

Université de Montréal

**Identification des réseaux transcriptionnels de résistance  
aux antifongiques chez *Candida albicans***

par

Sadri Znaidi

Institut de recherche en immunologie et oncologie

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor*  
en biologie moléculaire

Octobre, 2009

© Sadri Znaidi, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Identification des réseaux transcriptionnels de résistance aux antifongiques  
chez *Candida albicans*

présentée par :

Sadri Znaidi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Claude Labbé, président-rapporteur

Dr. Martine Raymond, directeur de recherche

Dr. Muriel Aubry, membre du jury

Dr. Frédéric Devaux, examinateur externe

Dr. Dindial Ramotar, représentant du doyen de la faculté de médecine

## Résumé

Plusieurs souches cliniques de *Candida albicans* résistantes aux médicaments antifongiques azolés surexpriment des gènes encodant des effecteurs de la résistance appartenant à deux classes fonctionnelles : i) des transporteurs expulsant les azoles, *CDR1*, *CDR2* et *MDR1* et ii) la cible des azoles 14 $\alpha$ -lanostérol déméthylase encodée par *ERG11*. La surexpression de ces gènes est due à la sélection de mutations activatrices dans des facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille *zinc cluster* (Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>) qui contrôlent leur expression : Tac1p (Transcriptional activator of CDR genes 1) contrôlant l'expression de *CDR1* et *CDR2*, Mrr1p (Multidrug resistance regulator 1), régulant celle de *MDR1* et Upc2p (Uptake control 2), contrôlant celle d'*ERG11*. Un autre effecteur de la résistance clinique aux azoles est *PDR16*, encodant une transférase de phospholipides, dont la surexpression accompagne souvent celle de *CDR1* et *CDR2*, suggérant que les trois gènes appartiennent au même régulon, potentiellement celui de Tac1p. De plus, la régulation transcriptionnelle du gène *MDR1* ne dépend pas seulement de Mrr1p, mais aussi du facteur de transcription de la famille *basic-leucine zipper* Cap1p (Candida activator protein 1), un régulateur majeur de la réponse au stress oxydatif chez *C. albicans* qui, lorsque muté, induit une surexpression constitutive de *MDR1* conférant la résistance aux azoles. Ces observations suggèrent qu'un réseau de régulation transcriptionnelle complexe contrôle le processus de résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans*. L'objectif de mon projet au doctorat était d'identifier les cibles transcriptionnelles directes des facteurs de transcription Tac1p, Upc2p et Cap1p, en me servant d'approches génétiques et de génomique fonctionnelle, afin de i) caractériser leur réseau transcriptionnel et les modules transcriptionnels qui sont sous leur contrôle direct, et ii) d'inférer leurs fonctions biologiques et ainsi mieux comprendre leur rôle dans la résistance aux azoles. Dans un premier volet, j'ai démontré, par des expériences de génétique, que Tac1p contrôle non seulement la surexpression de *CDR1* et *CDR2* mais aussi celle de *PDR16*. Mes résultats ont identifié une nouvelle mutation activatrice de Tac1p (N972D) et ont révélé la participation

d'un autre régulateur dans le contrôle transcriptionnel de *CDR1* et *PDR16* dont l'identité est encore inconnue. Une combinaison d'expériences de transcriptomique et d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à l'hybridation sur des biopuces à ADN (ChIP-chip) m'a permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression est contrôlée *in vivo* et directement par Tac1p (*PDR16*, *CDR1*, *CDR2*, *ERG2*, autres), Upc2p (*ERG11*, *ERG2*, *MDR1*, *CDR1*, autres) et Cap1p (*MDR1*, *GCY1*, *GLR1*, autres). Ces expériences ont révélé qu'Upc2p ne contrôle pas seulement l'expression d'*ERG11*, mais aussi celle de *MDR1* et *CDR1*. Plusieurs nouvelles propriétés fonctionnelles de ces régulateurs ont été caractérisées, notamment la liaison *in vivo* de Tac1p aux promoteurs de ses cibles de façon constitutive et indépendamment de son état d'activation, et la liaison de Cap1p non seulement à la région du promoteur de ses cibles, mais aussi celle couvrant le cadre de lecture ouvert et le terminateur transcriptionnel putatif, suggérant une interaction physique avec la machinerie de la transcription. La caractérisation du réseau transcriptionnel a révélé une interaction fonctionnelle entre ces différents facteurs, notamment Cap1p et Mrr1p, et a permis d'inférer des fonctions biologiques potentielles pour Tac1p (trafic et la mobilisation des lipides, réponse au stress oxydatif et osmotique) et confirmer ou proposer d'autres fonctions pour Upc2p (métabolisme des stérols) et Cap1p (réponse au stress oxydatif, métabolisme des sources d'azote, transport des phospholipides). Mes études suggèrent que la résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans* est intimement liée au métabolisme des lipides membranaires et à la réponse au stress oxydatif.

**Mots-clés** : *Candida albicans*, antifongiques azolés, résistance aux médicaments, génomique fonctionnelle, réseau transcriptionnel.

## Abstract

Many azole resistant *Candida albicans* clinical isolates overexpress genes encoding azole resistance effectors that belong to two functional categories: i) *CDR1*, *CDR2* and *MDR1*, encoding azole-efflux transporters and ii) *ERG11*, encoding the target of azoles 14 $\alpha$ -lanosterol demethylase. The constitutive overexpression of these genes is due to activating mutations in transcription factors of the zinc cluster family ( $Zn_2Cys_6$ ) which control their expression. Tac1p (Transcriptional activator of CDR genes 1), controlling the expression of *CDR1* and *CDR2*, Mrr1p (Multidrug resistance regulator 1), regulating *MDR1* expression and Upc2p (Uptake control 2), controlling the expression of *ERG11*. Another determinant of clinical azole resistance is *PDR16*, encoding a phospholipid transferase, whose overexpression often accompanies that of *CDR1* and *CDR2* in clinical isolates, suggesting that the three genes belong to the same regulon, potentially that of Tac1p. Further, *MDR1* expression is not only regulated by Mrr1p, but also by the basic-leucine zipper transcription factor Cap1p (Candida activator protein 1), which controls the oxidative stress response in *C. albicans* and whose mutation confers azole resistance via *MDR1* overexpression. These observations suggest that a complex transcriptional regulatory network controls azole resistance in *C. albicans*. My Ph.D. studies are aimed at identifying the direct transcriptional targets of Tac1p, Upc2p and Cap1p using genetics and functional genomics approaches in order to i) characterize their regulatory network and the transcriptional modules under their direct control and ii) infer their biological functions and better understand their roles in azole resistance. In the first part of my studies, I showed that Tac1p does not only control the expression of *CDR1* and *CDR2*, but also that of *PDR16*. My results also identified a new activating mutation in Tac1p (N972D) and revealed that the expression of *CDR1* and *PDR16* is under the control of another yet unknown regulator. The combination of transcriptomics and genome-wide location (ChIP-chip) approaches allowed me to identify the *in vivo* direct targets of Tac1p (*PDR16*, *CDR1*, *CDR2*, *ERG2*, others), Upc2p (*ERG11*, *ERG2*, *MDR1*, *CDR1*, others) and Cap1p (*MDR1*, *GCY1*, *GLR1*,

others). These results also revealed that Upc2p does not only control the expression of *ERG11* but also that of *MDR1* and *CDR1*. Many new functional features of these transcription factors were found, including the constitutive binding of Tac1p to its targets under both activating and non-activating conditions, and the binding of Cap1p which extends beyond the promoter region of its target genes, to cover the open reading frame and the putative transcription termination regions, suggesting a physical interaction with the transcriptional machinery. The characterization of the transcriptional regulatory network revealed a functional interaction between these factors, notably between Cap1p and Mrr1p, and inferred potential biological functions for Tac1p (lipid mobilization and traffic, response to oxidative and osmotic stress) and confirmed or suggested other functions for Upc2p (sterol metabolism) and Cap1p (oxidative stress response, regulation of nitrogen utilization and phospholipids transport). Taken together, my results suggest that azole resistance in *C. albicans* is tightly linked to membrane lipid metabolism and oxidative stress response.

**Keywords** : *Candida albicans*, antifungal agents, drug resistance, functional genomics, transcriptional regulatory networks.

## Table des matières

I.	<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	1
I.1.	<i>Candida albicans</i> : Généralités .....	1
I.1.1.	Identification de <i>Candida albicans</i> et systématique .....	1
I.1.2.	Particularités cytologiques de <i>C. albicans</i> .....	4
I.1.3.	Génétique de <i>Candida albicans</i> .....	7
I.2.	Les infections à <i>Candida</i> ou candidoses .....	13
I.2.1.	Les infections superficielles ou cutanéomuqueuses à <i>Candida</i> .....	15
I.2.2.	Les infections systémiques ou candidémies .....	17
I.3.	Les agents antifongiques et le traitement des candidoses .....	20
I.3.1.	Les azoles .....	22
I.3.2.	Les allylamines .....	26
I.3.3.	Les polyènes .....	27
I.3.4.	Les échinocandines .....	28
I.3.5.	Autres antifongiques .....	30
I.4.	La résistance clinique aux antifongiques : les mécanismes moléculaires .....	31
I.4.1.	La résistance aux azoles .....	34
I.4.2.	La résistance aux échinocandines .....	47
I.4.3.	La résistance aux polyènes .....	49
I.4.4.	La résistance à la 5-Fluorocytosine .....	50
I.5.	Contrôle transcriptionnel des gènes effecteurs de la résistance aux azoles .....	51
I.5.1.	Les facteurs de transcription à doigts de zinc du type <i>zinc cluster</i> : Structure et fonctions chez <i>Candida albicans</i> .....	51
I.5.2.	Régulation de l'expression du gène <i>MDR1</i> par le facteur de transcription bZIP Cap1p .....	52
I.6.	Le génome de <i>Candida albicans</i> .....	56
I.6.1.	Caractérisation du génome de <i>C. albicans</i> .....	57

I.6.2.	La génomique fonctionnelle chez <i>C. albicans</i> : technologies et applications	
		59
I.7.	Hypothèse de recherche et objectifs	68
II.	<b>Chapitre 2: The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates <i>PDR16</i> expression in <i>Candida albicans</i></b>	70
II.1.	Summary	72
II.2.	Introduction	73
II.3.	Results	76
II.4.	Discussion	89
II.5.	Experimental procedures	95
II.6.	Acknowledgments	101
II.7.	References	102
III.	<b>Chapitre 3: Genome-wide expression and location analyses of the <i>Candida albicans</i> Tac1p regulon</b>	106
III.1.	Abstract	108
III.2.	Introduction	109
III.3.	Materials and Methods	111
III.4.	Results	122
III.5.	Discussion	136
III.6.	Acknowledgments	145
III.7.	References	146
IV.	<b>Chapitre 4 : Genome-wide location analysis of <i>Candida albicans</i> Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance</b>	153
IV.1.	Abstract	155
IV.2.	Introduction	156
IV.3.	Materials and Methods	159
IV.4.	Results	166
IV.5.	Discussion	179



IV.6.	Acknowledgments.....	184
IV.7.	References.....	185
V.	<b>Chapitre 5: Identification of the <i>Candida albicans</i> Cap1p regulon</b> .....	191
V.1.	Abstract .....	193
V.2.	Introduction.....	194
V.3.	Materials and Methods.....	197
V.4.	Results.....	208
V.5.	Discussion.....	223
V.6.	Acknowledgments.....	229
V.7.	References.....	230
VI.	<b>Chapitre 6: Zinc cluster proteins in <i>Candida albicans</i>: from glucose metabolism to drug resistance</b> .....	238
VI.1.	Summary .....	240
VI.2.	Introduction.....	241
VI.3.	Structural features of zinc cluster proteins and their mechanism of activation 244	
VI.4.	The repertoire of zinc cluster proteins in <i>Candida albicans</i> .....	246
VI.5.	The functions of zinc cluster transcription factors in <i>Candida albicans</i> .....	250
VI.6.	Conclusion .....	264
VI.7.	Future perspectives.....	264
VI.8.	Acknowledgments.....	266
VI.9.	Financial & competing interests disclosure .....	266
VI.10.	References.....	267
VII.	<b>Discussion et perspectives</b> .....	280
VII.1.	Régulation de la résistance aux antifongiques azolés par le facteur de transcription Tac1p .....	280
VII.1.1.	Contrôle de l'expression du gène <i>PDR16</i> par Tac1p et implication d'un second facteur dans la régulation transcriptionnelle de <i>CDR1</i> et <i>PDR16</i> .....	280

VII.1.2.	Mécanismes d'activation de Tac1p.....	282
VII.1.3.	Tac1p est une protéine résidente des promoteurs de ses gènes cibles ...	288
VII.1.4.	Tac1p subit une modification post-traductionnelle lorsqu'il est activé .	289
VII.1.5.	Fonctions biologiques de Tac1p chez <i>C. albicans</i> .....	292
VII.2.	Régulation de la résistance aux antifongiques azolés par le facteur de transcription Upc2p.....	297
VII.2.1.	Upc2p régule l'expression de deux autres déterminants de la résistance clinique aux azoles, en plus d' <i>ERG11</i> .....	297
VII.2.2.	Mécanismes potentiels d'activation d'Upc2p .....	298
VII.3.	Contrôle transcriptionnel par Cap1p chez <i>C. albicans</i> .....	301
VII.3.1.	Yap1p et Cap1p : similarités et différences fonctionnelles.....	301
VII.3.2.	La liaison de Cap1p aux régions « déserts de gènes » aurait une signification biologique.....	304
VII.4.	Le réseau transcriptionnel de résistance aux azoles chez <i>C. albicans</i> .....	308
VII.4.1.	La technologie du ChIP-chip : Du design expérimental à l'identification des réseaux transcriptionnels.....	308
VII.4.2.	Le réseau transcriptionnel de résistance aux azoles chez <i>C. albicans</i> : constituants et inférences .....	313
VII.5.	Les facteurs de transcription <i>zinc cluster</i> comme cible pour la production d'une nouvelle classe d'antifongiques .....	322

## Liste des tableaux de la section Introduction (chapitre 1)

<b>Tableau I-1.</b> Distribution (%) des espèces <i>Candida</i> isolées des patients avec candidémie.....	14
<b>Tableau I-2.</b> Profils de susceptibilité typiques d'espèces <i>Candida</i> à différents antifongiques (MIC <sub>90%</sub> en µg/ml).....	33
<b>Tableau I-3.</b> Comparaison de l'approche transcriptomique et l'approche ChIP-chip.....	65

## Liste des figures des sections Introduction et Discussion

<b>Figure I-1.</b> Les premières illustrations de <i>Candida</i> ( <i>Oidium</i> ) <i>albicans</i> publiées par Charles Robin en 1853.....	2
<b>Figure I-2.</b> Phylogénie simplifiée de génomes fongiques.....	3
<b>Figure I-3.</b> Cytologie de <i>C. albicans</i> .....	6
<b>Figure I-4.</b> Reproduction sexuée chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>C. albicans</i> .....	10
<b>Figure I-5.</b> Mécanismes possibles de transmigration de <i>C. albicans</i> au niveau de l'endothélium vasculaire pour accéder à la circulation sanguine.....	20
<b>Figure I-6.</b> Développement des agents antifongiques de 1954 à 2005.....	21
<b>Figure I-7.</b> Mode d'action des antifongiques majeurs, azoles, allylamines, polyènes et échinocandines.....	26
<b>Figure I-8.</b> Mécanismes moléculaires de la résistance clinique aux azoles chez <i>Candida albicans</i> .....	36
<b>Figure I-9.</b> Représentation graphique des profils de résistance au Fluconazole d'une série d'isolats cliniques de <i>C. albicans</i> prélevés d'un patient séropositif au VIH avec des épisodes récurrents de candidose oropharyngée sous traitement au Fluconazole.....	46
<b>Figure I-10.</b> Les mutations conférant la résistance aux échinocandines chez les isolats cliniques de <i>C. albicans</i> sont localisées au niveau des régions « hot spots » HS1 et HS2 de Fks1p.....	48
<b>Figure I-11.</b> Mécanisme d'activation de Yap1p chez <i>S. cerevisiae</i> .....	54
<b>Figure I-12.</b> Schéma de la technologie des biopuces à ADN.....	60
<b>Figure I-13.</b> Principe de la technologie d'immunoprécipitation de la chromatine couplée aux biopuces à ADN (ChIP-chip).....	64
<b>Figure I-14.</b> Organisation d'un réseau de régulation transcriptionnelle.....	67
<b>Figure VII-1.</b> Localisation des mutations activatrices retrouvées dans différents régulateurs de la résistance clinique aux azoles de <i>C. albicans</i> et <i>C. glabrata</i> .....	285
<b>Figure VII-2.</b> Modèle d'activation de Tac1p.....	287
<b>Figure VII-3.</b> Caractérisation de souches de <i>C. albicans</i> exprimant des allèles <i>TAC1</i> .....	291

<b>Figure VII-4.</b> <i>TAC1</i> est un régulateur négatif de la réponse aux stress oxydatif et osmotique.....	293
<b>Figure VII-5.</b> Profil de liaison de Cap1p-HA <sub>3</sub> (WT) et Cap1p-CSE-HA <sub>3</sub> (CSE) à une région intergénique du Contig19.10119.....	305
<b>Figure VII-6.</b> Le petit ARN CaOxyS est exprimé de manière dépendante de <i>CAP1</i> .....	307
<b>Figure VII-7.</b> Réseau transcriptionnel de résistance aux antifongiques azolés chez <i>C. albicans</i> .....	314
<b>Figure VII-8.</b> Liaison de Mrr1p et Cap1p <i>in vivo</i> au génome de <i>C. albicans</i> autour du locus de <i>MDR1</i> .....	319

*À mes chers parents,*

*À Marwa Smaoui,*

*À mes grands-parents paternels,*

*À la mémoire de mes grands-parents maternels  
Slaheddine Djemaâ et la Princesse Traki Bey de Tunisie*

*"Nothing in biology makes sense, except in the light of Evolution"*

Theodosius Dobzhansky, 1973.

## Remerciements

Je ne cesserai de souligner le soutien de ma directrice de recherche, Dr. Martine Raymond. Ses conseils, sa disponibilité continue et ses talents de mentor ont été des éléments incontournables au succès de mes études. Avec elle, ces cinq années d'études doctorales ont été des plus enrichissantes et passionnantes. Travailler en sa compagnie était toujours un plaisir. Je lui serai toujours reconnaissant pour m'avoir inculqué le souci du détail, la rigueur du raisonnement scientifique et l'esprit critique.

Je remercie tous les membres de notre laboratoire pour leur disponibilité et pour avoir consacré du temps à mes nombreuses questions, en particulier Sandra Weber et Osman Zin-Al Abdin, ainsi que tous les membres de l'Institut de recherche en immunologie et oncologie qui ont de près ou de loin contribué au succès de mes études doctorales, notamment Dr. Marc Therrien, Dr. Sébastien Lemieux, Geneviève Boucher, Dr. Brian Wilhelm et Christian Charbonneau. Je remercie le Dr. François Robert, pour m'avoir permis d'effectuer mon stage d'apprentissage au sein de son équipe et pour ses nombreuses suggestions et conseils, ainsi que Dr. André Nantel pour son aide et suggestions dans l'analyse des données de génomique fonctionnelle. Mes remerciements à Simon Drouin, Louise Laramée, Adnane Sellam et Hugo Lavoie pour leur précieux temps et leur disponibilité lors de mes visites au laboratoire. Je n'oublie pas l'apport de mes professeurs des cours du programme de doctorat en biologie moléculaire, ainsi que Vivianne Jodoin, Pascale Lethézien et Suzanne Renaud, pour leur assistance administrative. Je remercie Drs. David Phillip Rogers, Katherine Barker et Joachim Morschhauser pour leur collaboration à mes projets de doctorat. Je suis reconnaissant du précieux soutien financier des fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) et des programmes de biologie moléculaire de la faculté de médecine de l'université de Montréal. Enfin, je remercie les Drs. Jean-Claude Labbé, Muriel Aubry, Dindial Ramotar et Frédéric Devaux, pour avoir accepté d'être membre du jury de ma thèse et pour les révisions et commentaires apportés au présent ouvrage.

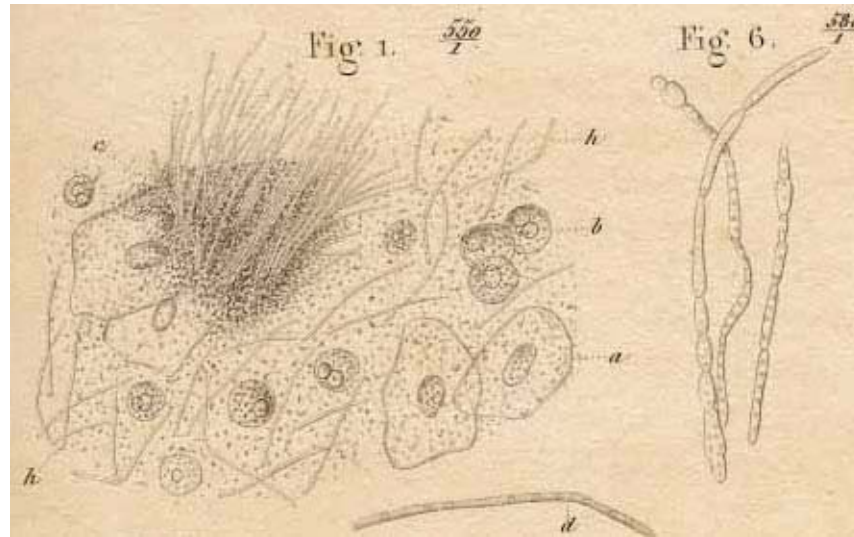
# I. Chapitre 1 : Introduction

## I.1. *Candida albicans* : Généralités

### I.1.1. Identification de *Candida albicans* et systématique

Entre 1839 et 1844, des expériences indépendantes émanant des laboratoires de Frederik Berg à Stockholm, David Gruby à Paris et John Bennett à Édinbourg ont permis d'isoler des « cryptogames », se référant aux plantes se reproduisant par des spores, comme la cause du muguet buccal (*thrush* en anglais). Le muguet est une infection de la bouche connue depuis le Vè siècle av. J.-C. et décrite par Hippocrate, se manifestant par une inflammation de la muqueuse accompagnée de lésions (Barnett, 2008). En 1841, Berg identifia des champignons filamenteux dont les filaments s'étendent entre les cellules de l'épithélium buccal. En 1853, Charles-Phillipe Robin nomma l'organisme *Oidium albicans* (*albicans* du latin *albus*, qui signifie blanc) et publia des figures de ces cellules (Figure I-1). La désignation *Oidium* s'avéra par la suite inappropriée, s'appliquant plutôt à des moisissures poudreuses attaquant les plantes appelées milidiou poudreux (en anglais *powdery mildew*), et pendant plusieurs années le nom *Monilia albicans* a pris la relève pour désigner l'organisme, alors que le qualificatif de moniliase désignait l'infection provoquée par *Monilia* (Ainsworth, 1955). Nous savons aujourd'hui que le muguet est une mycose de la bouche, c'est-à-dire une infection buccale causée par des champignons, et que *Monilia albicans* est la levure *Candida albicans*. L'appellation *Candida* a été décernée par Christine Marie Berkhout, une botaniste hollandaise qui a décrit le genre *Candida* dans sa thèse à l'université d'Utrecht en 1923 (Ainsworth, 1955; Barnett, 2008).

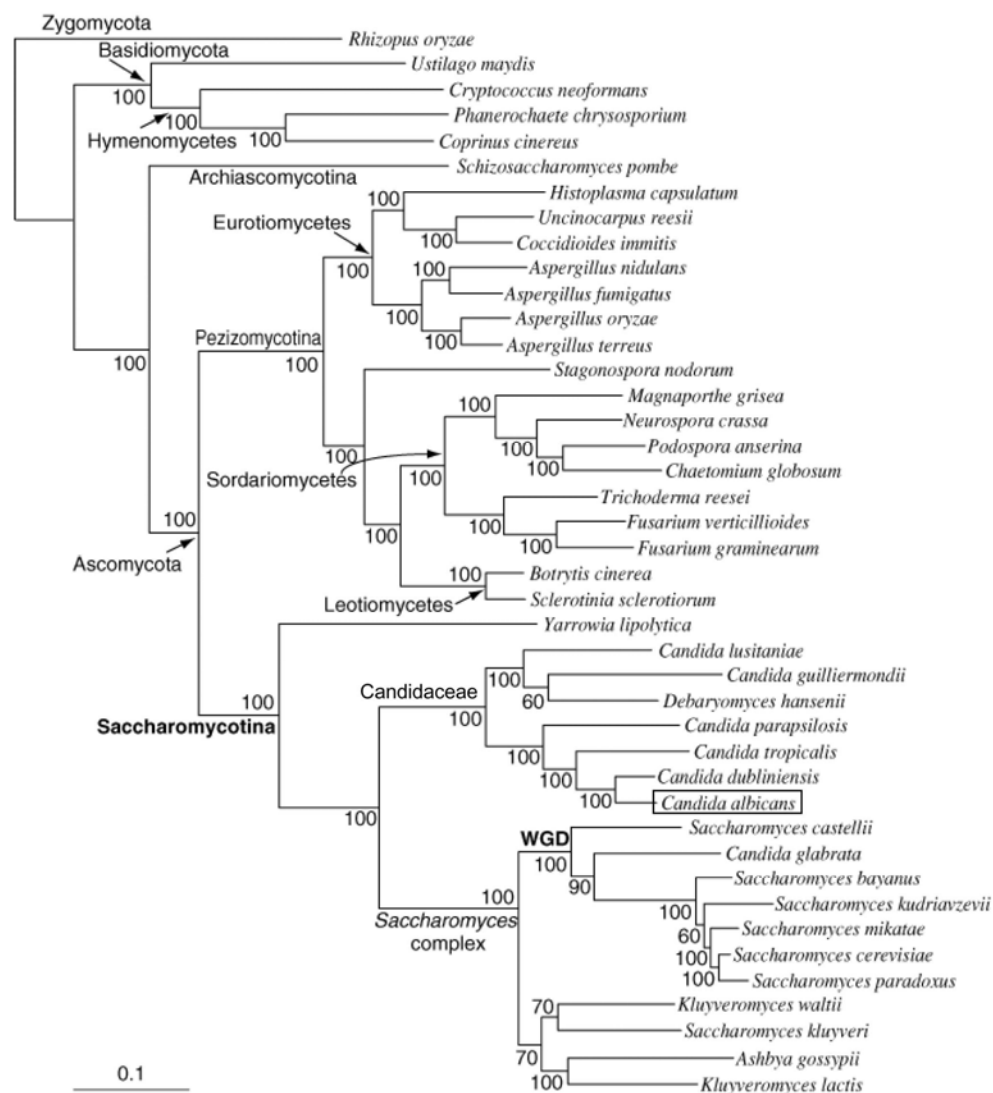




**Figure I-1.** Les premières illustrations de *Candida* (*Oidium*) *albicans* publiées par Charles Robin en 1853. Les cellules de l'épithélium buccal de formes polygonales (à gauche de la figure, Fig. 1.) mêlées de filaments d'« algues de la bouche » tels que décrits par Robin. Sur la droite de la figure est illustré le « champignon du muguet » (Fig. 6.), se référant aux formes filamenteuses de *C. albicans*. On peut distinguer, en haut du panneau, l'illustration d'une cellule bourgeonnante représentant la forme levure de *C. albicans*. Tiré et adapté de (Barnett, 2008).

*C. albicans* appartient au règne des Mycètes (en anglais *fungi*), au phylum des ascomycètes, à la classe des hémiascomycètes, à l'ordre des saccharomycètes, à la famille des *Candidaceae* et au genre *Candida* (Figure I-2). Les ascomycètes, le phylum le plus large des mycètes, est défini par la production de structures spécialisées appelées asques, qui enveloppent les spores formées durant la méiose. Il existe deux sous-phylums majeurs des ascomycètes : les euascomycètes (pezizomycotina), incluant les champignons hyphes (mycéliums) comme *Neurospora crassa*, et les saccharomycotina incluant l'ordre des hémiascomycètes, soit l'ordre des levures bourgeonnantes comme *Saccharomyces cerevisiae* (Figure I-2). Il faut noter que la classification classique en taxonomie était basée sur la morphologie, à une ère devant les progrès accomplis en biologie moléculaire et en génomique. De nos jours, la classification des espèces repose sur des outils performants

incluant le séquençage de génomes entiers ou les hybridations comparatives de génomes (voir section I.6.2.).



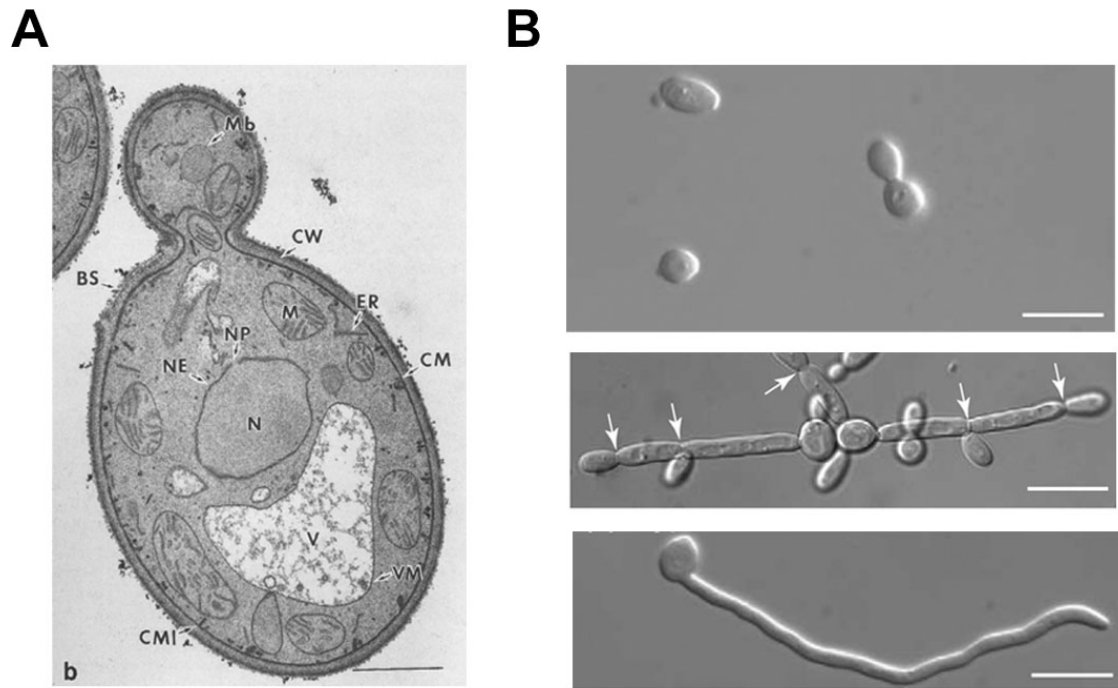
**Figure I-2.** Phylogénie simplifiée de génomes fongiques. L'arbre phylogénique est reconstruit en utilisant les séquences concaténées de 153 gènes conservés dans les 42 génomes représentés (Scannell et al., 2007). Le terme *Candida albicans* est encadré et le sous-phylum Saccharomycotina est indiqué en gras pour une localisation rapide sur la figure. Les pourcentages de l'analyse bootstrap sont indiqués au niveau des nœuds. WGD (en gras), Groupe d'espèces ayant subi la duplication du génome entier. Tiré et adapté de (Scannell et al., 2007).

*C. albicans* est donc une levure bourgeonnante très apparentée à *Saccharomyces cerevisiae*, les deux levures étant des saccharomycètes et capables de fermenter des sucres menant à la formation d'alcool et de dioxyde de carbone. La reproduction de ces deux espèces se fait par les voies asexuée et sexuée, mais contrairement à *S. cerevisiae*, la division méiotique n'a jamais été observée chez *C. albicans* (voir section I.1.3.). Une autre différence notable entre les deux espèces est que *S. cerevisiae* est un organisme haploïde alors que *C. albicans* est généralement diploïde mais avec de nombreuses variations de caryotypes, dont des aneuploïdies (voir section I.1.3.). Il existe autour de 150 espèces appartenant au genre *Candida*, mais uniquement 13 espèces sont capables de causer des infections chez l'homme (Calderone, 2002) (voir section I.2.).

### **I.1.2. Particularités cytologiques de *C. albicans***

La cytologie de la forme levure de *C. albicans* est typique de toute cellule eucaryote, et sur une coupe ultramince d'une cellule de *C. albicans* examinée au microscope électronique à transmission, on peut discerner les différentes organelles qui caractérisent la cellule eucaryote incluant un noyau dense, des mitochondries et une large vacuole (Figure I-3A). Comparativement à la forme levure plutôt sphérique de *S. cerevisiae*, *C. albicans* se présente sous une forme ovoïde (Figure I-3). À l'instar de *S. cerevisiae*, *C. albicans* peut servir de modèle pour étudier et expliquer des processus biologiques que l'on retrouve chez les eucaryotes supérieurs multicellulaires incluant l'organisme humain. La seule différence structurale majeure que l'on note entre *C. albicans* (et les levures en général) et les cellules eucaryotes animales est la paroi cellulaire (Figure I-3A). Cette structure, de largeur variant entre 150 et 300 nm, est l'une des cibles majeures des médicaments antifongiques (voir section I.3.). Il existe des particularités cytologiques propres à *C. albicans*, notamment morphologiques et phénotypiques qu'il est pertinent de détailler.

*C. albicans* est une levure polymorphe, c'est-à-dire capable d'adopter différentes morphologies dépendamment de signaux environnementaux et/ou génétiques (Sudbery *et al.*, 2004). Nous distinguons trois morphologies de *C. albicans* observées couramment au laboratoire ou *in vivo* chez l'hôte: la forme levure, les pseudo-hyphes et les vraies hyphes (Figure I-3B). La capacité de *C. albicans* de se convertir entre les formes levure, pseudo-hyphe et hyphe est souvent considérée comme un pré-requis à la virulence, en dépit du manque de preuves formelles. Initialement, une étude a montré que des mutants de *C. albicans* non filamenteux étaient avirulents (Lo *et al.*, 1997). Il s'en est suivi une démonstration qu'un mutant de *C. albicans* constitutivement sous la forme hyphe (ayant une délétion du gène *TUPI* encodant un corépresseur transcriptionnel général) était avirulent dans un modèle murin de candidose hématogène (Braun et Johnson, 1997; Braun *et al.*, 2000). La communauté scientifique accepte maintenant l'idée que c'est la capacité de *C. albicans* de subir la transition morphologique, plutôt que la forme morphologique en soi, qui est le principal déterminant de sa pathogénicité. Des essais au laboratoire nous montrent par ailleurs que les formes hyphes et pseudo-hyphes sont des formes capables de pénétrer un milieu de culture solide, comme l'agar. Un autre phénomène morphologique consiste en la conversion blanches-opaques des cellules (de l'anglais *white-opaque switching*). Il s'agit d'un phénomène épigénétique réversible lié au processus de la reproduction sexuée (*mating* en anglais) et sera détaillé à la section I.1.3. Il existe aussi la forme chlamydo-spore qui, comme son nom l'indique, est le résultat de sporulation induite lorsque les conditions de croissance de *C. albicans* deviennent sous-optimales. La germination se produit au niveau d'excroissance de formes filamenteuses branchées de *C. albicans* et les spores se présentent comme des cellules sphériques avec une paroi cellulaire très large (Whiteway et Bachewich, 2007).



**Figure I-3.** Cytologie de *C. albicans*. **A**, Ultrastructure en microscopie électronique à transmission d'une coupe ultramince d'une cellule de *C. albicans*. Mb, peroxyosome; CW, paroi cellulaire; BS, cicatrice de bourgeonnement; ER, réticulum endoplasmique; M, mitochondrie; NP, pore nucléaire; NE, enveloppe nucléaire; N, noyau; CM, membrane plasmique; VM, membrane vacuolaire; V, vacuole; CMI, invagination de la membrane plasmique. La barre représente 1 µm. Figure tirée et adaptée de (Osumi, 1998). **B**, Morphologies distinctes de *C. albicans* examinées au microscope. Panneau supérieur, forme levure bourgeonnante de *C. albicans*; panneau du milieu, forme pseudo-hyphe de *C. albicans* avec des constrictions au niveau des septums (indiquées par les flèches) et des branchements réguliers de cellules; panneau inférieur, forme hyphe vraie de *C. albicans* dépourvue de constrictions aux septa et de branchements de cellules. Les barres représentent 10 µm. Panneaux tirés et adaptés de (Sudbery *et al.*, 2004).

La forme levure de *C. albicans* est généralement maintenue lors de la croissance à une température inférieure à 30°C et à pH acide (autour de 4), ou bien à une densité cellulaire excédant  $10^7$  cellules par millilitre. La forme pseudo-hyphe est maintenue en augmentant modérément le pH (maintenu à 6) ou en stabilisant la température à 35°C.

Quant à la forme hyphe vraie, elle s'induit en ajoutant du sérum dans le milieu de croissance ou en augmentant la température à 37°C. La conversion levure-hyphe est aussi activée en présence de certains nutriments comme le N-acétylglucosamine (Sudbery *et al.*, 2004). Il est important de distinguer ces trois morphologies lorsque l'on s'intéresse aux phénomènes morphologiques chez *C. albicans*. Contrairement aux vraies hyphes, qui se développent à partir d'une cellule non bourgeonnée (ou blastospore) sans constriction visible (Figure I-3A, panneau inférieur), les pseudo-hyphes sont caractérisées par l'enchaînement de cellules allongées juxtaposées avec des strictions aux septa séparant chaque cellule fille (Figure I-3A, panneau du milieu). Les pseudo-hyphes se forment suite à l'allongement de bourgeons filles et s'en suit la formation de septa qui maintiennent les cellules filles attachées à la cellule mère, formant des branchements réguliers (Sudbery *et al.*, 2004). Il faut retenir que la morphologie de *C. albicans* est extrêmement plastique et très sensible aux différents régimes de culture cellulaire. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la morphogénèse de *C. albicans* sont bien détaillés dans une revue récente par Whiteway et Bachewich (Whiteway et Bachewich, 2007).

### **I.1.3. Génétique de *Candida albicans***

Il va sans dire que les progrès accomplis en génétique de la levure, considérés comme une véritable révolution, sont le fruit d'expérimentations effectuées chez *S. cerevisiae*. En effet, le génome haploïde de *S. cerevisiae* ainsi que la caractérisation de la reproduction sexuée et du cycle méiotique chez cette levure constituent des fondements de sa génétique flexible. On comprend donc qu'un organisme comme *C. albicans*, présumé diploïde obligatoire et dépourvu d'un cycle sexuel classique complet, voit sa manipulation génétique beaucoup plus laborieuse. De plus, les variations de caryotypes et les aneuploïdies, très fréquentes chez *C. albicans*, contribuent à la complexité de sa génétique. Par contre, des avancées récentes dans les techniques de génétique moléculaire de cet organisme, couplées au séquençage complet de son génome et son annotation, ont révolutionné la recherche sur cette levure (Berman et Sudbery, 2002; Braun *et al.*,

2005; Jones *et al.*, 2004). De plus, les données du projet du séquençage du génome de *C. albicans* combinées à des approches de clonage sophistiquées ont révélé l'existence de loci ressemblant à ceux des cassettes génétiques de la reproduction sexuée *MAT* chez *S. cerevisiae*, appelés *MTL* (en anglais *mating-type-like*) (Hull et Johnson, 1999). Ces loci, comme chez *S. cerevisiae*, déterminent la compétence pour la reproduction sexuée chez *C. albicans*.

