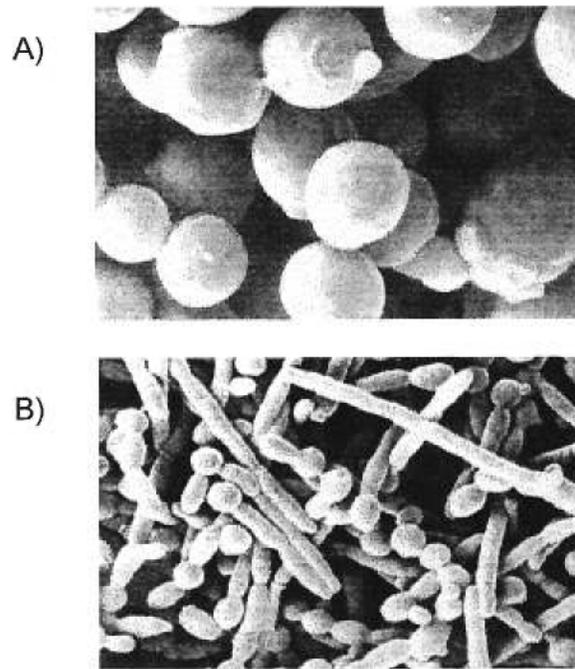


Figure 5. Transition « levure/hyphe » chez *C. albicans*. Deux des principales morphologies retrouvées chez ce pathogène. (A) forme levure ; (B) forme filamenteuse appelée hyphe. Illustrations tirées de Pla *et al.*, 1996.

La plupart des différents types de croissance et de morphologies retrouvés dans le règne des fungi sont basés sur la croissance apicale (Heath, 1990). Durant la croissance initiale du bourgeon, des amas d'actine se concentrent au niveau de l'apex de ce dernier et cette croissance apicale compte pour les deux tiers du volume final de la cellule-fille, alors que le tiers restant est accompli par une croissance générale du bourgeon, comme c'est le cas chez *S. cerevisiae* (Kilmartin *et* Adams, 1984 ; Adams *et* Pringle, 1984 ; Anderson *et* Soll, 1986). Par contre, lors de son développement sous une forme filamenteuse, la croissance apicale compte pour plus de 95% de l'expansion membranaire et cette croissance continue tant et aussi longtemps que les conditions propices à son développement sont maintenues (Staebell *et* Soll, 1985 ; Soll *et al.*, 1985). Des études de microscopie à fluorescence démontrent une accumulation d'actine (amas d'actine) au niveau de l'apex des bourgeons et des filaments en croissance chez les fungi (Figure 6 ; Adams *et* Pringle, 1984 ; Anderson *et* Soll, 1986 ; Heath, 1990 ; Marks *et al.*, 1986). De plus, des observations en microscopie électronique ont révélé l'existence d'une accumulation de vésicules de sécrétion au niveau des régions apicales où se trouvent les amas d'actine (Akashi *et al.*, 1993 ; Grove, 1978). La similarité au niveau de la localisation des vésicules de sécrétion et des amas d'actine suggère que l'accumulation de ces derniers serait probablement impliquée dans la localisation des vésicules de sécrétion (Akashi *et al.*, 1994). Des filaments d'actine sont également observés chez *C. albicans*, et leur polarisation vers le site d'exocytose pourrait faciliter le ciblage des vésicules de sécrétion vers l'apex des bourgeons ou des filaments en croissance (Figure 6 ; Drubin, 1996). Par conséquent, les phénomènes de

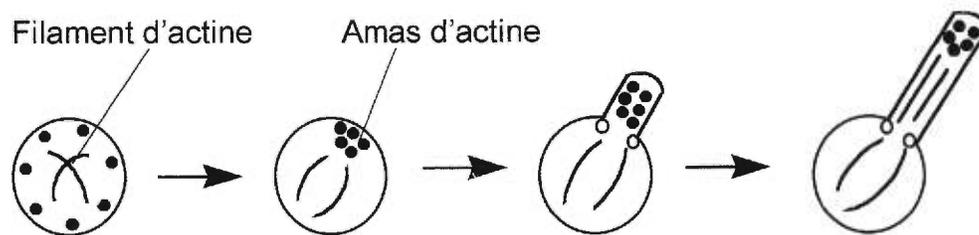


FIGURE 6. Cytosquelette d'actine chez *Candida albicans*. Lors de la croissance de *Candida albicans* sous forme filamenteuse, des filaments d'actine au niveau de la cellule-mère s'orientent vers le site d'exocytose, là où les amas d'actine se concentrent. Une fois en croissance, d'autres filaments d'actine s'orientent au niveau de ce dernier vers sa partie apicale. Quant à eux, les amas d'actine restent concentrés au site d'exocytose localisé à l'apex du filament en croissance à la surface de la cellule-mère. Schéma dérivé d' Anderson et Soll, 1986.

transition morphologique retrouvés chez *C. albicans* pourraient être considéré comme un processus dans lequel la croissance apicale serait sous le contrôle d'éléments du cytosquelette d'actine et que des modifications au niveau de ce dernier serait à la base de ces transitions morphologiques (Heath, 1990; Solomon, 1991).

La sécrétion est un processus fondamental à toutes les cellules eucaryotes. Chez *C. albicans*, elle joue également un rôle très important au niveau de sa virulence. Il existe plusieurs facteurs de virulence potentiels chez *C. albicans*, et parmi ceux-ci, nous retrouvons le processus de transition « levure/hyphe », la sécrétion des protéases aspartyles (SAPs) et l'expression à la surface membranaire de facteurs d'adhérence aux cellules hôtes (Cutler, 1991 ;Hostetter, 1994). Chez *C. albicans*, la présence de gènes homologues à ceux impliqués au niveau de la voie de la sécrétion chez *S. cerevisiae*, tel que *SEC4*, *SEC9*, *SEC17* et *SEC18*, suggère la présence de mécanismes de sécrétion similaires à ceux retrouvés chez *S. cerevisiae*. (Mao et Wong, 1998 ; Clement *et al.*, 1998 ; Nieto *et al.*, 1993 ; Nieto *et al.*, 1993). La nature diploïde et l'absence d'un cycle sexuel chez *C. albicans* en fait un pathogène difficile à étudier (Odds, 1994 ; Scherer *et Magee*, 1990 ; Shepherd *et al.*, 1985). Toutefois, les travaux réalisés vers la fin des années 80 et le début des années 90 des ont permis de développer des souches auxotrophes et des vecteurs intégratifs et autorépliatifs chez ce pathogène. Cela a aidé grandement à l'avancement des connaissances sur la génétique de ce pathogène (Kurtz *et al.*, 1986, 1987 ; Fonzi *et Irwin*, 1993).

ARTICLE

Clonage et caractérisation du gène *SEC4* de *Candida albicans*

Résumé

Le produit du gène *SEC4* est une des composante majeures de l'appareil de sécrétion chez *S. cerevisiae*. Plus spécifiquement, Sec4p jouerait un rôle très important au niveau du ciblage et de la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique. Récemment, l'implication génétique de *SEC4* avec le gène *RHO3* de *S. cerevisiae*, lequel est requis afin de maintenir la polarité cellulaire lors de la croissance des bourgeons à la surface des cellules-mère, nous a poussé à étudier le rôle de Sec4p lors des changements morphologiques observés chez la levure pathogène *Candida albicans*.

Par criblage d'une banque génomique, nous avons cloné le gène *SEC4* de *C. albicans*. Le produit de ce gène est une protéine de 210 acides aminés démontrant une homologie de 75% avec la protéine Sec4p de *S. cerevisiae*. L'ARNm Ca*SEC4* est exprimé constitutivement chez les différentes formes de croissance observées chez ce pathogène. Finalement, le gène Ca*SEC4* peut compenser la perte de fonction du gène *SEC4* de *S. cerevisiae* observée chez le mutant thermosensible *sec4-8*, lorsque ce dernier est incubé à température restrictive.

Cet article a été accepté pour publication dans la revue scientifique *Yeast*. La numérotation des figures a été adaptée pour ce mémoire et est donc différente de celle éventuellement retrouvée dans l'article publié.