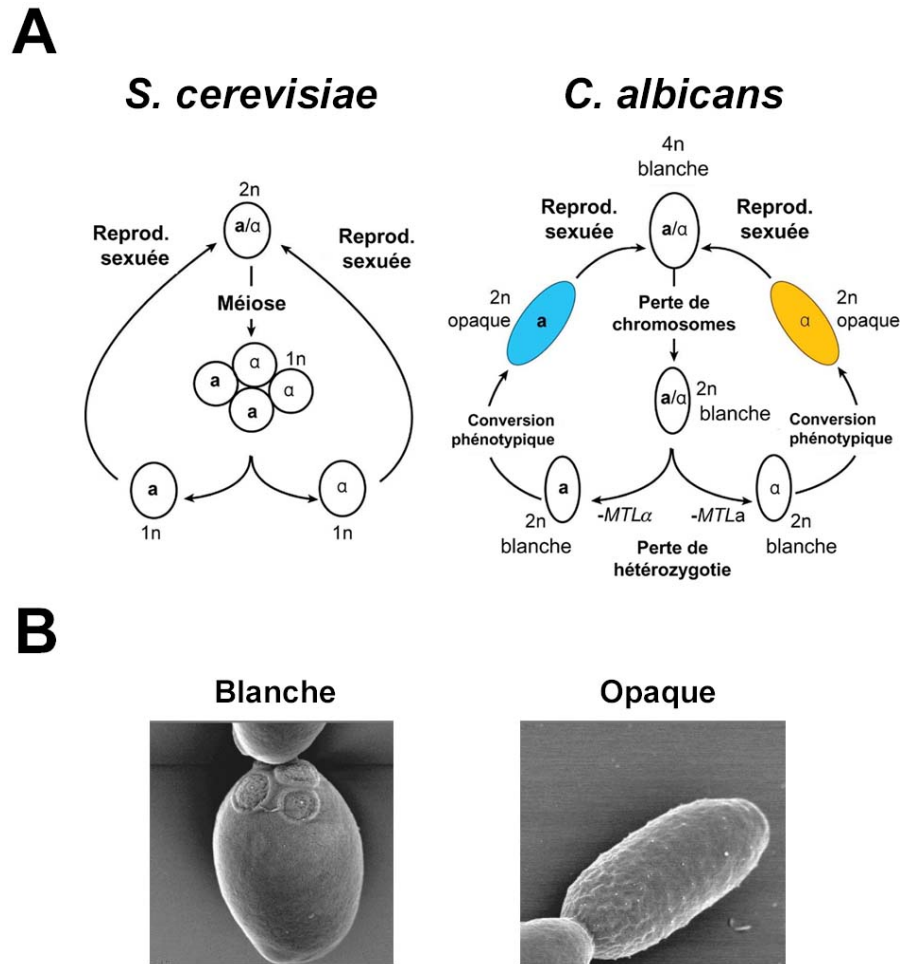
La reproduction sexuée et la méiose ont été très bien caractérisées chez les levures modèles *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* (Davis et Smith, 2001; Souza *et al.*, 2003). Chez *S. cerevisiae*, la reproduction sexuée est observée entre des cellules haploïdes du type *MAT<sub>a</sub>* et *MAT<sub>α</sub>* pour générer une cellule fille diploïde stable *a/α* qui se réplique par mitose jusqu'à ce que la méiose soit induite suite à une carence en sources d'azote ou la présence de sources de carbone non fermentables (Figure I-4A, panneau gauche). Chez *S. pombe*, la reproduction sexuée se produit aussi entre cellules haploïdes, mais l'état diploïde est souvent transitoire et subit rapidement la méiose pour générer la forme haploïde. Que ce soit chez *S. cerevisiae* ou *S. pombe*, le processus de la méiose génère quatre spores haploïdes enveloppées dans un asque. On se rend ainsi compte de l'utilité des produits de la méiose chez ces deux organismes en génétique classique, puisque les spores représentent des produits de recombinaison génétique et peuvent être exploitées pour générer des mutants recombinés de façon aisée.

La reproduction sexuée chez *C. albicans* est initiée suite à un changement phénotypique caractéristique appelé conversion blanche-opaque, un phénomène réversible et héréditaire, qui se produit chez une souche homozygote pour le *MTL* (i.e. *MTL<sub>a/a</sub>* ou *MTL<sub>α/α</sub>*). Morphologiquement, les cellules opaques sont allongées, avec une paroi cellulaire rugueuse alors que les cellules blanches présentent les caractéristiques classiques de la forme levure ovoïde avec une paroi lisse (Figure I-4B). Seules les cellules opaques sont compétentes pour subir la reproduction sexuée, qui s'opère entre une souche *MTL<sub>a/a</sub>* et une souche *MTL<sub>α/α</sub>* pour générer une cellule fille tétraploïde hétérozygote *MTL<sub>a/α</sub>*. Ce

processus a été observé au laboratoire ainsi que chez l'hôte *in vivo* (Hull *et al.*, 2000;Lachke *et al.*, 2003;Lockhart *et al.*, 2003). Mais à la différence de *S. cerevisiae* et *S. pombe*, la division réductionnelle méiotique n'a jamais été observée chez *C. albicans*. Pour terminer ce cycle sexuel, les cellules tétraploïdes de *C. albicans* semblent procéder par un mécanisme parasexuel, impliquant la perte concertée et aléatoire de chromosomes homologues (Forche *et al.*, 2008) (Figure I-4A, panneau droit). Le locus *MTL* ségrège lui aussi de façon aléatoire, de telle sorte que plusieurs cellules filles sont *MTLa/a* ou *MTL $\alpha$ / $\alpha$*  et donc compétentes pour la reproduction sexuée. On a aussi observé que plusieurs progénitures de la reproduction sexuée chez *C. albicans* sont aneuploïdes, avec particulièrement des trisomies d'un ou de plusieurs chromosomes (Forche *et al.*, 2008).

Une autre caractéristique dont il faut tenir compte en génétique de la levure *C. albicans* et en la manipulant au laboratoire est l'instabilité de son génome. Cette plasticité génomique est reflétée par le mécanisme parasexuel décrit plus haut, impliquant la perte d'hétérozygotie aux loci *MTL* et la perte concertée de chromosomes pour convertir la progéniture tétraploïde en diploïde. Plusieurs cas d'aneuploidies et d'altérations des chromosomes ont été observés chez *C. albicans* (Ahmad *et al.*, 2008;Chibana *et al.*, 2000;Rustchenko, 2007;Selmecki *et al.*, 2005;Selmecki *et al.*, 2006). Par exemple dans des souches cliniques résistantes aux médicaments antifongiques, des altérations des chromosomes incluant la formation d'isochromosomes (i.e. des chromosomes constitués de la duplication d'un bras long ou de celle d'un bras court) et des aneuploidies sont fréquentes (voir section I.4.1.) (Selmecki *et al.*, 2006). Certains milieux de culture induisent des aneuploidies chez *C. albicans*, comme par exemple la croissance sur du milieu contenant du sorbose comme seule source de carbone qui induit la perte d'un homologue du chromosome 5 (Janbon *et al.*, 1998). Ce dernier contient le locus d'un gène codant pour un régulateur négatif (*SOUI*) de l'utilisation du sorbose (Janbon *et al.*, 1998).





**Figure I-4.** Reproduction sexuée chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*. **A**, Panneau gauche : Cycle sexuel chez *S. cerevisiae*. Les cellules haploïdes (1n) possèdent l'un ou l'autre des loci *MATa* (**a**) ou *MATα* (**α**). La reproduction sexuée (Reprod. sexuée) entre les cellules **a** et **α** résulte en une cellule diploïde (2n). Les cellules diploïdes subissent la méiose suivie de la sporulation pour régénérer des cellules haploïdes. Panneau droit : Cycle parasexuel chez *C. albicans*. Les cellules diploïdes (2n) sont typiquement hétérozygotes au locus *MTL*. Par un mécanisme de perte d'hétérozygotie au chromosome 5, sur lequel se trouve le locus *MTL*, des souches homozygotes pour *MTLa* ou *MTLα* sont générées et subissent un changement de morphologie de la forme blanche (**B**, panneau gauche) à opaque (**B**, panneau droit). Les cellules opaques diploïdes **a** et **α** subissent la reproduction sexuée pour générer des cellules tétraploïdes *a/a/α/α* qui perdent de façon concertée des chromosomes pour revenir à l'état diploïde. Figures tirées et adaptées des références (Bennett et Johnson, 2005; Noble et Johnson, 2007).

Ces exemples illustrent la faculté d'adaptation de *C. albicans* lorsqu'elle est soumise à un stress nutritionnel ou environnemental quelconque. Une autre illustration est reflétée par la perte d'une copie du chromosome 1 lorsque les cellules de *C. albicans* sont incubées dans du milieu contenant de l'acide 5-fluoroorotique (5-FOA), un composé permettant la sélection des souches de laboratoire ayant perdu la fonctionnalité du gène *URA3* (voir plus bas) (Chen *et al.*, 2004b). Une étude très récente a aussi montré que les aneuploidies sont induites notamment lors la transformation des souches de laboratoire par les techniques de choc thermique sous acétate de lithium ou par l'électroporation (Bouchonville *et al.*, 2009). C'est ainsi que la manipulation génétique de *C. albicans*, comme la construction de mutants, doit tenir compte de ces aspects plus complexes comparativement, par exemple, à la manipulation de la levure modèle *S. cerevisiae*.

La possibilité de créer des mutants perte-de-fonction du type « *knock-out* » a été une énorme avancée en génétique de *C. albicans*. De cette façon, les chercheurs étaient capables d'évaluer et d'apprécier la contribution d'un gène aux divers phénotypes de *C. albicans*, incluant par exemple la pathogénèse ou la résistance aux médicaments antifongiques. Fonzi & Irwin se sont basés sur une technique de délétion de gène très utilisée chez *S. cerevisiae* pour créer un outil similaire chez *C. albicans* (Fonzi et Irwin, 1993). La méthode, appelée « *URA-blaster* », utilise la recombinaison homologue pour remplacer une copie du gène au chromosome par un fragment linéaire d'ADN exogène dont les bouts sont homologues à l'ADN flanquant le gène cible. Pour cela, une souche auxotrophe pour l'uridine (souche *uraΔ/uraΔ*) a été créée et le gène *URA3* conférant la prototrophie à l'uridine est ainsi utilisé comme marqueur de sélection des transformants ayant intégré la cassette de délétion. De plus, puisque le gène *URA3* (encodant l'enzyme de biosynthèse de l'uracile orotidine-5'-phosphate décarboxylase) peut être contre-sélectionné sur un milieu contenant du 5-FOA, il est possible de « recycler » le marqueur dans le but de remplacer le deuxième allèle du gène cible. Cette stratégie de délétion de gènes a été

rapidement adoptée par la communauté scientifique. Certains groupes ont créé des variantes de la technique « *URA*-blaster » en substituant les étapes fastidieuses de clonage de la cassette de délétion par une simple réaction de polymérisation en chaîne du type PCR (de Hoogt *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000). En dépit de l'utilité de cette stratégie, de nouvelles approches de délétion de gène chez *C. albicans* ont très vite été mises au point, en raison d'un biais d'interprétation de résultats phénotypiques issu de la découverte que le dosage du gène *URA3* affectait plusieurs phénotypes incluant la virulence dans des modèles de souris ou la morphogénèse (Brand *et al.*, 2004). De plus, le 5-FOA utilisé pour recycler le marqueur *URA3* s'avérait être un puissant mutagène et aneuploidogène qui génère des altérations au niveau des chromosomes (Wellington et Rustchenko, 2005). Les marqueurs de sélection dominants, comme les gènes de résistance à l'acide mycophénolique (allèle muté *IMH3*) ou à la nouséothricine (gène bactérien optimisé pour *C. albicans*, *SAT1*), ont donc été utilisés alternativement à la méthode « *URA*-blaster » (Reuss *et al.*, 2004; Wirsching *et al.*, 2000b). Le marqueur *SAT1*, en particulier, est très utilisé puisqu'il permet d'obtenir des transformants après seulement un jour d'incubation sur un milieu supplémenté de nouséothricine. Ces techniques ont de plus l'avantage d'utiliser le système de recyclage du marqueur par l'action d'une FLP-recombinase dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur inductible, comme par exemple le promoteur *MAL2* activé en présence de maltose (Reuss *et al.*, 2004; Wirsching *et al.*, 2000b). Une fois exprimée, la FLP-recombinase catalyse la recombinaison de deux séquences de reconnaissance (FRT) flanquant le marqueur de sélection dominant qui est ainsi excisé et peut donc être réutilisé pour remplacer le second allèle du gène cible. D'autres marqueurs d'auxotrophie comme *HIS1*, *LEU2* et *ARG4* sont utilisés par la communauté scientifique, puisqu'à la différence d'*URA3*, ces marqueurs ne semblent pas affecter les phénotypes comme la virulence par exemple. Des cribles génétiques sont maintenant possibles dans *C. albicans*, en exploitant la collection de mutants de *C. albicans* générés par mutagenèse par insertion de transposons combinée aux marqueurs d'auxotrophie *URA3* et *ARG4* (Nobile et Mitchell, 2009).

Dans toutes ces approches, il est essentiel de savoir si une mutation introduite dans un gène cible est responsable du phénotype observé chez le mutant. Comme décrit plus haut, on peut comprendre que la remarquable plasticité du génome de *C. albicans* combinée à l'influence de certains marqueurs de sélection sur le phénotype peut faire que des altérations génétiques autres que celle voulue conduisent à une interprétation erronée du phénotype observé. C'est ainsi que la complémentation de l'effet de la mutation par réintroduction du gène du type sauvage devient nécessaire pour démontrer un lien direct entre la mutation créée et le phénotype observé chez le mutant. Une autre approche consiste à générer plusieurs mutants indépendants et de reproduire pour chaque mutant le même phénotype. Idéalement, la combinaison des deux approches permettrait de prouver hors de tout doute qu'une mutation donnée est la cause du phénotype observé. L'expérimentateur peut aussi utiliser un test de ségrégation en exploitant le cycle parasexuel de *C. albicans*. Par exemple, une souche *MTLa/a* ayant la mutation du gène cible est croisée à une souche *MTL $\alpha$ / $\alpha$*  du type sauvage. Après la reproduction sexuée, et la perte concertée des chromosomes, l'expérimentateur effectue une caractérisation phénotypique et génotypique de la progéniture. Les phénotypes de ces dernières devraient corrélérer avec les génotypes si le lien entre la mutation du gène et le phénotype observé est direct.

## **I.2. Les infections à *Candida* ou candidoses**

Les infections fongiques, ou mycoses, sont des pathologies allant d'infections superficielles de la peau et des muqueuses, rarement malignes, à des infections profondes ou invasives qui compromettent les chances de survie, surtout chez les patients immunodéprimés. Les infections superficielles sont très courantes chez les sujets en bonne santé et incluent les infections de la peau, des ongles (onychomycoses) et du cuir chevelu (la teigne) qui sont souvent causées par des dermatophytes, comme *Trichophyton* spp. (e.g. *T. rubrum*, espèce la plus isolée dans ces cas). Les mycoses plus sévères, notamment opportunistes, sont associées plutôt aux genres *Candida*, *Aspergillus* et *Cryptococcus*. De

plus, depuis quelques années, on a noté l'émergence de mycètes opportunistes autres que *Candida* incluant les moisissures hyalines et les mycètes pigmentés (causant les chromoblastomycoses) (Pfaller et Diekema, 2007).

Les candidoses sont des mycoses associées au genre *Candida* et, contrairement aux dermatophytoses qui ne sont pas invasives, elles peuvent se disséminer pour atteindre les organes et la circulation sanguine. On parle alors de candidose invasive ou candidémie. Parmi les espèces *Candida* capables de causer des infections chez l'homme (au moins 13 espèces), *C. albicans* demeure la levure la plus fréquemment isolée en pathologie candidosique sévère (Tableau 1) ainsi qu'en pathologie mycosique opportuniste en général (Pfaller et Diekema, 2007).

**Tableau I-1.** Distribution (%) des espèces *Candida* isolées des patients avec candidémie.

Espèce	Fréquence <sup>a</sup>
<i>C. albicans</i>	48.0 - 59.0
<i>C. glabrata</i>	12.0 - 24.0
<i>C. parapsilosis</i>	7.0 - 11.0
<i>C. tropicalis</i>	5.8 - 19.0
<i>C. krusei</i>	1.0 - 5.0
<i>C. lusitaniae</i>	<1%
Autres espèces <i>Candida</i> spp.	2.0 - 6.9

<sup>a</sup> Fréquence en pourcentage d'espèce isolée par échantillon sanguin de patient avec candidémie. Données tirée de (Sims *et al.*, 2005).

*C. albicans* est un saprophyte de l'homme, souvent retrouvé dans le gros intestin, dont la multiplication est limitée par les constituants de la flore microbienne. Mais un déséquilibre dans la constitution de cette flore (e.g. traitement aux antibiotiques) ou une

altération des fonctions immunitaires (e.g. déficiences immunitaires, traitement par des immunosuppresseurs, chimiothérapie) favorise la prolifération de *C. albicans* et, par conséquent, rend le sujet prédisposé aux infections. Au début de l'épidémie du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), par exemple, on a noté une augmentation significative de l'incidence des candidoses superficielles et invasives (Egusa *et al.*, 2008). Mais avec le développement des nouvelles thérapies antirétrovirales hautement actives (highly active antiretroviral therapy, HAART), les infections à *Candida* et les infections opportunistes en général ont considérablement diminué chez les patients (Pfaller et Diekema, 2007; Sims *et al.*, 2005; Egusa *et al.*, 2008). On a aussi reporté la présence d'espèces *Candida* dans l'environnement hospitalier. Les infections nosocomiales (contractées à l'hôpital) à *Candida* ont été attribuées à une transmission de la main du personnel hospitalier au patient (Pfaller et Diekema, 2007). Ainsi, en plus de la prédisposition de certains patients à développer des infections à *Candida* (e.g. patients immunodéprimés aux soins intensifs), il y a le risque de contamination venant du personnel médical et paramédical.

### **I.2.1. Les infections superficielles ou cutanéomuqueuses à *Candida***

Chez les sujets immunocompétents, les infections superficielles à *Candida* atteignent généralement la bouche et le vagin. Des extensions de la bouche vers l'œsophage et le reste du tube digestif sont possibles, même en dehors de toute perturbation de la flore buccale (Rousset, 1997). Évidemment, sur un terrain immunodéprimé, les infections superficielles sont plus sévères et présentent un fort risque d'évolution vers des infections invasives (voir section II.2.). Les infections superficielles à *Candida* incluent la candidose buccale, la candidose œsophagienne et iléo-colique et la candidose génitale.

La candidose buccale se présente sous trois aspects : le muguet buccal, la langue noire villosité et la perlèche mycosique. Le muguet buccal se manifeste d'abord par une certaine gêne à la mastication et à la déglutition pouvant entraîner le refus de la nourriture (dysphagie). La muqueuse buccale est rouge, sèche et œdémateuse avec souvent des

plaques blanches crémeuses qui, au grattage, laissent percevoir une muqueuse enflammée. Toutes les muqueuses de la cavité buccale sont généralement atteintes. La langue noire villositaire, plutôt considérée comme une évolution du muguet buccal, se présente par un changement de couleur de l'enduit de la langue allant du blanc au jaune puis au marron et enfin au noir. Enfin, la perlèche mycosique se présente comme une fissuration très inflammatoire des commissures labiales, entraînant des signes d'irritation et de brûlures. L'inflammation s'étend quelques fois à la joue. Le patient a de la gêne à ouvrir et fermer la bouche (Rousset, 1997).

La candidose oesophagienne iléo-colique se subdivise en trois variantes, selon la partie du tube digestif atteinte: l'oesophagite candidosique, la colite candidosique et l'anite candidosique. La première se manifeste souvent par un reflux gastro-œsophagien accompagné de pyrosis, aigreurs postprandiales. La colite candidosique (inflammation du colon suite à une candidose) se manifeste par des douleurs coliques avec diarrhées pâteuses à liquides, accompagnées d'inflammation de l'anus (anite). Enfin, l'anite candidosique, faisant généralement suite à la colite candidosique, se manifeste par des brûlures anales avec propagation de l'atteinte au niveau du sillon interfessier et de toute la partie glabre, pathologie fréquente chez le nourrisson (érythème fessier du nourrisson) et les personnes âgées (Rousset, 1997).

La candidose génitale est souvent considérée comme une maladie sexuellement transmissible, généralement de la femme à son partenaire puisque le sexe féminin est prédisposé à la candidose génitale. Chez la femme, la vulvo-vaginite candidosique s'observe à tout âge, notamment pendant la période d'activité génitale. Les causes favorisantes les plus fréquentes sont les perturbations hormonales ou thérapeutiques (pilule, grossesse). Le tableau clinique se caractérise par une plainte de prurit, de brûlures vaginales et urétrales. Souvent, la douleur atteint les replis génitaux. Des leucorrhées blanchâtres laiteuses malodorantes font d'emblée évoquer la candidose. La candidose génitale chez l'homme (balanite) se traduit par une irritation d'une partie ou de toute la surface du gland

et/ou du prépuce. Parfois, des fissures peuvent se former, très sensibles au contact avec la peau affectée (Rousset, 1997).

### **I.2.2. Les infections systémiques ou candidémies**

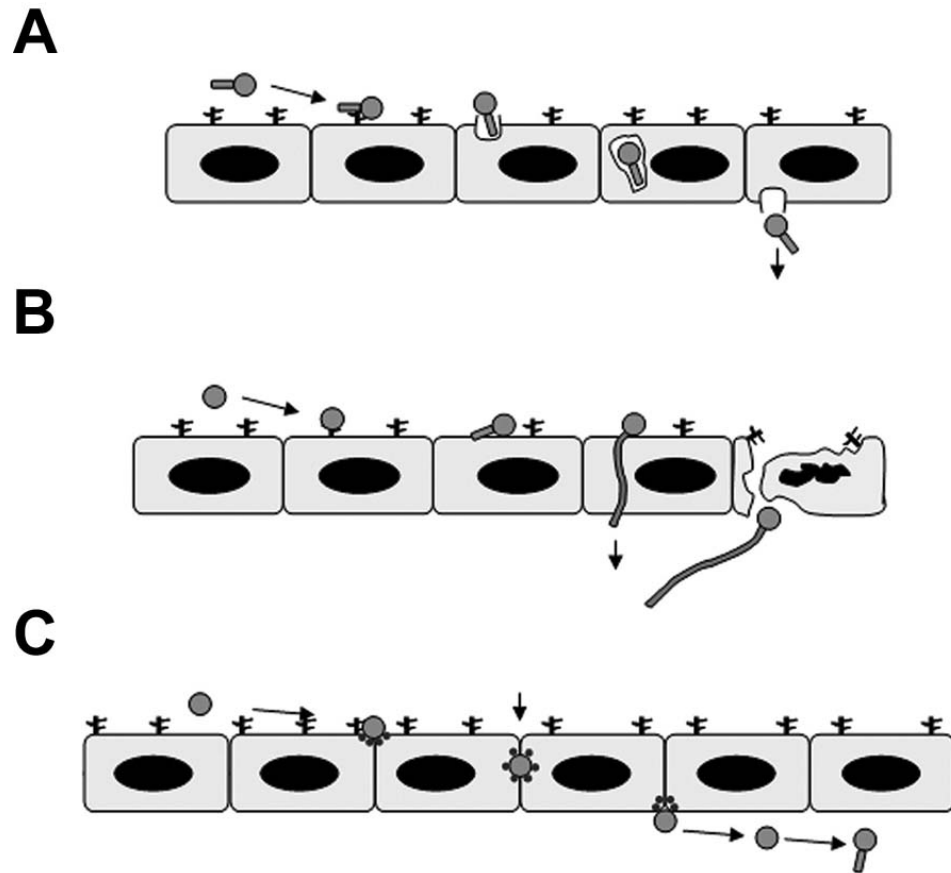
La candidose invasive est un problème de santé public persistant et le nombre de nouveaux cas par an est en augmentation (Pfaller et Diekema, 2007). Les voies de dissémination de *Candida* sont les voies endogènes et exogènes. La voie endogène est la plus importante, puisque dans ce cas c'est l'espèce *Candida* qui fait partie de la flore intestinale normale ou qui parasite la peau du patient qui est à l'origine de la candidémie (Eggimann et Calandra, 2002). Par contre, l'infection requiert dans ce cas un terrain prédisposé comme par exemple l'altération de la barrière cutanéomuqueuse suite à une chirurgie, une malignité gastro-intestinale, l'exposition à la chimiothérapie, les brûlures, les traitements par les immunosuppresseurs et les corticoïdes. La voie exogène n'est pas fréquente, mais peut s'avérer importante, suivant le site de contamination. Dans ce cas, une contamination par les solutions de nutrition parentérale, les cathéters, l'hémodialyse, une transmission des mains du personnel soignant, la contamination par usage de drogues injectables ou la transmission sexuelle (candidose génitale) peuvent évoluer vers la candidémie ou candidose hématogène (Sims *et al.*, 2005). Les signes cliniques d'une candidose hématogène ne sont pas spécifiques et sont souvent confondus avec une bactériémie. Chez les adultes, notamment les patients admis en soins intensifs postopératoires, le signal d'alarme d'une candidose hématogène coïncide avec une fièvre soudaine persistante et réfractaire aux antibiotiques (Eggimann et Calandra, 2002; Sims *et al.*, 2005). Ce symptôme peut-être accompagné de tachycardie, hypotension et frissons ou une détérioration de l'état de santé général. Une candidose hématogène peut disséminer vers d'autres parties du corps. On parle alors de candidose secondaire. Celle-ci touche notamment la peau (66% des cas), le système nerveux central (64% des cas) ou la rétine (54% des cas) (Eggimann et Calandra, 2002; Sims *et al.*, 2005). Une étude sur les candidémies montre un pourcentage de mortalité de 44% chez les patients avec ou sans






immunodépression (Safdar *et al.*, 2004). Les candidoses qui atteignent directement les organes internes sans passer par la circulation sanguine (i.e. infections primaires) touchent notamment le péritoine (candidose abdominale), l'appareil urinaire (candidose urinaire) et l'appareil cardiovasculaire. Elles sont généralement contractées à l'hôpital, suite à une contamination par les cathéters et les autres instrumentations médicales (i.e. voie exogène).

La dissémination hémotogène de *C. albicans* requiert d'abord l'adhésion des cellules de *C. albicans* à la paroi de l'endothélium vasculaire pour ensuite transmigration à travers l'endothélium et accéder à la circulation sanguine (Figure I-5). Il y a deux théories qui expliquent comment *C. albicans* adhère à l'endothélium. La première théorie stipule que *C. albicans* doit d'abord subir une conversion de la morphologie vers les formes hyphes qui interagissent avec la paroi vasculaire et l'altèrent avant de transmigration vers la circulation sanguine. La deuxième théorie, par contre, stipule que les cellules sous la forme levure adhèrent à l'endothélium et transmigrent sans subir un changement de morphologie. Ces deux écoles de pensées sont issues de la controverse au sujet de la nécessité d'une forme plutôt qu'une autre dans la virulence de *C. albicans* (discutée à la section I.2.2.). Le premier point de contact entre *C. albicans* et l'endothélium est la couche la plus externe de la paroi de *C. albicans* qui est constituée de protéines et d'hydrates de carbones jouant le rôle de molécules d'adhésion ou adhésines (Grubb *et al.*, 2008). Ces adhésines incluent des protéines ayant des propriétés ressemblant aux intégrines  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_V\beta_3$  et  $\alpha_V\beta_5$ , qui lient une variété de ligands de l'endothélium comme les molécules d'adhésion cellulaires (*cell adhesion molecules*, CAM), et des protéines portant des séquences ressemblant aux agglutinines (*Agglutinin-like sequence*, ALS) comme Als3p, qui lie la cadhérine N de la cellule endothéliale (Phan *et al.*, 2007). Des polysaccharides mannanes de la paroi de *C. albicans* agissent aussi comme des molécules d'adhésion à l'endothélium. De tels résidus mannosyl, liés en N- ou en O-, sont impliqués dans la reconnaissance de *C. albicans* par le système immunitaire inné, notamment via les *toll-like receptors* (TLR) (Grubb *et al.*, 2008). Ces derniers sont exprimés par certaines cellules endothéliales et sont utilisés par *C. albicans* pour adhérer à l'endothélium (Grubb *et al.*, 2008). Il y a plusieurs mécanismes

proposés pour la transmigration de *C. albicans* (Figure I-5) (Grubb *et al.*, 2008). Le premier mécanisme, montrant le plus d'intérêt par la communauté scientifique, propose que les cellules de *C. albicans* sont endocytosées par les cellules endothéliales et traversent la cellule pour être expulsées vers la circulation sanguine (Figure I-5A). Un autre mécanisme implique l'extension d'une cellule hyphe qui pénètre la cellule endothéliale, menant à sa destruction et l'accès à la circulation sanguine (Figure I-5B). Alternativement, *C. albicans* peut passer entre les cellules endothéliales en alternant le type de molécules d'adhésion, d'une manière similaire au processus de diapédèse que l'on remarque lors du passage des cellules phagocytaires de la circulation sanguine vers le site d'une inflammation (Figure I-5C). Un mécanisme impliquant la phagocytose préalable d'une cellule de *C. albicans* par un leucocyte, une transmigration par diapédèse à travers l'endothélium du leucocyte contenant la cellule intacte, suivie du relâchement de celle-ci dans la circulation sanguine est possible.

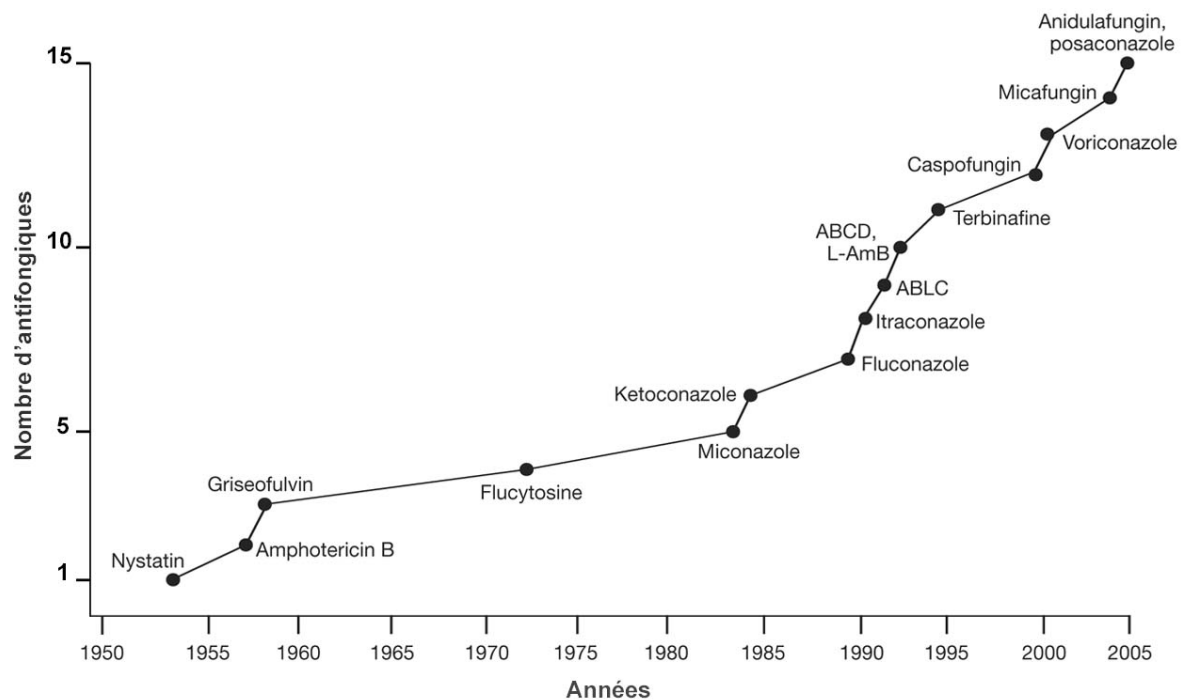


**Figure I-5.** Mécanismes possibles de transmigration de *C. albicans* au niveau de l'endothélium vasculaire pour accéder à la circulation sanguine. , cellule endothéliale; , molécule d'adhésion de la cellule endothéliale; , cellule de *C. albicans*. Figure tirée et adaptée de (Grubb *et al.*, 2008).

### I.3. Les agents antifongiques et le traitement des candidoses

Les candidoses ainsi que toutes les autres formes de mycoses sont traitées par l'administration d'agents antifongiques. Il existe cinq classes d'agents antifongiques majeurs : Les polyènes, les azoles, les allylamines, les échinocandines et d'autres agents incluant la griséofulvine, la 5-fluorocytosine et les thiocarbamates (Mohr *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2004). Malgré cette variété de classes d'antifongiques, certains

médicaments sont efficaces contre certaines espèces de champignons mais pas contre d'autres (voir plus bas). Depuis les années 1950, le nombre d'agents antifongiques ne cesse d'augmenter, incluant des améliorations dans leur formulation ou des développements dans leur efficacité pharmacologique (Figure I-6). Il est important de noter que les récents développements des nouveaux antifongiques (échinocandines et triazoles de seconde génération) corrèlent avec l'émergence des infections fongiques causées par les espèces *Candida* autres que *C. albicans* ainsi que d'autres mycètes du type moisissures qui sont de moins en moins susceptibles aux anciens antifongiques (Pfaller et Diekema, 2004; Sheehan *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2004).



**Figure I-6.** Développement des agents antifongiques de 1954 à 2005. ABCD, dispersion colloïdale d'amphotéricine B; L-Amb, amphotéricine B liposomale, ABLC, amphotéricine B complexe lipidique. Figure tirée et adaptée de (Mohr *et al.*, 2008).

La plupart de ces médicaments (polyènes, azoles, allylamines et thiocarbamates) agissent en perturbant la composition des membranes en ergostérol, qui est le stérol majeur des membranes des champignons, soit en inhibant directement le sentier de biosynthèse de l'ergostérol (action des azoles, des allylamines et des thiocarbamates) soit en interférant directement avec la composition des membranes en ergostérol (action des polyènes) (Figure I-7). Les échinocandines (e.g. caspofungine) ciblent le complexe protéique impliqué dans la biosynthèse des polysaccharides  $\beta$ -1,3 glucanes de la paroi cellulaire (Figure I-7B). Enfin, les analogues des pyrimidines, comme la 5-fluorocytosine, inhibent la synthèse de l'ADN.

Il est important de cerner la difficulté de générer un antifongique efficace sans occasionner des effets secondaires pour le patient. En effet, les mammifères et les champignons partagent des caractéristiques biologiques très similaires, puisqu'ils sont phylogéniquement apparentés. Un médicament antifongique peut donc cibler une fonction biologique donnée d'un champignon mais altérer en parallèle la fonction paralogue chez l'hôte, ce qui mène à une toxicité. Ainsi, le développement d'un antifongique efficace avec peu ou pas d'effets néfastes pour le patient constitue un vrai défi. On notera aussi que certains antifongiques utilisés de nos jours sont dérivés de produits du métabolisme secondaire des champignons eux-mêmes et des bactéries. Ces molécules constituent des moyens utilisés par les microbes pour se protéger d'autres microbes envahissant l'environnement et les ressources nutritionnelles nécessaires à leur survie.

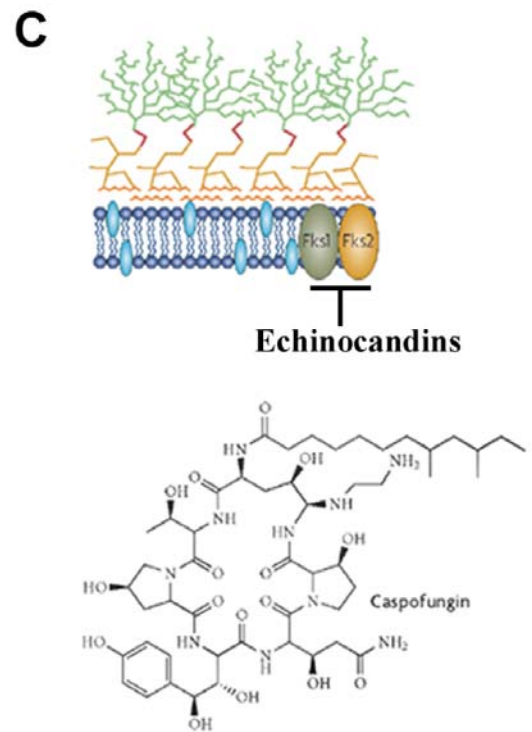
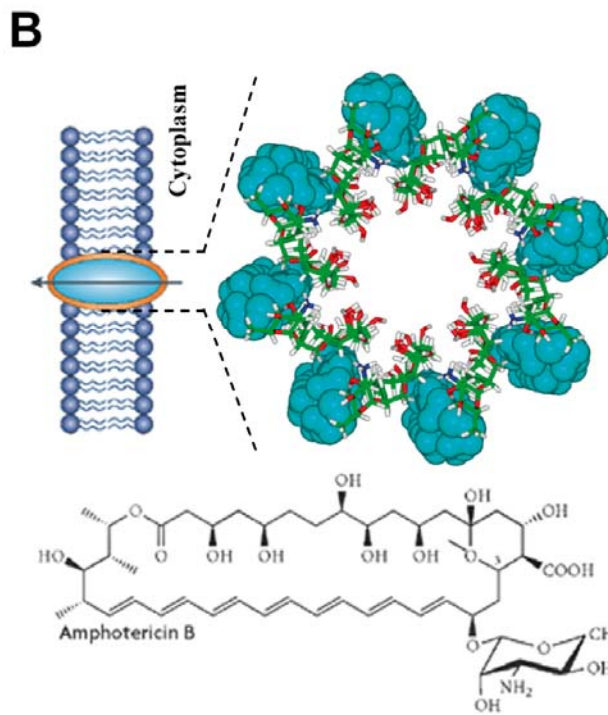
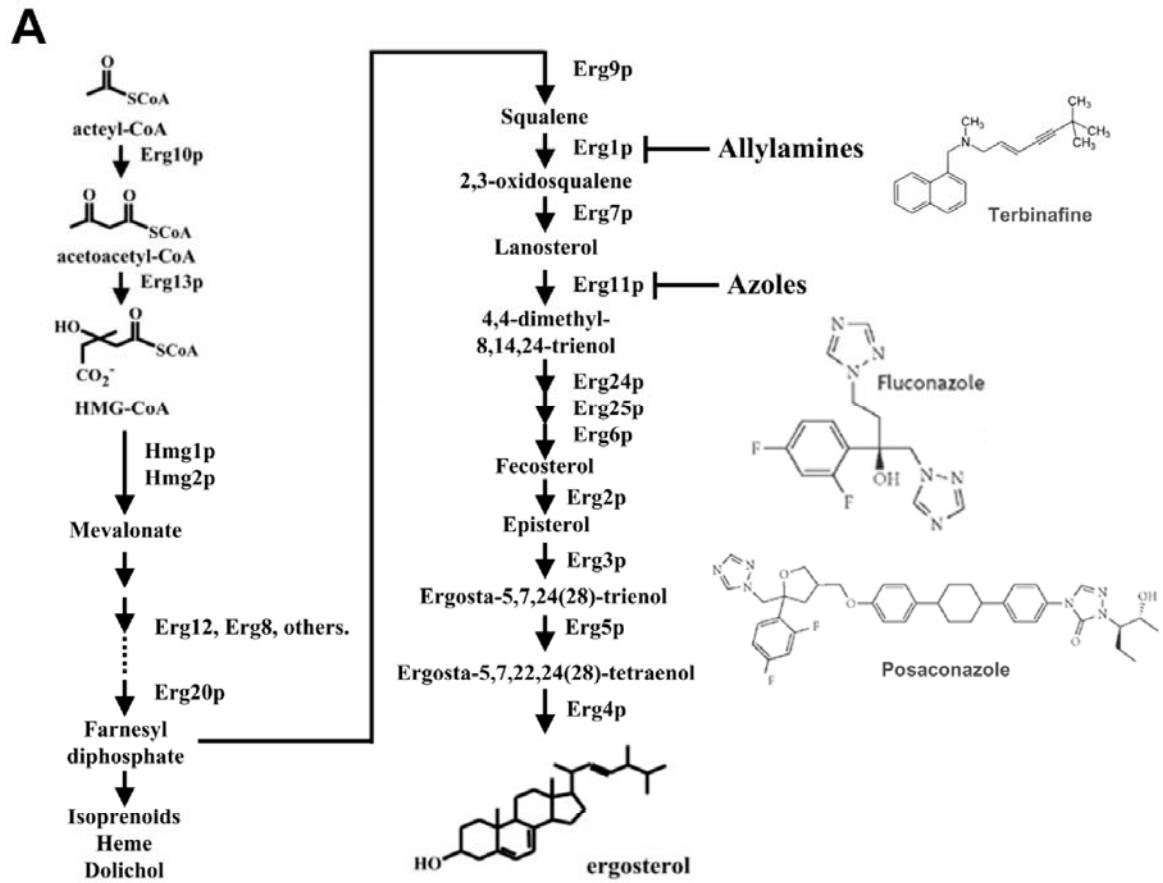
### **I.3.1. Les azoles**

Les azoles sont, de loin, les médicaments antifongiques les plus utilisés pour traiter les mycoses. Ils agissent par l'inhibition de l'enzyme cytochrome P450 fongique  $14\alpha$ -lanostérol déméthylase, encodée par le gène *ERG11* chez *C. albicans*, impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol (Figure I-7A). Il existe deux groupes d'azoles utilisés en




clinique : les imidazoles (kétoconazole, miconazole, clotrimazole et éconazole), possédant deux atomes d'azote au noyau azole, et les triazoles (fluconazole, itraconazole, voriconazole et posaconazole), possédant trois atomes d'azote au noyau azole. Puisque les triazoles possèdent une affinité plus élevée pour les cytochromes P450 fongiques que pour ceux de l'hôte, ils sont mieux tolérés par le patient. Le cytochrome P450-Erg11p (aussi appelé Cyp51p) catalyse la déméthylation du groupement  $14\alpha$ -méthyl du lanostérol par une activité monooxygénase. Cette protéine contient un noyau hème au niveau du site actif. Les azoles se lient à l'atome de fer du noyau hème d'Erg11p via un atome d'azote du noyau imidazole ou triazole. Le reste de la molécule d'azole se lie à l'apoprotéine dépendamment de la structure de l'azole (Odds *et al.*, 2003). En inhibant Erg11p, le traitement aux azoles mène à l'accumulation de stérols méthylés, notamment le 14-méthylergosta-8,24(28)-dien-3,6-diol, qui vont inhiber la croissance du champignon (propriété fongistatique) sans l'éradiquer. Les azoles ne sont donc pas fongicides et cette propriété est importante pour comprendre les mécanismes de résistance aux azoles (section I.4.).

À la différence des imidazoles, les triazoles possèdent un large spectre d'activité dans le traitement des mycoses superficielles et invasives et sont donc plus utilisés que les imidazoles. Ils sont subdivisés en deux catégories : les triazoles de première génération (e.g. fluconazole) et les triazoles de seconde génération (e.g. posaconazole) (Figure I-7A). Le fluconazole, disponible depuis 1990, est reconnu comme étant l'azole de premier choix dans le traitement et la prévention des candidoses superficielles et invasives (Charlier *et al.*, 2006). Le fluconazole possède un excellent profil pharmacocinétique et est le mieux toléré par l'organisme (Charlier *et al.*, 2006). Il possède une excellente activité antifongique contre les espèces *Candida* ainsi que d'autres espèces comme *Cryptococcus neoformans*. Par contre, une résistance au fluconazole intrinsèque à l'espèce de champignon est particulièrement rencontrée chez les espèces *Candida* autres que *C. albicans* comme *C. krusei* et *C. glabrata* (Pfaller et Diekema, 2004). Le fluconazole est administré oralement ou par voie intraveineuse. Le posaconazole, comme les autres triazoles de seconde génération, possède un spectre d'activité antifongique plus étendu que les triazoles de

première génération, couvrant le traitement des infections à levure et aux autres champignons et moisissures incluant *Aspergillus*, *Scedosporium* et *Fusarium*. Il est administré oralement et est le seul antifongique azolé avec une activité contre les zygomycètes (Torres *et al.*, 2005). En dépit de leur excellente tolérance par l'organisme, les azoles peuvent être toxiques pour le foie et un examen des fonctions hépatiques est nécessaire avant le début du traitement. On estime à 5-7% la proportion de patients qui arrêtent le traitement pour dysfonctionnement hépatique (Chen et Sorrell, 2007).





**Figure I-7.** Mode d'action des antifongiques majeurs, azoles, allylamines, polyènes et échinocandines. **A.** Le sentier de biosynthèse de l'ergostérol est la cible des azoles et des allylamines. Les azoles (e.g. fluconazole et posaconazole, dont les structures sont représentées à la droite) inhibent l'enzyme 14 $\alpha$ -lanostérol déméthylase encodée par le gène *ERG11* chez *C. albicans* (Erg11p) menant à la formation de méthylstérols qui arrêtent la croissance du champignon (effet fongistatique). Les allylamines (e.g. terbinafine) inhibent l'enzyme squalène époxydase encodée par le gène *ERG2* (Erg2p) avec comme conséquence l'accumulation de squalène et la diminution de la quantité d'ergostérol. Par contre, les allylamines ne sont pas efficaces pour traiter les candidoses. **B.** Les polyènes ciblent l'ergostérol au niveau des membranes fongiques constituées de phospholipides (sphères bleues foncées avec une chaîne hydrocarbonée) et d'ergostérol, créant des pores perméables aux ions (ovale bleu clair) et menant à la mort cellulaire (activité fongicide). À droite du panneau est représenté un modèle tridimensionnel du canal Amphotéricine B (dont la structure est représentée en bas du panneau)-Ergostérol. Le canal contient huit molécules d'AmB (représentées par un squelette de chaînes colorées suivant la nature de l'atome) et huit molécules d'ergostérol (représenté par un modèle éclaté vert) le tout formant un pore aqueux. Modèle pris de (Baginski *et al.*, 2005). **C.** Les échinocandines inhibent les enzymes  $\beta$ -1,3-D-glucan synthases Fks1p (ovale vert foncé) et Fks2p (ovale orange) impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides  $\beta$ -1,3-glucanes de la paroi, menant à l'altération de la paroi cellulaire. Fks1p et Fks2p sont des protéines intégrées à la membrane plasmique fongique constituée de phospholipides (sphères bleues foncées avec une chaîne hydrocarbonée) et d'ergostérol (ovales bleus), , polymère de chitine; ,  $\beta$ -1,3/1,6 D-glucanes; , glycoprotéines. Cette figure est tirée et adaptée de (Baginski *et al.*, 2005; Cowen, 2008; Davies *et al.*, 2005).

### I.3.2. Les allylamines

Le sentier de biosynthèse de l'ergostérol est la cible d'une autre classe d'antifongiques que sont les allylamines (Figure I-7). Les allylamines (e.g. terbinafine) constituent une classe d'antifongiques majeure car c'est la classe de choix pour le traitement des mycoses superficielles de la peau (e.g. onychomycose) qui sont très fréquentes dans la population. La terbinafine inhibe la squalène époxydase, encodée par le gène *ERG2*, qui est une des mailles de la chaîne enzymatique de biosynthèse de l'ergostérol (Figure I-7A) et possède une activité fongicide à l'égard des dermatophytes mais peu ou pas d'activité contre *C. albicans* et les levures en général. Des préparations topiques ou orales de cet antifongique sont couramment utilisées pour traiter les infections de la peau et des ongles causées par les dermatophytes. La terbinafine est généralement très bien tolérée par le patient, mais peut

occasionner des troubles gastro-intestinaux ou une élévation des transaminases hépatiques (Chen et Sorrell, 2007;Odds *et al.*, 2003).

### **I.3.3. Les polyènes**

Les polyènes, comme leur nom l'indique, sont des molécules constituées d'un enchaînement de liaisons doubles (ène) à caractère hydrophobe suivies d'une chaîne carbonée hydroxylée à caractère hydrophile, le tout formant un cycle (voir structure de l'amphotéricine B, Figure I-7B). L'amphotéricine B (AmB) a été pendant des années le seul antifongique polyène administré par voie systémique. C'est un macrolide extrait de la bactérie *Streptomyces nodosus* possédant une activité fongicide à haute concentration (Baginski *et al.*, 2005;Eggimann *et al.*, 2003). Mise à part sa toxicité, l'AmB dispose de plusieurs caractéristiques qui le rendent très efficace pour traiter toutes les formes de mycoses incluant les candidoses : i) une très forte activité antifongique, ii) une activité fongicide, iii) un large spectre d'activité antifongique et iv) une très rare sélection de la résistance; il est d'ailleurs utilisé pour contourner la résistance à d'autres classes d'antifongiques comme les azoles. Ces propriétés sont exclusives à l'AmB, ce qui en fait une cible pour le développement de dérivés ayant très peu ou pas de toxicité pour l'hôte.

L'efficacité de l'AmB est démontrée contre les infections à levure, à *Cryptococcus* et aux moisissures et possède donc un large spectre d'activité (Chen et Sorrell, 2007;Mohr *et al.*, 2008). Son mode d'action est atypique pour une molécule antimicrobienne. En effet, au lieu d'inhiber un enzyme, les polyènes se lient à l'ergostérol, ce qui perturbe la fonction de la membrane menant à la création de pores à travers lesquels des ions intracellulaires sont déversés à l'extérieur de la cellule (Baginski *et al.*, 2005) (voir modèle à la Figure I-7B). Bien que le mécanisme moléculaire d'action précis de l'AmB soit encore mal connu, des structures hypothétiques des pores formés de molécules d'ergostérol et d'AmB ont été calculées par des méthodes de chimie computationnelle (Baginski *et al.*, 2005) (Figure I-7). Ces modèles de canaux sont constitués de huit molécules d'ergostérol jointes par

l'intermédiaire de huit molécules d'AmB le tout formant un canal aqueux. À des concentrations faibles d'AmB, les pores sont perméables seulement aux cations monovalents comme le potassium, mais à des concentrations élevées les pores deviennent perméables à des anions comme le chlorure (Mohr *et al.*, 2008).

À la différence des azoles, les polyènes sont fongicides ce qui va à l'encontre du développement d'une résistance à cette classe d'antifongiques et constitue ainsi un avantage par rapport aux autres médicaments. L'AmB possède une affinité plus élevée pour l'ergostérol que pour le cholestérol, le stérol majeur des cellules de mammifères et donc de l'hôte. Cette sélectivité semble être en majeure partie due à la configuration tridimensionnelle de l'ergostérol, plutôt cylindrique et similaire à la celle de l'AmB, facilitant les liaisons du type van der Waals comparativement au cholestérol qui est de forme sigmoïde (Baginski *et al.*, 2005;Odds *et al.*, 2003). Un autre argument de sélectivité est le ratio ergostérol/phospholipides plus élevé dans les membranes fongiques comparativement au ratio cholestérol/phospholipides chez les mammifères (Baginski *et al.*, 2005;Odds *et al.*, 2003). Par contre cette sélectivité est faible, ce qui fait que l'AmB possède un potentiel toxique pour les cellules de l'hôte. En effet, l'administration de l'AmB conventionnelle (aussi appelée AmB déoxycholate) est accompagnée d'une néphrotoxicité dose-dépendante fréquemment rencontrée chez les patients. Ainsi des reformulations de l'AmB ont vu le jour pour contrecarrer les effets secondaires et notamment la néphrotoxicité. Ces reformulations, constituées de l'encapsulation de l'AmB dans des liposomes ou des complexes lipidiques, vont diminuer la néphrotoxicité en réduisant la quantité d'AmB délivrée aux reins.

### **I.3.4. Les échinocandines**

Les échinocandines sont la classe d'antifongiques la plus récemment développée. Ce sont de larges molécules lipopeptidiques cycliques constituées d'un cycle hexapeptidique amphiphile avec un branchement du type N-acyl de chaîne lipidique (voir

structure de la caspofungine, Figure I-7C). C'est la composition de cette chaîne lipidique qui varie d'une échinocandine à une autre. Les échinocandines sont des métabolites secondaires fongiques dont la cible est le complexe protéique transmembranaire Fks1p/Fks2p responsable de la synthèse des polysaccharides de la paroi fongique  $\beta$ -1,3 D-glucanes (Mohr *et al.*, 2008;Odds *et al.*, 2003) (Figure I-7C). Chez *C. albicans*, le gène *FKS1* encode une protéine intégrée à la membrane plasmique de 215 kDa qui est la sous-unité majeure du complexe glucan synthase (Mio *et al.*, 1997). En inhibant la fonction de Fks1p et Fks2p, le traitement aux échinocandines mène à la diminution de la production de  $\beta$ -1,3 D-glucanes avec pour conséquence une fragilisation de la paroi cellulaire, son altération et ultimement une lyse cellulaire (Mohr *et al.*, 2008;Odds *et al.*, 2003). Les mécanismes moléculaires précis d'inhibition du complexe Fks1p t Fks2p ne sont pas encore connus.

En plus de la caspofungine, première échinocandine utilisée pour le traitement des mycoses, deux autres membres de cette classe ont été récemment développés et sont la micafungine et l'anidulafungine (Figure I-6). La caspofungine (Figure I-7C) est un sous-produit de fermentation isolé du champignon filamenteux *Glarea lozoyensis*. Initialement, cet antifongique a été utilisé pour traiter les aspergilloses invasives qui sont réfractaires à d'autres thérapies. Par la suite, son efficacité a été prouvée contre les infections à *Candida* comme la candidose oesophagienne ou la candidémie (Mohr *et al.*, 2008). Les échinocandines sont généralement inactives sur des espèces autres que *Candida* et *Aspergillus* et ont ainsi un spectre d'activité antifongique restreint. Comme les autres antifongiques de cette classe, la caspofungine est administrée par injection intraveineuse mais pas orale, en raison de sa faible biodisponibilité orale (Chen et Sorrell, 2007;Mohr *et al.*, 2008). La toxicité associée aux échinocandines est rare puisque leur action est spécifique à l'intégrité de la paroi fongique. Certains effets indésirables incluent de l'allergie (15%-20% des cas) ou de la fièvre (10%-35% des cas) (Chen et Sorrell, 2007).

### I.3.5. Autres antifongiques

D'autres antifongiques administrés chez les patients incluent la griséofulvine, la 5-fluorocytosine et les thiocarbamates. La griséofulvine est parmi les premiers antifongiques qui ont été développés (Figure I-6) et est un produit du métabolisme de *Penicillium spp.* Son mécanisme d'action précis est encore inconnu, mais l'explication favorite est l'inhibition de l'assemblage des microtubules. Le spectre d'activité antifongique de la griséofulvine est restreint aux dermatophytes, ce qui fait qu'elle est très utilisée pour traiter les mycoses superficielles de la peau causée par les dermatophytes (Develoux, 2001). La griséofulvine est peu absorbée par le tube digestif. L'absorption est augmentée par l'administration d'un repas riche en graisse et la majorité des effets secondaires sont bénins : céphalées, troubles gastro-intestinaux ou éruptions cutanées (Develoux, 2001). La 5-fluorocytosine, un analogue de pyrimidine développée quelques années après la griséofulvine, exerce son activité antifongique via une conversion en 5-fluorouracil qui inhibe la synthèse de l'ADN et sa réplication en altérant la fonction de la thymidylate synthase (Odds *et al.*, 2003). Pour ce mécanisme d'action, les cellules cibles ont besoin d'exprimer une cytosine perméase (Fcy1p et Fcy2p) pour internaliser la molécule de 5-fluorocytosine, une cytosine déaminase (Fca1p) pour la convertir en 5-fluorouracile et l'uracile phosphoribosyl transférase (encodée par *FURI*, un déterminant important de la résistance clinique à la 5-fluorocytosine) pour convertir le 5-fluorouracile en un substrat pour la synthèse des acides nucléiques. La majorité des champignons filamenteux ne possèdent pas ces enzymes, ce qui fait que le spectre d'activité antifongique de la 5-fluorocytosine est restreint aux espèces *Candida* et *Cryptococcus neoformans* (Odds *et al.*, 2003). La 5-fluorocytosine ne devrait pas être administrée seule car un développement rapide de la résistance est courant (via des mutations dans la perméase, déaminase et/ou la phosphoribosyl transférase Fur1p, voir section I.4.4.). Son rôle est limité à une utilisation combinée avec un autre antifongique comme l'AmB, par exemple. La 5-fluorocytosine est généralement administrée oralement ou par injection, avec quelques fois de l'hépatotoxicité

ou une toxicité de la moelle osseuse associée (Chen et Sorrell, 2007;Odds *et al.*, 2003). Les thiocarbamates (e.g. tolnaftate) ont des structures similaires aux allylamines et sont surtout utilisés pour le traitement des dermatophytoses de la peau en application topique. Les thiocarbamates, comme les allylamines, inhibent la squalène époxydase encodée par Erg2p et ne semblent pas avoir un effet sur les infections à *Candida*. Par contre, les thiocarbamates sont fongicides à l'égard des dermatophytes comme *T. rubrum* (Favre et Ryder, 1996).

#### **I.4. La résistance clinique aux antifongiques : les mécanismes moléculaires**

L'émergence de la résistance aux médicaments chez tous les microorganismes pathogènes, incluant les champignons, est un processus évolutif initié par l'exposition aux agents antimicrobiens. La résistance aux médicaments évolue parce que la plupart des agents antimicrobiens n'éradique pas le pathogène, ce qui fait que les sous-populations microbiennes qui survivent au traitement sont soumises à une pression sélective du médicament avec pour conséquence la sélection de mutations conférant la croissance du microorganisme en dépit de la présence de l'agent antimicrobien (Anderson, 2005;Cowen *et al.*, 2002). La résistance clinique aux antimicrobiens est définie comme étant toute persistance ou progression d'une infection causée par un microorganisme pathogène en dépit d'une thérapie antimicrobienne appropriée. Cette définition tient compte non seulement de la susceptibilité du pathogène au médicament administré, mais aussi d'autres conditions comme les caractéristiques pharmacocinétiques, les interactions médicamenteuses, l'état immunitaire du patient et la conformité de prise du médicament par le patient (Anderson, 2005;Cowen *et al.*, 2002;Pappas *et al.*, 2004). Donc, la résistance aux médicaments est une manifestation complexe de facteurs liés aussi bien au pathogène qu'à l'hôte. Mais pour caractériser la résistance microbienne en soi, on se limite à l'évaluation de la susceptibilité d'un isolat clinique (i.e. clone d'espèce pathogène isolé du

site d'infection de l'hôte) aux agents antimicrobiens par des mesures *in vitro* qui doivent être reproductibles et standardisées. Ces mesures déterminent la concentration inhibitrice minimale, en anglais *minimum inhibitory concentration* (MIC), qui par définition est la concentration la plus faible d'un composé antimicrobien causant une réduction d'au moins 50% de la croissance comparativement à une croissance en l'absence de ce composé. Pour les champignons pathogènes et plus particulièrement les levures, la MIC est déterminée selon la méthodologie NCCLS M27-A (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997; Rex et Pfaller, 2002). Cette méthodologie a permis de dresser des points d'interprétation de la résistance aux antifongiques dans un essai MIC (généralement un MIC causant une inhibition de croissance de 90% après 48 heures d'incubation, MIC<sub>90%</sub>) chez certaines espèces *Candida* spp (Tableau 2). Par exemple, pour le fluconazole, une MIC<sub>90%</sub> ≤ 8 µg/ml interprète une susceptibilité (S), une MIC<sub>90%</sub> de 16-32 µg/ml interprète une susceptibilité dose-dépendante (S-DD) alors qu'une MIC<sub>90%</sub> ≥ 64 µg/ml interprète une résistance (R) (Kontoyiannis et Lewis, 2002; Pfaller *et al.*, 2006) (Tableau 2). La désignation « dose-dépendante » est une nouvelle terminologie remplaçant « susceptibilité intermédiaire », parce-que les isolats ayant une MIC qui coïncide avec la catégorie S-DD requiert généralement un traitement à des doses plus élevées de fluconazole (≥ 12 mg/kg/jour). Pour l'itraconazole, les points d'interprétation de la résistance sont ≤ 0.125 µg/ml (S), 0.25-0.50 µg/ml (S-DD) et ≥ 1 µg/ml (R) (Kontoyiannis et Lewis, 2002; Pfaller *et al.*, 2006).

**Tableau I-2.** Profils de susceptibilité typiques d'espèces *Candida* à différents antifongiques (MIC<sub>90%</sub> en µg/ml).

Espèce	Fluconazole	Itraconazole	Amphotéricine B
<i>C. albicans</i>	2 (S)	0.25 (S)	0.5 (S)
<i>C. glabrata</i>	8-64 (S-DD)	0.5-2.0 (S-DD)	1.0 (S)
<i>C. parapsilosis</i>	2 (S)	0.12 (S)	1.0 (S)
<i>C. tropicalis</i>	1 (S)	0.12 (S)	1.0 (S)
<i>C. krusei</i>	≥64 (R)	0.5-1.0 (S-DD)	1.0 (S)
<i>C. lusitaniae</i>	4 (S)	0.25-1.0 (S-DD)	≥1.0 (R)

Données tirées et adaptées de (Kontoyiannis et Lewis, 2002). S, Susceptible; S-DD, Susceptibilité dose-dépendante; R, Résistant.

La résistance aux antifongiques est traditionnellement classifiée comme étant soit primaire (intrinsèque) – i.e. présente avant l'exposition à un agent antifongique – ou secondaire (acquise) – i.e. qui se développe après l'exposition aux médicaments antifongiques et résultant d'altérations génétiques stables (Kontoyiannis et Lewis, 2002; Rex et Pfaller, 2002). Certaines espèces *Candida* sont intrinsèquement résistantes au Fluconazole comme *C. krusei* et *C. glabrata*. (Tableau 2). Donc, des infections causées par ces espèces requièrent une stratégie de traitement alternative aux azoles (e.g. amphotéricine B) ou des doses élevées en azoles. Malgré une tendance inquiétante d'émergence de rares infections fongiques causées par des espèces intrinsèquement résistantes aux antifongiques usuels (Pfaller et Diekema, 2004), la résistance secondaire continue d'être cliniquement plus pertinente et est considéré comme un vrai défi pour le clinicien, surtout lors du traitement de patients sévèrement immunodéprimés. Je détaillerai ici les mécanismes moléculaires de la résistance secondaire aux antifongiques chez *C. albicans* et j'invite le lecteur à parcourir les revues récentes suivantes concernant les mécanismes de résistance chez d'autres espèces fongiques (Barker et Rogers, 2006; Cowen et Steinbach, 2008; Kanafani et Perfect, 2008; Perlin, 2007).



### **I.4.1. La résistance aux azoles**

Les azoles, malgré leur utilisation comme première ligne de traitement aux candidoses superficielles et invasives, sont des agents fongostatiques et donc un traitement prolongé aux azoles, notamment chez les patients immunodéprimés, sélectionne des mutations et altérations chez les souches survivantes avec pour conséquence le développement d'une résistance. Il est important de noter que les azoles constituent la classe la plus pertinente en termes de résistance clinique, comparativement aux autres classes (échinocandines et polyènes notamment), pour les raisons citées plus haut (voir aussi section I.3.1.). Pour cela, mes études au doctorat ont été axées particulièrement sur les mécanismes de résistance aux azoles (voir chapitres 2-6).

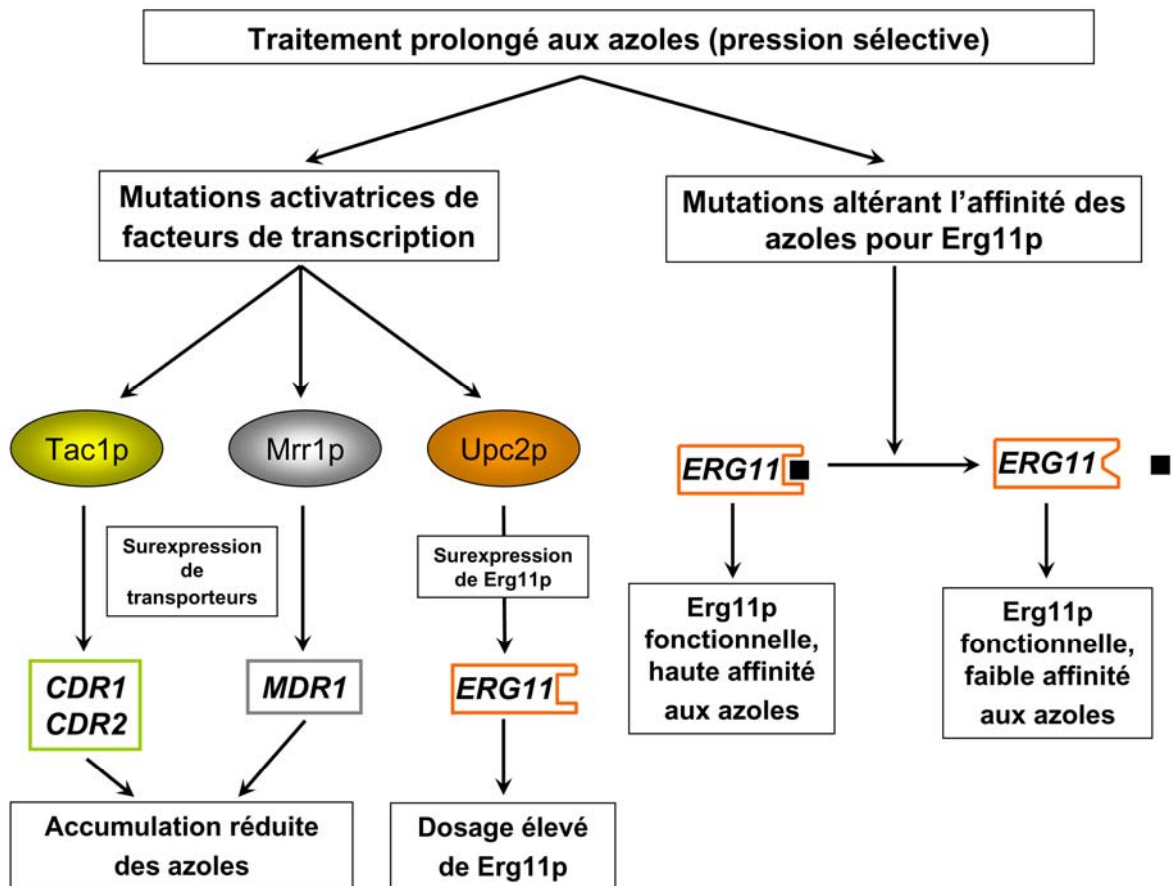
Les premières études ayant pour objectif de comprendre et caractériser les mécanismes moléculaires de la résistance clinique aux azoles ont été effectuées dans des isolats cliniques de *C. albicans* provenant de patients atteints de candidose mucocutanée chronique, en utilisant des approches d'analyses de polymorphismes de restriction (RFLP) (Pearce et Howell, 1991). Ces études ont montré une variabilité des profils génétiques entre les différentes souches isolées de *C. albicans* (Pearce et Howell, 1991). Des études plus étendues ont été par la suite effectuées sur des isolats cliniques provenant de patients séropositifs au VIH avec des épisodes récurrents de candidose oropharyngée traitées par l'administration de doses croissantes de Fluconazole au cours du temps (Sanglard *et al.*, 1995; White, 1997a; White *et al.*, 1998). Ces études ont mené à l'établissement d'une corrélation entre le développement de la résistance aux azoles et des altérations moléculaires spécifiques, suivies d'études qui ont démontré l'implication directe de ces altérations dans la résistance clinique (Marichal *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997; Wirsching *et al.*, 2000b; Saidane *et al.*, 2006). Plus récemment, des études d'hybridation comparatives de génomes ont montré que les souches cliniques résistantes

aux azoles subissaient des altérations chromosomiques ou aneuploidies notamment la formation d'isochromosomes (Selmecki *et al.*, 2006).

On peut classer les mécanismes moléculaires de résistance clinique aux azoles en deux grandes catégories : i) surexpression de gènes encodant des déterminants (ou effecteurs) de la résistance clinique aux azoles *CDR1*, *CDR2*, *MDR1*, *PDR16* et *ERG11* et ii) mutations dans la cible des azoles, la protéine Erg11p (Figure I-8) (Barker et Rogers, 2006;Akins, 2005;Lupetti *et al.*, 2002;Morschhauser, 2002;Sanglard et Odds, 2002;Sanglard, 2002). La surexpression des gènes effecteurs de la résistance clinique aux azoles est due à des mutations activatrices (mutations gain de fonction) dans des facteurs de transcription à doigts de zinc du type *zinc cluster* (voir section VI.) qui régulent leur expression : Tac1p (Transcriptional Activator of *CDR* genes) pour *CDR1* et *CDR2*, Mrr1p (Multidrug Resistance Regulator) pour *MDR1* et Upc2p (Uptake Control) pour *ERG11* (Figure I-8).

#### **I.4.1.1. Surexpression de gènes encodant des déterminants de la résistance aux azoles**

Les déterminants de la résistance clinique aux azoles connus à date appartiennent à quatre classes fonctionnelles : Cdr1p et Cdr2p sont des transporteurs membranaires de la famille ATP-binding cassette; Mdr1p est un transporteur membranaire du type facilitateur majeur; Pdr16p est une transférase de phospholipides et Erg11p est la déméthylase du lanostérol, cible des azoles. Ces effecteurs de la résistance contribuent à la résistance clinique selon deux processus : i) accumulation réduite des azoles, due à la surexpression des gènes des *CDR1*, *CDR2* et *MDR1* encodant des transporteurs (Figure I-8) et ii) surexpression ou amplification du gène *ERG11* encodant la cible des azoles menant à un dosage élevé de Erg11p (Figure I-8). La surexpression du gène *PDR16* est concomitante à celle de *CDR1* et *CDR2* dans les isolats cliniques, suggérant qu'elle résulte aussi de mutations activatrices de Tac1p, mais le mécanisme par lequel Pdr16p confère la résistance clinique n'est pas encore élucidé (Saidane *et al.*, 2006).



**Figure I-8.** Mécanismes moléculaires de la résistance clinique aux azoles chez *Candida albicans*. La pression sélective exercée par l'administration des azoles, qui sont des médicaments fongostatiques, sélectionne pour des mutations conférant la résistance clinique. Des mutations activatrices (gain de fonction) dans des facteurs de transcription de la famille *zinc cluster* (voir chapitre 6) Tac1p, Mrr1p et Upc2p, mènent à un dosage élevé des transporteurs *CDR1/CDR2*, *MDR1* et de la cible des azoles *ERG11*, respectivement. Des mutations dans *ERG11* confèrent la résistance clinique par perte/altération de l'affinité de l'enzyme pour les azoles. ■, molécule d'azole.

#### *I.4.1.1.1. Accumulation réduite des azoles due à la surexpression de gènes encodant des transporteurs*

Les études antérieures convergent vers l'évidence que chez les souches cliniques résistantes aux azoles, les dérivés azolés sont activement transportés vers l'extérieur de la

cellule par le biais des transporteurs Cdr1p et Cdr2p, qui utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP, ou par le biais de Mdr1p, qui utilise le gradient de protons à travers la membrane comme force de flux. Je recommande la lecture de la revue récente par Cannon *et al.* (2009) en ce qui à trait aux propriétés fonctionnelles de ces transporteurs dans le contexte de la résistance aux antifongiques, que je ne détaillerai pas ici (Cannon *et al.*, 2009).

Les gènes *CDR1* et *CDR2* encodent des transporteurs homologues à Pdr5p de *S. cerevisiae*, qui confère la résistance a plusieurs composés toxiques différents chez cette levure, et ont été identifiés par complémentation de la mutation *pdr5Δ* chez *S. cerevisiae* (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). Dans ces études, *CDR1* pouvait, notamment, conférer la résistance au miconazole alors que *CDR2* conférait la résistance à plusieurs azoles ainsi qu'à la terbinafine (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). Le gène *MDR1* (antérieurement nommé *BEN<sup>r</sup>*) a été cloné suite à sa capacité de conférer la résistance au bénomyl et au méthotrexate chez *S. cerevisiae* (Fling *et al.*, 1991). Des études de surexpression chez *S. cerevisiae* ont par la suite montré que *MDR1* conférait la résistance à d'autres substances toxiques comme le cycloheximide ou l'oxyde de nitroquinoline (Ben Yaacov *et al.*, 1994) et finalement aux azoles (Sanglard *et al.*, 1995).

Une première étude clé a montré que plusieurs isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux azoles surexpriment les gènes *CDR1* ou *MDR1* comparativement aux isolats parentaux susceptibles à ces composés (Sanglard *et al.*, 1995). Cette étude a notamment démontré que ces souches résistantes accumulaient moins de fluconazole comparativement aux souches sensibles (Sanglard *et al.*, 1995). Le clonage subséquent de *CDR2* a permis de montrer que dans les souches cliniques qui surexpriment *CDR1* on détectait aussi des niveaux très élevés de transcrits de *CDR2* (Sanglard *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997). Dans les souches sensibles, par contre, *CDR1* affiche des niveaux d'expression basaux qui sont détectables par des techniques moléculaires de détection de transcrits, mais on ne détecte pas l'expression de *CDR2* ni celle de *MDR1* (Sanglard *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*,

1997;Lyons et White, 2000;Saidane *et al.*, 2006). D'ailleurs, la délétion de *CDR1* dans une souche de *C. albicans* sensible au azoles confère une hypersensibilité à ces antifongiques ce qui confirme génétiquement l'implication de Cdr1p dans la résistance aux azoles (Sanglard *et al.*, 1996). Par contre, la délétion de *MDR1* ou de *CDR2* dans une souche sensible n'a pas d'effet, fort probablement parce que l'expression de *MDR1* et de *CDR2* ne sont pas détectables dans de telles souches (Sanglard *et al.*, 1996;Sanglard *et al.*, 1997).

Grâce à la création de marqueurs de sélection dominants (voir section I.4.1.), on a pu évaluer l'effet direct de délétion de *CDR1*, *CDR2* ou *MDR1* dans les isolats cliniques résistants aux azoles qui, à la différence des souches de laboratoire, ne sont pas compatibles avec l'utilisation des marqueurs d'auxotrophie de routine. La contribution de *MDR1* a été évaluée en exploitant la technique de *MPA<sup>R</sup>-flipping* (voir section I.4.1.) dans le but de créer un mutant de ce gène dans un isolat clinique surexprimant *MDR1* et les résultats démontrent une diminution marquée de la résistance aux azoles, mais pas son abolition, suggérant la participation d'autres mécanismes de résistance dans la souche étudiée (Wirsching *et al.*, 2000b). La contribution différentielle de *CDR1* et *CDR2* au phénotype de résistance dans les isolats cliniques surexprimant ces deux gènes a récemment été évaluée, soit par l'inhibition spécifique de la fonction des transporteurs ou par la délétion individuelle de ces gènes, et les résultats démontrent clairement une contribution majeure de Cdr1p comparativement à Cdr2p (Holmes *et al.*, 2008;Tsao *et al.*, 2009).

Des analyses de transcrits par la technique de buvardage Northern a permis d'observer des profils d'expression distincts de *CDR1*, *CDR2* et *MDR1* dans plusieurs isolats cliniques résistants aux azoles (Lopez-Ribot *et al.*, 1998;Saidane *et al.*, 2006), et on a pu remarquer que plusieurs isolats surexpriment *CDR1*, *CDR2* mais pas *MDR1* alors que d'autres surexpriment uniquement *MDR1*. Moins fréquemment, certains isolats ont une combinaison des deux profils avec une surexpression de tous les gènes à la fois (Lopez-Ribot *et al.*, 1998;Lyons et White, 2000;Saidane *et al.*, 2006;Sanglard *et al.*, 1995). La surexpression des gènes *CDR1*, *CDR2* et *MDR1* dans ces isolats n'est pas due à une

amplification de gène (i.e. élévation du nombre de copies du gène au niveau des chromosomes) ou a une stabilité élevée de l'ARN, mais plutôt à une intense activité transcriptionnelle (Lyons et White, 2000), ce qui suggérait l'implication d'un facteur agissant en *trans* (i.e. impliquant une molécule se liant au promoteur ces gènes). Des analyses des séquences régulatrices de *MDR1* dans une souche clinique surexprimant *MDR1* n'ont pas révélé la présence de mutations qui auraient pu altérer l'expression de ce gène, par contre l'insertion d'une fusion du promoteur de *MDR1* et d'un gène rapporteur dans la même souche menait à une expression constitutive et élevée du gène rapporteur, démontrant que la surexpression de *MDR1* dans les isolats cliniques est due à des mutations activatrices dans un facteur agissant en *trans* (Wirsching *et al.*, 2000a). En utilisant sensiblement la même approche, de Micheli *et al.* sont arrivés à la même conclusion pour *CDR1* et *CDR2* (de Micheli *et al.*, 2002). Donc de telles mutations activatrices dans des facteurs distincts agissant en *trans* expliqueraient pourquoi on a tendance à observer des profils distincts de surexpression des gènes *CDR1*, *CDR2* et *MDR1* dans les isolats résistants. Des études récentes ont démontré que c'est bien le cas, avec l'implication directe de mutations activatrices des facteurs de transcription Tac1p et Mrr1p dans la surexpression des gènes *CDR1/CDR2* et *MDR1*, respectivement (Coste *et al.*, 2006;Coste *et al.*, 2004;Dunkel *et al.*, 2008a;Morschhauser *et al.*, 2007). Ces deux facteurs de transcription font partie de la famille de régulateurs à doigts de zinc du type *zinc cluster* dont je détaillerai les propriétés et les fonctions au chapitre 6. Je détaillerai aussi la régulation transcriptionnelle des gènes *CDR1*, *CDR2* et *MDR1* par ces facteurs de transcription ainsi que par d'autres facteurs au chapitre 6 du présent ouvrage.

Les mutations activatrices dans *TAC1* et *MRR1* sont couplées à une perte d'hétérozygocité au niveau des chromosomes 5 et 3 du génome de *C. albicans*, respectivement (Coste *et al.*, 2006;Dunkel *et al.*, 2008a). Ces pertes d'hétérozygocité semblent se produire postérieurement à la sélection d'une mutation hétérozygote sur *TAC1* et *MRR1* (Coste *et al.*, 2006;Dunkel *et al.*, 2008a). D'ailleurs, la découverte de l'implication du facteur de transcription Tac1p dans la régulation des gènes *CDR1* et *CDR2*

est fortement tributaire de l'observation faite par Rustad *et al.* (2002) selon laquelle une perte d'hétérozygocité au niveau du locus *MTL* de *C. albicans*, qui se trouve sur le chromosome 5, est associée au développement de la résistance clinique aux azoles (Rustad *et al.*, 2002). Ce même groupe avait déjà démontré qu'une conversion de gène ou une recombinaison mitotique au niveau du locus de *ERG11*, qui se localise aussi sur le chromosome 5, est associée au développement de la résistance clinique aux azoles (White, 1997a). Une étude récente utilisant la technologie d'hybridation comparative de génomes (CGH, voir section I.6.2.) a démontré que les isolats cliniques résistants aux azoles possèdent plusieurs aneuploidies incluant un isochromosome 5 constitué de deux bras gauches identiques qui contiennent les loci de *TAC1* et *ERG11* (Selmecki *et al.*, 2006). Donc, il est clair que des réarrangements chromosomiques avec perte d'hétérozygocité au niveau du chromosome 5 sont liés au développement de la résistance clinique aux azoles, parce que les mutations sélectionnées dans *ERG11* (voir plus bas) et *TAC1* au cours de la pression sélective exercée par les traitements aux azoles deviennent homozygotes, avec pour conséquence une augmentation de l'impact de ces mutations sur le phénotype de résistance associé. Le même mécanisme semble se produire aussi au niveau du locus de *MRR1* (Dunkel *et al.*, 2008a). Néanmoins il est important de mentionner qu'en dépit du potentiel d'adaptation de *C. albicans* à la pression sélective des azoles conféré par l'aneuploïdie, on note la concomitance d'un déficit du taux de croissance (ou *fitness* en anglais) (Anderson, 2005). Ce qui fait que lors de la levée de la pression sélective médicamenteuse, *C. albicans* perd cette aneuploidie (par perte de chromosomes contenant les allèles mutés) et redevient sensible aux azoles (Anderson, 2005). Donc, on gardera en tête que la résistance aux azoles chez *C. albicans* est un phénomène réversible.

Chez les isolats résistants aux azoles surexprimant *CDR1* et *CDR2*, on note aussi une surexpression concomitante du gène *PDR16*, encodant une transférase de phosphatidylinositol putative (Saidane *et al.*, 2006). La fonction du gène *PDR16* a été mieux étudiée chez *S. cerevisiae*. Pdr16p est membre de la famille des homologues de SEC14 (SFH) (Griac, 2007). Ces derniers contiennent un domaine CRAL-TRIO (*cis-*

*retinal binding/triple function*) servant de poche hydrophobe pour lier les lipides (Griac, 2007). Ce domaine est aussi retrouvé dans plusieurs autres protéines liant les lipides. Pdr16p, comme les autres membres de la famille SFH, est une transférase de phosphatidylinositol non classique qui peut lier et transférer le phosphatidylinositol mais pas la phosphatidylcholine, à la différence des autres transférases du phosphatidylinositol qui peuvent transférer les deux types de phospholipides (Griac, 2007). *PDR16* confère la résistance aux azoles chez *S. cerevisiae* (van den Hazel *et al.*, 1999). L'expression de ce gène est régulée par Pdr1p/Pdr3p et des mutations activatrices dans ces deux régulateurs mènent à des niveaux élevés de transcrits de *PDR16* (do Valle Matta *et al.*, 2001; van den Hazel *et al.*, 1999). Les mécanismes suggérés pour expliquer la résistance médiée par Pdr16p chez *S. cerevisiae* incluent un changement de la structure/fonction de la membrane plasmique, un changement dans l'activité des protéines impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol ou un changement dans l'activité des transporteurs expulsant les azoles (van den Hazel *et al.*, 1999). La délétion de *PDR16* dans une souche clinique de *C. albicans* résistante aux azoles et surexprimant *CDR1*, *CDR2* et *PDR16* a montré que les souches mutantes sont deux fois plus susceptibles aux azoles que la souche parentale résistante (Saidane *et al.*, 2006). La réintroduction de *PDR16* dans la souche *pdr16Δ/pdr16Δ* a permis de restaurer la résistance, démontrant que *PDR16* est un autre déterminant important de la résistance clinique (Saidane *et al.*, 2006). La surexpression de *PDR16* dans une souche sensible aux azoles conférait la résistance par un facteur deux (Saidane *et al.*, 2006). Des études ultérieures ont montré que la surexpression de *PDR16* dans les isolats cliniques de *C. albicans* est due à une mutation agissant en *trans* (De Deken et Raymond, 2004), comme pour le cas de *CDR1* et *CDR2*. Les hypothèses formulées quant au mécanisme par lequel *PDR16* confère la résistance chez *S. cerevisiae* sont applicables chez *C. albicans*, mais il n'y a pas d'évidence expérimentale penchant vers un mécanisme plutôt qu'un autre.