Isolation and Characterization of the *Candida albicans* SEC4 gene

Martin Clément, Hélène Fournier, Louis de Repentigny
and Pierre Belhumeur *

Department of Microbiology and Immunology
Université de Montréal
2900 Édouard Montpetit
Montréal, Québec H3C 3J7 Canada

* Correspondence to: Dr. Pierre Belhumeur
(same address as above)
Telephone: (514) 343-5639
FAX: (514) 343-5701
e-mail: belhume@ere.umontreal.ca

5.1. ABSTRACT

The *SEC4* gene product is a major component of the protein secretion machinery. More specifically, it is believed to play a pivotal role in targeting and fusion of secretory vesicles to the plasma membrane. Its recently described implication with the *Saccharomyces cerevisiae* Rho3p, which is required for directing growing points during bud formation, has prompted us to investigate the role and function of Sec4p in the morphological changes of the yeast pathogen *Candida albicans*. We have therefore cloned the *C. albicans SEC4* gene. It encodes a 210 amino acids long protein sharing up to 75% homology to the *S. cerevisiae* homolog, when conserved changes are allowed. Its RNA is constitutively expressed in *C. albicans* grown under various physiological conditions. We also show that it can functionally complement a *S. cerevisiae sec4* thermosensitive mutant. The sequence of the *C. albicans SEC4* gene has been deposited in GenBank under Accession Number AF017183.

5.2. INTRODUCTION

Protein secretion is an essential process carried out in all living cells. In eukaryotes, the secretory pathway plays an essential role in cellular physiology, involving an initial translocation event of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) followed by transport from the ER to the Golgi apparatus and to the cell surface. In the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this process has been genetically analyzed through isolation of different mutants (*sec*) specifically defective in defined steps of the protein secretion pathway (Novick *et al.*, 1980). These *sec* mutations affect membrane biogenesis and cell surface growth.

The gene *SEC4* encodes a protein belonging to the Rab superfamily. This family consists of tightly related small GTP-binding proteins sharing common features (for review, see Bourne *et al.*, 1990) including a small size of about 21 kDa, conserved blocks involved in GTP/GDP metabolism and two cysteines at the C-terminal end which are post-translationally modified to interact with membranes (Rossi *et al.*, 1991). This Rab family is widespread among eukaryotes and is implicated in a variety of membrane traffic processes (Rothman and Orci, 1992). More specifically, mutations in the yeast *SEC4* gene disrupt transport from the Golgi to the cell surface, leading to the accumulation of post-Golgi transport vesicles containing Sec4p; this protein is believed to be involved in the targeting and fusion of the secretory vesicles to the plasma membrane (Novick *et al.*, 1980; Goud *et al.*, 1988). In the yeast *S. cerevisiae*, Sec4p is concentrated in the growing bud and plays a pivotal role in exocytosis by controlling a

plasma membrane-associated complex including other essential components for exocytosis such as Sec8p and Sec15p.

Recent reports describe the genetic interaction (multicopy suppressor, synthetic lethality) between *SEC4* and *RHO3*. Phenotypic analysis of *rho3* mutants of *S. cerevisiae* suggests that Rho3p is involved in directing the growing points during bud formation. Therefore, the interaction of these two genes establishes a connection between components necessary for cell polarization and components of the exocytic apparatus (Jun *et al.*, 1996).

Candida albicans, an opportunistic polymorphic fungus, is the major yeast pathogen in humans causing superficial and systemic infections, particularly in immunocompromised individuals (Odds, 1988). *C. albicans* can grow under two main different morphologies: yeast and mycelial forms. The yeast to mycelial transition may be related to environmental changes, such as shifting the temperature to 37°C, Zn²⁺ concentration or media composition, and is accompanied by morphological, biochemical and physiological variations (Shepherd, 1991; Bedell *et al.*, 1979; Odds, 1988).

In order to learn more on the structure/function of the Sec4p product from related fungi such as *S. cerevisiae* and *C. albicans*, and in a cell model where there is modelling/change of cellular morphology, we have cloned and characterized the *C. albicans SEC4* gene. We show that it encodes a 210 amino acids long protein displaying up to 75 % homology to the *S. cerevisiae* homolog. Its mRNA is expressed constitutively

in various *C. albicans* strains grown under various physiological conditions and in *C. dubliniensis*. Finally, we show that it can fully complement a *sec4* *S. cerevisiae* thermosensitive mutant.

5.3. MATERIALS AND METHODS

Strains, media and growth conditions

The *Candida albicans* strain used for generating the genomic library was WO-1 (Slutsky *et al.*, 1987; kindly provided by Dr D.R. Soll). Other *C. albicans* strains used in the *SEC4* RNA expression analysis were CAI4 (*ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm43*; Fonzi and Irwin, 1993; kindly provided by Dr W. Fonzi) and strain 25A, a vaginal clinical isolate obtained from G. St-Germain, Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ). *C. dubliniensis* strain 1283 isolated from a HIV-patient with oropharyngeal candidiasis (St-Germain *et al.*, 1995; de Repentigny and Ratelle, 1996) was also used in the RNA expression study.

The *Saccharomyces cerevisiae* SNY24 used in the *SEC4* functional complementation analysis was kindly provided by Dr P. Novick (*MATa sec4-8 ura3 leu2 his4 ade6*; Salminen and Novick, 1987)

Escherichia coli DH10B (Gibco BRL) was routinely used as a plasmid host and LE392 was used for the construction of the *C. albicans* genomic library. Bacterial and yeast media were prepared as described previously (Belhumeur *et al.*, 1993). Bacterial strain LE392, used for infection with bacteriophage λ , was grown in LB medium (Sambrook *et al.*, 1989) supplemented with 0.2% maltose and 10mM MgSO₄.

S. cerevisiae transformations were performed by the lithium acetate method (Schiestl *et al.*, 1993). *S. cerevisiae* and *C. albicans* strains were routinely grown at 30°C in YPD medium. Permissive temperature of the *sec4-8* thermosensitive SNY24 mutant was 25°C, and 34°C was used as restrictive temperature. To induce germ tube formation of *C. albicans* strains, 5% Newborn calf serum (Gibco BRL) was added to exponentially growing cells in YPD at 37°C; germ tubes were then collected by centrifugation after 1 hour of incubation. Procedures to obtain pure cultures of white or opaque cells of the *C. albicans* WO-1 strain were performed as described (Slutsky *et al.*, 1987).

Plasmids

Plasmids used in this work were YEp352 (2 μ , *URA3*; Hill *et al.*, 1986), pNB170 (or YCp50/Sc*SEC4*; CEN, *URA3*, *SEC4*; kindly provided by Dr P. Novick) and YEp/Ca*SEC4* (YEp352 containing Ca*SEC4* as a genomic 1.2 kb *HindIII* fragment; see Fig. 7A). The vector Bluescript SK II⁻ (Stratagene) was routinely used for subcloning and sequencing experiments.

DNA manipulations, sequencing and library screening

All DNA manipulations were carried out essentially according to standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989). The sequencing of both DNA strands was performed with the Sequenase kit (U.S.Biochemical) with α -³⁵S-dATP, using DNA oligonucleotide primers from the Bluescript SK II⁻ vector.

The construction of the *C. albicans* WO-1 genomic library was generated with the LambdaGEM-12 (Promega) according to the manufacturer. High molecular weight DNA from strain *C. albicans* WO-1 was extracted as described by Magee *et al.* (1987) and further purified by centrifugation on an ethidium bromide-caesium chloride density gradient (Wach *et al.*, 1994). Plaques lifts (nitrocellulose filters, Schleicher & Schuell) were denatured and prehybridized in 3X SSC (1X SSC is 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate), 10X Denhardt's solution, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA at 50°C for 2 hours. Hybridization was carried out in the same buffer supplemented with 10% dextran sulfate for 16 hours. The probe CaGSP1, encoding a small GTP-binding protein (to be described elsewhere), was approximately 800 nt in length and was radiolabelled using α -³²P-dCTP and the Oligolabelling Kit (Pharmacia LKB). Final washes conditions were 2X SSC-0.1%SDS at 50°C. DNAs from positive plaques were isolated with the Qiagen Lambda Kit and then, relevant restriction fragments were subcloned in Bluescript SK II⁻ vector.

RNA expression analysis

Total RNA from various strains or strains grown under different conditions was extracted as described previously (Swoboda *et al.*, 1994). The RNA was analyzed on a 1% agarose gel in 20 mM MOPS-5 mM sodium acetate-1 mM EDTA-0.66 M formaldehyde (Fourney *et al.*, 1988). Each lane contained 40 µg of RNA, and blots (nitrocellulose filters from Schleicher & Schuell) were analyzed with a 0.8 kb *Hind*III-*Bgl*II fragment containing CaSEC4 (see Fig. 7A) radiolabelled using α -³²P-dCTP and the

Oligolabelling Kit (Pharmacia LKB). Prehybridization and hybridization conditions were exactly the same as above but the temperature was 65°C throughout. Final washing conditions were 0.1X SSC-0.1%SDS at 65°C. Amounts of RNAs loaded were evaluated by direct staining of the gels with ethidium bromide, prior to transfer.

Functional complementation analysis

Various transformants of *S. cerevisiae* strains SNY24 (*sec4-8*) harboring pNB170 (*URA3*, *CEN*, *SEC4*) as positive control, YEp/Ca*SEC4* or YEp352 (negative control) were grown in CAT medium at the permissive temperature of 25°C, and 5 µl of 10-fold serial dilutions of cell suspensions adjusted to an OD₆₀₀ of 1 were spotted on CAT and incubated either at permissive (25°C) or restrictive temperature (34°C), as indicated. A minimum of three independent transformants were assayed, although only the result of one is presented.

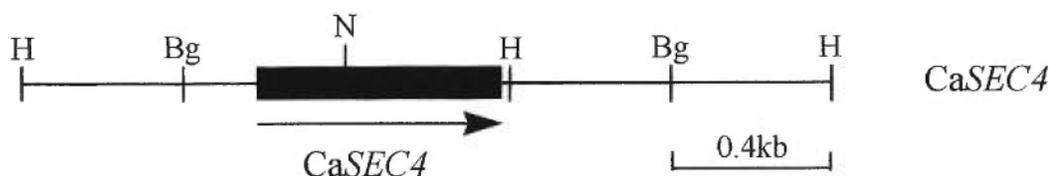
5.4. RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of the C. albicans SEC4 gene

While investigating the possibility of a second gene for CaGSP1 encoding a small nuclear-located GTP binding protein (to be described elsewhere; Clément, Fournier, de Repentigny and Belhumeur), as is the case for its homolog in *S. cerevisiae* (Belhumeur *et al.*, 1993), we probed a *C. albicans* genomic library at very low stringency using CaGSP1 as a probe. We have then isolated a DNA fragment with an open reading frame (ORF) sharing a great deal of homology to another GTP-binding protein, Sec4p. The homology between *C. albicans* GSP1 and *C. albicans* SEC4 at the nucleic acid level is approximately 34% (not shown).

As shown in Fig. 7B, there is an intron-less ORF of 630 nucleotides with a coding capacity of 210 amino acids long peptide with the typical domains involved in the guanine nucleotide metabolism (Bourne *et al.*, 1991). The sequence also reveals the presence of two cysteine residues at the C-terminus end, which could potentially be post-translationally modified to interact with membranes, as it is the case for its budding yeast homolog where there is palmytilation (Kaiser *et al.*, 1997). The predicted CaSec4p M_r is 23.1 kDa and its pI, 5.33. It should be mentioned that the pI of Sec4p (from *S. cerevisiae*) is 6.6. An alignment of the CaSec4p and Sec4p amino acid sequences is shown in Fig. 8. The identity at the amino acid level is 63% but it goes up to 75% when conserved changes are allowed.

A)



B)

```

AGATCTTGGAACATAAATAAATATTTTACAACGTTTTCACAAACAATACCCACGATATAAC 59
TGGAGATTTAGTTTACTATTTTGGATTGTTTTTGTAAATTTTTTCCCTCCCGTTTTA 119
TTTTTAATTTTGTTCAAAATCATTCAAGAAAAACATATCAAGTATTACAATTCATC 179
ATGAGCCGTAAGGGAACATCATCAAGAGCATATGACATGATTATGAAGTTATTTGGTT 239
1 M S G K G T S S R A Y D M I M K L L L V
GGAGATTCGGGTGGGAAATCGTGTATTATTGCGTTTTGTTGAAGATAAATCAAC 299
21 G D S G V G K S C L L L R F V E D K F N
CCTTCATTTATAACCACCATTGGTATTGATTTCAAAATCAGAACTATTGAAAGCAAAGGG 359
41 P S F I T T I G I D F K I R T I E S K G
AAAAGAATTAATTCAGGTTTGGGATACGCTGGTCAAGAAAAGGTTCAAGAACCTACT 419
61 K R I K L Q V W D T A G Q E R F R T I T
ACTGCTTACTACCGTGGTCCATGGGGATTGCTTAAATATATGATGTCACTGATTCAAGA 479
81 T A Y Y R G A M G I V L I Y D V T D S R
TCATTTGAAAATGTTGAAAATGTTTCAACAGTTACTCAGCACGCCAATGAGGATGCA 539
101 S F E N V E N W F Q T V T Q H A N E D A
CAGATATTTTAGTAGGTAACAAGTGTGATGATGAAGTAAACAGACAAGTTCTAAAGAG 599
121 Q I F L V G N K C D D E V N R Q V S K E
CAAGGTCAAGAATTAGCTGCTAATAAATGTTCCATTTTGGAAAGCCAGTCCCAAAAGC 659
141 Q G Q E L A A K L N V P F L E A S A K S
AATGAAAACGTTGACTCTATTTTTACGAATTTGGCTAGTATTATCCAAGAGAAGCATGTI 719
161 N E N V D S I F Y E L A S I I Q E K H V
GAAGAGAAATATTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 779
181 E E N I G G V G G A S G A G G I D V S Q
AATAATTCGGAGCAAAGAATAACTGTGCTAGAGAAGCTT 820
201 N N S G A K N N C C *

```

FIGURE 7. *CaSEC4* gene structure. (A) General organization of the *CaSEC4* gene. The closed box represents the identified *CaSEC4* ORF and the arrow, the deduced direction of transcription. Indicated restriction enzymes are: H, *HindIII*; Bg, *BglIII*, N, *NcoI*. (B) Sequence analysis of the *Candida albicans SEC4* gene and its protein. Nucleotide and amino acid sequences are numbered on the right and the left, respectively.

		G-1		G-2	
		GAGGVKG		YDPTIEDSY	
CaSec4	MSGKGTSSR-----AYDMIMKLLL	VGDSGVGKS	SCLLLRFVEDKFNPS	FITTIGIDF	51
ScSec4	MSGLRTVSASSGNGKSYDSIMKILLI	GDSGVGKS	SCLLVRFVEDKFNPS	FITTIGIDF	57
	*** * *	** **	*****	*****	
		G-3			
		DTAGQE			
CaSec4	KIRTIESK GKRIKLVW	DTAGQE	RFRTIT TAYYRGAMGIVLIYDVTDSRSFENVENW		108
ScSec4	KIKTV DINGKVKLQLW	DTAGQE	RFRTIT TAYYRGAMGIILVYDVT DERTFTNIKQW		114
	** . *	** . **	*****	* . ***** * . * . *	
		G-4		G-5	
		NKCD		ETSAK	
CaSec4	FQTVTQHANEDAQIFLVGN	KCDE	VNRQVSKEQGQELAAKLNVPF	LEASAK	165
ScSec4	FKTVNEHANDEAQLLLVGN	KSDMET	-RVVTADQGEALAKELGIPF	IESSAK	170
	* ** . *** ** . ***** * * * * . ** . ** * . *** . *** . ** .				
CaSec4	SIFYELASIIQEKHVEENIGGVG-GASGAGGIDV	SNNSGAKNCC			210
ScSec4	EIFFTLAKLIQEKIDSNKLVGVGNGKEGNISINSGSGNS-SKSNCC				215
	** . ** . **** . **** * * * . ** * ***				

FIGURE 8. Comparison of the predicted *C. albicans* Sec4 (CaSEC4) and *S. cerevisiae* Sec4 (ScSEC4) proteins. G domains, similar to Ras and involved in GTP metabolism, are indicated. The amino acid sequences are aligned for optimal homology. Identities and homologies of amino acids are indicated by asterisk and dots, respectively.

CaSEC4 mRNA expression

We have analyzed the expression of *CaSEC4* at the RNA level. Total RNA was extracted from various *C. albicans* strains grown under different conditions and these preparations were submitted to Northern blot analysis, using a radiolabelled *CaSEC4* DNA fragment. As can be seen in Fig. 9, an RNA transcript of approximately 0.9 kb in size was detected in all *C. albicans* strains used including WO-1, CAI4 and the clinical isolate 25A. A similar transcript is also detected in *C. dubliniensis* 1283 strain, a clinical isolate from an HIV patient of a newly identified *Candida* species (Sullivan *et al.*, 1995). The weaker signal obtained for the *C. dubliniensis* RNA preparation could be due to a decreased homology with the *C. albicans* probe. The transcript is constitutively expressed whether cells were grown under conditions inducing enrichment for white or opaque cells (W or O for WO-1), hyphal or yeast cells (H or Y). This indicates that if *CaSec4p* does play a pivotal role in the yeast-to-hyphal growth decision/transition or the white-to-opaque phenotypic switching, it is through a post-transcriptional mechanism and/or its differential association to (a) partner(s) responsible for the morphological changes.