*1.4.1.1.2. Surexpression ou amplification du gène ERG11 encodant la cible des azoles menant à un dosage élevé d'Erg11p*



La surexpression hétérologue d'*ERG11* de *C. albicans* chez *S. cerevisiae* confère la résistance aux azoles (Lamb *et al.*, 1997). La surexpression d'*ERG11* chez *C. albicans*, en utilisant un vecteur répliatif, confère une résistance modérée aux médicaments azolés (Du *et al.*, 2004). La surexpression d'*ERG11* aurait pour conséquence une élévation des niveaux de l'enzyme dans la cellule, d'où le besoin de quantités élevées en azoles pour inhiber son activité. D'autre part, des études chez *S. cerevisiae* ont montré qu'un mutant *erg11Δ/erg11Δ* n'est pas viable sous des conditions aérobies (Bard *et al.*, 1993). Ceci est probablement dû au fait que, sous ces conditions, *S. cerevisiae* utilise le sentier de biosynthèse de l'ergostérol pour s'approvisionner en composés stérols, qui requiert un enzyme Erg11p fonctionnel. Par contre, chez *C. albicans* la délétion d'*ERG11* ne semble pas létale sous aérobiose (Sanglard *et al.*, 2003). Cette observation va à l'encontre de l'inhibition d'Erg11p par les azoles, car les mutants *erg11* devraient phénotypier une inhibition par ces médicaments. On suspecte donc la présence d'un mécanisme compensatoire ou la sélection de mutation autre qu'*erg11* dans ce mutant (Sanglard *et al.*, 2003). Vu que le mutant *erg11* a été construit par passage sur un milieu contenant de l'Amphotéricine B, il est possible que d'autres mutations aient été sélectionnées lors de ce processus et qui aient conféré la croissance du mutant en dépit de l'absence d'*ERG11*, comme une mutation dans *ERG3* (Sanglard *et al.*, 2003) (voir plus bas). Toujours est-il que toutes ces observations indiquent qu'une modification du dosage d'*ERG11* dans la cellule affecte la susceptibilité aux azoles.

Plusieurs isolats cliniques résistants aux azoles ont des taux de transcrits élevés d'*ERG11* comparativement aux souches parentales sensibles (Coste *et al.*, 2007; Dunkel *et al.*, 2008b; Selmecki *et al.*, 2006; Selmecki *et al.*, 2008; White, 1997a). Dans un de ces isolats, Dunkel *et al.* (2008) ont identifié une mutation gain de fonction du facteur de transcription Upc2p (Dunkel *et al.*, 2008b), appartenant à la famille des facteurs de transcription *zinc cluster* (voir chapitre 6). Upc2p est le régulateur majeur de la synthèse de l'ergostérol chez *C. albicans* et contrôle l'expression du gène *ERG11* en plus d'autres gènes

de la famille *ERG* (MacPherson *et al.*, 2005; Silver *et al.*, 2004). La délétion d'*UPC2* dans cette souche a aboli à la fois la surexpression d'*ERG11* et la résistance aux azoles (Dunkel *et al.*, 2008b). Par contre, cette souche exprimait à des taux détectables le transporteur Mdr1p, ce qui n'exclut pas la possibilité que la résistance médiée par Upc2p implique au moins en partie *MDR1*, à part *ERG11*. Une régulation à la baisse d'*ERG11* dans cette souche, par un promoteur inductible, permettrait de quantifier la contribution d'Erg11p dans la résistance. Par ailleurs, une étude par Coste *et al.* a montré qu'une augmentation des transcrits d'*ERG11* par un facteur 8 dans une souche clinique résistante aux azoles est associée à une augmentation de la résistance par un facteur 2, en l'absence de toute autre altération qui aurait causé cette hausse de résistance (Coste *et al.*, 2007). L'augmentation des transcrits d'*ERG11* dans cette situation corrèle avec la présence d'isochromosome 5 (bras gauche) qui contient le locus d'*ERG11* (Coste *et al.*, 2007). Une étude récente a montré un lien direct entre l'expression élevée d'*ERG11* et la présence d'isochromosome 5 dans un isolat clinique résistant (Selmecki *et al.*, 2008). Ainsi, dans les souches cliniques résistantes aux azoles, un dosage élevé d'*ERG11* peut être la conséquence d'une mutation activatrice (gain de fonction) d'Upc2p et/ou de la formation d'un isochromosome 5.

#### **I.4.1.2. Mutations dans la cible des azoles, la protéine Erg11p**

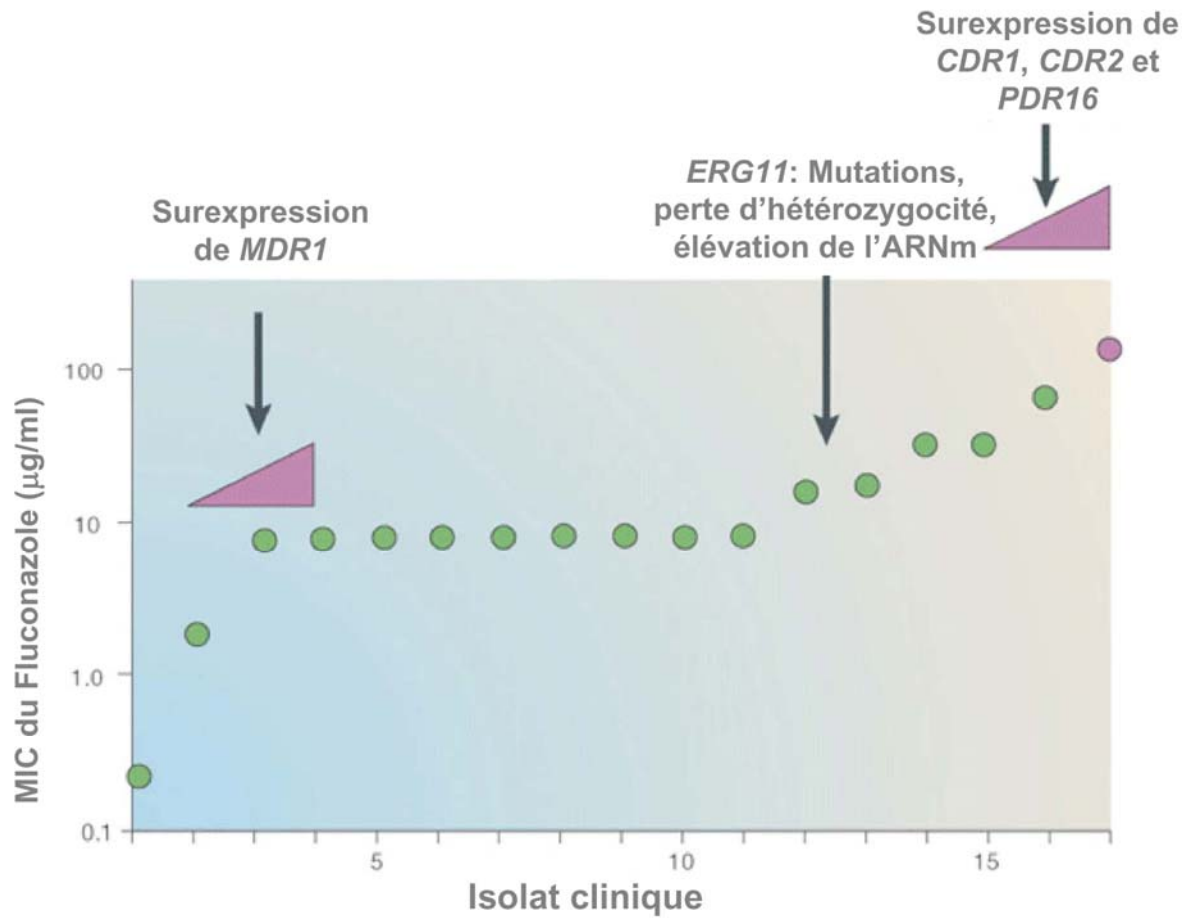
Une cause fréquente de la résistance aux médicaments est la sélection de mutations dans la cible du médicament. Il existe au moins 12 mutations dans Erg11p qui confèrent la résistance clinique aux azoles chez *C. albicans* (Akins, 2005). Certaines mutations altèrent l'attachement du noyau hème, causant une activité déméthylase réduite, alors que d'autres altèrent l'affinité des azoles sans affecter l'attachement du noyau hème ou la fonction déméthylase (Akins, 2005). Par ailleurs, on a observé qu'à part l'acquisition de mutations dans Erg11p, il y avait souvent d'autres altérations qui affectaient le gène comme une augmentation du nombre de copies ou une perte d'hétérozygocité (White *et al.*, 1998). C'est pour cela que la démonstration du lien direct entre ces mutations et la résistance aux azoles ont été le plus souvent adressées dans un contexte hétérologue, par expression chez

*S. cerevisiae* où de tels évènements sont rares (Akins, 2005; Morschhauser, 2002). Certaines mutations, e.g. R467K et G464S (Franz *et al.*, 1998; White, 1997b), se retrouvent à proximité du site de liaison du noyau hème ce qui causerait des altérations structurales ou fonctionnelles de la liaison au noyau hème. Il faut mentionner que, d'une façon similaire au processus de résistance aux azoles impliquant les mutations dans *TAC1*, un changement d'un état hétérozygote à homozygote pour les mutants *ERG11* est associé avec une augmentation du phénotype de la résistance. C'est pour cela que les investigations initiales des mécanismes de résistance via des altérations dans *ERG11* ont toujours coïncidé avec la présence d'évènements de perte d'hétérozygotie et d'augmentation du nombre de copies du locus d'*ERG11* (White *et al.*, 1998). Avec la découverte que la résistance aux azoles est accompagnée de phénomènes de perte d'hétérozygotie, d'aneuploidies et de formation d'isochromosomes touchant le chromosome 5, sur lequel se situent les loci de *TAC1* et *ERG11*, on a pu expliquer pourquoi les altérations dans ces deux gènes déterminants de la résistance clinique sont souvent concomitantes (Coste *et al.*, 2007; Selmecki *et al.*, 2006; Selmecki *et al.*, 2008; White, 1997a; White *et al.*, 1998).

#### **I.4.1.3. Des mécanismes multiples contribuent au développement de la résistance clinique aux azoles de façon échelonnée**

L'évolution de la résistance clinique aux azoles chez les patients est un processus échelonné impliquant les mécanismes qui sont cités ci-haut. Dans une étude de cas, une série d'isolats de *C. albicans* ont été obtenus au cours du traitement au fluconazole d'un patient séropositif pour le VIH souffrant d'une candidose oropharyngée (Figure I-9) (White, 1997a; White *et al.*, 1998). La MIC de fluconazole administré augmentait avec le temps, de façon concomitante avec l'accumulation des mécanismes de résistance qui, ensemble, mènent à une résistance élevée (Figure I-9). L'examen du niveau d'expression des effecteurs de la résistance aux azoles ainsi que des altérations moléculaires et génétiques ayant eu lieu dans les isolats a permis de connaître à quel stade du traitement est associée chaque altération (Figure I-9). Au début du traitement, l'élévation de la MIC de

l'isolat 1 à l'isolat 2 est fort probablement le résultat de l'acquisition d'une mutation hétérozygote activatrice dans le gène du facteur de transcription *MRR1*, puisqu'on a détecté une augmentation des transcrits de *MDR1* dans la souche 2. L'augmentation de la MIC entre la souche 2 et la souche 3 peut être expliquée par une perte d'hétérozygocité touchant le gène muté de *MRR1* au chromosome 3, la mutation devenant ainsi homozygote. La semi-dominance des mutations dans *MRR1* supporte cette hypothèse (Morschhauser *et al.*, 2007). La même séquence semble être produite de l'isolat 12 à 14 avec la sélection d'une mutation dans *ERG11* suivie d'une perte d'hétérozygocité. L'augmentation des transcrits d'*ERG11* dans ces souches pourrait être due à une mutation activatrice dans *Upc2p* ou l'augmentation du nombre de copies du chromosome 5. Entre les isolats 15 et 16, il est fort probable qu'une mutation activatrice du facteur de transcription *Tac1p* a eu comme conséquence l'élévation des transcrits de *CDR1* et *CDR2*. On note aussi des transcrits élevés de *PDR16* dans ces deux souches (Saidane *et al.*, 2006). Une étude récente confirme que les deux allèles de *TAC1* ont acquis deux mutations distinctes différentes (Coste *et al.*, 2007). La surexpression de *PDR16* dans cette souche est concomitante à celle de *CDR1* et *CDR2* et est fort probablement la conséquence d'une mutation dans un facteur agissant en *trans* (De Deken et Raymond, 2004; Saidane *et al.*, 2006). L'élévation de la MIC entre les souches 16 et 17 ne peut être le résultat d'une perte d'hétérozygocité et/ou la formation d'isochromosome 5 car ces altérations semblent être absentes (Coste *et al.*, 2007). L'analyse des allèles des gènes *MRR1*, *TAC1* et *UPC2* ainsi que de l'état polymorphique précis des chromosomes 5 et 3 (contenant le locus de *MRR1*) permettrait de mieux caractériser les mécanismes de résistance ayant eu lieu dans les différents isolats. De plus, la détermination des cibles transcriptionnelles des facteurs de transcription impliqués dans la résistance clinique aux azoles permettrait de mieux comprendre le réseau transcriptionnel qui orchestre la résistance aux azoles dans de telles souches cliniques.



**Figure I-9.** Représentation graphique des profils de résistance au fluconazole d'une série d'isolats cliniques de *C. albicans* prélevés d'un patient séropositif au VIH avec des épisodes récurrents de candidose oropharyngée sous traitement au fluconazole (Redding *et al.*, 1994). Les isolats (au nombre de 17) sont indiqués sur l'axe des  $x$  dans l'ordre correspondant à la date de leur isolation respective sur une période de deux ans. Les doses de fluconazole administrées s'échelonnent de 100 mg/jour à 800 mg/jour. Les MIC<sub>90%</sub> (MIC) du fluconazole des isolats correspondants sont indiquées sur l'axe des  $y$  à l'échelle logarithmique. Les mécanismes moléculaires associés aux stades d'augmentation de la MIC sont indiqués en haut du graphe. Figure extraite et adaptée de (Anderson, 2005; White, 1997a).

#### I.4.2. La résistance aux échinocandines

Il faut noter que la prévalence de la résistance aux échinocandines paraît faible, voire sporadique (Laverdiere *et al.*, 2006; Morris et Villmann, 2006b; Morris et Villmann, 2006a), relativement à la résistance aux azoles. Comme pour les azoles, un des mécanismes de résistance par lequel les cellules peuvent minimiser l'impact d'un antifongique est l'acquisition de mutations dans la cible du médicament qui altère l'action inhibitrice de ce dernier. Le mécanisme le plus commun (voire le seul) de résistance clinique aux échinocandines chez *C. albicans* est l'acquisition de mutations dans la  $\beta$ -1,3-D-glucan synthase Fks1p, cibles des échinocandines (Perlin, 2007). À la différence de la résistance aux azoles, il n'y aurait pas de mécanisme de résistance clinique aux échinocandines faisant intervenir des transporteurs, même si une étude a montré un lien entre une susceptibilité réduite à la caspofungine et la surexpression de *CDR2* avec une élévation modérée de la MIC (Schuetzer-Muehlbauer *et al.*, 2003). Des données dans notre laboratoire ont montré, par contre, que la délétion de *CDR1* ou *CDR2* dans une souche surexprimant ces deux gènes n'a pas d'effet sur la susceptibilité à la caspofungine (Sarah Tsao et Martine Raymond). D'ailleurs, les échinocandines ne sont pas de bons substrats pour les transporteurs à médicaments (Perlin, 2007).

Des études chez *S. cerevisiae* combinées à d'autres chez *C. albicans* ont identifié des mutations dans Fks1p qui ont permis de cartographier une région dans Fks1p de *C. albicans* appelée « hot-spot1 (HS1) », délimitée par la phénylalanine à la position 641 et la proline à la position 649 (Park *et al.*, 2005) (Figure I-10A). Cette région est hautement conservée dans la famille des protéines Fks (Figure I-10B). Les analyses d'isolats cliniques de *C. albicans* obtenus de patients qui étaient réfractaires aux traitements par les échinocandines montraient des substitutions au niveau de l'acide aminé sérine à la position 645 de Fks1p (Park *et al.*, 2005). Chez un patient, des souches de *C. albicans* isolées de sites différents possédaient les mutations distinctes S645F et S645P dans Fks1p, conférant

une susceptibilité réduite à la caspofungine (Park *et al.*, 2005). Des études génétiques impliquant un autre mutant de *S. cerevisiae* ayant une mutation par substitution de l'arginine à la position 1357 de Fks1p par la sérine (R1357S) ont permis d'identifier une seconde région conférant la résistance à la caspofungine appelée « hot-spot 2 » (HS2) (Park *et al.*, 2005) (Figure I-10A).

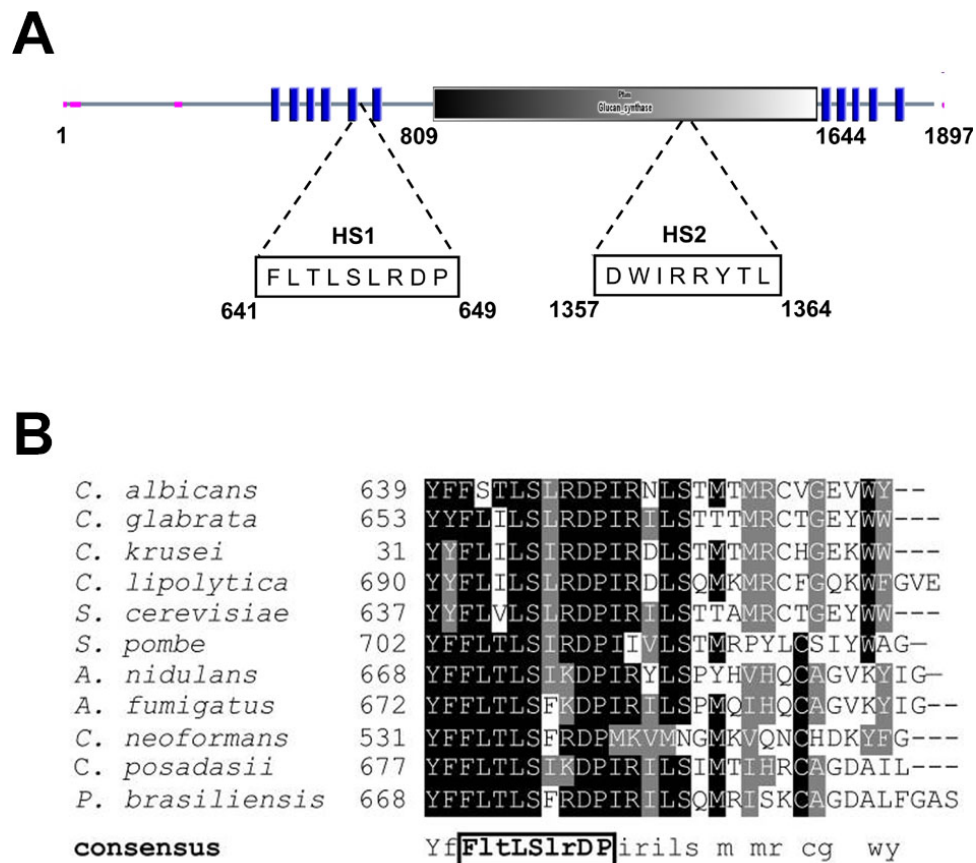


Figure I-10. Les mutations conférant la résistance aux échinocandines chez les isolats cliniques de *C. albicans* sont localisées au niveau des régions « hot spots » HS1 et HS2 de Fks1p. **A.** Représentation schématique (tirée et adaptée d'une analyse SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) de la protéine Fks1p de *C. albicans*. La protéine de 1897 acides aminés est formée de 11 domaines transmembranaires (rectangles bleus) et d'un domaine glucane synthase (rectangle gris, région délimitée par les acides aminés aux positions 809 et

1644). Les régions « hot spot 1 » (HS1, délimités par l'intervalle 641-649) et « hot spot 2 » (HS2, délimité par l'intervalle 1357-1364) (encadrés) sont caractérisées par la haute fréquence de mutations conférant la résistance aux échinocandines, notamment à la position S645 (HS1) et R1361 (HS2). **B.** Alignement des séquences en acides aminés de régions HS1 (dont le consensus est encadré en bas du panneau) de Fks1p provenant des espèces fongiques indiquées à gauche du panneau. Les acides aminés identiques sont colorés en noir alors que les acides aminés similaires sont colorés en gris. Le panneau B est tiré et adapté de (Perlin, 2007).

Plusieurs mutations ont été observées dans les régions « hot-spot » de Fks1p d'isolats cliniques de *C. albicans* qui présentent une susceptibilité réduite à la caspofungine. Ces mutations incluent des substitutions d'acides aminés non-conservés dans HS1 (Phe641, Leu642, Thr643, Ser645, Arg647, Asp648, Pro649) et dans HS2 (Arg1361). Alors que les mutations dans l'extrémité C-terminale de HS1 montrent le phénotype le moins prononcé, les mutations les plus fréquemment identifiées affectent la Sérine à la position 645 de HS1 (S645P, S645F ou S645Y) (Balashov *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2005). Ces mutations sont dominantes, présentant un phénotype de résistance que ce soit dans un contexte homozygote ou hétérozygote chez *C. albicans*. Les souches affectées par ces mutations montrent une résistance croisée à la micafungine ainsi que l'anidulafungine. Ces souches demeurent par contre susceptibles aux azoles et aux polyènes.

### **I.4.3. La résistance aux polyènes**

La résistance clinique aux polyènes est rare. Ceci est particulièrement dû à la nature fongicide de cette classe d'antifongiques (Ellis, 2002). On peut deviner que toute perturbation de la composition des membranes en ergostérol, notamment sa déplétion ou sa substitution par des analogues, peut mener à une résistance aux polyènes puisque leur mode d'action requiert l'ergostérol membranaire. Par contre, en clinique, ces phénomènes sont rarement observés. On a quand-même rapporté une résistance croisée aux azoles et à l'amphotéricine B dans une souche clinique possédant une mutation perte de fonction dans



Erg3p, la  $\Delta 5,6$  desaturase agissant en aval de Erg11p (Kelly *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1997; Nolte *et al.*, 1997) (Figure I-7A). Des mutations dans Erg3p conférant la résistance aux azoles, par enrichissement de dérivés précurseurs d'ergostérol non toxiques pour la cellule, confèrent aussi la résistance aux polyènes car l'ergostérol est remplacé par des dérivés ayant une faible affinité pour les polyènes (Akins, 2005). Il existe, par ailleurs, des champignons intrinsèquement résistants aux polyènes comme *Trichosporon beigeli*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *Pseudallescheria boydii* et certains mycètes pygmentés (Ellis, 2002).

#### **I.4.4. La résistance à la 5-fluorocytosine**

La résistance primaire et secondaire à la 5-fluorocytosine est un phénomène courant. Les estimations suggèrent que 10% des isolats cliniques de *C. albicans* sont intrinsèquement résistants alors que 30% développent une résistance secondaire (White *et al.*, 1998). Mais on comprend que l'importance de la résistance à la 5-fluorocytosine, du point de vue clinique, est limitée par le fait que 5-fluorocytosine possède un spectre très restreint d'activité impliquant uniquement les espèces *Candida* et *C. neoformans* et n'est utilisée qu'en combinaison avec d'autres classes d'antifongiques comme les polyènes. Des études récentes ont montré le rôle de l'enzyme encodée par *FURI*, l'uracile phosphorybosyl transférase, dans la résistance clinique à la 5-fluorouracile. La plupart des isolats cliniques sélectionnent la mutation inactivatrice C301T de *FURI* (correspondant à la substitution R101C de Fur1p) qui altère un acide aminé conservé et est homozygote dans les souches résistantes et hétérozygote dans les souches avec un phénotype de résistance intermédiaire (Dodgson *et al.*, 2004). Cette mutation est remarquablement fréquente dans les isolats cliniques résistants à la 5-fluorocytosine de l'embranchement I (i.e. *clade I* en anglais), suggérant que c'est la mutation majeure conférant la résistance (Dodgson *et al.*, 2004). Le principe du mécanisme de résistance impliquant Fur1p repose sur l'incapacité de convertir la 5-fluorocytosine en dérivé toxique fluorouracile monophosphate en raison de l'altération de la fonction de Fur1p par la mutation R101C (Akins, 2005). L'existence d'un

autre mécanisme de résistance à part l'inactivation de Fur1p est suggérée par une étude identifiant une mutation dans la cytosine perméase d'un isolat clinique, mais le lien direct entre cette altération et la résistance n'a pas été démontré (Hope *et al.*, 2004).

## **I.5. Contrôle transcriptionnel des gènes effecteurs de la résistance aux azoles**

Nous avons vu plus haut que l'expression des gènes effecteurs de la résistance clinique aux azoles est sous le contrôle de facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille *zinc cluster* chez *C. albicans*. Nous avons vu aussi, plus précisément, l'importance du régulateur Mrr1p dans le contrôle transcriptionnel de *MDR1*. Des études antérieures dans notre laboratoire ont aussi révélé l'implication d'un autre facteur de transcription, appelé Cap1p, dans la régulation de ce gène (Alarco et Raymond, 1999), mais jusqu'à présent aucune étude n'a démontré son implication dans la résistance clinique (i.e. l'existence d'altérations affectant Cap1p ou affectant des composantes contrôlant son activité ayant lieu dans des souches de *C. albicans* isolées de patients). Cap1p est un facteur de transcription de la famille *basic-leucine zipper* (bZIP) et est l'homologue fonctionnel de Yap1p chez *S. cerevisiae* (Alarco *et al.*, 1997; Alarco et Raymond, 1999). Je vais, d'abord, détailler la structure et fonctions des facteurs de transcription *zinc cluster* chez *C. albicans*, ensuite résumer les fonctions de Cap1p et son rôle dans la régulation de l'expression du gène *MDR1*.

### **I.5.1. Les facteurs de transcription à doigts de zinc du type *zinc cluster* : Structure et fonctions chez *Candida albicans***

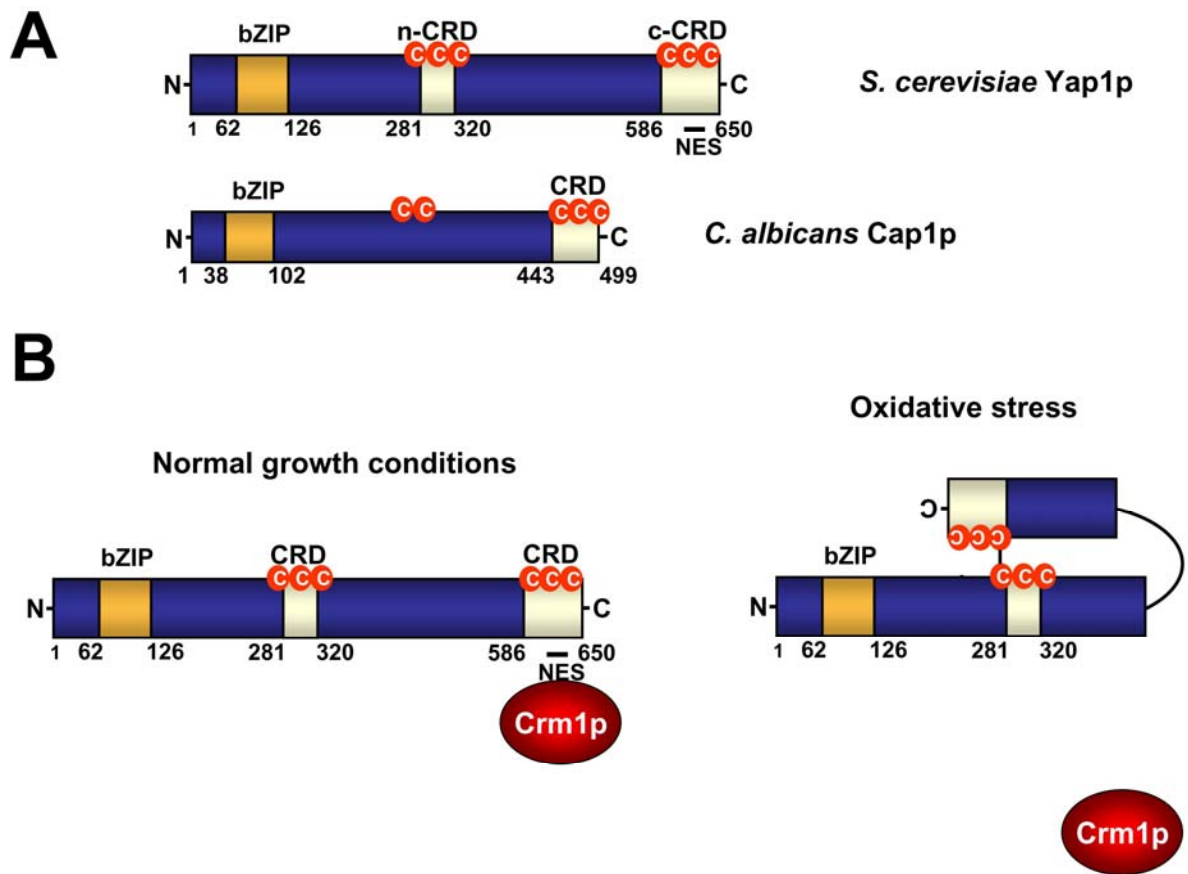
Plusieurs études, chez *S. cerevisiae* notamment, ont montré que la famille des facteurs de transcription *zinc cluster* est impliquée dans le contrôle transcriptionnel de gènes impliqués dans une variété de processus métaboliques et de mécanismes de réponse aux stress, comme la carence en éléments nutritifs ou la présence de produits toxiques et

xénobiotiques (MacPherson *et al.*, 2006). Certains régulateurs *zinc cluster* chez *S. cerevisiae*, comme Pdr1p, Pdr3p, Yrr1, Yrm1 et Pdr8p, contrôlent la résistance aux antifongiques et aux dérivés xénobiotiques (MacPherson *et al.*, 2006). Cette famille de régulateurs est exclusivement fongique et le génome de *C. albicans* en encode 78 membres (Braun *et al.*, 2005). Cette section de la thèse est structurée sous la forme d'une revue de la littérature sur les facteurs de transcription de la famille *zinc cluster* chez *C. albicans*, récapitulant leur structure et fonctions (voir chapitre 6).

### **I.5.2. Régulation de l'expression du gène *MDR1* par le facteur de transcription bZIP Cap1p**

Cap1p est l'homologue fonctionnel du facteur de transcription Yap1p chez *S. cerevisiae* (Alarco *et al.*, 1997; Alarco et Raymond, 1999). Yap1p est un régulateur majeur de la réponse au stress oxydatif chez la levure à bourgeon et est membre de la famille bZIP des facteurs de transcription, tout comme l'oncogène *c-jun* chez les mammifères (Moye-Rowley *et al.*, 1988; Moye-Rowley *et al.*, 1989). Yap1p se lie via son domaine amino-terminal bZIP (Figure I-11A) à des séquences de reconnaissance appelées Yap1 recognition elements (YRE), TTA(C/G)T(A/C)A, retrouvées dans les promoteurs de ses gènes cibles (Nguyen *et al.*, 2001) et contrôle l'expression de gènes encodant la majorité des antioxydants et des thiol-oxydoréductases comme la glutathione réductase *GLR1* et la thiorédoxine réductase *TRR1* (Herrero *et al.*, 2007; Moye-Rowley, 2003). Yap1p est aussi requis pour la réponse au stress induit par les métaux comme le cadmium et peut-être activé par des composés chimiques comme le diamide, des agents antifongiques comme le bénomyl, les radiations ionisantes, des métabolites endogènes toxiques comme le méthylglyoxal (Alarco *et al.*, 1997; Maeta *et al.*, 2004; Molin *et al.*, 2007). Notamment, une étude de notre laboratoire a montré que Yap1p régule l'expression de *FLR1*, encodant l'homologue fonctionnel de *MDR1* de *C. albicans* (Alarco *et al.*, 1997).

Des études ayant pour but de décortiquer le mécanisme d'activation de Yap1p ont montré que Yap1p utilise un mécanisme remarquable, exploitant l'oxydation de l'acide aminé cystéine, pour réguler l'expression de ses gènes cibles en réponse au stress oxydatif. Yap1p possède des domaines senseurs des niveaux d'oxydants dans la cellule, représentés par des domaines riches en résidus cystéine (cysteine-rich domain, CRD, Figure I-11A) : un domaine CRD retrouvé au centre de la protéine (**n**-CRD, **n** pour N-terminal) et un autre à l'extrémité C-terminale (**c**-CRD) (Figure I-11A). Le domaine C-terminal coïncide avec la séquence signal d'export du noyau (Nuclear Export Signal, NES) qui médie l'interaction avec l'exportine nucléaire Crm1p (Figure I-11B). En dehors de toute condition activatrice de Yap1p, ce dernier se retrouve localisé principalement au niveau du cytoplasme. Cette localisation cytoplasmique est déterminée par l'export constitutif de Yap1p du noyau qui est plus actif que l'import au noyau, grâce notamment à la fonction de l'exportine Crm1p. En réponse au stress oxydatif, un pont disulfure est généré entre la cystéine 303 (n-CRD) et la cystéine 598 (c-CRD), masquant ainsi la NES et prévenant l'interaction avec Crm1p ce qui mène à une rétention nucléaire et l'activation de l'expression des gènes cibles de Yap1p (Figure I-11B) (Herrero *et al.*, 2007; Kuge *et al.*, 1997; Kuge *et al.*, 1998; Kuge *et al.*, 2001).



**Figure I-11.** Mécanisme d'activation de Yap1p chez *S. cerevisiae*. **A.** Représentation schématique (barres bleues) des structures primaires des protéines Yap1p de *S. cerevisiae* (650 acides aminés) et Cap1p de *C. albicans* (499 acides aminés). Le domaine de liaison à l'ADN du type *basic leucine-zipper* (bZIP, rectangle jaune-orange) sont délimitées par les positions des acides aminés correspondants indiqués en bas. Les domaines riches en cystéine (rectangles blancs) sont retrouvés à la partie centrale (n-CRD) et à l'extrémité C-terminale (c-CRD) de la protéine Yap1p. Cap1p possède un domaine CRD à l'extrémité C-terminale et deux cystéines conservées (sphères rouges) à la partie centrale. Le domaine c-CRD inclut un signal d'export nucléaire (NES) médiant l'interaction avec l'exportine Crm1p (Herrero *et al.*, 2007). **B.** Panneau de gauche, Durant des conditions normales de croissance, Yap1p est exporté en dehors du noyau suite à l'interaction du signal NES avec Crm1p. Panneau de droite, Lors d'un stress oxydatif, l'oxydation des cystéines 598 du domaine c-CRD et cystéine 303 du domaine n-CRD mène à la formation d'un pont disulfure qui prévient l'interaction de l'exportine Crm1p avec le signal NES. Ceci a pour conséquence une rétention nucléaire et l'augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles de Yap1p (Herrero *et al.*, 2007).

La première caractérisation de Cap1p a été effectuée dans notre laboratoire, avec la démonstration que *CAP1* conférait la résistance au fluconazole en le surexprimant chez *S. cerevisiae* (Alarco *et al.*, 1997). La résistance au fluconazole est médiée par *FLR1* chez *S. cerevisiae* qui encode l'homologue fonctionnel de Mdr1p. *CAP1* complétait la fonction de *YAP1* dans des cellules *yap1Δ* (Alarco *et al.*, 1997). La délétion de *CAP1* dans une souche sensible aux azoles de *C. albicans* et la réintroduction de l'allèle dans la souche mutée n'ont pas d'effet sur la susceptibilité à cet antifongique (Alarco et Raymond, 1999). Par contre, l'expression d'une version tronquée de Cap1p (Cap1p-TR) isolée dans le criblage chez *S. cerevisiae* ne possédant pas les derniers 165 acides aminés C-terminaux, incluant le domaine CRD équivalent du c-CRD de Yap1p, conférait une résistance significative au fluconazole comparativement à l'expression de l'allèle du type sauvage (Alarco et Raymond, 1999). Cette résistance corrèle avec une surexpression constitutive de *MDR1* (Alarco et Raymond, 1999), suggérant que ce gène effecteur de la résistance clinique aux azoles est une cible directe ou indirecte de Cap1p et que *CAP1-TR* est une version hyperactive de Cap1p. Des études, ayant pour but de comprendre la régulation transcriptionnelle de *MDR1*, ont démontré l'importance de séquences ressemblant à des YREs dans l'induction de l'expression du gène *MDR1* par le benomyl ou le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Harry *et al.*, 2005; Hiller *et al.*, 2006; Rognon *et al.*, 2006). En particulier, la présence de deux séquences TTA(C/G)TAA faisant partie des éléments de régulation agissant en *cis* du promoteur de *MDR1*, localisés entre -561 et -520 par rapport au codon initiateur de *MDR1*, étaient requis pour l'induction de *MDR1* de façon dépendante de *CAP1* suite au traitement par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rognon *et al.*, 2006).

Plusieurs caractéristiques de Cap1p de *C. albicans* convergent vers l'idée que cette protéine subit le même mécanisme d'activation que celui de Yap1p chez *S. cerevisiae*. Les structures primaires de Cap1p et Yap1p sont similaires, avec une homologie de séquence significative, surtout à la partie C-terminale de la protéine, et la conservation des domaines fonctionnels clés (Figure I-11A) (Alarco *et al.*, 1997). La délétion de *CAP1* dans

une souche de laboratoire de *C. albicans*, tout comme une délétion de *YAPI* dans *S. cerevisiae*, confère une hypersensibilité au cadmium, à l'oxyde de nitroquinoline (4-NQO) et à la 1,10-phenanthroline, ce qui renforce la démonstration que ces deux protéines sont fonctionnellement homologues (Alarco et Raymond, 1999). Une étude a aussi démontré que la localisation nucléaire de Cap1p dépendait du stress oxydatif, avec une localisation diffuse dans toute la cellule en l'absence de traitement et une localisation nucléaire en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhang *et al.*, 2000). La mutation de la cystéine conservée à la position 477 de Cap1p (*C477A CAPI*), qui équivaut à la cystéine 629 de Yap1p, phénocopie la mutation *CAPI-TR*, confirmant l'importance de l'intégrité du domaine CRD dans la réponse au stress oxydatif (Alarco et Raymond, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Tout comme lors de l'expression de *CAPI-TR*, l'expression de *C477A CAPI* mène à des niveaux élevés des transcrits de la cible *GLRI* (Alarco et Raymond, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Ces résultats démontrent que *CAPI-TR*, tout comme *C477A CAPI*, sont des versions hyperactives de *CAPI*. Donc, par analogie au mécanisme d'activation de Yap1p chez *S. cerevisiae*, on pouvait émettre l'hypothèse que la perte du domaine CRD de Cap1p ne permet plus l'accessibilité de l'exportine Crm1p, ce qui a pour conséquence une rétention nucléaire et une augmentation de l'activité transcriptionnelle.

## **I.6. Le génome de *Candida albicans***

*Candida albicans* est le premier champignon pathogène dont le génome a été entièrement séquencé (Jones *et al.*, 2004). Cet effort a commencé très tôt, juste après la première publication du séquençage d'un génome fongique, celui de *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996). Comparativement au génome de *S. cerevisiae*, le génome de *C. albicans* est complexe. Tout d'abord, l'organisme est diploïde et est surtout fortement hétérozygote : les deux allèles de plusieurs gènes sont hautement polymorphiques, ce qui fait que l'assemblage des séquences peut les regrouper en deux contigs différents (Jones *et al.*, 2004). La disponibilité de la séquence du génome de *C. albicans* a sans aucun doute permis de faire avancer nos connaissances sur la biologie de ce pathogène opportuniste, sa

pathogénèse et les mécanismes de sa réponse aux traitements antifongiques. De nouveaux gènes, non attendus, comme les loci *MTL* ont été identifiés (Hull et Johnson, 1999). Des biopuces à ADN ont été créées pour examiner les variations du transcriptome sous différentes conditions (i.e. *expression microarrays*). Les biopuces ont aussi servi à mettre en évidence le phénomène de perte d'hétérozygoté durant la pathogénèse ou dans les isolats cliniques résistants aux antifongiques (i.e. *comparative genomic hybridizations*, CGH). Les biopuces ont enfin permis de créer un outil permettant d'identifier, *in vivo*, les sites de liaison de protéines de *C. albicans* se liant à l'ADN en exploitant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (i.e. *chromatin immunoprecipitation-on-chip*, ChIP-chip). Avant de discuter des différentes technologies de génomique fonctionnelle appliquées à *C. albicans*, je vais présenter un bref historique ainsi qu'un aperçu de la caractérisation du génome de *C. albicans*.