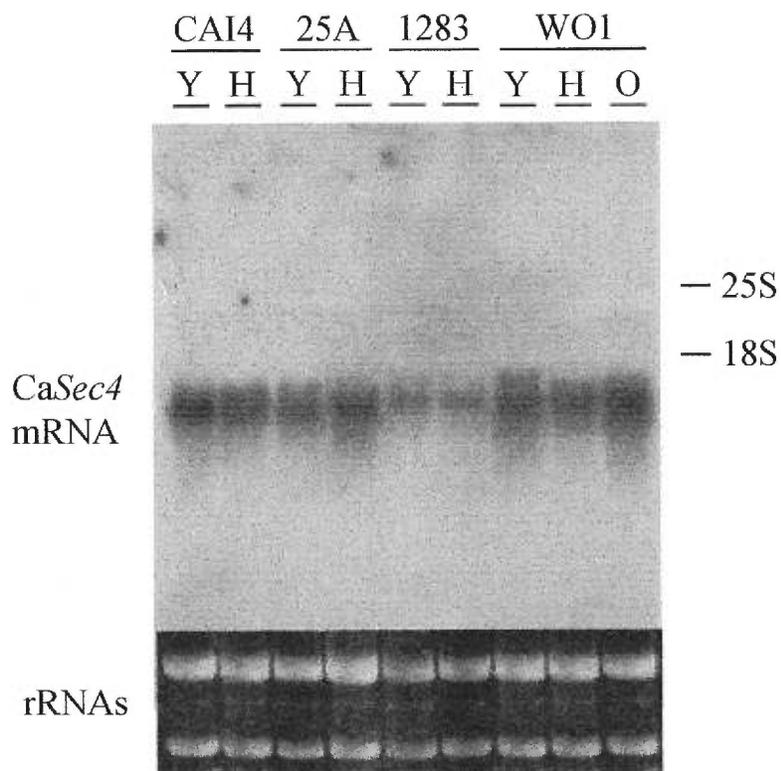


FIGURE 9. Northern blot hybridization analysis of CaSEC4 RNA in *Candida* strains grown under various conditions. Each lane contains 40 μ g of RNA from different *C. albicans* strains CAI4, WO-1 and the clinical isolate 25A or *C. dubliniensis* 1283 (clinical isolate from an HIV patient) growing as yeast (Y), hyphal (H) or opaque (O) cells. Lower panel is a photograph of the gel before transfer (rRNAs).

Functional complementation of S. cerevisiae sec4-8 mutation by CaSEC4

In order to assess the correlation between sequence similarity between the *S. cerevisiae* and the *C. albicans* *SEC4* homologs, the ability of the latter to functionally complement a thermosensitive allele of the former was assayed. A genomic 1.2 kb *HindIII* fragment encompassing the coding region of *CaSEC4* flanked, in 5' and 3', by approximately 600 nt and 10 nt respectively (see Fig. 7A) was cloned into the multicopy vector YEp352 (YEp/*CaSEC4*). The thermosensitive *sec4-8* *S. cerevisiae* mutant strain (SNY24) was then transformed with YEp/*CaSEC4*, YEp352 (empty vector, as negative control) and pNB170 (*S. cerevisiae* *SEC4* in YCp50 as positive control). As can be seen in Fig. 10, SNY24 cells transformed with YEp/*CaSEC4* could then grow at the restrictive temperature of 34°C (right-end panel) while those transformed with the vector alone (YEp352) could not. A slight thermosensitivity (worsened growth) of SNY24 could even be detected at permissive temperature (25°C, left-end panel) as seen by the cells harboring the vector alone (YEp352) compared to those carrying either YCp50/*ScSEC4* (pNB170) or YEp/*CaSEC4*.

From this experiment, we conclude that the *CaSEC4* gene can functionally complement a *S. cerevisiae* *sec4* mutant.

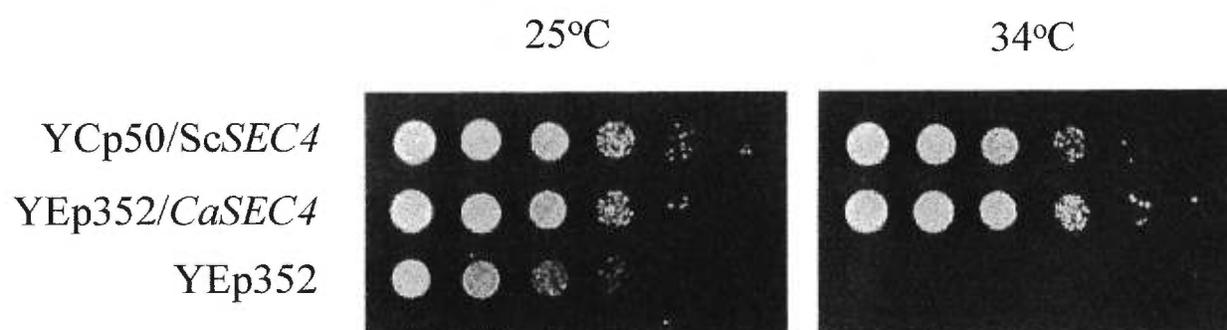


FIGURE 10. Complementation of the *S. cerevisiae* *sec4-8* ts mutation by *CaSEC4*. *S. cerevisiae* SNY24 (*sec4-8*) cells were transformed to Ura⁺ at 25°C with URA3-based plasmids carrying various inserts and 10-fold serial dilutions of the transformants were then spotted in duplicate on selective medium plates and incubated either at 25°C or at 34°C, as indicated. Plasmids are: YEp352 (vector alone as negative control); pNB170 (YCp50/ScSEC4 as positive control) and YEp352/CaSEC4 (as a genomic 1.2 kb *Hind*III fragment; see Fig. 7A).

5.5. CONCLUSIONS

We have isolated the *C. albicans* gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* *SEC4* homolog, involved in the targeting and fusion of the secretory vesicles to the plasma membrane. It encodes a predicted 217 amino acid long protein, sharing up to 73% homology to the *S. cerevisiae* protein. The *C. albicans* *SEC4* mRNA is constitutively expressed in strains grown under various conditions inducing different cellular morphologies, as well as in the newly described species *C. dubliniensis*. Finally, the *C. albicans* *SEC4* gene can functionally complement a *S. cerevisiae* *sec4* thermosensitive mutant.

At present, the mechanisms by which *C. albicans* adopts these different cellular morphologies are not known but the availability of this DNA clone should enable us to analyze its contribution in these biological phenomena.

During the revision of this manuscript, the sequence of the *Candida albicans* *SEC4* gene was deposited in the GenBank database (Accession Number AF015306) by Mao, Y. X. and Wong, B. (Yale University, New Haven CT): their sequence and ours are entirely identical.

5.6. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to D.R. Soll and W. Fonzi for providing the *C. albicans* WO-1 and CAI4 strains, respectively. We would like to thank P. Novick for sending us the *S. cerevisiae* SNY24 strain along with the pNB170 plasmid. We also wish to thank Ms. J. Joly and M. G. St-Germain for providing the clinical isolates of *Candida* strains from the Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ).

5.7. REFERENCES

Bedell, G.W. and Soll, D.R. (1979). Effects of low concentration of zinc on growth and dimorphism of *Candida albicans*: evidence of zinc-resistance and sensitive pathways for mycelium formation. *Infect. Immun.* **26**, 348-354.

Belhumeur, P., Lee, A., Tam, R., DiPaolo, T., Fortin, N. and Clark, M.W. (1993). *GSP1* and *GSP2*, genetic suppressors of the *prp20-1* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2152-2161.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-132.

de Repentigny, L. and Ratelle, J. (1996). Comparison of itraconazole and ketoconazole in HIV-positive patients with oropharyngeal or esophageal candidiasis. Human Immunodeficiency Virus Itraconazole Ketoconazole Project Group. *Chemotherapy* **42**, 374-383.

Fonzi, W.A. and Irwin, M.Y. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.

Fourney, R.M., Miyakoshi, J., Day III, R.S. and Paterson, M.C. (1988). Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus (Gibco BRL)* **10**, 5-6.

Goud, B., Salminen, A., Walworth, N.C. and Novick, P.J. (1988). A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* **53**, 753-768.

Hill, J.E., A.M. Myers, T.J. Koerner, and Tzagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**, 163-167.

Jun, I., Toh-e, A. and Matsui, Y. (1996). Genetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *RHO3* gene, encoding a Rho-type small GTPase, provides evidence for a role in bud formation. *Genetics* **142**, 359-369.

Kaiser, C.A., Gimeno, R.E. and Shaywitz, D.A. (1997). Protein Secretion, Membrane Biogenesis, and Endocytosis. In: J.R. Pringle, J.R. Broach and E.W. Jones (Eds.). *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* (V. 3: Cell Cycle and Cell Biology). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 91-227

Magee, B.B., D'Souza, T.M. and Magee, P.T. (1987). Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J. Bacteriol.* **169**, 1639-1643.

Novick, P., Field, C. and Sheckman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-215.

Odds, F. (1988). *Candida and Candidosis*, 2nd edn. Bailliere Tindall, London.

Rossi, G., Jiang, Y., Newman, A.P. and Ferro-Novick, S. (1991). Dependence of Ypt1 and Sec4 membrane attachment on Bet2. *Nature* **351**, 158-161.

Rothman, J.E. and Orci, L. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* **355**, 409-415.

Salminen, A. and Novick, P.J. (1987). A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* **49**, 527-538.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schiestl, R.H., Manivasakam, P., Woods, R.A. and Gietz, R.D. (1993). Introducing DNA into yeast by transformation. *Methods in Enzymol.* **5**, 79-85.

Shepherd, M.G. (1991). In Prasad, R. (Ed.), *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 5-19.

Slutsky B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller M. and Soll, D.R. (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **169**, 189-97.

St-Germain, G., Dion, C., Espinel-Ingroff, A., Ratelle, J. and de Repentigny, L. (1995). Ketoconazole and itraconazole susceptibility of *Candida albicans* isolated from patients infected with HIV. *J. Antimicrob. Chemotherapy.* **36**, 109-118.

Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E. and Coleman, D.C. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141**, 1507-1521.

Swoboda. R.K., Bertram, G., Delbruck, S., Ernst, J.F., Gow, N.A., Gooday, G.W. and Brown, A.J. (1994). Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism. *Molecular Microbiology* **13**, 663-672.

Wach, A., Pick, H. and Philippsen, P. (1994). Procedures for isolating yeast DNA for different purposes. In: J.R. Johnston (Ed.), *Molecular Genetics of Yeast. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 1-16.

DISCUSSION

6. DISCUSSION

Par criblage d'une banque génomique de la souche de *C. albicans* WO-1 à l'aide d'un fragment d'ADN recouvrant la région codante du gène *CaGSP1*, nous avons isolé l'homologue du gène *SEC4* chez *Candida albicans*. L'homologie relativement élevée (34%) entre les gènes *CaGSP1* et *CaSEC4* vient du fait que les séquences nucléotidiques correspondantes aux domaines responsables du métabolisme du GTP/GDP sont bien conservées entre ces deux gènes. Ceci serait suffisant pour permettre l'appariement, même imparfait, entre ces fragments d'ADN à une faible stringence.

Deux évidences semblent indiquer que le gène cloné est vraiment l'homologue fonctionnel du gène *SEC4* de *S. cerevisiae*. Premièrement, la séquence protéique de ce gène est très apparentée à celles des produits des gènes *SEC4* et *YPT2* de *S. cerevisiae* et de *S. pombe*, respectivement. Ypt2p est l'homologue fonctionnel de Sec4p (Haubruck *et al.*, 1990). Deuxièmement, nous avons démontré que le gène isolé de *C. albicans* est capable de compléter le défaut de croissance observé chez le mutant thermosensible *sec4-8* de *S. cerevisiae*, lorsqu'il est incubé à température restrictive. Par conséquent, ces observations suggèrent que le gène de *C. albicans*, appelé *CaSEC4*, est l'homologue fonctionnel du gène *SEC4* de *S. cerevisiae*.

Lors des essais fonctionnels chez le mutant thermosensible *sec4-8*, nous avons remarqué que l'efficacité de complémentation par le gène *CaSEC4* était légèrement plus

élevé que celle du gène *SEC4* de *S. cerevisiae* (Figure 10). Toutefois, le gène *CaSEC4* était porté par un plasmide multicopie (YEp352), alors que celui de *S. cerevisiae* était sur un vecteur centromérique (YCp50 ; 1-2 copies/cellule). L'effet inverse aurait pu être observé si le gène *CaSEC4* avait été porté par un vecteur centromérique.

Deux autres hypothèses pourraient expliquer cette différence en ce qui a trait à l'efficacité de complémentation par les gènes *CaSEC4* et *SEC4*. Premièrement, il est possible que les éléments de régulation au niveau des promoteurs soient différents. Un alignement de séquences des 180 nucléotides situés en amont du codon d'initiation de la traduction des gènes *SEC4* et *CaSEC4* semble démontrer la présence de caractéristiques communes entre ces deux promoteurs. Afin d'étudier davantage cet aspect, il serait intéressant de vérifier l'efficacité de complémentation du mutant *sec4-8* par les gènes *SEC4* et *CaSEC4* placés sous le contrôle des promoteurs des gènes *CaSEC4* et *SEC4* respectivement. Une seconde approche consisterait à cloner les deux promoteurs devant un gène rapporteur, tel celui encodant la β -galactosidase de *E. coli*. Ceci nous permettrait de vérifier la fonctionnalité du promoteur du gène *CaSEC4* chez *S. cerevisiae*.

Dans le cas où aucune différence significative ne soit observée en ce qui a trait à la fonctionnalité des promoteurs chez *S. cerevisiae*, une explication possible serait la variation des séquences primaires des produits des gènes *CaSEC4* et *SEC4*. L'homologie entre les séquences des protéines *CaSec4p* et *Sec4p* n'est que de 75% lorsque les changements conservatifs sont pris en considération. Par conséquent, la

différence de composition en acides aminés entre ces deux protéines pourrait expliquer pourquoi les deux gènes n'ont pas la même efficacité à compléter le mutant thermosensible *sec4-8* à 34°C. Aussi, les domaines d'interaction des différentes protéines interagissant avec Sec4p ou CaSec4p pourraient être légèrement différents et ainsi créer une différence en ce qui a trait à l'efficacité de complémententation par les deux gènes. De plus, chez *C. albicans* le code génétique est légèrement différent de celui retrouvé chez *S. cerevisiae* et chez les eucaryotes supérieurs. En effet, le codon CUG qui code normalement pour une sérine, code pour une leucine chez *C. albicans* (Santos et Tuite, 1995). L'hypothèse d'une altération de la fonctionnalité de CaSec4p, dû au remplacement des sérines par des leucines lorsque exprimée chez *S. cerevisiae*, est à exclure puisque aucun codon CUG n'est présent dans la séquence du gène *CaSEC4*. Dans le but de vérifier la fonctionnalité des différents domaines présents sur la protéine CaSec4p, il serait intéressant de construire des protéines chimériques entre CaSec4p et Sec4p.

Chez *S. cerevisiae*, le gène *SEC4* accomplit une fonction essentielle. C'est également le cas pour l'homologue de ce dernier chez *S. pombe*. Ceci porte à croire que *CaSEC4* aurait également une fonction essentielle à la viabilité chez *C. albicans*. Toutefois, aucun essai de double délétion du gène *CaSEC4* n'a été réalisé. L'expression ubiquitaire de l'ARNm *CaSEC4* observé au niveau des différentes morphologies retrouvées chez *C. albicans* suggère cependant que CaSec4p doit jouer un rôle essentiel peu importe la forme de croissance observée chez ce pathogène.

L'absence de variation significative au niveau de l'abondance de l'ARNm *CaSEC4* observée lors de l'analyse par Northern suggère également que *CaSec4p* ne serait pas impliquée directement au niveau des mécanismes de transition « levure/hyphe » et « white/opaque ». Une régulation traductionnelle de cet ARNm ne peut évidemment être écartée. Toutefois, il est aussi possible que *CaSec4p* soit impliquée dans ces contrôles de transition, mais de façon indirecte. En effet, d'autres partenaires spécifiques des différents états de croissance pourraient s'associer physiquement à *CaSec4p*. Afin d'identifier de tels partenaires, il serait intéressant de construire des banques d'ADN complémentaire (cDNA) des états de transition « levure/hyphe » et/ou « white/opaque » et de les utiliser dans le système des « 2-hybrides » chez *S. cerevisiae* avec le gène *CaSEC4* comme appât. Cela permettrait d'identifier les produits des gènes ayant de l'affinité pour la protéine *CaSec4p* de *C. albicans*. De cette façon, nous pourrions identifier des protéines exprimées spécifiquement au niveau des différents états morphologiques et démontrant de l'affinité pour *CaSec4p*. L'identification de tels partenaires pourraient enrichir nos connaissances des mécanismes moléculaires de la morphogénèse chez *C. albicans*, la forme filamenteuse de ce pathogène étant associée à sa virulence (Saporito-Irwin *et al.* 1995; Ghannoum *et al.* 1995).

Des modifications post-traductionnelles de *CaSec4p* pourraient également avoir des effets au niveau des transitions morphologiques chez *C. albicans*. Par exemple, le produit du gène *Snc1* de *S. cerevisiae* est modifié post-transcriptionnellement près du domaine trans-membranaire par l'ajout de groupements lipidiques. Cette modification affecte la stabilité de *Snc1p* (Couve *et al.* 1995). Par conséquent, un contrôle à ce

niveau pourrait influencer l'activité de Snc1p. Chez *S. cerevisiae*, Sec4p est modifiée à son extrémité C-terminale par l'ajout de groupements géranyl-géranyl. Bien que non vérifié, CaSec4p devrait également être modifiée à son extrémité C-terminale dû à la présence de deux cystéines nécessaires à cette modification. Par conséquent, il serait donc intéressant d'étudier cet aspect afin de vérifier si une régulation différente pourrait survenir sur la protéine CaSec4p comparativement à celle de *S. cerevisiae*. Cela pourrait influencer son activité et par conséquent, le développement de *C. albicans*.