### **I.6.1. Caractérisation du génome de *C. albicans***

Le séquençage du génome de *C. albicans* a commencé en 1996 avec un projet pilote de séquençage à l'Institut Sanger au Royaume Uni (Tait *et al.*, 1997) et la production de la carte génétique du chromosome 7 (Chibana *et al.*, 1998). Un assemblage préliminaire (version 4) a été produit en 1999, suivi de la version 6 en 2000 basée sur environ 313,000 lectures de séquence qui ont été assemblées en 1,213 contigs d'une taille d'au moins 2 kilobases avec une annotation préliminaire de 9,168 cadres de lectures ouverts (Nantel, 2006). Ces publications de données de séquençage ont induit une véritable explosion d'études de génomique fonctionnelle avec la fabrication de biopuces à ADN, la création de bibliothèques de délétion systématique de gènes et de mutagenèse par transposons à l'échelle du génome (Bruno et Mitchell, 2004; De Backer *et al.*, 2001; Roemer *et al.*, 2003; Uhl *et al.*, 2003). En 2004, le Centre des technologies du génome de Stanford, aux Etats-Unis, a publié le séquençage du génome de la souche SC5314 qui reste jusqu'à aujourd'hui la souche référence pour les études sur *C. albicans* (Jones *et al.*, 2004). Cette souche a été choisie pour son utilisation fréquente en analyse moléculaire et les tests de virulence et pour



le profil électrophorétique normal de son caryotype (Jones *et al.*, 2004) Ce projet de séquençage a permis la production d'un assemblage diploïde, appelé Assemblage 19, constitué de 412 supercontigs des paires homologues représentant la variabilité allélique du génome de *C. albicans*, différenciés par la nomenclature Contig19-1xxxx et Contig19-2xxxx. L'annotation du génome de *C. albicans* a été publiée en 2005 et a révélé plusieurs propriétés du génome de *C. albicans* (Braun *et al.*, 2005). Le nombre de cadres de lectures confirmés suite à l'annotation du génome basée sur l'assemblage 19 s'élève à 6,354 gènes, dont 215 contenant au moins un intron, 190 qui sont tronqués car localisés aux extrémités et 80 qui semblent être des duplicatas étant localisés dans des régions de chevauchement de contigs (Braun *et al.*, 2005). Une nomenclature de gène similaire à celle de *S. cerevisiae* a été adoptée et une base de données officielle des gènes de *C. albicans* a été créée, appelée *Candida* Genome Database (CGD, [www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)). En 2007, la dernière version du séquençage du génome, l'assemblage 21, a été publiée (van Het *et al.*, 2007). Cet assemblage repose sur l'assignation des supercontigs de l'assemblage 19 à des chromosomes individuels purifiés par électrophorèse en champ pulsé et hybridés à des biopuces à ADN. Il contient 15.845 mégabases (Mb) de 8 séquences linéaires d'ADN représentant les 8 chromosomes de *C. albicans*. C'est un assemblage haploïde, contrairement à l'assemblage 19 diploïde. Ce sont les régions des Contig19-1xxxx qui ont été utilisées pour assigner les chromosomes. Donc l'assemblage 21 ne fournit pas d'information sur l'hétérozygoté (van Het *et al.*, 2007).

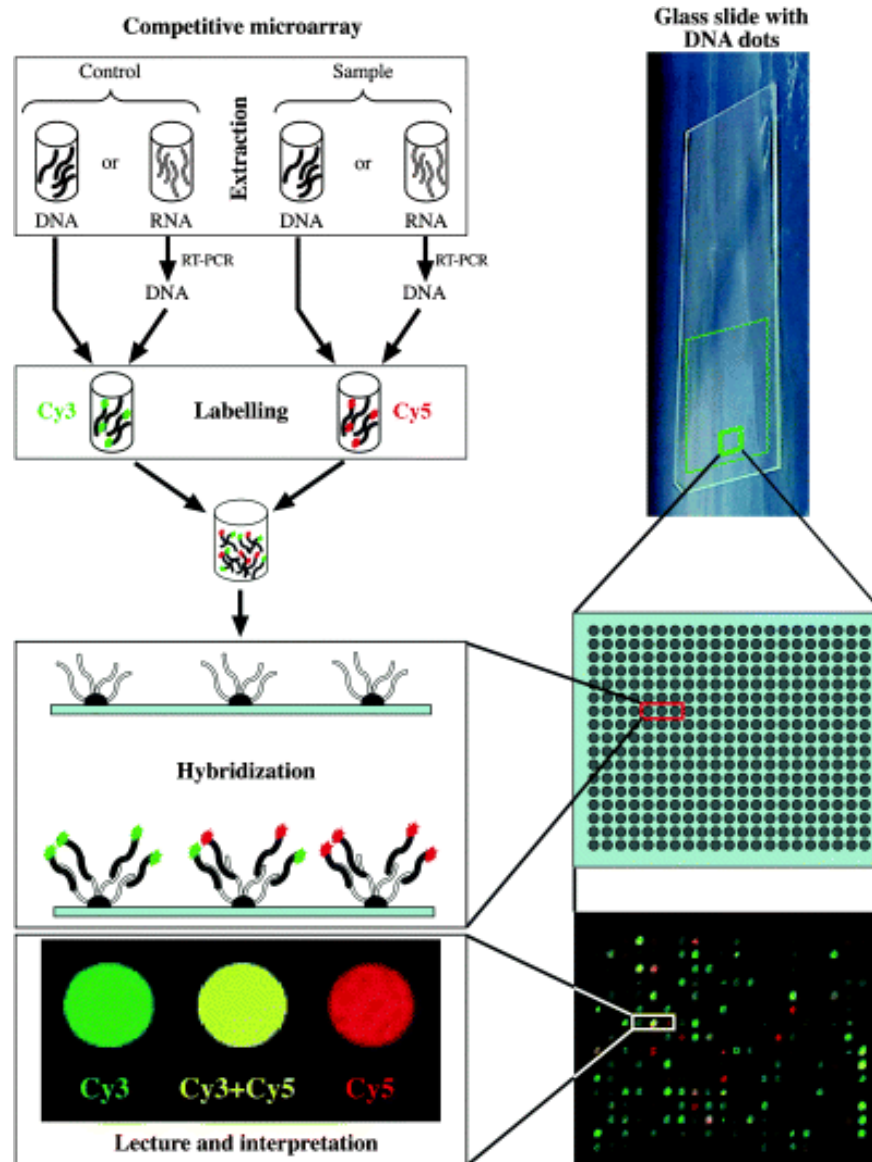
La taille du génome, le nombre de gènes et la proportion des introns chez *C. albicans* sont similaires à ceux de *S. cerevisiae*. Mais à la différence de *S. cerevisiae*, *C. albicans* possède un nombre significatif de gènes témoignant d'une capacité métabolique plus étendue, incluant des gènes encodant des transporteurs d'oligopeptides, des enzymes du catabolisme des acides aminés et des enzymes dégradant les lipides (Braun *et al.*, 2005). Il a été suggéré que cette différence est le résultat de la variabilité des niches de l'hôte de *C. albicans*. Avec la publication de l'assemblage 21, le nombre de gènes du génome de *C. albicans* a été révisé à 6,090 gènes placés sur 8 paires de chromosomes homologues de

tailles allant de 1.0 Mb à 3.2 Mb et numérotés par ordre de taille décroissante de 1 à 7 en plus du chromosome R, de taille légèrement inférieure à celle du chromosome 1 (van Het *et al.*, 2007). Tous ces chromosomes, à part le chromosome 3, contiennent au moins une copie d'une séquence répétitive appelée *major repeat sequence* (MRS) dont la fonction est inconnue mais dont on sait par exemple que la taille corrèle avec la fréquence de perte du chromosome 5 (Chibana et Magee, 2009). Il existe un nombre significatif de séquences d'ADN répétées dans le génome de *C. albicans*, résultant en partie de la présence d'insertions de rétrotransposons mais aussi de familles de gènes comme les gène *ALS* qui encodent des glycoprotéines de la surface cellulaire importantes pour l'interaction hôte-pathogène (Braun *et al.*, 2005; Goodwin et Poulter, 2000). Il existe plusieurs familles de gènes encodant des protéines hautement homologues en plus des gènes *ALS*, comme les gènes *TLO*, retrouvés exclusivement sur les télomères et dont la fonction n'a pas été déterminée, les gènes *SAP*, encodant les aspartyl-protéinases sécrétées ayant un rôle dans la virulence, ou les gènes *LIP* encodant des lipases (van Het *et al.*, 2007). Les centromères ont été identifiés sur tous les chromosomes et ne semblent pas avoir de motifs de séquences communs (Sanyal *et al.*, 2004).

### **1.6.2. La génomique fonctionnelle chez *C. albicans* : technologies et applications**

Les biopuces à ADN sont considérées comme une véritable révolution de la génomique. Le séquençage du génome de *C. albicans* a permis la construction de biopuces d'expression qui ont permis d'analyser le transcriptome de *C. albicans* aussitôt que les premiers assemblages 4 et 6 ont été produits. Une biopuce à ADN est constituée d'une collection de sondes d'ADN fixées sur un support solide (Panda *et al.*, 2003) (Figure I-12). Ces sondes peuvent être des produits de réactions de polymérisation en chaîne (amplicons) ou des oligonucléotides (généralement de 50 à 70-mers) déposés ou synthétisés *in situ* par des méthodes photolithographiques (Lipshutz *et al.*, 1999). Le dépôt des sondes sur le support solide, généralement une lame de verre, permet d'obtenir des biopuces à haute

densité. Par exemple, une lame de biopuce à ADN intragénique de *C. albicans* fabriquée par Eurogentec (représentant 6039 cadres de lectures ouverts) est formée de 32 blocs contenant chacun  $20 \times 20$  sondes avec un espacement de  $200 \mu\text{m}$  et un diamètre de spot de  $100 \mu\text{m}$  (<http://www.eurogentec.com/EGT/files/GMA-DS-CANDIDA-1103-V4.pdf>).



**Figure I-12.** Schéma de la technologie des biopuces à ADN. Les biopuces à ADN sont constituées de sondes d'ADN déposées sur un support solide couvrant une lame de verre de microscope (panneau droit, *glass slide*

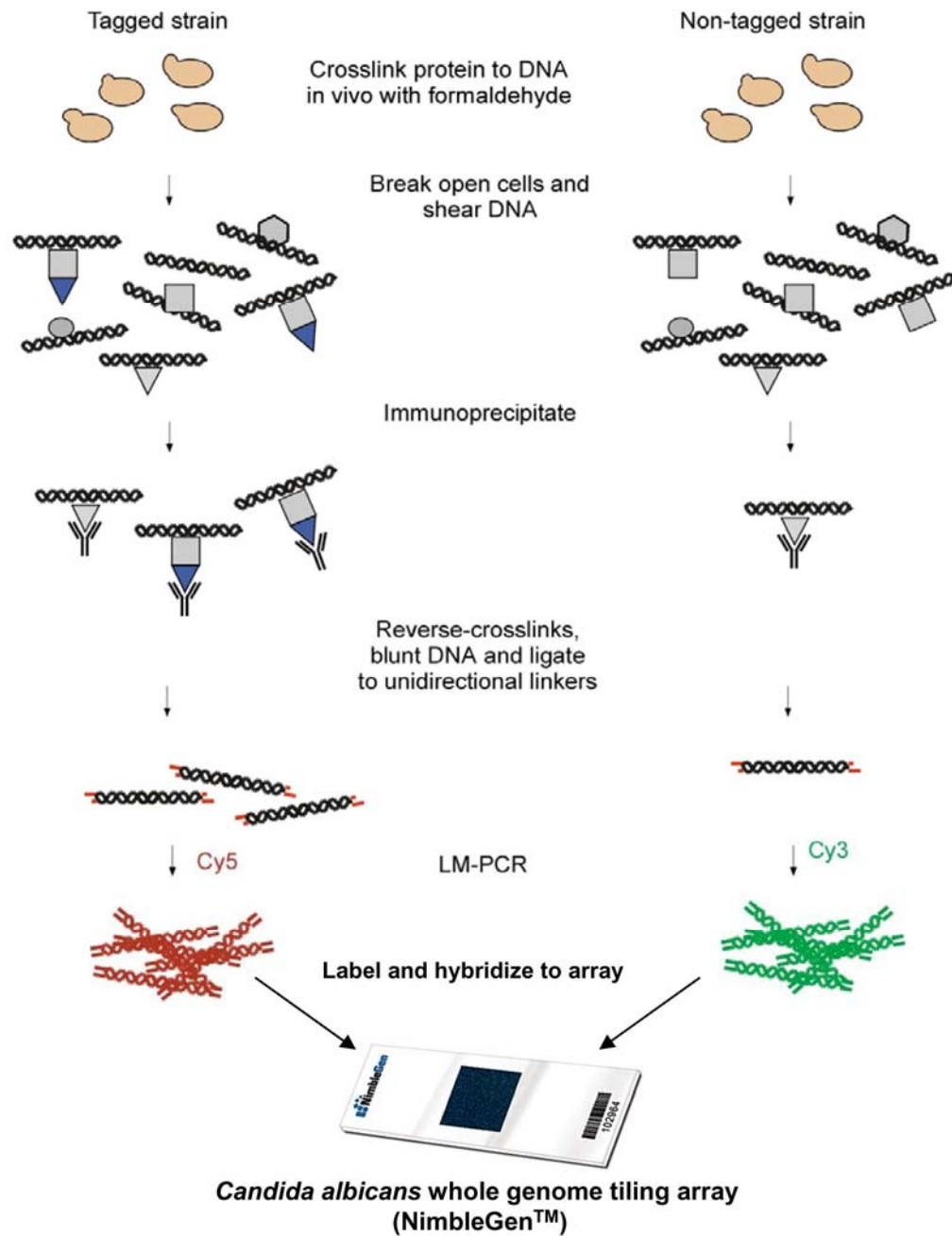
*with DNA dots*). L'échantillon test (panneau gauche, *sample*) peut être de l'ADN (e.g. fragments d'ADN génomique ou ADN immunoprécipité) ou de l'ARN qui sera par la suite réverse-transcrit en ADN (*RT-PCR*). L'échantillon contrôle correspond à de l'acide nucléique provenant de la souche contrôle non traitée. Les fragments d'ADN sont marqués par des fluorochromes (e.g. Cy5, émettant une fluorescence rouge et Cy3, émettant une fluorescence verte), mélangés et hybridés aux sondes de la biopuce. Par compétition avec l'ADN marqué contrôle, l'ADN test hybride spécifiquement à la sonde correspondante sur la biopuce. Plus la quantité de l'ADN test est élevée comparativement à l'ADN contrôle, plus le fluorochrome qui le marque prédomine, et vice-versa. Une égalité des signaux (i.e. conditions test et contrôle inchangées au niveau de la sonde), les fluorochromes émettent une fluorescence jaune. Figure tirée de (Garaizar *et al.*, 2006).

La technologie des biopuces à ADN évolue rapidement. Les premières études ont utilisé une stratégie qui consiste en l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne du répertoire complet des cadres de lecture ouverts d'une souche référence dont le génome est séquencé et le dépôt de ces sondes d'ADN par robotique sur des lames de verre. Chez *C. albicans*, des études utilisant ce type de biopuces fabriquées par Incyte Genomics et Eurogentec ont permis pour la première fois d'analyser le changement du transcriptome suite à un traitement par les azoles ou dans des isolats cliniques résistantes aux azoles comparativement aux isolats parentaux susceptibles (De Backer *et al.*, 2001; Rogers et Barker, 2002; Rogers et Barker, 2003). Les études plus récentes utilisent la technologie de photolithographie inventée par Affymetrix, où des oligonucléotides sont synthétisés *in situ* sur les lames (Albert *et al.*, 2003). Par exemple, les analyses des transcriptomes des souches cliniques résistantes aux azoles surexprimant *MDR1* ont utilisé des biopuces à oligonucléotides fabriquées par Affymetrix et NimbleGen (Affymetrix® NimbleExpress™) et ont permis d'identifier le régulateur Mrr1p qui contrôle la surexpression de *MDR1* (Morschhauser *et al.*, 2007). Les biopuces à oligonucléotides offrent plusieurs avantages comparativement aux biopuces à amplicons. Elles permettent, par exemple, la détection d'isoformes d'épissage alternatif de l'ARN messenger et la discrimination des transcrits hautement homologues. De plus, le coût de production des biopuces est moins élevé puisqu'il n'est plus nécessaire d'effectuer des amplifications par réaction de polymérisation en chaîne ou de sous-cloner les amplicons afin de vérifier la séquence d'ADN.

Les développements très récents dans le domaine des biopuces ont permis de créer des biopuces à ADN de très haute densité, appelées biopuces pangénomiques (en anglais *tiling arrays*), qui couvrent tout le génome d'un organisme donné de façon non biaisée. Il existe actuellement trois compagnies qui construisent et produisent différentes biopuces pangénomiques pour plusieurs organismes selon la taille des sondes, leur espacement et les caractéristiques du design. Affymetrix couvre une biopuce par 6 millions d'oligonucléotides de 25mers alors que NimbleGen la couvre par 385,000 d'oligonucléotides de 50 à 70mers. Enfin, Agilent utilise 244,000 oligonucléotides de 60mers (Liu, 2007). Les biopuces pangénomiques de NimbleGen et Agilent utilisent deux fluorochromes différentiels par biopuce (e.g. Cy5 et Cy3) alors que ceux d'Affymetrix utilise un seul fluorochrome par biopuce (Liu, 2007). Les biopuces pangénomiques possèdent un plus grand nombre d'applications que les biopuces standards. Parmi ces applications figurent la technologie de l'immunoprécipitation de la chromatine couplée aux biopuces (ChIP-chip) et la technologie d'hybridation comparative des génomes (CGH). Ces technologies ont été récemment utilisées chez *C. albicans*.

La technologie de ChIP-chip permet l'identification des sites de liaison d'un facteur de transcription ou d'une protéine se liant à l'ADN, *in vivo*, au génome (Ren *et al.*, 2000). Le principe de cette technique consiste à immunoprécipiter la chromatine en utilisant un anticorps reconnaissant la protéine à l'étude (e.g. facteur de transcription étiqueté par une étiquette moléculaire), suivi d'une hybridation des fragments de l'ADN enrichi par l'immunoprécipitation sur une biopuce à ADN, menant ainsi l'identification des cibles liées par la protéine immunoprécipitée (Figure I-13) (Buck et Lieb, 2004). Cette technologie a été appliquée à *C. albicans*, pour la première fois, dans une étude dont le but est d'identifier les cibles transcriptionnelles du complexe  $\alpha 1-\alpha 2$ , impliqué dans la conversion blanche-opaque et la reproduction sexuée de *C. albicans* (Srikantha *et al.*, 2006). Le design des biopuces utilisées a été mis au point par Michael Snyder alors que les puces ont été construites par NimbleGen et son basées sur l'assemblage 19 (Srikantha *et al.*, 2006). Ce

sont des biopuces de 385,000 oligonucléotides de 50mers dont 246,532 couvrent le brin Watson, espacées de 10 paires de bases, et 123,271 couvrent le brin Crick, espacées de 60 paires de bases (Srikantha *et al.*, 2006).



**Figure I-13.** Principe de la technologie d'immunoprécipitation de la chromatine couplée aux biopuces à ADN (ChIP-chip). Une protéine (e.g. facteur de transcription, carré gris) étiquetée par une étiquette moléculaire (triangle bleu) est exprimée dans une souche de *C. albicans* (*tagged strain*). L'introduction de l'étiquette moléculaire ne devrait pas altérer la fonction de la protéine et il est donc nécessaire d'entreprendre des tests de fonctionnalité de la protéine de fusion. Le contrôle négatif est la souche parentale n'exprimant pas l'étiquette moléculaire (*non-tagged strain*). La souche étiquetée et contrôle sont traitées par du formaldéhyde qui induit des liaisons covalentes entre les protéines et l'ADN. Des extraits cellulaires sont ensuite préparés et traités par sonication dans le but de fragmenter l'ADN génomique majoritairement en des fragments allant de 200 à 500 paires de bases. Les extraits sont ensuite incubés avec un anticorps reconnaissant l'épitope de l'étiquette moléculaire : c'est l'étape d'immunoprécipitation de la chromatine. L'anticorps reconnaît aussi des molécules ressemblant à l'épitope (triangle gris), mais puisque ces molécules sont aussi présentes dans la souche contrôle, le biais introduit par cette reconnaissance non spécifique est levé. Les fragments d'ADN sont purifiés, ligués à des fragments d'ADN unidirectionnels et amplifiés (*LM-PCR*) en incorporant des molécules d'aminoallyldésoxyuridine triphosphate qui permettent un marquage subséquent par les fluorochromes Cy5 (souche étiquetée) ou Cy3 (contrôle). Les sites de liaison de la protéine étiquetée au génome sont identifiés par hybridation de l'ADN marqué à des biopuces pangénomiques couvrant le génome de *C. albicans*, comme ceux fabriqués par NimbleGen (Srikantha *et al.*, 2006). Figure tirée et adaptée de (Ren *et al.*, 2000).

La technologie de ChIP-chip est un puissant outil complémentaire à l'analyse du transcriptome par biopuces (Tableau I-3). Elle possède plusieurs avantages comparativement aux techniques génétiques et biochimiques traditionnelles pour étudier les interactions des protéines régulatrices se liant à l'ADN. Par exemple, elle ne requiert pas la création de mutants, donc les protéines encodées par des gènes essentiels peuvent être étudiées. De plus, cette technologie est appliquée sous des conditions physiologiques *in vivo*, contrairement aux techniques *in vitro* d'interaction protéine-ADN. Ceci augmente la pertinence des données obtenues. Sachant que la technologie de ChIP-chip permet l'identification *in vivo* du régulon d'un facteur de transcription donné, elle permet par conséquent de construire des réseaux transcriptionnels (Lee *et al.*, 2002) (voir plus bas). Mieux encore, cette technologie permet d'identifier les motifs de liaison des facteurs de transcription en utilisant des algorithmes de détermination d'enrichissement de séquences

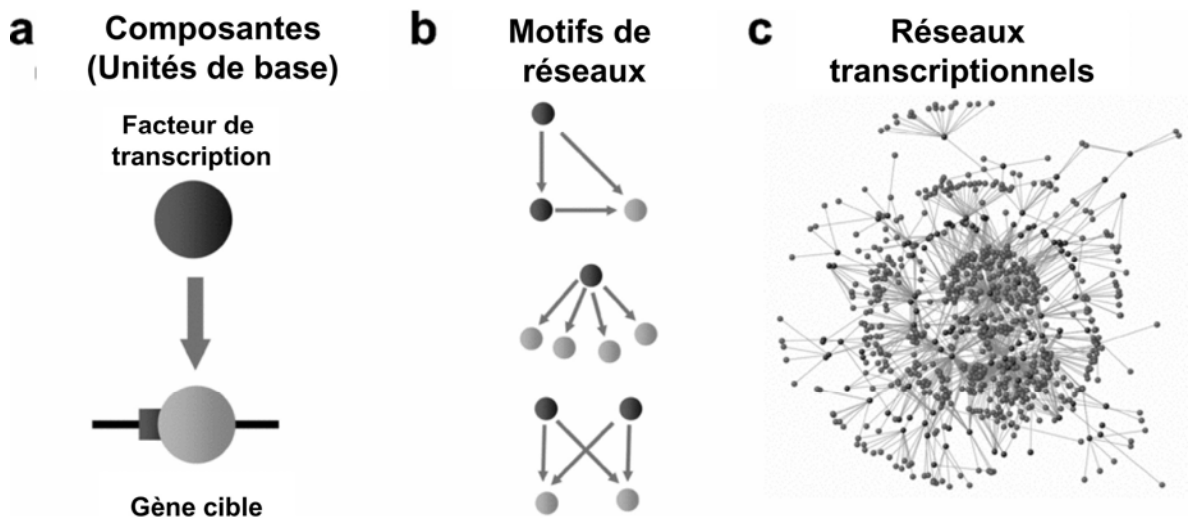
d'ADN liées *in vivo* (Harbison *et al.*, 2004). Elle permet aussi d'inférer un rôle biologique d'un facteur de transcription dont la fonction est inconnue en déterminant l'enrichissement des groupements fonctionnels des gènes cibles régulés directement par ce facteur (*gene ontology*).

**Tableau I-3.** Comparaison de l'approche transcriptomique et l'approche ChIP-chip.

<b>Transcriptomique</b>	<b>ChIP-chip</b>
Technologie <i>in vivo</i>	Technologie <i>in vivo</i>
Approche à l'échelle du génome	Approche à l'échelle du génome
Ne détermine pas les sites de liaison d'une protéine se liant à l'ADN	Permet d'identifier avec précision le site de liaison d'une protéine à l'ADN
Ne suffit pas pour construire un réseau de cascades régulatrices ou un réseau transcriptionnel	Permet d'identifier un réseau de cascades régulatrices ainsi que des réseaux transcriptionnels
Problèmes de stabilité de l'ARN	Pas de problèmes de stabilité d'acides nucléiques
Nécessité de construire un mutant pour la comparaison et les contrôles	Pas de nécessité de construire des mutants
Il n'est pas nécessaire de disposer d'un anticorps spécifique	Nécessite un anticorps spécifique et/ou construire une souche exprimant une protéine de fusion avec une étiquette moléculaire. Nécessite des essais fonctionnels de la protéine de fusion
Permet de savoir si un régulateur agit comme un activateur ou un répresseur d'un gène, mais ne différencie pas entre une régulation directe et indirecte	Permet de savoir si un régulateur se lie directement au promoteur d'un gène mais ne permet pas de savoir si ce régulateur agit comme un activateur ou un répresseur de ce gène
Plusieurs outils disponibles pour l'analyse bioinformatique	Peu d'outils pour l'analyse bioinformatique mais en cours de développement actif
La mise au point est très bien établie et utilisée de façon courante dans les laboratoires	La mise au point est complexe et longue. Plusieurs étapes expérimentales sont impliquées



L'intégration des données issues d'expériences de ChIP-chip et d'analyses d'expression à l'échelle du génome permet, notamment pour les facteurs de transcription, de dresser un réseau de régulation transcriptionnelle (Buck et Lieb, 2004; Lee *et al.*, 2002). La représentation des réseaux transcriptionnels permet d'avoir une idée conceptuelle sur la régulation transcriptionnelle à l'échelle du génome. Les études ayant pour objectif d'identifier et caractériser ces réseaux ont montré que leur structure peut être représentée selon au moins trois niveaux distincts d'organisation (Figure I-14). Au plus bas niveau, le réseau est représenté par une interaction régulatrice entre un facteur de transcription et un gène cible qu'il régule directement (Figure I-14a). Au niveau local d'organisation, l'unité de base s'organise en unités fondamentales de régulation transcriptionnelle appelées motifs de réseaux (Figure I-14b). Enfin, au niveau global d'organisation, l'ensemble de toutes les interactions régulatrices dans une cellule forme le réseau de régulation transcriptionnelle (Figure I-14c) (Babu, 2008; Blais et Dynlacht, 2005).



**Figure I-14.** Organisation d'un réseau de régulation transcriptionnelle. **a**, L'unité de base d'un réseau, ou composante, consiste en une interaction régulatrice (flèche grise) d'un facteur de transcription (sphère noire) et d'un gène cible (sphère grise). **b**, Les composantes forment un petit réseau d'interactions régulatrices appelées motifs de réseaux. Les trois motifs les plus courants sont montrés : en haut du panneau, motif à contrôle *feed-forward*; au milieu du panneau, motif à entrée unique (*single input motif*) et en bas du panneau, motif à entrées multiples (*multiple input motif*). **c**, L'ensemble de toutes les interactions régulatrices forment le réseau transcriptionnel. Figure tirée et adaptée de (Babu, 2008).

Une autre application des biopuces pangénomique est l'hybridation comparative de génomes (*comparative genomic hybridizations*, CGH) (Liu, 2007). Le principe de la technologie CGH consiste à purifier et marquer des fragments d'ADN génomique provenant d'une souche test et d'une souche contrôle dont l'intégrité du génome est caractérisée. Cette technologie permet de détecter les aneuploïdies et les altérations du nombre de copies et/ou de la longueur des chromosomes. Des études dans *C. albicans* ont révélé, bien avant le développement de cette technologie, que certaines souches de laboratoire montraient des anomalies du nombre de copies de chromosomes par des approches de buvardage Southern (Chen *et al.*, 2004b; Chibana *et al.*, 2000) ou par l'électrophorèse en champ pulsé (Chibana *et al.*, 2000; Kabir *et al.*, 2005; Rustchenko *et al.*, 1994). Ces altérations du génome ont été aussi observées par ces mêmes approches dans les isolats cliniques (Legrand *et al.*, 2004). Avec le développement de la technologie CGH et son application chez *C. albicans*, des études ont permis de mettre en évidence la fréquence des aneuploïdies dans les souches de laboratoire (Selmecki *et al.*, 2005) ainsi que dans les souches cliniques résistantes aux azoles (Selmecki *et al.*, 2006; Selmecki *et al.*, 2008). La technologie CGH utilisée jusqu'à date chez *C. albicans* n'utilise pas des biopuces pangénomiques, mais des biopuces standards. L'utilisation de biopuces pangénomiques permettrait une résolution plus élevée et donc de déterminer avec plus de précision l'étendue et les limites des altérations ayant eu lieu dans les souches aneuploïdes de *C. albicans*.

## I.7. Hypothèse de recherche et objectifs

Problématique : Nous avons vu au chapitre 1 que la régulation transcriptionnelle de la résistance aux azoles repose sur la fonction de différents facteurs de transcription qui modulent l'expression des gènes effecteurs de ce processus. Ceci suggère qu'un réseau de régulation transcriptionnelle complexe contrôle la résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans*. Ce réseau transcriptionnel n'est pas encore caractérisé. De plus, l'identité du facteur de transcription qui contrôle l'expression de l'effecteur de la résistance clinique aux azoles, *PDR16*, n'est pas encore connue.

Hypothèses de recherche : 1) L'observation que la surexpression de *PDR16* accompagne celle de *CDR1* et *CDR2* dans les souches cliniques résistantes aux azoles suggère que ces gènes appartiennent au même régulon, potentiellement celui de Tac1p. 2) Mise à part leur capacité de conférer la résistance aux antifongiques azolés, Tac1p, Upc2p, Mrr1p et Cap1p auraient d'autres fonctions biologiques dans la cellule possiblement liées à leur rôle dans la résistance aux azoles.

Objectifs : L'identification des cibles transcriptionnelles directes de Tac1p, Upc2p, Mrr1p et Cap1p, à l'échelle du génome, nous permettrait i) de caractériser leur réseau de régulation transcriptionnelle et de révéler les modules transcriptionnels qui sont sous leur contrôle direct, ii) d'inférer leurs fonctions biologiques et iii) d'expliquer leur rôle dans la résistance aux azoles.

Méthodes : Pour arriver à cet objectif, je me suis servi i) d'approches génétiques, afin de déterminer si l'expression de *PDR16* est contrôlée par Tac1p, et ii) d'approches de génomique fonctionnelle combinant la transcriptomique et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à l'hybridation sur des biopuces à ADN (ChIP-chip), afin d'identifier les modules transcriptionnels directs des facteurs de transcription étudiés.

Perspectives à long terme: Les connaissances qui découlent de l'atteinte d'un tel objectif permettraient, dans une perspective à long terme, d'envisager des stratégies thérapeutiques permettant de contrecarrer la résistance aux antifongiques chez l'opportuniste fongique majeur de l'homme *C. albicans* et de proposer de nouvelles cibles permettant d'envisager le développement de nouveaux médicaments antifongiques.

## II. Chapitre 2: The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates *PDR16* expression in *Candida albicans*

Le contenu de ce chapitre a été publié dans la revue Molecular Microbiology en 2007.

Des données supplémentaires électroniques de ce chapitre sont accessibles sur l'adresse :

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/118542200/supinfo>.

**Znaidi, S.**, De Deken, X., Weber, S., Rigby, T., Nantel, A. et Raymond, M. (2007). The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates *PDR16* expression in *Candida albicans*". *Mol. Microbiol.* 66:440-52.

Contribution des auteurs : L'estimation de ma contribution est de 85%. De Deken a séquencé les produits PCR des isolats cliniques, Weber a cloné les allèles de *TAC1* dans et le plasmide pYC2/CT et les a séquencés, Rigby a effectué les analyses CGH. J'ai écrit la totalité du manuscrit sous la supervision de ma directrice de recherche Martine Raymond.

**The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates *PDR16* expression in *Candida albicans***

Running title: *PDR16* regulation by Tac1p

Sadri Znaidi<sup>1</sup>, Xavier De Deken<sup>‡</sup>, Sandra Weber<sup>1</sup>, Tracey Rigby<sup>2</sup>, André Nantel<sup>2</sup>, and  
Martine Raymond<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7; <sup>2</sup>Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada H4P 2R2; and <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7.

\*Corresponding author. Mailing address: Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7. Phone: (514) 343-6746. Fax: (514) 343-6843.

<sup>‡</sup>Present address: IRIBHM, ULB, Campus Erasme, Brussels, Belgium.

## II.1. Summary

The *Candida albicans* *PDR16* gene, encoding a putative phosphatidylinositol transfer protein, is co-induced with the multidrug transporter genes *CDR1* and *CDR2* in azole-resistant ( $A^R$ ) clinical isolates and upon fluphenazine exposure of azole-susceptible ( $A^S$ ) cells, suggesting that it is regulated by Tac1p, the Transcriptional Activator of *CDR* genes. Deleting *TAC1* in an  $A^R$  isolate (5674) overexpressing *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* decreased the expression of the three genes and fluconazole resistance to levels similar to those detected in the matched  $A^S$  isolate (5457), demonstrating that Tac1p is responsible for *PDR16* upregulation in that strain. Deleting *TAC1* in the  $A^S$  strain SC5314 abolished *CDR2* induction by fluphenazine and decreased that of *PDR16* and *CDR1*, uncovering the participation of an additional factor in the regulation of *PDR16* and *CDR1* expression. Sequencing of the *TAC1* alleles identified one homozygous mutation in strain 5674, an Asn to Asp substitution at position 972 in the C-terminus of Tac1p. Introduction of the Asp<sup>972</sup> allele in a *tac1* $\Delta/\Delta$  mutant caused high levels of fluconazole resistance and *TAC1*, *PDR16*, *CDR1*, and *CDR2* constitutive induction. These results demonstrate that i) Tac1p controls *PDR16* expression, ii) Asn<sup>972</sup> to Asp<sup>972</sup> is a gain-of-function mutation, and iii) Tac1p is positively autoregulated, directly or indirectly.

## II.2.Introduction

*Candida albicans* is a commensal yeast residing on the mucosal surfaces of healthy individuals as part of the normal microbial flora. In immunocompromised individuals, *C. albicans* becomes virulent and invasive, causing severe mucosal and systemic infections (Sims *et al.*, 2005). These infections are usually treated with azole derivatives, such as fluconazole (FLC), which target the ergosterol biosynthesis pathway by inhibiting the product of the *ERG11* gene, the P450 cytochrome 14 $\alpha$ -lanosterol demethylase (Odds *et al.*, 2003). Because azole drugs are fungistatic rather than fungicidal, their long-term and repeated use leads to the selection of azole-resistant ( $A^R$ ) strains, a challenging problem for clinicians treating AIDS patients with mucosal candidosis or immunosuppressed patients with *C. albicans* bloodstream infections (Kontoyiannis and Lewis, 2002).

Biochemical and molecular analyses of  $A^R$  strains have shown that alterations in the *ERG11* gene (RNA upregulation and coding mutations) can confer azole resistance, by increasing the levels of the Erg11p enzyme or by modulating its substrate affinity (Marichal *et al.*, 1999; Podust *et al.*, 2004). Another frequent mechanism of azole resistance is a reduced intracellular drug accumulation caused by the overexpression of the *CDR1* and *CDR2* genes, encoding two homologous multidrug transporters of the ATP-binding cassette family, and of the *MDR1* gene, coding for a major facilitator (Akins, 2005). Interestingly, a number of  $A^R$  strains overexpress *CDR1* and *CDR2* but not *MDR1* whereas other strains overexpress only *MDR1*, suggesting that two different transcriptional pathways are responsible for the upregulation of these genes in  $A^R$  strains (Sanglard *et al.*, 1995; Franz *et al.*, 1998; Lopez-Ribot *et al.*, 1998; Saidane *et al.*, 2006).

Tac1p, a transcription factor of the zinc cluster family, was recently identified as the regulator responsible for the constitutive upregulation of the *CDR1* and *CDR2* genes in  $A^R$  clinical isolates and for the drug-inducible expression of these two genes in  $A^S$  strains (Coste *et al.*, 2004; Coste *et al.*, 2006). Tac1p regulates the transcription of *CDR1* and



*CDR2* by binding to a drug-responsive element (DRE; 5'-CGGAA/TATCGG) located in their promoter region and formed by two CGG triplets spaced by four bases (Coste *et al.*, 2004). Hyperactive alleles of *TAC1*, capable of conferring high constitutive expression of *CDR1* and *CDR2* and azole resistance, have been recovered from *C. albicans* A<sup>R</sup> clinical isolates and found to contain a gain-of-function mutation, an amino acid change from asparagine to aspartic acid at position 977 in the putative transactivation domain of Tac1p (N977D) (Coste *et al.*, 2006). This mutation is co-dominant as increased azole resistance is observed only when the *TAC1* allele carrying this mutation becomes homozygous (Coste *et al.*, 2006). The mechanism by which homozygosis occurs at the *TAC1* locus involves either mitotic recombination between the two copies of chromosome 5 that contains the *TAC1* gene or by the duplication of the chromosome 5 copy carrying the hyperactive *TAC1* allele accompanied by loss of the copy carrying the wild-type *TAC1* (Coste *et al.*, 2006). Comparative genome hybridization (CGH) studies have shown that many A<sup>R</sup> *C. albicans* strains are trisomic for chromosome 5 or possess an isochromosome 5 (composed of two left arms) and that azole resistance correlates with the presence of this isochromosome (Selmecki *et al.*, 2006).

In addition to *CDR1* and *CDR2*, other target genes of Tac1p have been identified by genome-wide expression profiling (*RTA3*, *IFU5*, *HSP12*) which also contain a putative DRE in their promoter region (Coste *et al.*, 2004), however their role in azole resistance is unknown. We recently reported that *C. albicans* A<sup>R</sup> clinical isolates overexpressing *CDR1* and *CDR2* also overexpress the *PDR16* gene encoding a putative phosphatidylinositol transfer protein (PITP) of the Sec14p family (Saidane *et al.*, 2006). We showed that deleting *PDR16* in an A<sup>R</sup> clinical strain decreases the azole resistance of the cells by two fold as compared to the matched A<sup>S</sup> isolate while overexpressing *PDR16* in A<sup>S</sup> cells increases their resistance to azoles also by two fold, indicating that *PDR16* plays a role in clinical azole resistance. In addition to its concomitant overexpression with *CDR1* and *CDR2* in A<sup>R</sup> strains, other results suggested that *PDR16* belongs to the same transcriptional network as *CDR1* and *CDR2* and is potentially controlled by Tac1p. First, exposure of A<sup>S</sup>

cells to fluphenazine (FPZ), a Tac1p-mediated inducer of *CDR1* and *CDR2* transcription (Coste *et al.*, 2004), also activates *PDR16* expression (Saidane *et al.*, 2006). Second, the *PDR16* promoter from an A<sup>S</sup> strain is more active when integrated in the A<sup>R</sup> isolate overexpressing *CDR1* and *CDR2* than in the matched A<sup>S</sup> isolate, indicating that the upregulation of *PDR16* in the A<sup>R</sup> strain is caused by a *trans*-acting mutation, potentially the one responsible for *CDR1* and *CDR2* upregulation (De Deken and Raymond, 2004). Third, the three genes were found by genome-wide expression profiling to be co-induced upon estradiol treatment (Cheng *et al.*, 2006). In the present study, we provide genetic evidence demonstrating that *PDR16* belongs to the Tac1p regulon and we also describe a new Tac1p gain-of-function mutation (N972D).

## II.3. Results

### *Deletion of the TAC1 gene in the C. albicans A<sup>R</sup> clinical isolate 5674*

To determine whether Tac1p is responsible for the constitutive upregulation of *PDR16* in A<sup>R</sup> clinical strains, we deleted the *TAC1* gene in strain 5674 (Saidane *et al.*, 2006). This clinical isolate is resistant to several azole derivatives and expresses high levels of *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* RNA, as compared to the matched A<sup>S</sup> parental isolate 5457 (Table 1, appendix section) (Saidane *et al.*, 2006). We used the *MPA<sup>R</sup>*-flipping strategy that allows the dominant selection of transformants with the *MPA<sup>R</sup>* marker conferring mycophenolic acid (MPA) resistance (Wirsching *et al.*, 2000). A *TAC1* deletion cassette was constructed, consisting of the *MPA<sup>R</sup>-FLP* marker flanked by *TAC1* upstream (*TAC1<sub>up</sub>*, 1450 bp) and downstream (*TAC1<sub>down</sub>*, 1428 bp) sequences amplified from strain 5674 (pSFI1TAC1DU7; see Experimental procedures) (Fig. 1A). The cassette was released by digestion with *ApaI* and introduced into strain 5674. The transformants were analyzed by Southern blotting, using *Bam*HI-digested genomic DNA and the *TAC1<sub>up</sub>* probe (Fig. 1B). As predicted, the probe detected a single fragment of 8.4 kb in the 5674 strain, corresponding to the wild-type alleles of *TAC1* (Fig. 1C, top panel, lane 1). The two independent heterozygous *tac1Δ* mutants SZY1 and SZY11 had the expected integration profile, with the appearance of the 4.0-kb band (Fig. 1C, top panel, lanes 2 and 3). A fragment of 5.5 kb was also detected in both strains, consistent with premature excision of the *MPA<sup>R</sup>* marker (Fig. 1C, top panel, lanes 2 and 3) (Wirsching *et al.*, 2000). Induction of the *SAP2* promoter resulted in complete excision of the *MPA<sup>R</sup>* marker in the SZY19 and SZY20 mutants since only the 8.4-kb and 5.5-kb fragments were detected in these strains (Fig. 1C, top panel, lanes 4 and 5). A second round of transformation with the *TAC1* deletion construct generated two homozygous *tac1Δ/tac1Δ* mutants, SZY25 and SZY26, both lacking the wild-type 8.4-kb fragment and displaying the 4.0-kb band, diagnostic of the insertion of the *TAC1* deletion construct in the second *TAC1* allele (Fig. 1C, top panel,

lanes 6 and 7). Excision of the *MPA<sup>R</sup>* marker from strains SZY25 and SZY26 was confirmed by the presence of a unique 5.5-kb fragment in the two *MPA<sup>S</sup> tac1Δ/Δ* homozygous mutants SZY31 and SZY32 (Fig. 1C, top panel, lanes 8 and 9). Southern blot analyses of the strains using the *TAC1* ORF as a probe confirmed that *TAC1* was completely deleted in strains SZY25, SZY26, SZY31 and SZY32 (Fig. 1C, bottom panel, lanes 6-9).