Récemment, une technique permettant de cribler des banques de peptides a été développée. Il s'agit du « Phage Display Library » (Scott *et* Smith, 1990). Il existe plusieurs variantes mais essentiellement, il s'agit d'une librairie d'épitopes peptidiques de sept acides aminés ou plus portés sur une protéine capsidique de bactériophages. Un éventail de 10^9 à 10^{10} épitopes différents peut être représenté dans une telle banque. Cette approche, n'étant pas sans rappeler la technique des « 2-hybrides », présente deux avantages. D'une part, la collection de séquences peptidiques ne se limite pas aux gènes cellulaires et d'autre part, le tout se déroulant *in vitro*, il ne peut y avoir sous-représentation de gènes ou séquences autrement toxiques pour la cellule lorsque surexprimés, comme c'est le cas *in vivo* dans la technique des « 2-hybrides ». Par criblage de telles banques peptidiques avec la protéine CaSec4p de *C. albicans*, nous pourrions identifier des séquences peptidiques démontrant de l'affinité pour le produit du gène CaSEC4. La nature des peptides ainsi identifiés pourrait nous informer sur de nouveaux domaines d'interactions entre CaSec4p et des protéines connues ou encore inconnues pour leur implication avec CaSec4p. De plus, l'identification de ces peptides

pourrait être le point de départ pour la conception de nouveaux produits antifongiques contre le pathogène opportuniste *C. albicans*, leur présence devrait interférer avec l'activité normale de CaSec4p.

REMERCIEMENTS

7. REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement le Dr Pierre Belhumeur pour m'avoir accepté dans son laboratoire, pour les bons conseils qu'il m'a donnés et pour son soutien tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais remercier également le Dr Louis de Repentigny pour ses encouragements et ses connaissances médicales.

Aussi, je remercie mes collègues de travail pour leurs suggestions et leur écoute.

Finalement, merci à ma famille et à ma copine Chantal pour leurs encouragements et la confiance qu'il ont porté à mon égard.

RÉFÉRENCES

8. RÉFÉRENCES

Aalto, M.K., Ronne, H. and Keränen, S. (1993). Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.* **12** : 4095-4104.

Adams, A.E.M., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F. and Pringle, J.R. (1990). *CDC42* and *CDC43*, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **111** : 131-142.

Adams, A.E.M. and Pringle, J.A. (1984). Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **98** : 934-945.

Akashi, T., Homma, M., Kanbe, T. and Tanaka, K. (1993). Ultrastructure of proteinase-secreting cells of *Candida albicans* studied by alkaline bismuth staining and immunocytochemistry. *J. Gen. Microbiol.* **139** : 2185-2195.

Akashi, T., Kanbe, T. and Tanaka, K. (1994). The role of the cytoskeleton in the polarized growth of the germ tube in *Candida albicans*. *Microbiol.* **140** : 271-280.

Alberts, B. *et al.* (1989). Biologie moléculaire de la cellule. Flammarion Médecine-Sciences. 2nd Ed. pp. 405-475.

Anaissie, E.J. (1992). Opportunistic mycosis in the immunocompromised host : experience at a cancer center and review. *Clin. Infect. Dis.* **14** : 43-53.

Anderson, J.M. and Soll, D.R. (1986). Differences in actin localization during bud and hypha formation in the yeast *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **132** : 2035-2047.

Baker, D., Hicke, L., Rexach, M., Schleyer, M. and Schekman, R. (1988). Reconstitution of *SEC* gene product-dependent intercompartmental protein transport. *Cell* **54** : 335-344.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R. (1994). COPII : A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77** : 895-907.

Baumert, M., Maycox, P.R., Navone, F., De Camilli, R. and Fahn, R. (1989). Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO j.* **8** : 379-384.

Beckers, C.J.M., Block, M.R., Glick, B.S., Rothman, J.E. and Balch, W.E. (1989). Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature* **339** : 397-398.

Bedell, G.W. and Soll, D.R. (1979). Effects of low concentration of zinc on the growth and dimorphism of *Candida albicans*: evidence of zinc-resistance and sensitive pathways for mycelium formation. *Infect. Immun.* **26** : 348-354.

Bednarek, S.Y., Ravazzola, M., Hosobuchi, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Schekman, R. and Orci, L. (1995). COPI- and COPII-coated vesivles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell* **83** : 1183-1196.

Bennet, M.K., Calakos, N. and Scheller, R.H. (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* **257** : 255-259.

Blobel, G. and Sabatini, D.D. (1971). Ribosome-membrane interaction in eukaryotic cells. In *Biomembranes* (ed. L.A. Manson), Plenum Press, New York, vol. 2, p.193.

Block, M.R., Glick, B.S., Wilcox, C.A., Wieland, F.T. and Rothman, J.E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **85** : 7852-7856.

Boken, D.J., Swindells, S. and Rinaldi, M.G. (1993). Fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Clin Infect. Dis.* **17** : 1018-1021.

Bourne, H.R. (1988). Do GTPases direct membrane traffic in secretion ? *Cell* **53** : 669-671.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily : A conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348** : 125-132.

Bourne, H.R. (1991). The GTPase superfamily : Conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349** : 117-127.

Bowser, R. and Novick, P. (1991). Sec15 protein, an essential component of the exocytotic apparatus, is associated with the plasma membrane and with a soluble 19.5S particle. *J. Cell Biol.* **112** : 1117-1131.

Bowser, R., Müller, H., Govindan, B. and Novick, P. (1992). Sec8 and Sec15p are components of a plasma membrane-associated 19.5S particle that may function downstream of Sec4p to control exocytosis. *J. Cell Biol.* **118** : 1041-1056.

Brennwald, P. and Novick, P. (1993). Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature* **362** : 560-563.

Brennwald, P., Kearns, B., Champion, K., Keränen, Bankaisis, S.V. and Novick, P. (1994). Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* **79** : 245-258.

Chant, J., and Pringle, J.R. (1995). Patterns of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **129** : 751-765.

Clary, D.O. and Rothman, J.E. (1990). Purification of three related peripheral membrane proteins needed for vesicular transport. *J. Biol. Chem.* **265** : 10109-10117.

Clary, D.O., Griff, I.C. and Rothman, J.E. (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* **61** : 709-721.

Clement, M., Fournier, H., de Repentigny, L. and Belhumeur, P. (1998). Isolation and characterization of the *Candida albicans* *SEC4* gene. *Yeast* (in press).

Collins, R.N., Brennwald, P., Garrett, M., Lauring, A. and Novick, P. (1997). Interactions of nucleotide release factor Dss4p with Sec4p in the post-Golgi secretory pathway of yeast. *J Biol Chem* **272** : 18281-18289.

Couve, A., Protopopov, V. and Gerst, J.E. (1995). Yeast synaptobrevin homologs are modified posttranslationally by the addition of palmitate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** : 5987-5991.

Couve, A. and Gerst, J.E. (1994). Yeast Snc proteins complex with Sec9 : Functional interactions between putative SNARE proteins. *J. Biol. Chem.* **269** : 23391-23394.

Cutler, J.E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45** : 187-218.

Diaz, R., Mayorga, L.S., Weidman, P.J., Rothman, J.E. and Stahl, P.D. (1989). Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. *Nature* **339** : 398-400.

Drubin, D.G., and Nelson, W.J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* **84** : 335-344.

Dunn, B., Stearns, T. and Botstein, D. (1993). Specificity domains distinguish the Ras-related GTPases Ypt1 and Sec4. *Nature* **362** : 563-565.

Egerton, M., Zueco, J. and Boyd, A. (1993). Molecular characterization of the SEC1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* : Subcellular distribution of a protein required for yeast protein secretion. *Yeast* **9** : 703-713.

Elorza, M.V., Rico, H. and Sentandreu, R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol* **129** : 1577-1582.

Ferro-Novick, S. and Novick, P. (1993). The role of GTP-binding proteins in transport along the exocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9** : 575-599.

Field, C. and Schekman, R. (1980). Localized secretion of acid phosphatase reflects the pattern of cell surface growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **86** : 123-128.

Finger, F.P. and Novick, P. (1997). Sec3p is involved in secretion and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. of the Cell.* **8** : 647-662.

Fonzi, W.A. and Irwin, M.Y. (1993). Isogenic construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134** : 717-728.