**Table 1.** Characteristics of the *C. albicans* strains used in this study

Strain	Parental strain	Genotype <sup>a</sup>	Chr5 <sup>b</sup>	Chr7 <sup>c</sup>	Resistance <sup>d</sup>	Reference
5457	–	Azole-susceptible clinical isolate	2	2	S	Saidane <i>et al.</i> (2006)
5674	5457	Azole-resistant clinical isolate	2	2	R	Saidane <i>et al.</i> (2006)
SZY1	5674	<i>TAC1/tac1Δ::MPA<sup>R</sup>-FLP</i>				This study
SZY11	5674	<i>TAC1/tac1Δ::MPA<sup>R</sup>-FLP</i>				This study
SZY19	SZY1	<i>TAC1/tac1Δ::FRT</i>	2	2	R-S	This study
SZY20	SZY11	<i>TAC1/tac1Δ::FRT</i>	3	3	R	This study
SZY25	SZY19	<i>tac1Δ::MPA<sup>R</sup>-FLP/tac1Δ::FRT</i>				This study
SZY26	SZY20	<i>tac1Δ::MPA<sup>R</sup>-FLP/tac1Δ::FRT</i>				This study
SZY31	SZY25	<i>tac1Δ::FRT/tac1Δ::FRT</i>	2	3	S	This study
SZY32	SZY26	<i>tac1Δ::FRT/tac1Δ::FRT</i>	2	3	S	This study
SC5314	–	Parental azole-susceptible strain	2	2	S	Gillum <i>et al.</i> (1984)
SZY13	SC5314	<i>TAC1/tac1Δ-MPA<sup>R</sup>-FLP</i>				This study
SZY18	SC5314	<i>TAC1/tac1Δ::MPA<sup>R</sup>-FLP</i>				This study
SZY22	SZY13	<i>TAC1/tac1Δ::FRT</i>				This study
SZY24	SZY18	<i>TAC1/tac1Δ::FRT</i>				This study
SZY27	SZY22	<i>tac1Δ::MPA<sup>R</sup>-FLP/tac1Δ::FRT</i>				This study
SZY30	SZY24	<i>tac1Δ::MPA<sup>R</sup>-FLP/tac1Δ::FRT</i>				This study
SZY33	SZY27	<i>tac1Δ::FRT/tac1Δ::FRT</i>	3	3	S	This study
SZY35	SZY30	<i>tac1Δ::FRT/tac1Δ::FRT</i>	2	3	S	This study
SZY84	SZY33	<i>TAC1-2(5457)-MPA<sup>R</sup>-FLP/tac1Δ::FRT</i>	3	3	S	This study
SZY90	SZY35	<i>TAC1-2(5457)-MPA<sup>R</sup>-FLP/tac1Δ::FRT</i>	2	3	S	This study
SZY86	SZY33	<i>TAC1-2(5674)-MPA<sup>R</sup>-FLP/tac1Δ::FRT</i>	3	3	R	This study
SZY91	SZY35	<i>TAC1-2(5674)-MPA<sup>R</sup>-FLP/tac1Δ::FRT</i>	2	2	R	This study

a. The genotype of each strain is given irrespective of chromosome 5 trisomy.

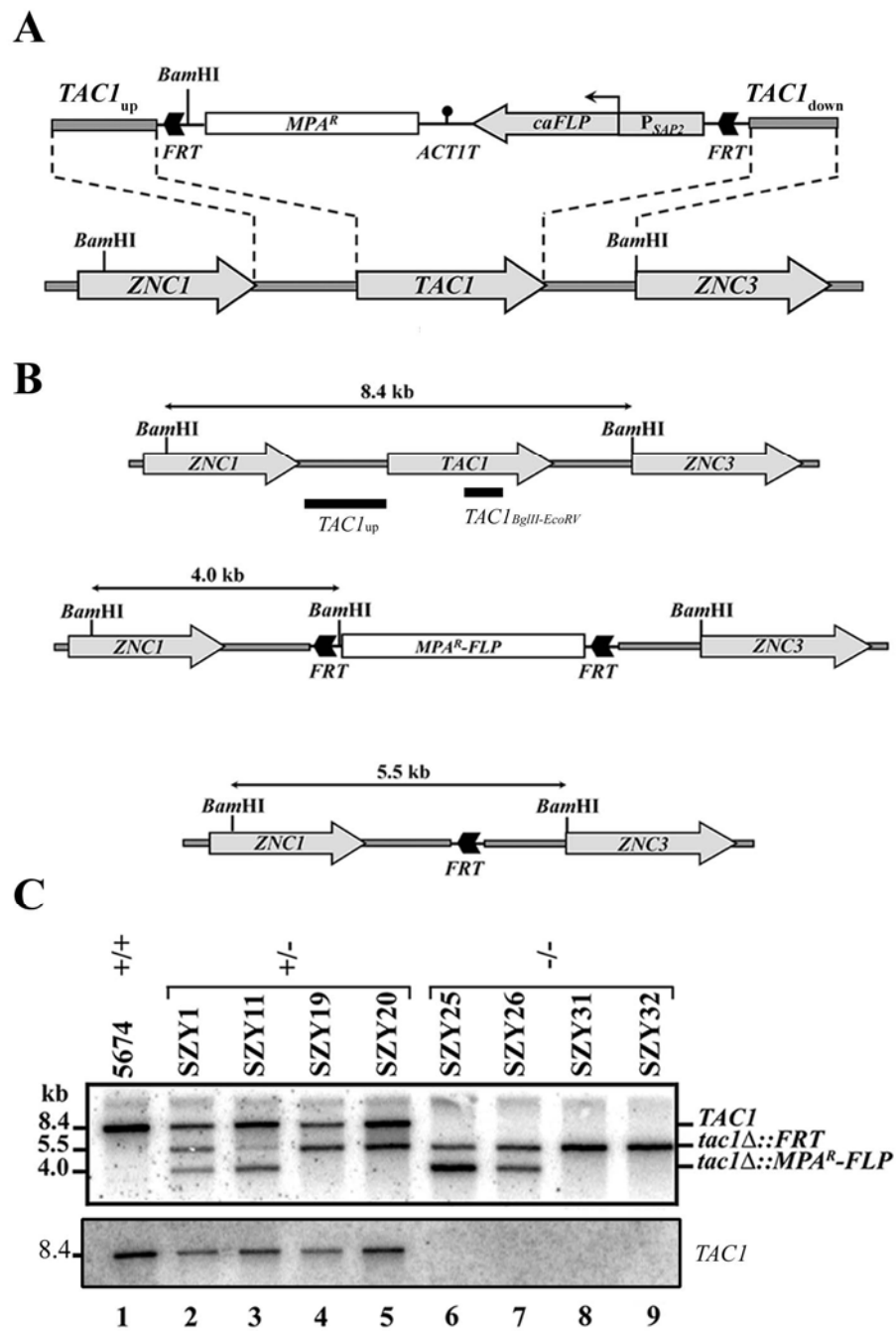
b. Chromosome 5 copy number of the strains as determined by CGH analyses.

c. Chromosome 7 copy number of the strains as determined by CGH analyses.

d. S: azole-susceptible; R: azole-resistant; R-S: average resistance.

Although the Southern blot analysis showed that all the fragments had the anticipated size, we observed differences among band intensity (Fig. 1C), suggesting that alterations in the chromosome 5 copy number occurred in some of our mutants (see Supplementary material for details). To verify this hypothesis, we performed a CGH analysis of strain 5674 and its post-excision *MPA<sup>R</sup>* marker derivatives SZY19, SZY20, SZY31 and SZY32 (Fig. S1). The results of this experiment revealed that strain SZY20

was trisomic for chromosome 5 whereas strains SZY19, SZY31 and SZY32 were disomic for that chromosome (Table 1). This study also revealed that strains SZY20, SZY31 and SZY32 acquired an additional copy of chromosome 7 during the deletion process (Table 1) (see Discussion).



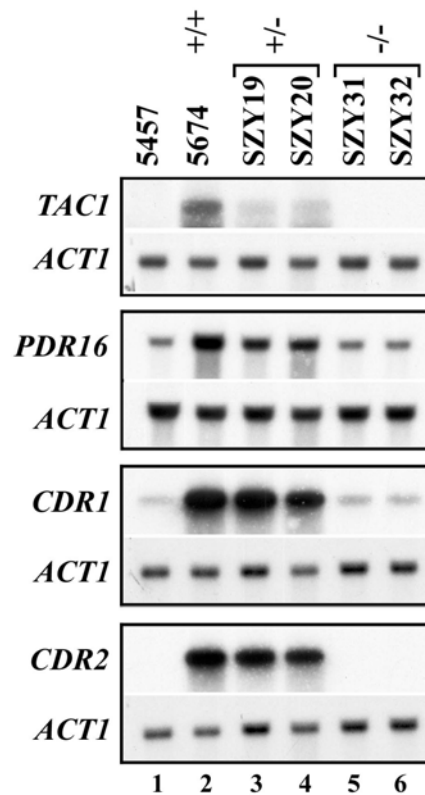
**Figure 1.** Sequential deletion of the *TAC1* alleles in strain 5674 using the *MPA<sup>R</sup>*-flipping strategy. A. Top: the pSF11 plasmid containing the *MPA<sup>R</sup>*-flipper cassette was used to construct the *TAC1* deletion cassette. *TAC1* upstream (*TAC1<sub>up</sub>*, positions -1420 to -1) and downstream (*TAC1<sub>down</sub>*, positions +2947 to +4350) sequences from strain 5674 flank the *MPA<sup>R</sup>*-flipping cassette in an inverted transcriptional orientation. From

left to right: *FRT*, FLP recombination target; *MPA<sup>R</sup>*, *MPA* resistance marker; *ACT1T*, transcription termination sequence of the *C. albicans ACT1* gene; *caFLP*, *C. albicans*-adapted *FLP* gene; *P<sub>SAP2</sub>*, promoter of the *C. albicans SAP2* gene. Below: the entire *TAC1* ORF flanked by the *ZNC1* and *ZNC3* genes (Coste *et al.*, 2004) (bottom) is replaced with the *TAC1* deletion cassette. B. Schematic representation of the *TAC1* alleles following insertion of the *TAC1 MPA<sup>R</sup>-FLP* cassette by homologous recombination at the *TAC1* locus and excision of the *MPA<sup>R</sup>-FLP* cassette through *FRT* recombination. Top, wild-type *TAC1* alleles; middle, *tac1Δ::MPA<sup>R</sup>-FLP* alleles; bottom, *tac1Δ::FRT* alleles. The size of the *Bam*HI fragments detected by the *TAC1<sub>up</sub>* probe (top, left thick line) used for the Southern blot experiments is given for each type of allele. C. Southern blot analysis of the 5674-derived *tac1Δ* mutants. *Bam*HI-digested genomic DNAs (500 ng) from the parental 5674 strain (+/+) and the *tac1* heterozygous (+/-) and homozygous (-/-) mutant derivatives were electrophoresed, transferred to a nylon membrane and analyzed with the *TAC1<sub>up</sub>* probe. The size of the expected *Bam*HI fragments for each type of allele is indicated on the left. Lower panel: The membrane was deprobed and rehybridized with the *TAC1<sub>BgIII-EcoRV</sub>* probe (panel B, right thick line) to detect the presence of the *TAC1* ORF in the strains.

#### *TAC1* is responsible for PDR16 overexpression in the *A<sup>R</sup>* strain 5674

To determine whether *PDR16* expression is affected by the *TAC1* deletion, total RNA prepared from the 5457 (*A<sup>S</sup>*) strain, the 5674 (*A<sup>R</sup>*) strain, and the different 5674-derived *tac1Δ* mutants were analyzed by Northern blotting (Fig. 2). The *TAC1* probe detected a 4.2 kb-transcript in strain 5674 (Fig. 2, lane 2) that is longer than the *TAC1* ORF (2.9 kb), indicating that the *TAC1* mRNA contains long 5' and/or 3' untranslated regions. Interestingly, *TAC1* expression was undetectable in the *A<sup>S</sup>* strain 5457 (Fig. 2, lane 1), showing that an increase in the expression of the *TAC1* gene accompanies the acquisition of azole resistance in strain 5674. The *TAC1* RNA levels decreased in the SZY19 and SZY20 *tac1Δ* heterozygous mutants when compared to strain 5674 (Fig. 2, lanes 3 and 4) and disappeared in the SZY31 and SZY32 *tac1Δ/tac1Δ* mutants (Fig. 2, lanes 5 and 6), confirming the specificity of the *TAC1* probe and the complete deletion of the *TAC1* gene in these two strains. As previously reported (Saidane *et al.*, 2006), *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* were overexpressed in strain 5674 as compared to strain 5457 (Fig. 2, compare lanes 1 and 2). *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* expression levels substantially decreased in the SZY19 and SZY20 heterozygous mutants (Fig. 2, lanes 3 and 4) and further decreased in the SZY31 and SZY32 homozygous mutants, reaching normal levels of expression similar to

those detected in the A<sup>S</sup> 5457 isolate (Fig. 2, compare lanes 5 and 6 to lane 1). Interestingly, *PDR16* and *CDR1*, unlike *CDR2*, displayed basal levels of expression in strains SZY31 and SZY32 similar to those detected in strain 5457, indicating that factor(s) other than Tac1p are responsible for their basal levels of expression in strain 5457. Taken together, these results demonstrate that *PDR16* expression is controlled by *TAC1* and that the constitutive upregulation of *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* in strain 5674 is strictly *TAC1*-dependent.

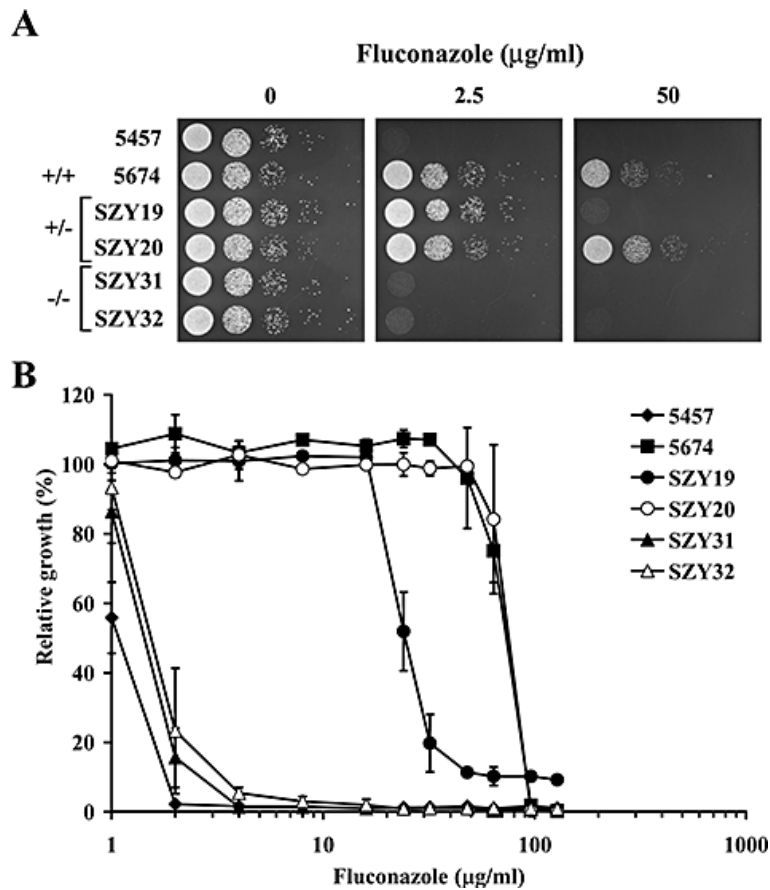


**Figure 2.** Northern blot analysis of the 5674-derived *tac1Δ* mutants. Total RNA was prepared from strain 5457, strain 5674 (+/+) and the 5674-derived heterozygous (+/-) and homozygous (-/-) *tac1Δ* mutants. RNA samples (15 μg) were electrophoresed, transferred to nylon membranes and probed with [ $\alpha^{32}$ P]-labeled DNA fragments specific for the *TAC1*, *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* genes (indicated on the left; see Experimental Procedures). The membranes were deprobed and rehybridized with the *ACT1* gene as a control.

*TAC1 is responsible for the FLC resistance of strain 5674*



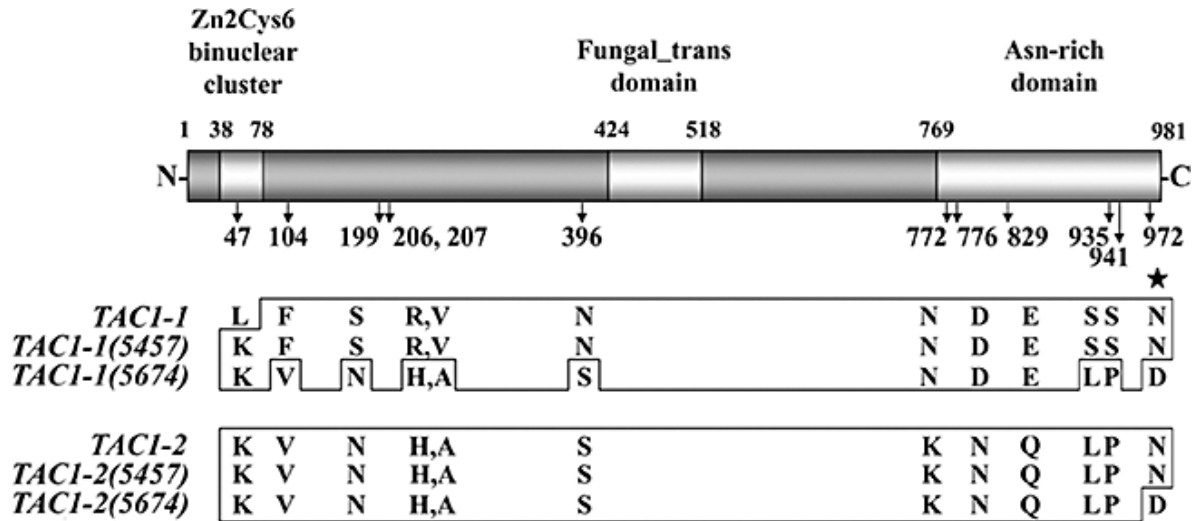
We then assessed the consequence on FLC resistance of deleting *TAC1* in strain 5674, using spot (Fig. 3A) and microtiter plate assays (Fig. 3B). As previously reported, strain 5674 was more resistant to FLC than strain 5457, in both assays (Saidane *et al.*, 2006). Unexpectedly, the two heterozygous mutants SZY19 and SZY20 had different FLC-resistant phenotypes, strain SZY19 displaying intermediate resistance levels ( $IC_{50\%}$  of  $24 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) and strain SZY20 being as resistant as the  $A^R$  strain 5674 ( $IC_{50\%}$  of  $64 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) (Fig. 3B). Finally, the two homozygous *tac1* $\Delta$ /*tac1* $\Delta$  mutants SZY31 and SZY32 were as sensitive as the 5457 strain (Fig. 3B), the homozygous deletion of *TAC1* causing a complete loss of FLC resistance. These results demonstrate that *TAC1* is the key regulator of FLC resistance in strain 5674.



**Figure 3.** FLC susceptibility of the 5674-derived *tac1*Δ mutants. A. FLC susceptibility of strain 5457, strain 5674 (+/+) and the 5674-derived heterozygous (+/-) and homozygous (-/-) *tac1*Δ mutants was determined by spot assay. The cells were spotted onto YPD plates containing the indicated concentrations of FLC on a log scale *x*-axis (top). The growth was recorded following incubation at 30°C for two days. B. The FLC susceptibility of the strains shown in panel A was determined by liquid microdilution assays. The data is presented as the relative growth of the cells (in percentage) in FLC-containing medium as compared to the growth of the same strain in FLC-free medium (100%). The values represent the means ± standard deviations of one representative experiment performed in duplicate.

#### *Identification of one missense N972D mutation in Tac1p from the A<sup>R</sup> 5674 strain*

To determine whether *TAC1* is mutated in strain 5674, we first sequenced PCR products of the *TAC1* gene from strains 5457 and 5674 (see Experimental procedures). Sequencing results revealed a homozygous mutation in the *TAC1* PCR product from strain 5674, changing an adenine at position +2914 bp of the *TAC1* ORF to a guanine. This mutation results in an asparagine to aspartic acid substitution at position 972 (N972D) in Tac1p from strain 5674. We next cloned and sequenced the *TAC1* alleles from strains 5457 and 5674 (see Experimental procedures), which identified two different *TAC1* alleles in each strain. Using the Clustal\_X program (Thompson *et al.*, 1997), the predicted protein sequences of these *TAC1* alleles were aligned with the protein sequences of alleles *TAC1-1* (orf19.3188) and *TAC1-2* (orf19.10700) of reference strain SC5314. This analysis yielded two groups of alleles clustering with allele *TAC1-1* or *TAC1-2*. The new alleles were thus designated *TAC1-1(5457)*, *TAC1-1(5674)*, *TAC1-2(5457)* and *TAC1-2(5674)* (Fig. 4). Interestingly, the *TAC1-2* cluster contains Tac1p sequences that are identical except for the presence of the N972D substitution in the Tac1p protein encoded by allele *TAC1-2(5674)*. This amino acid change is also present in the Tac1p sequence encoded by the other *TAC1* allele in strain 5674, *TAC1-1(5674)*. The fact that the sequence of Tac1p encoded by allele *TAC1-2(5457)* (from the A<sup>S</sup> strain 5457) differs from that encoded by allele *TAC1-2(5674)* (from the A<sup>R</sup> strain 5674) only by the N972D substitution suggests that this substitution is responsible for the constitutive upregulation of *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* and the FLC-resistant phenotype of strain 5674.



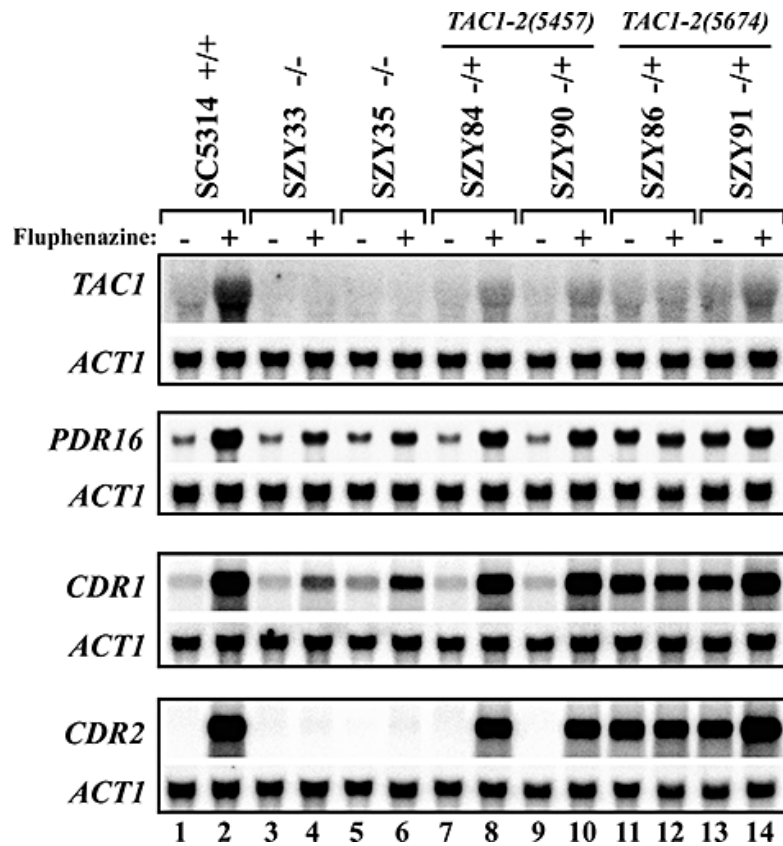
**Figure 4.** *TAC1* allelic polymorphisms in strains SC5314, 5457 and 5674. Top: schematic representation of the Tac1p protein. The predicted functional domains of Tac1p are depicted (light gray boxes): the Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster DNA-binding domain (residues 38-78; Pfam entry PF00172), the Fungal\_trans domain (residues 424-518; Pfam entry PF04082) and the C-terminal Asn-rich region encompassing residues 769-981 which contains the putative transactivation domain (Coste *et al.*, 2004). The position in Tac1p of the coding polymorphisms shown in panel B is indicated below the arrows. Bottom: alignment of the coding polymorphisms detected between the predicted protein sequences of the *TAC1* alleles from strains SC5314 (orf19.3188 and orf19.10700), 5457 (*TAC1-1(5457)* and *TAC1-2(5457)*) and 5674 (*TAC1-1(5674)* and *TAC1-2(5674)*). The identical residues in each group of homologous sequences are boxed; the N972D mutation is indicated by an asterisk. The sequences of the *TAC1-1(5457)*, *TAC1-2(5457)*, *TAC1-1(5674)* and *TAC1-2(5674)* alleles have been deposited at GenBank (accession numbers DQ837375, DQ837376, DQ837377 and DQ837378, respectively).

*The N972D mutation in Tac1p is responsible for the constitutive upregulation of TAC1, PDR16, CDR1 and CDR2*

To investigate the effect of the N972D substitution, we used the previously constructed *MPA<sup>R</sup> TAC1* deletion cassette to delete the *TAC1* gene in the A<sup>S</sup> strain SC5314 and to individually introduce the *TAC1-2(5457)* and *TAC1-2(5674)* alleles in the resulting *tac1Δ/tac1Δ* homozygous mutants (see Supplementary material and Fig. S2 for details). Southern blot experiments confirmed the deletion and re-integration of the *TAC1* alleles in

these strains (Fig. S2). As for the 5674 derivatives, CGH analyses identified chromosome 5 and/or chromosome 7 trisomies (Fig. S1 and Table 1).

To determine the effect of the N972D mutation on gene expression, we performed a Northern blot analysis of total RNA from strain SC5314, the two homozygous *tac1Δ/tac1Δ* mutants (SZY33, SZY35) as well as the two *TACI-2(5457)* (SZY84, SZY90) and *TACI-2(5674)* (SZY86, SZY91) integrants. It has been shown that the expression of the *CDR1* and *CDR2* genes is induced by fluphenazine (FPZ), a Ca<sup>2+</sup>-calmodulin antagonist, in a *TACI*-dependent manner (Coste *et al.*, 2004). The cells were therefore treated or not with FPZ before RNA extraction, to determine whether *PDR16* induction by this compound is *TACI*-dependent and to examine the drug-inducible activity of the integrated *TACI* alleles. Using a *TACI* probe, we found that the expression of the *TACI* gene itself is induced by FPZ treatment (Fig. 5, lanes 1 and 2). *TACI* RNA was not detected in the two *tac1Δ/tac1Δ* mutants SZY33 and SZY35, consistent with the complete deletion of *TACI* in these strains (Fig. 5, lanes 3-6). As expected, the expression of *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* was induced by FPZ (Coste *et al.*, 2004; Saidane *et al.*, 2006) (Fig. 5, compare lanes 1 and 2). The induction of *CDR2* was completely abolished in the *tac1Δ/Δ* mutants whereas that of *PDR16* and *CDR1* was only partially decreased by the homozygous deletion of *TACI* (Fig. 5, lanes 3-6), revealing the participation of an additional factor in the induction of *CDR1* and *PDR16* expression by FPZ. Finally, the expression levels of *PDR16* and *CDR1* in untreated SC5314 cells were similar to those in the untreated SZY33 and SZY35 *tac1Δ/Δ* mutants (Fig. 5, compare lanes 3 and 5 with lane 1), indicating that Tac1p is not responsible for the basal expression of the two genes in SC5314 cells. Taken together, these results demonstrate that *PDR16* expression is regulated by *TACI*, in a fashion similar to *CDR1*.



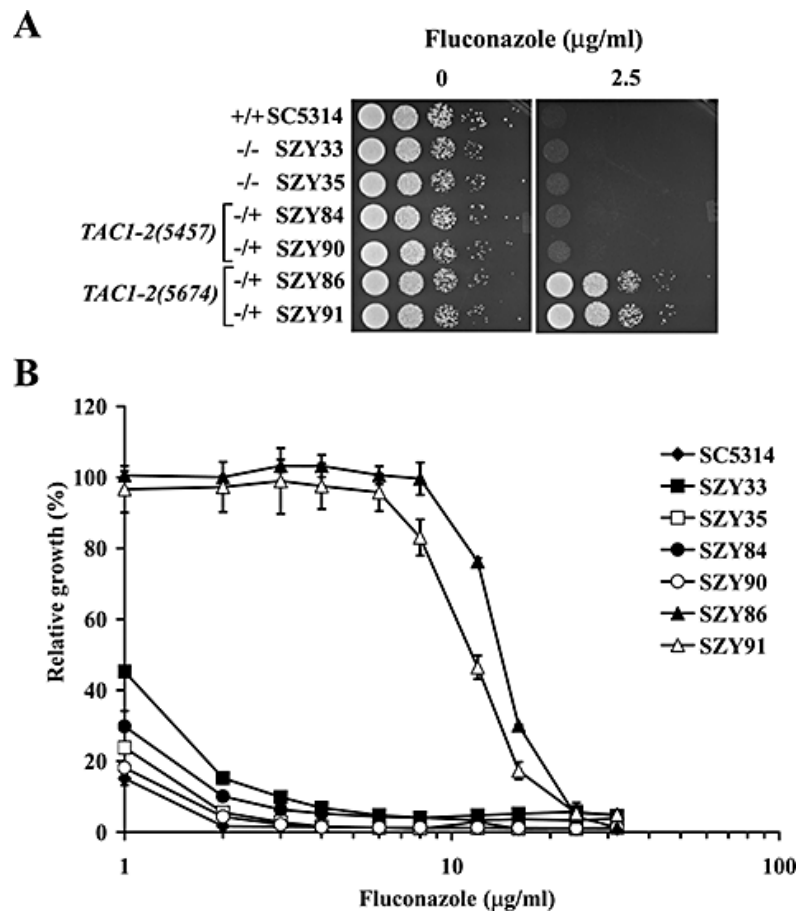
**Figure 5.** Northern blot analysis of the SC5314-derived *tac1Δ* mutants and *TAC1* integrants. The wild-type SC5314 strain (+/+) and its *tac1Δ* homozygous mutants (-/-) together with the SZY33- and SZY35-derived *TAC1-2(5457)* and *TAC1-2(5674)* integrants (-/+) were treated (+) or not (-) with 50 μg/ml of FPZ for 20 min in YPD medium. Total RNA was prepared and RNA samples (20 μg) were electrophoresed, transferred to nylon membranes and probed with the *TAC1*, *CDR1*, *CDR2* and *PDR16* specific probes (indicated on the left). The membranes were deprobed and rehybridized with the *ACT1* probe.

This Northern blot experiment also investigated the effect of the N972D mutation on *PDR16*, *CDR1*, *CDR2* and *TAC1* expression (Fig. 5, lanes 7-14). We found that introduction of the wild-type *TAC1-2(5457)* allele in the two *tac1Δ/tac1Δ* mutants restored FPZ induction of the four genes (Fig. 5, lanes 7-10) whereas introduction of the *TAC1-2(5674)* allele carrying the N972D mutation yielded constitutively high levels of *TAC1*, *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* expression, under both FPZ-treated and -untreated conditions

(Fig. 5, lanes 11-14). These results showed that i) the N972D substitution is a gain-of-function mutation which constitutively activates the expression of *PDR16*, *CDR1* and *CDR2*; and ii) *TAC1* overexpression in strain 5674 (Fig. 2) is a consequence of the N972D substitution.

#### *The N972D mutation in Tac1p leads to the acquisition of azole-resistance*

To investigate the effect of the N972D mutation on azole susceptibility, we performed FLC resistance (spot and microtiter plates) assays with strain SC5314, the two *tac1Δ/tac1Δ* mutants (SZY33, SZY35) and the *TAC1-2(5457)* (SZY84, SZY90) and *TAC1-2(5674)* (SZY86, SZY91) integrants (Fig. 6). Both assays showed similar FLC susceptibility profiles for strains SC5314, SZY33 and SZY35, indicating that the wild-type *TAC1* gene does not regulate the susceptibility of normal cells to azole drugs. Integration of the wild-type *TAC1-2(5457)* allele in the SZY33 and SZY35 *tac1Δ/tac1Δ* mutants did not affect the FLC susceptibility of the cells, since strains SZY84 and SZY90 were as susceptible to FLC as strain SC5314 (Fig. 6). This was not due to an inactive *TAC1-2(5457)* allele since this allele was capable of conferring *TAC1*, *PDR16*, *CDR1* and *CDR2* FPZ-induction (Fig. 5, lanes 7-10). Unlike for allele *TAC1-2(5457)*, integration of the *TAC1-2(5674)* allele in the SZY33 and SZY35 *tac1Δ/tac1Δ* mutants conferred high levels of FLC resistance, about ten-fold higher than the *TAC1-2(5457)* integrants ( $IC_{50\%}$  of 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  for *TAC1-2(5674)* as compared to 1  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  for the *TAC1-2(5457)* integrants) (Fig. 6B). We also observed that strain SZY86 was slightly more resistant than strain SZY91 (Fig. 6B), possibly as a consequence of the extra copy of the chromosome 5 fragment detected in the SZY86 mutant (Fig. S2C). Taken together, these results demonstrate that the N972D mutation confers FLC resistance.



**Figure 6.** FLC susceptibility of the SC5314-derived *tac1* $\Delta$  mutants. A. Spot assay. The FLC susceptibility of the parental SC5314 strain (+/+) and its corresponding homozygous *tac1* $\Delta$  mutants (-/-) together with the SZY33- and SZY35-derived *TAC1-2(5457)* and *TAC1-2(5674)* integrants (-/+) was determined on YPD plates containing increasing concentrations of FLC indicated on a log scale *x*-axis (top). B. Liquid microdilution assay. The FLC susceptibility of the strains shown in panel A was also determined by microtiter plate assays. The data is presented as the relative growth of the cells (in percentage) in FLC-containing medium as compared to the growth of the same strain in FLC-free medium (100%). The values represent the means  $\pm$  standard deviations of one representative experiment performed in duplicate.

## II.4. Discussion

Different genetic evidences presented in this study demonstrate that Tac1p regulates *PDR16* expression. First, deleting *TAC1* in the A<sup>R</sup> clinical strain 5674, in which *PDR16* is upregulated, reduces *PDR16* expression to basal levels, similar to those observed in the matched A<sup>S</sup> strain 5457, demonstrating that Tac1p is responsible for *PDR16* overexpression in strain 5674 (Fig. 2). Second, deleting *TAC1* in the A<sup>S</sup> SC5315 strain strongly reduced *PDR16* induction by FPZ (Fig. 5). Finally, introduction of the *TAC1* N972D gain-of-function allele in the SC5314-derived *tac1Δ/tac1Δ* mutant resulted in the constitutive upregulation of *PDR16* (Fig. 5). These findings, together with our previous demonstration that *PDR16* participates in the A<sup>R</sup> phenotype of strain 5674, indicate that Tac1p regulates the expression of at least another gene, besides *CDR1* and *CDR2*, to confer azole resistance. Whether *PDR16* is a direct target of Tac1p, like *CDR1* and *CDR2*, remains to be determined. Sequence analysis did not identify a DRE motif (CGGN<sub>4</sub>CGG) in the *PDR16* promoter, suggesting that the regulation of *PDR16* by Tac1p is indirect. However it is also possible that Tac1p, like other zinc cluster factors, binds to different combinations of CGG triplets in the promoter of its targets to regulate their transcription (Kim *et al.*, 2003). Interestingly, we observed a residual upregulation of *PDR16* and *CDR1*, but not *CDR2*, upon FPZ treatment of the *tac1Δ/tac1Δ* mutant (Fig. 5). This result is important as it uncovers the participation of another factor in the FPZ-induced expression of these two genes and shows that the targets of Tac1p belong to two classes with respect to their inducibility by FPZ, those totally Tac1p-dependent (*CDR2*) and those partially Tac1p-dependent (*PDR16*, *CDR1*). The availability of well-characterized *tac1Δ/tac1Δ* mutant strains coupled to functional genomic approaches will allow us to investigate this observation at the whole-genome level. A functional dissection of the *PDR16* promoter is also underway to identify the *cis*-acting sequences mediating FPZ induction and possibly Tac1p-binding as well as the *trans*-acting factor mediating *PDR16* residual induction by FPZ in the absence of Tac1p.



It was recently reported that a single N977D mutation in the C-terminal domain of Tac1p, recovered from two independent A<sup>R</sup> strains, was responsible for the constitutive activation of *CDR1* and *CDR2* expression and for FLC resistance (Coste *et al.*, 2004; Coste *et al.*, 2006). Our results showing that the *TAC1-2(5674)* allele, which differs from the wild-type *TAC1-2(5457)* allele only by the N972D mutation, displays gain-of-function properties, demonstrate that this mutation is responsible for the constitutive activation of Tac1p in strain 5674 and thus identifies another gain-of-function mutation in *TAC1*. Whether the N972D mutation is co-dominant, as the N977D mutation (Coste *et al.*, 2006), remains to be determined, although the similar location and nature of the two mutations suggest that it is likely to be the case. The consequence of the sequence polymorphisms on the activity of the *TAC1-1(5674)* and *TAC1-2(5674)* alleles also remains to be determined. Finally, it is also currently unknown how the N972D and N977D mutations activate Tac1p. Previous studies on the *S. cerevisiae* zinc cluster regulators of pleiotropic drug resistance Pdr1p and Pdr3p, which control the expression of the multidrug efflux transporters *PDR5*, *SNQ2* and *YORI* and hence pleiotropic drug resistance (Balzi and Goffeau, 1995), identified a large number of activating mutations located within different functional domains of these two proteins (Nourani *et al.*, 1997; Carvajal *et al.*, 1997; Simonics *et al.*, 2000; Kolaczowska *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2004). It was shown that an *S. cerevisiae* strain carrying an activating mutation in Pdr1p (F815S) exhibits enhanced occupancy of coactivator complexes at the *PDR5* promoter accompanied by loss of contacts between histones and DNA as well as altered chromatin structure at both promoter and coding sequences of *PDR5* (Gao *et al.*, 2004). In addition, genome-wide location studies recently showed that Pdr1p is constitutively bound to its target promoters *in vivo* (Fardeau *et al.*, 2007), suggesting that the activation of Pdr1p by drugs or gain-of-function mutations involves mechanisms taking place after DNA-binding. However, the precise molecular mechanisms responsible for the conversion of Pdr1p and Pdr3p by these activating mutations remain elusive. The nature of the N972D and N977D mutations in Tac1p (gain

of a negative charge) is reminiscent of mutations that increase the acidity of the transactivating domain of the *S. cerevisiae* zinc cluster protein Gal4p, thereby promoting enhanced recruitment of the transcriptional machinery to the target promoters (Gill *et al.*, 1990). Alternatively, the N972D and N977D mutations could disrupt the interaction of Tac1p with a repressor, as proposed for the activating mutations G888D and G790D in the *S. cerevisiae* zinc cluster factors Upc2p and Ecm22p, respectively (Davies *et al.*, 2005). This study showed that any amino acid substitution larger than alanine at position G888 in Upc2p confers an hyperactive state to the protein, demonstrating that the size of the lateral chain (and not the charge) is responsible for the activation of Upc2p (Davies *et al.*, 2005). The frequent occurrence of gain-of-function mutations in transcription factors of the zinc cluster family suggests that a generic mechanism of transcriptional activation exists among the members of this family.

Results from our Northern blot analyses suggest that Tac1p positively regulates its own expression, either directly or indirectly. First, high levels of the *TAC1* RNA are observed in strain 5674 as compared to strain 5457 (Fig. 2), possibly as a consequence of the N972D mutation in *TAC1*. This is supported by the observation that introduction of the hyperactive *TAC1*<sup>N972D</sup> allele (*TAC1-2(5674)*) in a *tac1Δ/tac1Δ* mutant leads to the constitutive upregulation of *TAC1* expression, unlike introduction of the wild-type *TAC1* allele (*TAC1-2(5457)*) that has no effect (Fig. 5), although we cannot exclude the formal possibility that the stability of the *TAC1-2(5674)* mRNA is increased as compared to that of the wild-type *TAC1-2(5457)* allele. We also found that FPZ treatment induces *TAC1* expression (Fig. 5), possibly via an autoregulatory loop. This situation is similar to the *S. cerevisiae* Pdr3p protein in which activating mutations lead to the constitutive upregulation of the *PDR3* gene (Delahodde *et al.*, 1995; Simonics *et al.*, 2000). In this case, *PDR3* autoregulation is direct as Pdr3p was shown to bind to the *PDR3* promoter (Delahodde *et al.*, 1995). A possible Tac1p direct autoregulation is supported by the presence of a DRE-

like element in the *TAC1* promoter, CGGAGCACGG, located between positions -1051 and -1060 relative to the ATG codon. Comparing the expression levels of a reporter gene driven by the *TAC1* promoter (containing or not the DRE) in strains carrying the gain-of-function or the corresponding wild-type *TAC1* allele should answer this question. Irrespective of the mechanism (direct or indirect), the consequence of a positive autoregulatory loop for Tac1p may allow the protein to be produced in large amounts, leading to a rapid, sustained and efficient response of the cells to drugs or to any intracellular or extracellular signals regulating the Tac1p pathway (Lee *et al.*, 2002).