Fox, J.L. (1993). Fungal infection rates are increasing. *ASM News* **10** : 515-518.

Gallwitz, D., Donath, C. and Sander, C. (1983). A yeast gene encoding a protein homologous to the human *c-has/bas* proto-oncogene product. *Nature.* **306** : 704-707.

Garrett, M.D., Zahner, J.E., Cheney, C.M. and Novick, P.J. (1994). *GDI1* encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *EMBO J.* **13** : 1718-1728.

Gerst, J.E., Rodgers, L., Riggs, M. and Wigler, M. (1992). *SNC1*, a yeast homolog of the synaptic vesicle-associated membrane protein/synaptobrevin gene family: Genetic interaction with the *RAS* and *CAP* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 4338-4342.

Goud, B., Salminen, A., Walworth, N.C. and Novick, P.J. (1988). A GTP-binding proteins required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* **53** : 753-768.

Govindan, B., Bowser, R. and Novick, P. (1995). The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J. Cell Biol.* **128** : 1055-1068.

Gumbiner, B. and Kelly, R.B. (1982). Two distinct intracellular pathways transport secretory and membrane glycoproteins to the surface of pituitary tumor cells. *Cell* **28(1)** : 51-59.

Graham, T.R. and Emr, S.D. (1991). Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast *sec18* (NSF) mutant. *J. Cell Biol.* **114** :207-218.

Griff, I.C., Schekman, R., Rothman, J.E. and Kaiser, C.A. (1992). The yeast *SEC17* gene product is functionally equivalent to mammalian α -SNAP protein. *J. Biol. Chem.* **267** : 12106-12115.

Grove, S.N. (1978). The cytology of hyphal tip growth. In *The Filamentous Fungi*. Edited by J.E. Smith & D.R. Berry. London : Edward Arnold. pp. 28-50.

Haarer, B.K., Corbett, A., Kweon, Y., Petzold, A.S., Silver, P., and Brown, S.S. (1996). *SEC3* mutations are synthetically lethal with profilin mutations and cause defects in diploid-specific bud-site selection. *Genetics* **144** : 495-510.

Hansen, W., Garcia, P.D. and Walter, P. (1986). *In vitro* protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum : ATP-dependent posttranslational translocation of the prepro- α -factor. *Cell* **45** : 397-406.

Harsay, E. and Bretscher, A. (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J. Cell Biol.* **131** : 297-310.

Haubruck, H., Engelke, U., Mertins, P. and Gallwitz, D. (1990). Structural and functional analysis of *ypt2*, an essential ras-related gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* encoding a Sec4 protein homologue. *EMBO J.* **9** : 1957-1962.

Heath, I.B. (1990). The role of actin in tip growth of fungi. *Int. Rev. Cytol.* **123** : 95-127.

Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52** : 536-553.

Hess, D.T., Slater, T.M., Wilson, M.C. and Skene, J.H.P. (1992). The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS. *J. Neurosci.* **12** : 4634-4641.

Hitchcock, C.A., Pye, G.W., Troke, P.F., Johnson, E.M. and Warnock, D.W. (1993). Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37** : 1962-1965.

Hostetter, M.K. (1994). Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin. Microbiol. Rev.* **7** : 29-42.

Imai, J., Toh-E, A. and Matsui, Y. (1996). Genetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* *RHO3* gene, encoding Rho-type small GTPase, provides evidences for a role in bud formation. *Genetics* **142** : 359-369.

Inoue, A., Obata, K. and Akagava, K. (1992). Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *J. Biol. Chem.* **267** : 10613-10619.

Jiang, Y., Rossi, G. and Ferro-Novick, S. (1993). Bet2p and Mad2p are components of a prenyltransferase that adds geranylgeranyl onto Ypt1p and Sec4p. *Nature* **366** : 84-86.

Johnson, D.I. and Pringle, J.R. (1990). Molecular characterization of *CDC42*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J. Cell Biol.* **111** : 143-152.

Johnston, G.C., Prendergast, J.A. and Singer, R.A. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* *MYO2* gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles. *J. Cell Biol.* **113** : 539-551.

Kabcenell, A.K., Goud, B., Northrup, J.K. and Novick, P.J. (1990). Binding and Hydrolysis of guanine nucleotides by Sec4p, a yeast protein involved in the regulation of vesicular trafic. *J. Biol. Chem.* **265** : 9366-9372.

Kaiser, C.A. and Schekman, R. (1990). Distinct sets of *SEC* genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* **61** : 723-733.

Kilmartin, J.V. and Adams, A.E.M. (1984). Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J. Cell Biol.* **98** : 922-933.

Kurtz, M.B., Cortelyou, M.W. and Kirsch, D.R. (1986). Integrative transformation of *Candida albicans* using a cloned *Candida ADE2* gene. *Mol. Cell. Biol.* **6** : 142-149.

Kurtz, M.B., Cortelyou, M.W., Miller, S.M., Lai, M. and Kirsch, D.R. (1987). Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **7** : 209-217.

Lian, J.P. and Ferro-Novick, S. (1993). Bos1p an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum to Golgi transport vesicles, is required for their fusion competence. *Cell* **73** : 735-745.

Magdolen, V., Oechsner, U., Muller, G. and Bandlow, W. (1988). The intron-containing gene for yeast profilin (PFY) encodes a vital function. *Mol Cell Biol* **8** : 5108-5115.

Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J.C. and Rothman, J.E. (1988). Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* **58** : 329-336.

Mao, Y.X. and Wong, B. Isolation of a *Candida albicans* homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* vesicular transport gene *SEC4*. Ref. GenBank.

Marks, J., Hagan, I.M. and Hyams, J.S. (1986). Growth polarity and cytokinesis in fission yeast : the role of the cytoskeleton. *J. Cell. Sci. Suppl.* **5** : 229-241.

Matsui, Y. and Toh-E, A. (1992a). Isolation and characterization of two novel *ras* superfamily genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **144** :43-49.

Matsui, Y. and Toh-E, A. (1992b). Yeast *RHO3* and *RHO4* *ras* superfamily genes are necessary for bud growth and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes *CDC42* and *BEM1*. *Mol. Cell. Biol.* **12** : 5690-5699.

Milstein, C., Brownlee, G.G., Harrison, T.M. and Mathews, M.D. (1972). A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nat. New Biol.* **239** : 117-120.

Morgan, A., Dimaline, R. and Burgoyne, R.D. (1994). The ATPase activity of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is regulated by soluble NSF attachment proteins. *J. Biol. Chem.* **269** : 29347-29350.

Moya, M., Roberts, D. and Novick, P. (1993). *DSS4-1* is a dominant suppressor of *sec4-8* that encodes a nucleotide exchange protein that aids Sec4p function. *Nature* **361** : 460-463.

Nair, J., Müller, H., Peterson, M. and Novick, P. (1990). Sec2 protein contains a coiled-coil domain essential for vesicular transport and a dispensable carboxy terminal domain. *J. Cell Biol.* **110** : 1897-1909.

Nieto, A., Sanz, P., Sentandreu, R. and del Castillo Agudo, L. (1993). Cloning and characterization of the *SEC18* gene from *Candida albicans*. *Yeast* **9** : 875-887.

Nombela, C., Pla, J., Herreros, E., Gil, C., Molina, M. and Sánchez, M. (1992). Novel targets for antifungal drugs. In Bennett, J.E., Hay, A.J. and Peterson, P.K. (Eds), *New Strategies in Fungal Disease*. Churchill Livingstone, London, pp. 117-129.

Novick, P. and Botstein, D. (1985). Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell* **40** : 405-416.

Novick, P., Ferro-Novick, S. and Schekman, R. (1981). Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* **25** : 461-469.

Novick, P., Field, C. and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21** : 205-215.

Novick, P., Goud, B., Salminen, A., Walworth, N.C., Nair, J. and Potenza, M. (1988). Regulation of vesicular traffic by a GTP-binding protein on the cytoplasmic surface of secretory vesicles in yeast. *Cold Spring Harbord Symp. Quant. Biol.* **53** : 637-647.

Novick *et al.*, (1993). The cycle of *SEC4* function in vesicular transport. *Ciba Foundation Symposium 176 : The GTPase superfamily*. John Wiley & Sons Ltd, England. pp. 218-232.

Nuoffer, C. and Balch, W.E. (1994). GTPases : Multifunctional molecular switches regulating vesicular traffic. *Annu. Rev. Biochem.* **63** : 949-990.

Odds, F.C. (1988). *Candida and candidosis*. 2nd edn. Bailliere-Tindall, London.

Odds, F.C. (1994). *Candida* species and virulence. *ASM News* **60** : 313-318.

Oka, T. and Nakano, A. (1994). Inhibition of GTP Hydrolysis by Sar1p causes accumulation of vesicles that are a functional intermediate of the ER-to-Golgi transport in yeast. *J. Cell Biol.* **124** : 425-434.

Oyler, G.A., Higgins, G.A., Hart, R.A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F.E. and Wilson, M.C. (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell. Biol.* **109** : 3039-3052.

Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* **189** : 347-358.

Paquet, M.R., Pfeffer, S.R., Burczak, J.D., Glick, B.S. and Rothman, J.E. (1986). Components responsible for transport between successive Golgi cisternae are highly conserved in evolution. *J. Biol. Chem.* **261** : 4367-4370.

Pearse, B.M.F. and Robinson, M.S. (1990). Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6** : 151-171.

Pfaller, M.A. and Wenzel, R.P. (1992). The impact of changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11** : 287-291.

Pfeffer, S.R. (1996). Transport vesicle docking-SNAREs and associates. *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **12** :441-461.

Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-Garcia, F., Sanchez, M. and Nombela, C. (1996). Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast* **12** : 1677-1702.

Potenza, M., Bowser, R., Müller, H. and Novick, P. (1992). *SEC6* encodes an 85 kDa soluble protein required for exocytosis in yeast. *Yeast* **8** : 549-558.

Preuss, D., Mulholland, J., Franzusoff, A., Segev, N. and Botstein, D. (1992). Characterization of the *Saccharomyces* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy. *Mol. Biol. Cell* **3** : 789-803.

Pringle, J.R., Broach, J.R. and Jones, E.W. (1997). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. vol. **3** : Cell cycle and cell biology. Cold Spring Harbor. pp. 91-227.

Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P. and Gerst, J.E. (1993). Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* **74** : 855-861.

Rexach, M.F. and Schekman, R.W. (1991). Distinct biochemical requirements for the budding, targeting, and fusion of ER-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* **114** : 219-229.

Rexach, M.F., Latterrich, M. and Schekman, R.W. (1994). Characteristics of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* **126** : 1133-1148.

Richardson, M.D. (1991). Opportunistic and pathogenic fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **28** : 1-11.

Roemer, T., Vallier, L.G. and Snyder, M. (1996). Selection of polarized growth sites in yeast. *Trends in Cell Biol.* **6** : 434-441.

Rossi, G., Jiang, Y., Newman, A.P. and Ferro-Novick, S. (1991). Dependence of Ypt1 and Sec4 membrane attachment on Bet2. *Nature* **351** : 158-161.

Rothblatt, J.A. and Myers, D.I. (1986). secretion in yeast : Reconstitution of the translocation and glycosylation of α -factor and invertase in a homologous cell-free system. *Cell* **44** : 619-628.

Rothman, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372** : 55-63.

Ruohola, H., Kabcenell, A.K. and Ferro-Novick, S. (1988). Reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in yeast : The acceptor Golgi compartment is defective in the *sec23* mutant. *J. Cell Biol.* **107** : 1465-1476.

Ryley, J.F., Wilson, R.G. and Barrett-Bee, K.J. (1984). Azole resistance in *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **22** : 53-63.

Salama, N.R., Yeung, T. and Schekman, R.W. (1993). The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins. *EMBO J.* **12** : 4073-4082.

Salminen, A. and Novick, P.J. (1987). A *ras*-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* **49** : 527-538.

Salminen, A. and Novick, P.J. (1989). The *sec15* protein responds to the function of GTP binding protein, Sec4, to control vesicular traffic. *J. Cell Biol.* **109** : 1023-1036.

Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M. and 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.

Santos, M.A. and 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.

Saporito Irwin, S.M., Birse, C.E., Sypherd, P.S. and Fonzi, W.A. (1995). *PHR1*, a ph-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **15** : 601-613.

Scherer, S. and Magee, P.T. (1990). Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* **54** : 226-241.

Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino, de Laureto P., DasGupta, B.R. and Montecucco, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359** : 832-835.

Schmitt, H.D., Wagenr, P., Plaff, E. and Gallwitz, D. (1986). The *ras*-related *YPT1* gene product in yeast: A GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization. *Cell* **47** : 401-412.

Scott, J.K. and Smith, G.P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249** : 386-390.

Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J.E. and Wieland, F.T. (1991). A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. *Nature* **349** :215-220.

Segev, N. and Botstein, D. (1987). The *ras*-like yeast *YPT1* gene is itself essential for growth, sporulation, and starvation response. *Mol. Cell Biol.* **7** : 2367-2377.

Shepherd, M.G., Poulter, R.T. and Sullivan, P.A. (1985). *Candida albicans* : biology, genetics and pathogeneticity. *Annu. Rev. Microbiol.* **39** : 579-614.

Shepherd, M.G. (1991). In Prasad, R. (Ed), *Candida albicans : Cellular and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 5-19.

Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. and Soll D.R. (1987). « White-Opaque transition » : a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **169** : 189-197.

Sogaard, M., Tani, K., Ye, R.R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J. and Söllner, T. (1994). A Rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell* **78** : 937-948.

Soll, D.R., Herman, M.A. and Staebell, M.A. (1985). The involvement of cell wall expansion in the two modes of mycelium formation of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **131** : 2367-2375.

Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362** : 318-324.

Solomo, F. (1991). Analyses of the cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7** : 633-662.

Staebell, M. and Soll, D.R. (1985). Temporal and spatial differences in cell wall expansion during bud and mycelium formation in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **131** : 1467-1480.

TerBush, D.R. and Novick, P. (1995). Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **130** : 299-312.

TerBush, D.R., Maurice, T., Roth, D., and Novick, P. (1996). The exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15** : 6483-6494.

Thompson, R.C. (1988). EFTu provides an internal kinetic standard for translational accuracy. *Trends Biochem. Sci.* **13** : 91-93.

Titus, M.A. (1993). From fat yeast and nervous mice to brain myosin-V. *Cell* **75** : 9-11.

Tkacz, J.S. and Lampen, J.O. (1972). Wall replication in *Saccharomyces* species : Use of fluorescein-conjugated concanavalin A to reveal the site of mannan insertion. *J. Gen. Microbiol.* **72** : 243-247.

Trimble, W.S., Cowan, D.M. and Scheller, R.H. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** : 4538-4542.

Tuite, M.F. (1992). Antifungal drug development : the identification of new targets. *Trends Biotechnol.* **7** : 235-239.

Vanden Bossche, H., Marichal, P. and Odds, F.C. (1994). Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.* **2** : 393-400.

von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184** : 99-105.

von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J. Membr. Biol.* **115** : 195-201.

Walch-Solimena, C., Collins R.N. and Novick P.J. (1997). Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J. Cell Biol.* **137** : 1495-1509.

Walter, P. and Blobel, G. (1980). Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77** : 7112-7116.

Walter, P. and Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is release by microsomal membranes. *J. Cell Biol.* **91** : 557-561.

Walworth, N.C., Goud, B., Kabcenell, A.K. and Novick, P.J. (1989). Mutational analysis of *SEC4* suggest a cyclical mechanism for the regulation of vesicular traffic. *EMBO J.* **8** : 1685-1693.

Walworth, N.C., Brennwald, P., Kabcenell, A.K., Garrett, M. and Novick, P. (1992). Hydrolysis of GTP by Sec4 protein plays an important role in vesicular transport and is stimulated by a GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12** : 2017-2028.

Waters, M. and Blobel, G. (1986). Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur post-translationally and requires ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* **102** : 1543-1550.

Waters, M.G., Serafini, T. and Rothman, J.E. (1991). « Coatamer »: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349** : 248-251.

Whiteheart, S.W., Rossmagel, K., Buhrow, S.A., Brunner, M., Jaenicke, R. and Rothman, J.E. (1994). N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: A trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J. Cell Biol.* **126** : 945-954.

Whiteheart, S.W., Griff, I.C., Brunner, M., Clary, D.O., Mayer, T., Buhrow, S.A. and Rothman, J.E. (1993). SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. *Nature* **362** : 353-355.

Wilson, D.W., Whiteheart, S.W., Wiedman, M., Brunner, M. and Rothman, J.E. (1992). A multisubunit particle implicated in membrane fusion. *J. Cell Biol.* **117** : 531-538.

Wilson, D.W., Wilcox, C.A., Flynn, G.C., Chen, E., Kuang, W.-J., Henzel, W.J., Block, M.R., Ulrich, A. and Rothman, J.E. (1989). A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature* **339** : 355-359.

Ziman, M., O'Brien, M., Ouellette, L.A., Church, W.R. and Johnson, D.I. (1991). Mutational analysis of *CDC42Sc*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol. Cell. Biol.* **11** : 3537-3544.

Ziman, M. and Johnson, D.I. (1994). Genetic evidence for a functional interaction between *Saccharomyces cerevisiae* *CDC24* and *CDC42*. *Yeast* **10** : 463-474.