Recent reports have shown that cases of aneuploidy are frequent in *C. albicans* and may represent means for the cells to adapt to different environmental conditions (Chibana *et al.*, 2000; Rustchenko, 2007; Selmecki *et al.*, 2005; Selmecki *et al.*, 2006). For example, loss of one copy of chromosome 1 has been observed in strains exposed to the growth inhibitor 5-fluoroorotic acid (Chen *et al.*, 2004). Also, loss of one copy of chromosome 5 or gain of one copy of chromosome 6 has been documented in strains grown on media containing L-sorbose or D-arabinose as the only carbon source, respectively (Kabir *et al.*, 2005; Rustchenko *et al.*, 1994). Of particular interest, chromosome 5 aneuploidy, due to trisomy or segmental aneuploidy (isochromosome formation), is linked to azole resistance in several clinical isolates (Coste *et al.*, 2006; Selmecki *et al.*, 2006). CGH analysis of our panel of *tac1* mutants identified strains with chromosome 5 trisomy but no cases of isochromosome 5 formation (Fig. S1). Chromosome 5 trisomy does not appear to be linked to azole resistance in our *tac1* mutant strains since strain SZY33 (three copies of chromosome 5; *tac1Δ/tac1Δ/tac1Δ*) is no more resistant to azoles than strain SZY35 (two copies of chromosome 5; *tac1Δ/tac1Δ*) (Figs 6 and S1). Our CGH experiments also identified several cases of chromosome 7 trisomy (Fig. S1). Chromosome 7 is the smallest of the eight *C. albicans* chromosomes and has been reported to undergo several types of rearrangements, including trisomy, reciprocal translocation, and chromosomal deletion

(Chibana *et al.*, 2000; Selmecki *et al.*, 2006; Rustchenko, 2007). Our results show that chromosome 7 trisomy does not correlate with azole resistance, as several of our strains carrying three copies of chromosome 7 are A<sup>S</sup> (Table 1). It also appears from our results that genetic engineering of *C. albicans*, including stressful conditions associated with cell transformation, can cause alterations in chromosome copy number affecting not only the targeted chromosome (in our case, chromosome 5) but other chromosomes as well (in our case, chromosome 7). Such common occurrence of aneuploidy emphasizes the importance of inspecting the chromosomal integrity of the strains by CGH analysis during mutant construction.

While deleting *TAC1* in strain 5674, one of the two heterozygous mutants, strain SZY20, behaved unexpectedly. This strain, which is predicted to carry two copies of the *TAC1*<sup>N972D</sup> allele (*TAC1*<sup>N972D</sup>/*TAC1*<sup>N972D</sup>/*tac1*Δ::*FRT*) based upon the Southern and CGH experiments and which is as resistant to azoles as strain 5674, did not have higher levels of *CDR1*, *CDR2* and *PDR16* expression when compared to the other heterozygous mutant SZY19 which carries only one copy of *TAC1*<sup>N972D</sup> and has reduced azole resistance when compared to strain 5674. The azole resistance of strain SZY20 in the absence of *CDR1*, *CDR2* and *PDR16* upregulation suggests that it is *TAC1*-independent and caused by an unknown mechanism. The fact that strain SZY32, which is derived from strain SZY20 and has lost this additional copy of chromosome 5, is susceptible to azoles demonstrates that the unknown alteration causing azole resistance in strain SZY20 is specific to that strain. This is also supported by the finding that a third independent heterozygous mutant behaves similarly to strain SZY19 (data not shown).

Our demonstration that *PDR16* expression is controlled by Tac1p supports the proposition that Tac1p regulates the phospholipid composition of the cell membranes in *C.*

*albicans* as one of its physiological functions. In *S. cerevisiae*, *PDR16* encodes a PITP of the Sec14p family (Li *et al.*, 2000; Schnabl *et al.*, 2003). PITPs are lipid-binding proteins that transfer molecules of phosphatidylinositol or phosphatidylcholine between membrane compartments. The high level of structural and functional homology between the *C. albicans* and *S. cerevisiae* Pdr16p proteins suggests that *C. albicans* Pdr16p is likely to function as a PITP as well (Saidane *et al.*, 2006). Other targets of Tac1p involved in phospholipid homeostasis include Cdr1p and Cdr2p, which function as general phospholipid translocators in addition to their role as drug efflux pumps (Smriti *et al.*, 2002), and Rta3p which is homologous to *S. cerevisiae* Rsb1p, a protein with phospholipid translocating activity (Coste *et al.*, 2004; Kihara and Igarashi, 2004). It is therefore possible that Tac1p regulates the asymmetric distribution of phospholipids in the two lipid bilayers of the membranes. This function is similar to that of Pdr1p and Pdr3p which have been shown to regulate the inward and outward movement of phospholipids across the yeast plasma membrane (Kean *et al.*, 1997; Hanson and Nichols, 2001). Thus, phospholipid translocation and pleiotropic drug resistance are intimately linked processes, which are important for yeast cell survival in a wide range of environments and, not surprisingly, highly conserved in *C. albicans* and *S. cerevisiae*.

## II.5. Experimental procedures

### *Strains and growth media*

The *C. albicans* strains used in this study are listed in Table 1. The cells were grown at 30°C in yeast peptone dextrose (YPD) medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) or in synthetic complete (SC) medium (in which uracil is replaced by 100 µg.ml<sup>-1</sup> of uridine (Sherman, 1991)) containing 10 µg.ml<sup>-1</sup> or 1 µg.ml<sup>-1</sup> of mycophenolic acid (MPA; Sigma). The *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) or DH5α bacterial strains were used for DNA cloning and maintenance of the plasmid constructs.

### *Candida albicans transformation*

*C. albicans* transformations were performed as described previously (Ito *et al.*, 1983) with minor modifications. The cells were grown overnight in 15 ml of YPD medium, diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.1 in 100 ml of fresh YPD and allowed to grow to an OD<sub>600</sub> of 0.4. The cells were harvested, washed once with 10 ml of sterile water and resuspended in 1ml of 1X LiAc solution (Ito *et al.*, 1983). Cells (100 µl) were transferred to a sterile tube containing 2-10 µg of *Apa*I-digested DNA derived from the pSF11 constructs and 100 µg of denatured salmon sperm DNA as carrier. A LiAc/40% PEG solution (700 µl of 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM LiAc, 40% (w/v) PEG4000) was added and the cell suspensions were incubated overnight at 30°C with gentle rotation. The cells were heat shocked at 42°C for 15 min and plated on SC medium plates containing 10 µg.ml<sup>-1</sup> of MPA.

### *Antifungal drugs and susceptibility testing*

Stock solutions of FLC (a gift from Pfizer Canada Inc.) were prepared at a concentration of  $5 \text{ mg.ml}^{-1}$  in water. For microtiter plate assays, cells were grown overnight in YPD medium then diluted in YPD to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.1, followed by a second 1:100 dilution in the same medium. Fifty microliters of this dilution was added to  $50 \mu\text{l}$  of a FLC solution (in YPD) concentrated two times or drug-free medium in 96-well microtiter plates. The ranges of drug concentrations tested were 1 to  $128 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Growth was measured spectrophotometrically at  $\text{OD}_{600}$  after 24 h of incubation at  $30^\circ\text{C}$  in a humid chamber. The FLC  $\text{MIC}_{50}$  ( $\text{IC}_{50\%}$ ) values were determined as the first concentration of FLC capable of reducing growth by 50% as compared to control cells grown in the absence of FLC. For spot assays, cells were grown overnight on YPD plates and resuspended in water to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.1. Tenfold serial dilutions of each strain were spotted onto YPD plates supplemented with a range of concentrations of FLC or with the solvent alone. The ranges of concentrations tested were 2.5 to  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  of FLC. The plates were incubated for two days at  $30^\circ\text{C}$ .

*Construction of the TAC1 deletion cassette and deletion of TAC1 in strains 5674 and SC5314*

Plasmid pSF11 (Wirsching *et al.*, 2000) was used for the construction of the *TAC1* deletion cassette (Fig. 1A). A DNA fragment overlapping positions +2947 to +4350 in *TAC1* (*TAC1<sub>down</sub>*) was PCR-amplified with *Pfu* DNA polymerase (Stratagene) from 5674 genomic DNA, using primers 5'-AATCCGCTCGAGGGGTTAAAAAAGAGTTGTAATTGG (introduces an *XhoI* site, underlined) and 5'-CTACTAGGGGCCCGGCTGATGAGAGAGTGTGTGC (introduces an *ApaI* site, underlined) (primer sequences were from strain SC5314 at <http://www.candidagenome.org>). The resulting fragment (1428 bp) was digested with *XhoI* and *ApaI* and cloned into the corresponding sites of pSF11, generating plasmid

pSFI1TAC1D2. The *TACI<sub>up</sub>* fragment (positions -1420 to -1) was PCR-amplified with *Pfu* DNA polymerase using primer 5'-TCCCCGCGGGCCCTTTAGTTTATATAAATACTACCTTTCG (primer MR890; the underlined sequence introduces sequential *Sst*II and *Apa*I sites) and primer 5'-AAGGAAAAAGCGGCCGCTATTTATGAGAGAAGGAGAAAGGC which introduces a *Not*I site (underlined). The *TACI<sub>up</sub>* PCR fragment (1450 bp) was digested with *Sst*II and *Not*I and cloned into the corresponding restriction sites of pSFI1TAC1D2, yielding plasmid pSFI1TAC1DU7. Sequence comparison of the two *TACI* contigs in the reference strain SC5314 that was used for the *C. albicans* genome sequencing project (contig19-10170 and contig19-20170) (Jones *et al.*, 2004; Braun *et al.*, 2005) indicated that two alleles of *TACI<sub>up</sub>* and *TACI<sub>down</sub>* fragments display some sequence divergence (95% and 94% sequence identity, respectively). We therefore used restriction length polymorphism and DNA sequence analyses to make sure that the *TACI<sub>up</sub>* and *TACI<sub>down</sub>* fragments cloned from strain 5674 to construct the deletion cassette were derived from the same allele. This allele was the one homologous to contig19-10170 in strain SC5314 and it was therefore expected that the *TACI* deletion cassette would recombine more efficiently in strain 5674 with the allele homologous to the one in SC5314 contig19-10170. Plasmid pSFI1TAC1DU7 was digested to completion with *Apa*I and transformed into strain 5674 or SC5314. MPA-resistant (MPA<sup>R</sup>) transformants were selected on SC medium containing 10 µg ml<sup>-1</sup> of MPA (Sigma). MPA<sup>R</sup> colonies were picked after 7-9 days of growth at 30°C and streaked for single colonies before Southern blot analysis. Strains which had integrated the MPA<sup>R</sup>-flipping cassette at the *TACI* allele were grown overnight in YCB-BSA liquid medium (23.4 g of yeast carbon base, 4 g of BSA at pH 4.0) to induce the *SAP2* promoter and excision of the MPA<sup>R</sup> flipper cassette. The cells were spread on SC plates containing 1 µg.ml<sup>-1</sup> of MPA and incubated for two days to screen for MPA-sensitive (MPA<sup>S</sup>) clones. The procedure was repeated to disrupt the second allele of *TACI* in strains 5674 and SC5314, followed by Southern blot analysis of the strains to confirm the *TACI* deletion.



*Sequencing of the TAC1 alleles in strains 5457 and 5674 and construction of the TAC1 integration cassettes*

The *TAC1* gene was PCR-amplified from 5457 or 5674 genomic DNA using *pfu* Turbo DNA polymerase (Invitrogen) and primers 5'-CGCGGATCCATGGACACTTCACTGTCACTGGG (the underlined sequence introduces a *Bam*HI site) and 5'-CCGCTCGAGCCCTTAAATCCCCAAATTATTGTC (introduces a *Xho*I site, underlined). The resulting PCR products (2967 bp) were then entirely sequenced and subsequently cloned into the corresponding sites of pYC2/CT (Invitrogen). Sequencing of different clones identified two alleles from strain 5457 (*TAC1-1(5457)* and *TAC1-2(5457)*) and two alleles from strain 5674 (*TAC1-1(5674)* and *TAC1-2(5674)*). With the exception of a homozygous point mutation changing adenine at position +2914 bp of the 5674 *TAC1* ORF to guanine (corresponding to the N972D mutation in Tac1p), no additional mutations that might have been introduced during the amplification process were detected in the four *TAC1* alleles. Plasmid pSFI1TAC1D2 was used to individually introduce the *TAC1-2(5457)* or *TAC1-2(5674)* alleles into the SC5314-derived *tac1Δ/Δ* mutants SZY33 and SZY35. Using 5457 and 5674 genomic DNA as templates, two fragments overlapping positions -1420 to +3728 in *TAC1* were amplified by PCR with KOD HiFi DNA polymerase (Novagen) with primer MR890 (see above) and primer 5'-AAGAAAAAGCGGCCGCGAGTAAAGGAGTGGGAAAGAGTG (the underlined sequence introduces a *Not*I site). The resulting 5148 bp-fragments include 1420 bp upstream of the ATG codon, the 2946-bp *TAC1* ORF and 782 bp downstream of the stop codon. These fragments were cloned into the *Sst*II and *Not*I sites of pSFI1TAC1D2. Sequencing of the *TAC1* ORF from different clones confirmed the presence of two alleles from strain 5457 (in plasmids pSFI1TAC1REV6 and pSFI1TAC1REV4 harboring the *TAC1-1(5457)* and *TAC1-2(5457)* alleles, respectively) and two alleles from strain 5674 (in plasmids pSFI1TAC1REV47 and pSFI1TAC1REV43 harboring the *TAC1-1(5674)* and *TAC1-2(5674)* alleles, respectively). The pSFI1TAC1REV4 and pSFI1TAC1REV43

plasmids were digested to completion with *ApaI* and transformed into strains SZY33 and SZY35. Strains which had integrated the *MPA<sup>R</sup>*-flipping cassette at the *TAC1* locus were identified by Southern blotting.

#### *Genomic DNA isolation and Southern blot analysis*

*C. albicans* genomic DNA was prepared as described for *S. cerevisiae* (Rose *et al.*, 1990). For Southern blot experiments, genomic DNAs (500 ng) were digested to completion with *BamHI*, electrophoresed on a 1% agarose gel and transferred to a nylon membrane (Hybond-N; Amersham Pharmacia Biotech.). Prehybridization, hybridization and washing steps were carried out as previously described (Saidane *et al.*, 2006).

#### *RNA preparation and Northern blotting*

*C. albicans* cultures (100 ml) were grown with agitation in YPD medium at 30°C to an OD<sub>600</sub> of approximately 1.0. For fluphenazine (FPZ) treatment, 10 OD<sub>600</sub> units of cells were exposed or not to 50 µg.ml<sup>-1</sup> of FPZ for 20 min at 30°C with gentle shaking. FPZ was obtained from Sigma and was prepared in water at a concentration of 20 mg.ml<sup>-1</sup>. Total RNA was extracted using the hot phenol method (Wodicka *et al.*, 1997). Northern blotting was performed as previously described (Saidane *et al.*, 2006). The membranes were exposed to a PhosphorImager screen (Molecular Dynamics) or a FUJIFILM Imaging Plate screen. The signal was quantified using the Multi Gauge program, version 2.3 (FUJIFILM). The membranes were subsequently exposed to Kodak XAR or MS films at -80°C.

#### *Probe preparation*

The *PDR16*, *CDR1*, *CDR2* and *ACT1* probes used for the Northern blot experiments have been described elsewhere (Saidane *et al.*, 2006). The *TACI*<sub>BgIII-EcoRV</sub> probe used for the Northern blot experiments (Figs. 2 and 5) consists of a 601-bp fragment corresponding to positions +1420 to +2020 in the *TACI* ORF. The *TACI*<sub>down-AvaI</sub> probe corresponds to positions +3101 to +3584 (relative to the ATG codon of the *TACI* ORF). The *TACI* probes used for the Southern blot experiments were : *TACI*<sub>up</sub> (Figs. 1C and S2A, upper panels), *TACI*<sub>BgIII-EcoRV</sub> (Figs. 1C and S2A, lower panels) and *TACI*<sub>down-AvaI</sub> (Fig. S2C).

#### *Genome databases, DNA sequencing and sequence alignment analyses*

Sequence information for the SC5314 *TACI* gene was obtained from the Biotechnology Research Institute of Montreal, National Research Council of Canada (<http://candida.bri.nrc.ca/candida/index.cfm>) and the Stanford Genome Technology Center (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida>) websites. Sequencing of the *TACI* alleles from the 5674 and 5457 strains was performed at the IRIC Genomics Platform. Sequence alignments were performed using the BioEdit (Ibis Therapeutics) and Clustal\_X programs (Thompson *et al.*, 1997).

## **II.6.Acknowledgments**

The authors would like to thank Osman Zin Al-Abdin for excellent technical assistance, Joachim Morschhauser for the gift of pSFI1 and the IRIC Genomics Platform for DNA sequencing. This work was supported by a research grant to M.R. from the Canadian Institutes of Health Research (MT-15679). S.Z. is supported by a doctoral studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This is NRC publication number 49521.

## II.7.References

- Akins, R.A. (2005) An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* **43**: 285-318.
- Anderson, J.B., Sirjusingh, C., and Ricker, N. (2004) Haploidy, diploidy and evolution of antifungal drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **168**: 1915-1923.
- Balzi, E. and Goffeau, A. (1995) Yeast multidrug resistance: the PDR network. *J Bioenerg Biomembr* **27**: 71-76.
- Braun, B.R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., *et al.* (2005) A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet* **1**: 36-57.
- Carvajal, E., van den Hazel, H.B., Cybularz-Kolaczowska, A., Balzi, E., and Goffeau, A. (1997) Molecular and phenotypic characterization of yeast *PDR1* mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Mol Gen Gene*, **256**: 406-415.
- Chen, X., Magee, B.B., Dawson, D., Magee, P.T., and Kumamoto, C.A. (2004) Chromosome 1 trisomy compromises the virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **51**: 551-565.
- Cheng, G., Yeater, K.M., and Hoyer, L.L. (2006) Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. *Eukaryot Cell* **5**: 180-191.
- Chibana, H., Beckerman, J.L., and Magee, P.T. (2000) Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res* **10**: 1865-1877.
- Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhauser, J., Forche, A., Selmecki, A., *et al.* (2006) A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* **172**: 2139-2156.
- Coste, A.T., Karababa, M., Ischer, F., Bille, J., and Sanglard, D. (2004) *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot Cell* **3**: 1639-1652.
- Davies, B.S., Wang, H.S., and Rine, J. (2005) Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol Cell Biol* **25**: 7375-7385.
- De Deken, X. and Raymond, M. (2004) Constitutive activation of the *PDR16* promoter in a *Candida albicans* azole-resistant clinical isolate overexpressing *CDR1* and *CDR2*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2700-2703.
- Delahodde, A., Delaveau, T., and Jacq, C. (1995) Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol Cell Biol* **15**: 4043-4051.

- Fardeau, V., Lelandais, G., Oldfield, A., Salin, H., Lemoine, S., Garcia, M., *et al.* (2007) The central role of *PDR1* in the foundation of yeast drug resistance. *J Biol Chem* **282**: 5063-5074.
- Franz, R., Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Ruhnke, M., and Morschhauser, J. (1998) Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 3065-3072.
- Gao, C., Wang, L., Milgrom, E., and Shen, W.C. (2004) On the mechanism of constitutive Pdr1 activator-mediated *PDR5* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for enhanced recruitment of coactivators and altered nucleosome structures. *J Biol Chem* **279**: 42677-42686.
- Gill, G., Sadowski, I., and Ptashne, M. (1990) Mutations that increase the activity of a transcriptional activator in yeast and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 2127-2131.
- Gillum, A.M., Tsay, E.Y., and Kirsch, D.R. (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**: 179-182.
- Hanson, P.K. and Nichols, J.W. (2001) Energy-dependent flip of fluorescence-labeled phospholipids is regulated by nutrient starvation and transcription factors, *PDR1* and *PDR3*. *J Biol Chem* **276**: 9861-9867.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.
- Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., *et al.* (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci. USA* **101**: 7329-7334.
- Kabir, M.A., Ahmad, A., Greenberg, J.R., Wang, Y.K., and Rustchenko, E. (2005) Loss and gain of chromosome 5 controls growth of *Candida albicans* on sorbose due to dispersed redundant negative regulators. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12147-12152.
- Kean, L.S., Grant, A.M., Angeletti, C., Mahe, Y., Kuchler, K., Fuller, R.S., and Nichols, J.W. (1997) Plasma membrane translocation of fluorescent-labeled phosphatidylethanolamine is controlled by transcription regulators, *PDR1* and *PDR3*. *J Cell Biol* **138**: 255-270.
- Kihara, A. and Igarashi, Y. (2004) Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. *Mol Biol Cell* **15**: 4949-4959.
- Kim, J.-H., Polish, J., and Johnston, M. (2003) Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. *Mol Cell Biol* **23**: 5208-5216.
- Kolaczowska, A., Kolaczowski, M., Delahodde, A., and Goffeau, A. (2002) Functional dissection of Pdr1p, a regulator of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **267**: 96-106.
- Kontoyiannis, D.P. and Lewis, R.E. (2002) Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* **359**: 1135-1144.

- Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., *et al.* (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **298**: 799-804.
- Li, X., Routt, S.M., Xie, Z., Cui, X., Fang, M., Kearns, M.A., *et al.* (2000) Identification of a novel family of nonclassic yeast phosphatidylinositol transfer proteins whose function modulates phospholipase D activity and Sec14p-independent cell growth. *Mol Biol Cell* **11**: 1989-2005.
- Lopez-Ribot, J.L., McAtee, R.K., Lee, L.N., Kirkpatrick, W.R., White, T.C., Sanglard, D., and Patterson, T.F. (1998) Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 2932-2937.
- Marichal, P., Koymans, L., Willemsens, S., Bellens, D., Verhasselt, P., Luyten, W., *et al.* (1999) Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145**: 2701-2713.
- Nourani, A., Papajova, D., Delahodde, A., Jacq, C., and Subik, J. (1997) Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain. *Mol Gen Genet* **256**: 397-405.
- Odds, F.C., Brown, A.J., and Gow, N.A. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**: 272-279.
- Podust, L.M., Yermalitskaya, L.V., Lepesheva, G.I., Podust, V.N., Dalmaso, E.A., and Waterman, M.R. (2004) Estriol bound and ligand-free structures of sterol 14 $\alpha$ -demethylase. *Structure* **12**: 1937-1945.
- Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990) *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New-York.
- Rustchenko, E. (2007) Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **7**: 2-11.
- Rustchenko, E.P., Howard, D.H., and Sherman, F. (1994) Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. *J Bacteriol* **176**: 3231-3241.
- Saidane, S., Weber, S., De Deken, X, St Germain, G., and Raymond, M. (2006) *PDR16*-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **60**: 1546-1562.
- 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.
- Schnabl, M., Oskolkova, O.V., Holic, R., Brezna, B., Pichler, H., Zagorsek, M., *et al.* (2003) Subcellular localization of yeast Sec14 homologues and their involvement in regulation of phospholipid turnover. *Eur J Biochem* **270**: 3133-3145.
- Selmecki, A., Bergmann, S., and Berman, J. (2005) Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol Microbiol* **55**: 1553-1565.

- Selmecki, A., Forche, A., and Berman, J. (2006) Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* **313**: 367-370.
- Sherman, F. (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **194**: 3-21.
- Simonics, T., Kozovska, Z., Michalkova-Papajova, D., Delahodde, A., Jacq, C., and Subik, J. (2000) Isolation and molecular characterization of the carboxy-terminal pdr3 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **38**: 248-255.
- Sims, C.R., Ostrosky-Zeichner, L., and Rex, J.H. (2005) Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch Med Res* **36**: 660-671.
- Smriti, Krishnamurthy, S., Dixit, B.L., Gupta, C.M., Milewski, S., and Prasad, R. (2002) ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators. *Yeast* **19**: 303-318.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882.
- Wirsching, S., Michel, S., and Morschhauser, J. (2000) Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol* **36**: 856-865.
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M.H., and Lockhart, D.J. (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **15**: 1359-1367.



### III. Chapitre 3: Genome-wide expression and location analyses of the *Candida albicans* Tac1p regulon

Le contenu de ce chapitre a été publié dans la revue Eukaryotic Cell en 2007.

Des données supplémentaires électroniques de ce chapitre sont accessibles sur l'adresse :

<http://ec.asm.org/cgi/content/full/6/11/2122/DC1>.

Liu, T.T.\*, **Znaidi, S.\***, Barker, K.S., Xu, L., Homayouni, R., Saidane, S., Morschhäuser, J., Nantel, A., Raymond, M., Rogers, P.D. (2007). Genome-wide expression and location analyses of the *Candida albicans* Tac1p regulon. *Eukaryot. Cell.* 6:2122-2138. \*: **Contributions égales.**

Contribution des auteurs : L'estimation de ma contribution est de 45%. Liu, avec l'aide de Barker, a effectué toutes les expériences de biopuces d'expression, la PCR quantitative de la figure 1 et a participé à la rédaction du manuscrit avec Barker sous la supervision de Dr. David Rogers. Xu et Homayouni ont aidé par des analyses bioinformatiques, Saidane a effectué la PCR quantitative de la figure 3. J'ai écrit plus de la moitié du contenu du manuscrit sous la supervision de ma directrice de recherche Martine Raymond.

## Genome-wide expression and location analyses of the *Candida albicans* Tac1p regulon

Running Title: Identification of the Tac1p regulon

Teresa T. Liu<sup>1,2</sup> §, Sadri Znaidi<sup>3</sup> §, Katherine S. Barker<sup>1,2</sup>, Lijing Xu<sup>4</sup>, Ramin Homayouni<sup>4,5</sup>,  
Saloua Saidane<sup>3</sup>, Joachim Morschhäuser<sup>6</sup>, André Nantel<sup>7</sup>, Martine Raymond<sup>3, 8, ‡, \*</sup>, P. David  
Rogers<sup>1,2, ‡, \*</sup>

Departments of Clinical Pharmacy, Pharmaceutical Sciences, Molecular Sciences, and Pediatrics, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, Tennessee, 38163,<sup>1</sup> Children's Foundation Research Center of Memphis, Le Bonheur Children's Medical Center, Memphis, Tennessee 38103,<sup>2</sup> Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, QC, Canada H3T 1J4,<sup>3</sup> Bioinformatics Program, University of Memphis, Memphis, TN 38152,<sup>4</sup> Department of Biology, University of Memphis, Memphis, TN 38152,<sup>5</sup> Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Röntgenring 11, D-97070 Würzburg, Germany,<sup>6</sup> Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada H4P 2R2,<sup>7</sup> Department of Biochemistry, Université de Montréal, QC, Canada H3T 1J4<sup>8</sup>

\*Corresponding authors:

P. David Rogers, Le Bonheur Children's Medical Center, Room 304 West Patient Tower, Children's Foundation Research Center, 50 North Dunlap Street, Memphis, TN 38103  
Phone: (901) 287-5387. Fax: (901) 287-5036. \_\_\_\_\_

Martine Raymond, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7.  
Phone: (514) 343-6746. Fax: (514) 343-6843. \_\_\_\_\_

§ **These two authors contributed equally to this work.**

‡ These two authors share senior authorship of this paper.

### III.1. Abstract

A major mechanism of azole resistance in *Candida albicans* is over-expression of the genes encoding the ABC transporters Cdr1p and Cdr2p due to gain-of-function mutations in Tac1p, a transcription factor of the zinc cluster family. To identify the Tac1p regulon, we analyzed four matched sets of clinical isolates representing the development of *CDR1*- and *CDR2*-mediated azole resistance, using gene expression profiling. We identified 31 genes that were consistently up-regulated with *CDR1* and *CDR2*, including *TAC1* itself, and 12 consistently down-regulated genes. When a resistant strain deleted for *TAC1* was similarly examined, the expression of almost all of these genes returned to levels similar to those in the matched azole-susceptible isolate. Using genome-wide location (ChIP-chip) analysis, we found 37 genes whose promoters were bound by Tac1p *in vivo*, including *CDR1* and *CDR2*. Sequence analysis identified 9 new genes whose promoters contain the previously reported Tac1p drug-responsive element (DRE; CGGN<sub>4</sub>CGG), including *TAC1*. In total, there were 8 genes whose expression was modulated in the four azole-resistant clinical isolates in a *TAC1*-dependent manner and whose promoter was bound by Tac1p, qualifying them as direct Tac1p targets: *CDR1*, *CDR2*, *GPX1* (putative glutathione peroxidase), *LCB4* (putative sphingosine kinase), *RTA3* (putative phospholipid flippase), orf19.1887 (putative lipase) as well as *IFU5* and orf19.4898 of unknown function. Our results show that Tac1p binds under non-activating conditions to the promoter of its targets, including to its own promoter. They also suggest roles for Tac1p in regulating lipid metabolism (mobilization and trafficking) and oxidative stress response in *C. albicans*.

## III.2.Introduction

*Candida albicans* causes mucosal, cutaneous, and systemic infections including oropharyngeal candidiasis (OPC), the most frequent opportunistic infection among patients with AIDS (25, 40). Azole antifungal agents have proven effective in the management of OPC; however, with increased use of these agents, treatment failures have occurred that have been associated with the emergence of azole-resistant strains of *C. albicans* (47, 52, 56, 63, 82).

The azole antifungals target lanosterol demethylase (Erg11p), a key enzyme in the ergosterol biosynthesis pathway (38). Several mechanisms of resistance to the azole antifungal agents have been described in *C. albicans* including increased expression of genes encoding multi-drug efflux pumps (27, 28, 47, 67, 69, 80, 81). These include the gene encoding a transporter of the major facilitator superfamily (*MDR1*) and genes encoding two ATP binding cassette (ABC) transporters (*CDR1* and *CDR2*) (27, 28, 47, 69, 80). Over-expression of these efflux pumps is presumed to prevent accumulation of effective concentrations of the azole antifungal agents within the fungal cell. Among studies examining multiple matched azole-susceptible and -resistant sets of isolates, some isolates only over-express *MDR1*, whereas others only over-express *CDR1* and *CDR2* (47, 56). These observations suggest that two distinct transcriptional pathways are involved in regulating these efflux pumps.

Previous studies have shown that a wild-type *CDR1* promoter fused to a luciferase reporter construct becomes activated when placed in an azole-resistant isolate that over-expresses *CDR1* and *CDR2* (20). Using this system, it was shown that a conserved DNA sequence element in the *CDR1* and *CDR2* promoters, named drug response element (DRE; 5'-CGGAA/TATCGG), was necessary for *CDR1* constitutive as well as drug-inducible transcriptional activation (20). These results suggested that a gain-of-function mutation in a transcription factor was the cause of the *CDR1* and *CDR2*

constitutive overexpression in azole-resistant isolates (20). The zinc cluster transcription factor Tac1p (for transcriptional activator of CDR genes) was recently identified and shown to be responsible for *CDR1* and *CDR2* transcriptional activation (15, 16). An amino acid change from an asparagine to aspartic acid at position 977 (N977D) in Tac1p was able to confer increased expression of *CDR1* and *CDR2* accompanied by decreased azole susceptibility (15). It was also shown that the DNA-binding domain of Tac1p fused to the GST protein binds *in vitro* to the *CDR1* and *CDR2* DRE (16).

Interestingly, increased azole resistance is observed when a gain-of-function mutation is present in both *TAC1* alleles (15). The *TAC1* locus is on chromosome 5. Homozygosity at the *TAC1* locus occurs either through mitotic recombination between copies of chromosome 5, or through the presence of extra copies of chromosome 5 harboring a gain-of-function *TAC1* allele and loss of chromosome 5 with the wild-type *TAC1* allele (15). Selmecki *et al.* demonstrated that a specific segmental aneuploidy, consisting of an isochromosome composed of the two left arms of chromosome 5, is associated with azole resistance. Increases and decreases in azole resistance were found to be strongly associated with gain and loss of this isochromosome (73). Recent work by Coste *et al.* showed that the effect of specific mutations in azole resistance genes located on chromosome 5 (*TAC1*, *ERG11*) can be further enhanced by loss-of-heterozygosity and/or addition of extra copies of chromosome 5 (14).

In addition to *CDR1* and *CDR2*, other targets of Tac1p (*RTA3*, *HSP12*, and *IFU5*) have been identified, all of which contain a putative DRE in their promoter region (16). In a separate study, it was shown that *PDR16*, encoding a putative phosphatidylinositol transfer protein contributing to clinical azole resistance, is also a target of Tac1p (66, 85). In the present study, we used functional genomic approaches, namely genome-wide expression and location profiling, to identify the Tac1p regulon. Our results provide a more comprehensive picture of the molecular effects of Tac1p mutations in azole-resistant clinical isolates and suggest other important cellular functions for Tac1p in *C. albicans*.

### III.3. Materials and Methods

**Strains and growth media.** The *C. albicans* strains used in this study are listed in Table 1. The matched clinical isolate sets and strain SZY31 were grown in yeast peptone dextrose (YPD) broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 30°C. The CAI4 strain and its epitope-tagged derivatives were grown at 30°C in YPD or, under selective conditions, in synthetic complete (SC) medium lacking uracil (74) supplemented or not with 100 µg.ml<sup>-1</sup> of uridine and 1 mg.ml<sup>-1</sup> of 5-fluoroorotic acid (5-FOA, Toronto Research Chemicals, Inc., Toronto, ON). The *Escherichia coli* DH5α bacterial strain was used for DNA cloning and maintenance of the plasmid constructs.

**TABLE 1.** Strains used in this study

Strain	Parental strain	Genotype or description	FLC MIC (µg/ml)	Reference or source
C43 (DSY294)		Azole-susceptible clinical isolate	0.25 <sup>a</sup>	67
C56 (DSY296)	C43	Azole-resistant clinical isolate	128 <sup>a</sup>	67
Gu2		Azole-susceptible clinical isolate	6.25 <sup>b</sup>	28
Gu5	Gu2	Azole-resistant clinical isolate	>100 <sup>b</sup>	28
3	2	Azole-susceptible clinical isolate	8 <sup>c</sup>	83
17	16	Azole-resistant clinical isolate	>64 <sup>c</sup>	83
5457		Azole-susceptible clinical isolate	≤0.5 <sup>d</sup>	66
5674	5457	Azole-resistant clinical isolate	32.0 <sup>d</sup>	66
SZY31	5674	<i>tac1Δ::FRT/tac1Δ::FRT<sup>f</sup></i>	0.5 <sup>c</sup>	85
CAI4		<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	2.0 <sup>e</sup>	26
SZY51	CAI4	<i>TAC1/TAC1::HA<sub>3</sub>-URA3-HA<sub>3</sub></i>	ND <sup>e</sup>	This study
SZY63	SZY51	<i>TAC1/TAC1::HA<sub>3</sub></i>	2.0 <sup>e</sup>	This study
SZY103	SZY63	<i>TAC1::HA<sub>3</sub></i>	2.0 <sup>e</sup>	This study
SZY106	SZY63	<i>TAC1::HA<sub>3</sub></i>	2.0 <sup>e</sup>	This study
SZY91	SC5314	<i>tac1Δ/TAC1(N972D)-MPA<sup>R</sup>-FLP</i>	16.0 <sup>e</sup>	85

<sup>a</sup> FLC concentration yielding at least 90% growth inhibition after 24 h of growth compared with the growth of the control (69).

<sup>b</sup> Lowest FLC concentration in which little or no growth was visually detected after 48 h of growth.

<sup>c</sup> MIC<sub>80</sub> according to the CLSI (formerly NCCLS) macrodilution reference method or a microdilution modification of the CLSI method (57, 83).

<sup>d</sup> MIC<sub>50</sub> value, determined as the first concentration of the azole drug able to reduce growth by 50% compared with that of control cells grown in the absence of drug.

<sup>e</sup> MIC<sub>70</sub> value (see Fig. S1 in the supplemental material).

<sup>f</sup> FRT, FLP recombination target.

<sup>g</sup> ND, not determined.

**Construction of *C. albicans* expression microarrays.** The nucleotide sequences corresponding to 6,165 open reading frames (ORFs) for *C. albicans* were downloaded from the Galar Fungail European Consortium (Assembly 6, [http://www.pasteur.fr/Galar\\_Fungail/CandidaDB/](http://www.pasteur.fr/Galar_Fungail/CandidaDB/)). We set out to design two non-

overlapping probesets targeting the 3'-600 bp region of each ORF. Each probeset consisted of 13 'perfect match' 25-bp probes and their corresponding 'mismatch' control probes containing a single mismatch in the center of the oligonucleotide. For ORFs less than 600 bp in length the sequence was divided in two equal segments for subsequent design procedures. Optimum probesets were selected by the Affymetrix design team based on their model which, among other things, considers probe hybridization quality and cross-hybridization potential. Consequently, in some cases, only one probeset was selected for a given ORF. For quality control and normalization purposes, we made 2-3 additional probe sets spanning the entire sequence of the *C. albicans* 18S rRNA (GenBank Accession M60302), genes encoding GAPDH, actin and Mdr1p (Bmr1p) in addition to the standard Affymetrix controls (BioB, C, D, cre, DAP, PHE, LYS, THR). In the end, the GeneChip contained 10,736 probe sets including 9 controls, 6,123 unique ORFs and duplicate probe sets for 4,604 ORFs. The duplicate probe sets are made to distinct regions of the ORF, thereby allowing 2 independent measurements of the mRNA level for that particular gene. The *C. albicans* custom Affymetrix NimbleExpress Arrays (CAN04a530004N) were manufactured by NimbleGen Systems (1) per our specification.

**RNA preparation for microarrays.** The matched clinical isolate sets and strain SZY31 were grown in YPD broth at 30°C in a shaking incubator to mid-log phase as described previously (61). The cell pellets were frozen and stored at -80°C prior to RNA preparation. Experiments were repeated independently three times. Total RNA was isolated using the hot SDS-phenol method (70). Frozen cell pellets were suspended in 12 ml of 50 mM sodium acetate (pH 5.2), 10 mM EDTA at room temperature, after which 1 ml of 20% sodium dodecyl sulfate and 12 ml of acid phenol (Fisher Scientific, Waltham, MA) were added. This mixture was incubated 10 min at 65°C with vortexing each minute, cooled on ice for 5 min, and centrifuged for 15 min at 12,000 x g. Supernatants were transferred to new tubes containing 15 ml of chloroform, mixed and centrifuged at 200 x g for 10 min. The aqueous layer was removed to new tubes, RNA was precipitated with 1 volume isopropanol and 0.1 volume 2 M sodium acetate (pH 5.0), and then collected by

centrifugation at 17,000 x g for 35 min at 4°C. The RNA pellet was suspended in 10 ml of 70% ethanol, collected again by centrifugation, and suspended in nuclease free water.

**cRNA synthesis and labelling.** Immediately prior to cDNA synthesis, the purity and concentration of RNA samples were determined from  $A_{260}/A_{280}$  readings and RNA integrity was determined by capillary electrophoresis using the RNA 6000 Nano Laboratory-on-a-Chip kit and Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) as per the manufacturer's instructions. First and second strand cDNA was synthesized from 15 µg of total RNA using the SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and oligo-dT24-T7 primer (PrOligo: Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. cRNA was synthesized and labelled with biotinylated UTP and CTP by *in vitro* transcription using the T7 promoter-coupled double stranded cDNA as template and the Bioarray HighYield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, New York, NY). Double-stranded cDNA synthesized from the previous steps was washed twice with 70% ethanol and suspended in 22 µl of RNase-free water. The cDNA was incubated as recommended with reaction buffer, biotin-labelled ribonucleotides, dithiothreitol, RNase inhibitor mix and T7 RNA polymerase for 5 h at 37°C. The labelled cRNA was separated from unincorporated ribonucleotides by passing through a CHROMA SPIN-100 column (Clontech, Mountain View, CA) and ethanol precipitated at -20°C overnight.

**Oligonucleotide array hybridization and analysis.** The cRNA pellet was suspended in 10 µl of RNase-free water and 10 µg was fragmented by ion-mediated hydrolysis at 95°C for 35 min in 200 mM Tris-acetate (pH 8.1), 500 mM potassium acetate, 150 mM magnesium acetate. The fragmented cRNA was hybridized for 16 h at 45°C to the *C. albicans* NimbleExpress GeneChip arrays. Arrays were washed at 25°C with 6 × SSPE, 0.01% Tween 20 followed by a stringent wash at 50°C with 100 mM MES, 0.1 M NaCl, 0.01% Tween 20. Hybridizations and washes employed the Affymetrix Fluidics Station 450 using their standard EukGE-WS2v5 protocol. The arrays were then stained with



phycoerythrin-conjugated streptavidin (Molecular Probes: Invitrogen) and the fluorescence intensities were determined using the GCS 3000 high-resolution confocal laser scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA). The scanned images were analysed using software resident in GeneChip Operating System v2.0 (GCOS; Affymetrix). Sample loading and variations in staining were standardized by scaling the average of the fluorescent intensities of all genes on an array to a constant target intensity. The signal intensity for each gene was calculated as the average intensity difference, represented by  $[\Sigma(\text{PM} - \text{MM})/(\text{number of probe pairs})]$ , where PM and MM denote perfect-match and mismatch probes.

**Expression microarray data analysis.** The scaled gene expression values from GCOS software were imported into GeneSpring 7.2 software (Agilent Technologies) for preprocessing and data analysis. Probe sets were deleted from subsequent analysis if they were called absent by the Affymetrix criterion and displayed an absolute value below 20 in all experiments. The expression value of each gene was normalized to the median expression of all genes in each chip as well as the median expression for that gene across all chips in the study. Pairwise comparison of gene expression was performed for each matched experiment. Data files of each scanned chip were submitted to the Gene Expression Omnibus database (GEO; [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)). The accession number for the series is GSE8727.

**Quantitative real-time PCR for expression data.** An aliquot of the RNA preparations from the samples used in the microarray experiments was saved for quantitative real-time reverse transcription (RT)-PCR follow-up studies. First-strand cDNAs were synthesized from 2  $\mu\text{g}$  of total RNA in a 21- $\mu\text{l}$  reaction volume using the SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCRs were performed in triplicate using the 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Inc.: ABI, Foster City, CA). Independent PCRs were performed using the same cDNA for both the gene of interest and the 18S rRNA, using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc.). Gene-

specific primers were designed for the gene of interest and the 18S rRNA using Primer Express software (Applied Biosystems, Inc.) and the Oligo Analysis & Plotting Tool (QIAGEN, Valencia, CA) and are shown in Table 2. The PCR conditions consisted of AmpliTaq Gold activation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. A dissociation curve was generated at the end of each PCR cycle to verify that a single product was amplified using software provided with the 7000 Sequence Detection System. The change in fluorescence of SYBR Green I dye in every cycle was monitored by the system software, and the threshold cycle ( $C_T$ ) above the background for each reaction was calculated. The  $C_T$  value of 18S rRNA was subtracted from that of the gene of interest to obtain a  $\Delta C_T$  value. The  $\Delta C_T$  value of an arbitrary calibrator (e.g., untreated sample) was subtracted from the  $\Delta C_T$  value of each sample to obtain a  $\Delta\Delta C_T$  value. The gene expression level relative to the calibrator was expressed as  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Statistical analysis was performed using R software version 2.5.0 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Fold enrichment was compared using Student's t-test. The statistical significance threshold was fixed at  $\alpha=0.05$ .

**TABLE 2.** Primers used for quantitative real-time PCR expression analysis

Gene	Primer pair <sup>a</sup>	Amplicon size (bp)
18S rRNA	F, 5'-CACGACGGAGTTTCACAAGA-3' R, 5'-CGATGGAAGTTTGAGGCAAT-3'	135
<i>CDR1</i>	F, 5'-ATTCTAAGATGTCGTCGCAAGATG-3' R, 5'-AGTTCTGGCTAAATTCTGAATGTTTTTC-3'	140
<i>CDR2</i>	F, 5'-TAGTCCATTCAACGGCAACATT-3' R, 5'-CACCCAGTATTTGGCATTGAAA-3'	76
<i>PDR16</i>	F, 5'-CTGCGGGACAAGATTCATTAGC-3' R, 5'-TTGAGTACCAACAGGATGTGCTTTA-3'	62
<i>TAC1</i>	F, 5'-TGGCAATGTATTTAGCAGATGAGG-3' R, 5'-TGCTTGAAGTGAAGGTGAATTTTG-3'	71

<sup>a</sup> F, forward; R, reverse.

**Generation of an HA-tagged Tac1p-expressing strain.** A DNA fragment overlapping positions -402 to +937 of *C. albicans URA3* ORF (*URA3* marker) was PCR-amplified with *Pfu* DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) from plasmid pCaEXP (12), using primers 5'-ATCATCTCTAGATAAGGATGGTATAAACGGAAAC (introduces an *Xba*I site, underlined) and 5'-GCCCCGGGAAGGACCACCTTTGATTG (introduces a *Sma*I site, underlined). The resulting fragment (1,362 bp) was digested with *Xba*I and *Sma*I and used to swap the equivalent *Xba*I-*Xho*I fragment of plasmid pMPY-3×HA (1,078 bp, containing the *S. cerevisiae URA3* marker) (72), generating plasmid pCaMPY-3×HA. A *TAC1*-tagging cassette was amplified from plasmid pCaMPY-3×HA using primers FWD: 5'-ttgattgataattcagctgtaaattgccatttagcaatttaataattaccaatTTTTctttgacaataattggggattAGGGAACAAAAGCTGG-3' (the lower case sequence corresponds to positions +2860 to +2943 of the *TAC1* ORF) and REV: 5'-taggaaaaatatatgaaacaataaatattacaagatatacatcattatacatcgtttcaccaattacaactctttttaacccCTATAGGGCGAATTGG-3' (the lower case sequence corresponds to positions +2947 to +3030 of the *TAC1* ORF) which anneal specifically to the in-frame pCaMPY-3×HA vector sequences PET-up and PET-down (upper case sequences) as described previously (72). The resulting fragment (1,821 bp), containing the *C. albicans URA3* marker flanked by direct repeats of the 3×HA epitope-encoding sequences and 84 bp of sequences homologous to the 3' end of the *TAC1* gene, was used to transform strain CAI4. Counterselection of the *URA3* gene was carried out on plates containing 5-FOA as described previously (8) except that uracil was replaced with uridine.

***Candida albicans* transformation.** *C. albicans* transformations were performed as described previously (35) with minor modifications. The cells were grown overnight in 15 ml of YPD medium, diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.1 in 100 ml of fresh YPD and allowed to grow to an OD<sub>600</sub> of 0.4. The cells were harvested, washed once with 10 ml of sterile water and resuspended in 1ml of 1X LiAc solution (35). Cells (100 µl) were

transferred to a sterile tube containing 6 µg of gel-purified PCR- fragment and 100 µg of denatured salmon sperm DNA as carrier. A LiAc/40% PEG solution (700 µl of 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 100 mM LiAc, 40% (w/v) PEG4000) was added and the cell suspensions were incubated overnight at 30°C with gentle rotation. The cells were heat shocked at 42°C for 15 min and plated on SC-ura plates.

**Genomic DNA isolation and Southern blot analysis.** *C. albicans* genomic DNA was prepared as described for *S. cerevisiae* (62). For the Southern hybridization, genomic DNAs (500 ng) were digested to completion with *Hind*III and *Eco*RV, electrophoresed on a 1% agarose gel and transferred to a nylon membrane (Hybond-N; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Prehybridization, hybridization and washing steps were carried out as previously described (66). The *TAC1* probe used consists of a <sup>32</sup>P-radiolabeled 927-bp PCR-amplified fragment from SC5314 genomic DNA overlapping positions +2020 to +2946 in the *TAC1* ORF. The membrane was exposed to a FUJIFILM Imaging Plate screen. The signal was quantified using the Multi Gauge program, version 2.3 (FUJIFILM). The membrane was subsequently exposed to a Kodak XAR film at -80°C.

**Total protein preparation and Western blotting.** Total protein was prepared from 2 O.D. units of strains CAI4 and SZY63 grown overnight, as described for *S. cerevisiae* (62). Extracts were boiled for 5 min, and 35 µl (out of 100 µl total) was separated by electrophoresis on an SDS–8% polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane with a Trans Blot SD Semi-Dry transfer apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) and analyzed with a mouse anti-HA monoclonal antibody (HA-probe (F-7): sc-7392, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) at a dilution of 1:2000, using a chemiluminescence detection system under conditions recommended by the manufacturer (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL).

**Chromatin immunoprecipitation.** Three independent cultures (50 ml each) of strains CAI4 and SZY63 were grown in YPD medium to an OD<sub>600</sub> of 0.8. The

cultures were then treated with 1.4 ml of 37% formaldehyde (final concentration 1%) to induce protein-DNA cross-links. Cells were incubated 30 min at room temperature with agitation and the cross-linking stopped by adding 1.2 ml of 2.5 M glycine. Cells were harvested, washed 3 times with 40 ml of ice-cold TBS buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) and snap frozen in liquid nitrogen. Total cell extracts were prepared by adding 0.7 ml of lysis buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 10 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin), 0.5 ml of acid-washed glass beads (Sigma) and bead beating 4 times for 5 min at highest settings in a mini bead-beater (Biospec Products). Preparation of soluble chromatin fragments was performed by sonicating the extracts 4 times during 20 sec at power 2-3 (output power 8-9 RMS) using Sonic Dismembrator Model 100 sonicator (Fisher Scientific). Immunoprecipitation was performed by incubating the sonicated extracts (from both the tagged SZY63 strain and the untagged parental CAI4 strain) overnight with monoclonal mouse anti-HA antibody (Santa Cruz Biotech) coupled to magnetic beads (Dynabeads Pan Mouse IgG, Dynal Biotech, Brown Deer, WI) at 4°C. Beads were then washed twice with lysis buffer, twice with lysis buffer supplemented with 360 mM NaCl, twice with wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM LiCl, 0.5% NP40, 0.5% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA) and once with TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). The cross-links were reversed by incubating the washed beads overnight in 50 µl of TE/1% SDS at 65°C. The eluted material was then treated with proteinase K, RNase A, extracted twice with phenol:chloroform:isoamyl-alcohol (25:24:1) and the DNA precipitated with 100% ethanol and resuspended in 50 µl of TE. 40 µl of the immunoprecipitated (IPed) DNA fragments were used for amplification and Cy5/Cy3 dye labeling prior to hybridization to *C. albicans* intergenic DNA microarrays.

**DNA labeling, hybridization to intergenic microarrays and data analysis.** Labeling was conducted as described by Drouin *et al.* (23). Briefly, the IPed DNA fragments were blunted with T4 DNA polymerase and ligated to unidirectional

linkers. The DNA was then amplified by LM-PCR in the presence of aminoallyl-modified dUTP. The labeling was carried out post-PCR using monoreactive Cy-dye NHS esters (Cy<sup>TM</sup>5/Cy<sup>TM</sup>3 Mono-Reactive Dye Packs, Amersham Biosciences) that react specifically with the aminoallyl-modified dUTP (5-(3-aminoallyl)-2' deoxyuridine-5'-triphosphate, Sigma-Aldrich). Both pools of labeled IPed DNA from the tagged SZY63 strain (Cy5) and the untagged parental CAI4 strain (Cy3) were mixed and hybridized to a *C. albicans* intergenic DNA microarray that will be described elsewhere (H. Hogues, H. Lavoie, A. Sellam, M. Mangos, T. Roemer, E. Purisima, A. Nantel and M. Whiteway, submitted for publication). Images of Cy5 and Cy3 fluorescence intensities were generated by scanning arrays using Axon 4000b scanner and were analyzed with GenePix Pro 4.1 software (Molecular Devices, formerly Axon Instruments, Inc, Downington, PA). Normalization of the data was conducted using ArrayPipe 1.7 (32), and replicate slides (n=3) were combined using a weighted average method as described in Ren *et al.* (60).

**Quantitative real-time PCR confirmation of the genome-wide location data.** Q-PCR was performed with three independent CAI4 and SZY63 ChIP samples prepared as described above, except that the cell cultures were carried out in the presence of DMSO (0.08%). Quantification of the DNA recovered from the CAI4 and SZY63 ChIPs was performed using the Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Molecular Probes: Invitrogen). A standard curve was prepared using *C. albicans* gDNA quantified by fluorometry and serially diluted in TE buffer (0, 0.1, 0.01, and 0.001 ng/μl). The CAI4 and SZY63 ChIP samples (1 μl) were resuspended in 49 μl of TE buffer. The samples (50 μl) were transferred, in duplicate, in a black 96-well plate (Costar 3694, Corning Inc., Corning, NY) and 50 μl of the PicoGreen reagent was added. The fluorescence was measured using the Envision luminometer (Perkin-Elmer, Waltham, MA) at an excitation and emission wavelength of 485 and 535 nm, respectively. The DNA concentration of the ChIP samples was an average 500 pg/μl, yielding approximately 25 ng of total immunoprecipitated DNA per ChIP sample (50 μl).

**TABLE 3.** Primers used for quantitative real-time PCR binding assays

Promoter	Primer/probe sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Amplicon location <sup>b</sup>
<i>CDRI</i>	F, GGTGCACACACACAAAACACACA R, TTGAGCTCCCCTACTATCCGATCCCTA P, TaqMan probe CCGCCCTCACTCTGTCCATACAAAT	-435 → -341
<i>PDR16</i>	F, GAAAAGAAAAAGAAATGGCAACAT R, TCGACACGTCTTTCCATCAC P, Universal ProbeLibrary probe no. 77 (catalog no. 04689003001) GGTGGTGG	-424 → -501
<i>TAC1</i>	F, CACGAAGATAAAAAATTGTGGTAGC R, AATTGTGCTGATATTTAATTGTTGGT P, Universal ProbeLibrary probe no. 18 (catalog no. 04686918001) CAGCAGGA	-1024 → -948
<i>FURI</i>	F, GGTGCTTTTGGGAGAATGAA R, CTCCTCAAAACAAAAGTCAA P, Universal ProbeLibrary probe no. 27 (catalog no. 04687582001) GCTGCCTG	-987 → -913
<i>SPS4<sup>c</sup></i>	F, TACAGTTGCCCCAGTCAACA R, TGTCTTGGAAACGGAAACTCA P, Universal ProbeLibrary probe no. 15 (catalog no. 04685148001) TCCTGCTC	-636 → -574

<sup>a</sup> F, forward; R, reverse; P, probe. The TaqMan probe was from IDT, and the Universal ProbeLibrary probes were from Roche.

<sup>b</sup> Position according to the ATG start codon.

<sup>c</sup> orf19.7568.

Q-PCR assays were designed using the Universal ProbeLibrary (Roche Applied Science, formerly Exiqon's ProbeLibrary, Indianapolis, IN) and the TaqMan (Integrated DNA Technologies, IDT, Coralville, IA) methodologies. The different primers and probe combinations used for Q-PCR are listed in Table 3. The *CDRI*, *PDR16*, *TAC1* and *FURI* promoter sequences were submitted to the Universal ProbeLibrary, using the web-based ProbeFinder software (version 2.34, Roche Applied Sciences) available on the Roche Applied Science website ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)). The software assigned optimal PCR specific primer sequences to be combined with the corresponding Universal ProbeLibrary probe for each promoter sequence (Universal ProbeLibrary probes, Roche Diagnostics Corp., Basel, Switzerland). We also used the PrimerQuest tool from the IDT website (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) to design a custom TaqMan probe for the *TAC1* promoter (with its corresponding forward and reverse primers) that binds closer to the DRE motif than the Universal ProbeLibrary probe. The *C. albicans* homologue of *S. cerevisiae* *SPS4* (orf19.7568) was used as the reference promoter and *FURI* was used as a control, to perform statistical analyses. The *SPS4* and *FURI* genes were selected because i) they were not modulated in our microarray expression study and

ii) their promoters were not enriched in the ChIP-chips experiments. A set of probe and primers was designed for each of the *SPS4* and *FURI* promoters using the ProbeFinder software (Table 3).

Q-PCR reaction mixtures were prepared using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc.) according to the manufacturer's instructions. For reactions using probes from the Universal ProbeLibrary, 200 pg of ChIP DNA, 250 nM of each forward and reverse primer, 100 nM of the probe, 5  $\mu$ l of the TaqMan Universal PCR Master Mix and water were combined in a final volume of 10  $\mu$ l. Q-PCR reactions using the TaqMan probe were prepared using the same conditions except that the probe and the primers (forward and reverse) were added to a final concentration of 100 nM and 200 nM, respectively. Reactions were performed in MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Inc.) using an ABI 7900 HT Real-Time PCR instrument with 1 cycle at 95°C for 10 min and 40 cycles at (95°C for 15 sec and 60°C for 1 min). Each biological replicate sample (three) was processed in triplicate.

Data analysis was performed using the Sequence Detection System software (SDS 2.2.2; ABI). For each sample, Ct values were determined using the SDS software. The fold enrichments of the targets (*CDRI*, *PDR16* and *TAC1* promoters) were calculated using the relative quantification according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, where  $\Delta Ct = C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ reference}(SPS4 \text{ promoter})}$  and  $\Delta\Delta Ct = \Delta C_{T \text{ test (SZY63 ChIP sample)}} - \Delta C_{T \text{ calibrator (CAI4 ChIP sample)}}$  (46). The *FURI* promoter was used as a negative control to confirm the fold enrichment obtained using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Statistical analysis was performed using the R software ([www.r-project.org](http://www.r-project.org) version 2.5.1) and the  $\Delta\Delta Ct$ 's were compared using Welch's t-test. The statistical significance threshold was fixed at  $\alpha=0.001$ .

**DRE motif analysis.** The promoter sequences (1.5 kb upstream of the starting ATG) were retrieved from the Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org>) and analyzed for the presence of potential DRE motifs using the fuzznuc software from EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/>).



### III.4.Results

**Global Gene Expression Profile.** As a means to identify genes that are co-regulated with the *CDR1* and *CDR2* multidrug efflux pumps and thus potentially new transcriptional targets of Tac1p, we performed gene expression profiling analyses of four matched sets of azole- susceptible and -resistant *C. albicans* clinical isolates in which the acquisition of azole resistance is associated with *CDR1* and *CDR2* overexpression (Table 1). Three of these azole-resistant isolates possess previously defined gain-of-function mutations in the C-terminus of *TAC1*: a N977D amino acid substitution in isolate C56 (also known as DSY296) (15), a N972D amino acid substitution in isolate 5674 (85), and an A736C amino acid substitution in one allele and L962-N969 deletion in the second allele of *TAC1* in isolate 17 (14). Isolate 17 is the last in a series of 17 clinical isolates taken from a single HIV-infected patient (80, 83). Relative to the parental isolate 2, isolate 3 exhibits increased expression of *MDR1* whereas isolate 17 exhibits increased expression of *CDR1* and *CDR2* as well as *MDR1* (80, 83). We therefore compared isolate 17 to isolate 3 to identify the genes co-regulated with *CDR1* and *CDR2*. The other azole-resistant isolate, Gu5, overexpresses *CDR1* and *CDR2* and presumably also contains gain-of-function mutations in Tac1p. The eight strains did not show major chromosomal rearrangements or aneuploidies, as determined by comparative genomic hybridization analyses (data not shown and J. Berman, personal communication).

Three independent RNA samples per strain were hybridized to custom designed Affymetrix *C. albicans* microarrays and the data analyzed as described in Materials and Methods. Genes were initially considered to be differentially expressed if 1) their average fold change in expression was  $\geq 1.5$  for each matched isolate, 2) their expression changed by at least 1.5-fold in at least 2 of the 3 experiments for each matched isolate, and 3) if the average fold change was statistically significant by t-test. Using these criteria, there were 222 genes up-regulated and 150 genes down-regulated in C56 as

compared to C43, 104 genes up-regulated and 63 genes down-regulated in Gu5 as compared to Gu2, 126 genes up-regulated and 92 genes down-regulated in 17 as compared to 3, and 327 genes up-regulated and 243 genes down-regulated in 5674 as compared to 5457 (Table S1). Genes which met these criteria for all 4 matched isolates and whose average fold change was statistically significant by t-test in at least 2 of the 4 matched isolates were included in a final data set (Tables 4 and 5). We found 31 genes to be up-regulated in all four matched clinical isolate sets (Table 4) including the known Tac1p targets *CDR1*, *CDR2*, *IFU5*, *HSP12* and *RTA3* (16). Other up-regulated genes included *GPXI* (putative glutathione peroxidase), *CHK1* (histidine kinase), *LCB4* (Sphingoid long-chain base kinase), *NDH2* (NADH dehydrogenase), *SOU1* (sorbose dehydrogenase), orf19.3047 (transcription cofactor), orf19.4531 (ABC transporter) as well as *TAC1* itself, consistent with our previous proposition that *TAC1* transcription is autoactivated, either directly or indirectly, as a consequence of gain-of-function mutations in Tac1p (85). We also found 12 genes to be down-regulated in all four matched clinical isolate sets. These included *FTRI* (iron transporter), *IHD1* (putative GPI-anchored protein of unknown function), and *OPT6* (oligopeptide transporter) all of which encode integral membrane proteins, and *SOD5* (superoxide dismutase) which encodes a cell wall protein (Table 5). As judged from the expression data, clinical isolate 5674, which carries the Tac1p N972D amino acid substitution, results in the highest impact on gene expression among the isolates tested, as 38 out of the 43 genes modulated in a *TAC1*-dependent manner had the highest fold modulation in this strain (Tables 4 and 5).

**TABLE 4.** Genes up-regulated in all four matched clinical isolate sets

Systematic name <sup>a</sup>	CGD name <sup>b</sup>	CandidaDB name <sup>c</sup>	GO annotation (molecular function) <sup>d</sup>	Fold change in expression <sup>e</sup> in isolates:				
				C56 vs C43	Gu5 vs Gu2	17 vs 3	5674 vs 5457	SZY31 vs 5457
<b>orf19.6000</b>	<i>CDR1</i>	<i>CDR1</i>	Multidrug transporter activity	<b>1.7</b>	<b>3.0</b>	<b>2.4</b>	<b>4.4</b>	-1.0
<b>orf19.5958</b>	<i>CDR2</i>	<i>CDR2</i>	Transporter activity	<b>50.6</b>	<b>14.1</b>	<b>17.1</b>	<b>50.5</b>	-1.3
<b>orf19.86</b>		<i>GPX1</i>	Glutathione peroxidase activity	<b>2.3</b>	<b>3.0</b>	<b>2.3</b>	<b>4.0</b>	-1.2
orf19.896	<i>CHK1</i>	<i>HK1</i>	Protein histidine kinase activity	<b>2.5</b>	1.9	<b>1.8</b>	<b>4.5</b>	1.3
orf19.3160	<i>HSP12</i>	<i>HSP12</i>		<b>5.3</b>	2.9	3.1	<b>16.7</b>	-1.7
orf19.157		<i>IFA24.3</i>		<b>1.5</b>	1.7	<b>1.6</b>	2.1	1.1
<b>orf19.2568</b>	<i>IFU5</i>	<i>IFU5</i>		<b>3.3</b>	3.0	<b>3.7</b>	<b>5.4</b>	1.5
<b>orf19.5257</b>		<i>LCB4</i>	D-Erythro-sphingosine kinase activity	<b>2.2</b>	1.7	<b>2.2</b>	<b>4.0</b>	1.1
orf19.278		<i>MTR</i>		<b>3.1</b>	1.8	<b>1.9</b>	5.2	-1.1
orf19.5713	<i>YMX6</i>	<i>NDH2</i>	NADH dehydrogenase activity	<b>5.3</b>	<b>3.1</b>	<b>2.9</b>	<b>15.3</b>	1.2
orf19.7218	<i>RBE1</i>	<i>PRY2</i>		<b>2.1</b>	1.8	<b>1.7</b>	<b>1.7</b>	1.2
<b>orf19.23</b>	<i>RTA3</i>	<i>RTA3</i>	Phospholipid-translocating ATPase activity	<b>40.4</b>	<b>15.9</b>	<b>22.0</b>	<b>41.0</b>	1.0
orf19.2896	<i>SOU1</i>	<i>SOU1</i>	Sorbose dehydrogenase activity	<b>2.0</b>	1.5	<b>1.5</b>	<b>7.0</b>	-2.0
orf19.3104		<i>YDC1</i>		<b>3.3</b>	1.6	<b>2.1</b>	<b>5.3</b>	1.4
orf19.2726		<i>IPF10262</i>		<b>2.5</b>	<b>2.8</b>	<b>1.9</b>	<b>6.2</b>	-2.9
orf19.4459		<i>IPF11849</i>		2.0	4.1	<b>4.3</b>	<b>5.0</b>	-1.5
orf19.2244		<i>IPF12897</i>		<b>1.8</b>	1.7	1.5	<b>5.4</b>	-1.7
orf19.344		<i>IPF1514</i>		<b>15.5</b>	4.7	4.0	<b>28.9</b>	1.9
orf19.4907		<i>IPF17283</i>		<b>3.2</b>	1.6	<b>2.3</b>	2.0	1.1
orf19.5313		<i>IPF19810</i>		<b>36.0</b>	<b>29.4</b>	18.1	<b>143.1</b>	1.7
orf19.5777		<i>IPF19961</i>		<b>2.0</b>	1.7	<b>2.2</b>	<b>4.2</b>	-1.3
orf19.6840		<i>IPF3535</i>		<b>1.8</b>	2.3	<b>1.9</b>	<b>2.3</b>	-1.4
orf19.3047	<i>SIP3</i>	<i>IPF3598</i>	Transcription cofactor activity	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	1.7	<b>3.0</b>	1.3
orf19.2531	<i>CSP37</i>	<i>IPF4991</i>	ER <sup>/</sup> -to-Golgi vesicle-mediated transport	2.5	1.8	<b>5.5</b>	<b>6.8</b>	-1.3
orf19.7310		<i>IPF5981</i>		<b>4.9</b>	2.7	2.0	<b>16.8</b>	1.2
<b>orf19.1887</b>		<i>IPF6464</i>		<b>2.3</b>	1.8	<b>1.7</b>	4.5	1.2
orf19.2790		<i>IPF7260</i>	Histone-lysine N-methyltransferase activity	<b>1.8</b>	<b>1.6</b>	<b>1.6</b>	2.8	-1.0
orf19.4531		<i>IPF7530</i>	ATPase activity	<b>2.7</b>	<b>3.8</b>	<b>3.5</b>	4.0	-1.6
<b>orf19.4898</b>		<i>IPF8950</i>		<b>2.4</b>	1.6	<b>1.8</b>	3.4	1.1
orf19.3188	<i>TAC1</i>	<i>IPF9191.3f</i>		<b>2.7</b>	<b>2.8</b>	<b>2.8</b>	<b>4.2</b>	-11.7
orf19.3644		<i>IPF9683</i>		<b>2.5</b>	1.5	<b>2.1</b>	<b>3.4</b>	1.1

<sup>a</sup> orf19 nomenclature according to the assembly 19 version. Systematic names in bold designate overlap with ChIP-chip experiments.

<sup>b</sup> Gene name at CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

<sup>c</sup> Gene name at CandidaDB (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>).

<sup>d</sup> GO annotation found at CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

<sup>e</sup> Gene expression values in bold designate statistical significance ( $P < 0.05$ ) in all three experiments.

<sup>/</sup> ER, endoplasmic reticulum.

In order to determine which of these genes require Tac1p for their constitutive differential expression in these isolates, the gene expression profile of strain SZY31, a *tac1Δ/tac1Δ* derivative of the azole-resistant strain 5674 (Table 1), was compared with that of the azole-susceptible parental strain 5457 (85). Genes whose expression was modulated

in strain 5674 as compared to strain 5457 and whose expression in strain SZY31 was returned to levels similar to those observed in strain 5457 were determined to be dependent upon Tac1p for their up- or down-regulation. As shown in Tables 4 and 5, the majority of commonly differentially expressed genes were found to be Tac1p-dependent.

**TABLE 5.** Genes down-regulated in all four matched clinical isolate sets

Systematic name <sup>a</sup>	CGD name <sup>b</sup>	CandidaDB name <sup>c</sup>	GO annotation (molecular function) <sup>d</sup>	Fold change in expression <sup>e</sup> in isolates:				
				C56 vs C43	Gu5 vs Gu2	17 vs 3	5674 vs 5457	SZY31 vs 5457
orf19.7219	<i>FTR1</i>	<i>FTR1</i>	Ferrous iron transporter activity	-2.7	-3.0	-2.1	<b>-4.0</b>	-1.6
orf19.5025	<i>MET3</i>	<i>MET3</i>	Sulfate adenylyltransferase (ATP) activity	-2.0	<b>-7.9</b>	<b>-1.8</b>	-2.5	-1.2
orf19.2947	<i>SNZ1</i>	<i>SNZ1</i>		<b>-3.7</b>	-1.8	-1.7	<b>-2.2</b>	1.3
orf19.5760	<i>IHD1</i>	<i>IPF10662</i>		-1.9	-2.2	<b>-3.1</b>	<b>-9.0</b>	1.7
orf19.3475		<i>IPF11725</i>		<b>-3.9</b>	<b>-2.1</b>	<b>-2.7</b>	<b>-5.8</b>	-1.2
orf19.4655	<i>OPT6</i>	<i>IPF12193</i>	Oligopeptide transporter activity	<b>-1.8</b>	<b>-2.0</b>	<b>-2.4</b>	<b>-3.1</b>	-1.4
orf19.2060	<i>SOD5</i>	<i>IPF1222</i>	Copper, zinc superoxide dismutase activity	-2.3	<b>-8.6</b>	<b>-17.8</b>	<b>-26.3</b>	-1.4
orf19.2059		<i>IPF1228</i>		<b>-2.0</b>	-1.7	-1.7	<b>-2.9</b>	1.2
orf19.4749		<i>IPF13921</i>		<b>-2.3</b>	-1.8	<b>-2.4</b>	<b>-3.0</b>	-1.4
orf19.670.2		<i>IPF20159</i>		<b>-2.3</b>	-2.0	-1.7	<b>-4.9</b>	<b>-1.9</b>
orf19.6679		<i>IPF2314</i>		-1.5	<b>-2.1</b>	<b>-1.8</b>	-2.2	1.1
orf19.7561	<i>DEF1</i>	<i>IPF946</i>		<b>-3.4</b>	-1.5	<b>-1.6</b>	-2.8	-1.4

<sup>a</sup> orf19 nomenclature according to the assembly 19 version.

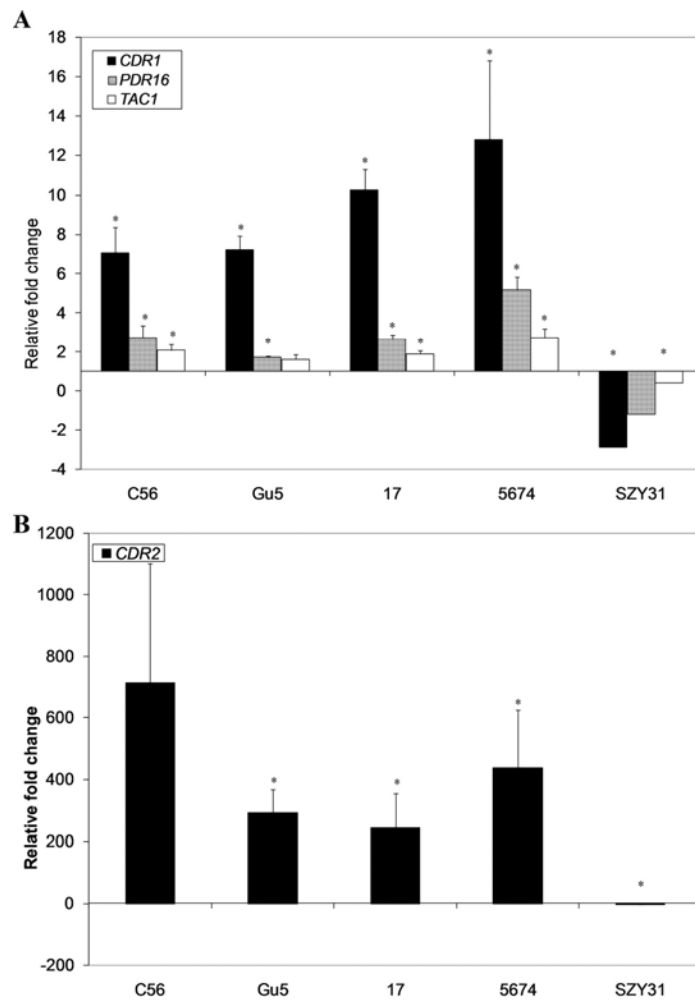
<sup>b</sup> Gene name at CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

<sup>c</sup> Gene name at CandidaDB (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>).

<sup>d</sup> GO annotation found at CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

<sup>e</sup> Gene expression values in bold designate statistical significance ( $P < 0.05$ ) in all three experiments.

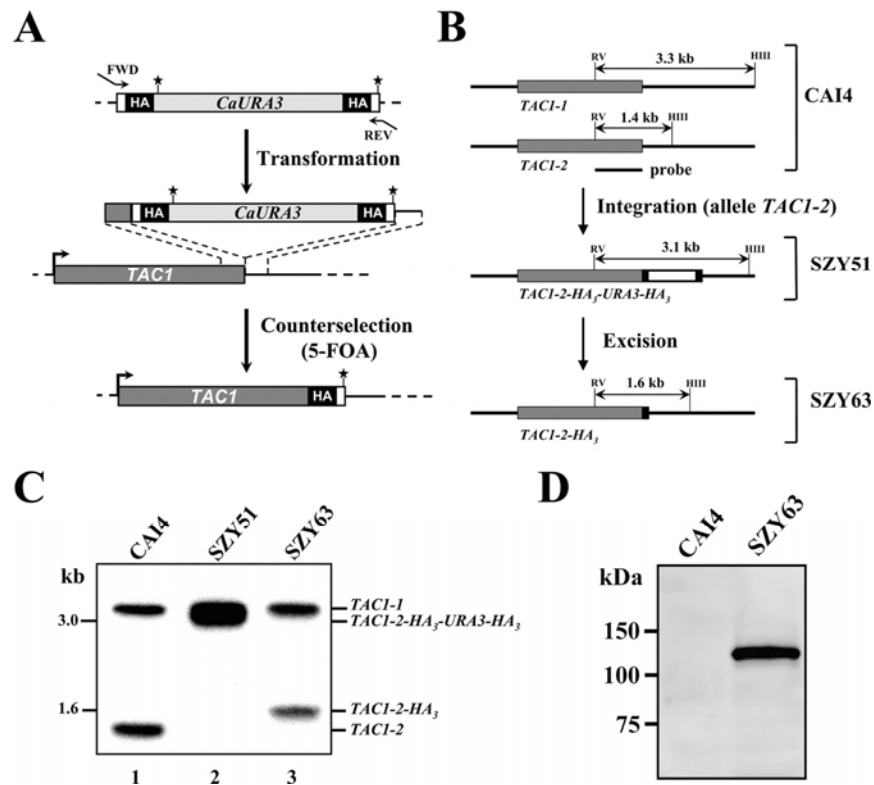
We selected four genes of interest for confirmation of differential expression by real-time RT-PCR. These included *CDR1*, *CDR2*, *TAC1*, and *PDR16*. *PDR16* was selected as it has been shown to be co-regulated with *CDR1* and *CDR2* in association with azole resistance, yet this is one of a limited number of genes not represented on the microarray used in this study (19, 66). As expected, all four genes were confirmed to be up-regulated in all four isolate sets (Fig. 1). Likewise, up-regulation of all four of these genes in isolate 5674 was ablated in strain SZY31 (Fig. 1).



**FIGURE 1.** Quantitative real-time RT-PCR analysis of selected genes differentially expressed in the microarray experiments. (A) Genes differentially expressed in each of the azole resistant clinical isolates as compared to their parent isolates. (B) *CDR2* gene expression in each of the azole resistant clinical isolates. Asterisks denote statistical significance by t-test ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ).

**Identification of Tac1p-binding sites *in vivo*.** To determine if the *TAC1*-dependent genes that were differentially expressed in the clinical isolates have their promoter bound *in vivo* by Tac1p and to identify additional direct targets of Tac1p, we conducted genome-wide location analyses (ChIP-chip), a procedure combining ChIP with hybridization to DNA intergenic microarrays (60). For this purpose, Tac1p was tagged at

its C-terminus with a triple hemagglutinin (HA) epitope, using homologous recombination at the *TAC1* chromosomal locus (Fig. 2). First, we adapted the *S. cerevisiae* PCR epitope-tagging vector pMPY-3×HA (72) for its use in *C. albicans*, by substituting the *S. cerevisiae* *URA3* marker with the *C. albicans* *URA3* gene (see Materials and Methods for details). The resulting vector (pCaMPY-3×HA) contains the Ca*URA3* marker flanked by direct repeats of the HA<sub>3</sub> epitope. The *TAC1*-tagging cassette was amplified with 100-bp primers (16 bp of vector sequences and 84 bp from the gene to be tagged), allowing tagging of Tac1p at its C-terminus (Fig. 2A). After transformation of the CAI4 strain and integration of the cassette by homologous recombination, the marker was excised via recombination between the two directly repeated HA<sub>3</sub> tags and the excision mutants were selected on 5-FOA medium (Fig. 2A). The resulting pre-excision (strain SZY51) and post-excision (strain SZY63) strains were characterized by Southern hybridization using *Hind*III and *Eco*RV double-digested genomic DNA and the *TAC1* probe (Fig. 2B). As predicted (Fig. 2B), the probe detected two fragments, one of 3.3 kb and one of 1.4 kb in the CAI4 strain, corresponding to the wild-type *TAC1-1* (orf19.3188) and *TAC1-2* (orf19.10700) alleles, respectively (Fig. 2C, lane 1). Integration of the HA<sub>3</sub>-tagging cassette occurred at the *TAC1-2* allele in the pre-excision strain SZY51, as the 1.4-kb band was shifted to the 3.1-kb band (Fig. 2C, lane 2). Excision of the Ca*URA3* marker in strain SZY63 was confirmed by the presence of the 1.6-kb band (Fig. 2C, lane 3). To detect the Tac1p-HA<sub>3</sub> fusion protein, Western blotting was performed in strains CAI4 and SZY63, using an anti-HA monoclonal antibody (Fig. 2D). A signal corresponding to the Tac1p-HA<sub>3</sub> fusion protein was detected in the HA-tagged SZY63 strain but not in strain CAI4 (control) (Fig. 2D). The size of this band was approximately 120 kDa, consistent with the predicted molecular weight of the Tac1p-HA<sub>3</sub> fusion protein (118 kDa).



**FIGURE 2.** Chromosomal tagging of Tac1p. (A) PCR epitope tagging strategy for C-terminally tagging transcription factor Tac1p with the triple HA epitope. Top, 100-nt primers (FWD and REV, see Materials and Methods) are designed such that the 5' 84 bases of the forward (FWD) and reverse primers are homologous to sequences of the *TAC1* gene and the 3' 16 bases are complementary and in-frame to unique sequences (open boxes) in the tagging cassette which contains the *C. albicans URA3* marker (*CaURA3*, light gray box) flanked by direct repeats of the 3×HA-encoding sequences (HA, black boxes). The Tac1p stop codon is indicated by the asterisk. Middle, PCR amplification results in a fragment whose ends include the primer sequences, allowing integration by homologous recombination of the tagging cassette upstream of the *TAC1* 3' untranslated region (horizontal thick line). The orientation of the *TAC1* ORF (dark gray box) is indicated by the arrow. Bottom, *CaURA3* marker excision results in the final product, *TAC1-HA<sub>3</sub>*. (B) Schematic representations of the *TAC1-1* (orf19.3188) and *TAC1-2* (orf19.10700) alleles (gray boxes) in strain CAI4 and sizes of the *HindIII*, *EcoRV* double-digested fragments detected by the *TAC1* probe (top, thick line) used for the Southern blot experiment are given for the *TAC1-2* allele following integration of the HA<sub>3</sub>-tagging cassette (open box) and excision of the *CaURA3* marker through HA<sub>3</sub> recombination. (C) Southern blot of genomic DNA from the CAI4 strain and its *URA3*-pre-(SZY51) and post-excision (SZY63) derivatives, digested with *EcoRV* and *HindIII* and hybridized with the *TAC1* probe shown in (B). Marker sizes are indicated on the left. (D) Western blot analysis of protein extracts from strains CAI4 and the Tac1p-HA<sub>3</sub> integrant SZY63 with an anti-HA monoclonal antibody. Molecular weights markers are indicated on the left.

Because the SZY63 integrant is heterozygous for the HA<sub>3</sub> tag and carries a wild type copy of the *TAC1* gene (*TAC1-I*), it was not possible to test the functionality of the Tac1p-HA<sub>3</sub> fusion protein in this background. Using growth on sorbose-containing medium, which induces loss of one copy of chromosome 5 in which *TAC1* is located (64), we constructed strains carrying only the HA<sub>3</sub> epitope-tagged allele of Tac1p (Fig. S1). Functional analysis of these strains by Northern blotting (Fig. S1C, Supplemental Materials and Methods) and FLC susceptibility testing (Fig. S1D, Supplemental Materials and Methods) demonstrated that introduction of the HA<sub>3</sub> tag at the C-terminus of Tac1p did not alter Tac1p function (i.e. did not result in a loss- or gain-of-function mutation).

ChIP-chip experiments were conducted using the CAI4 and SZY63 strains and intergenic DNA microarrays containing 70-mer oligonucleotides covering the promoter regions of the *C. albicans* genome (see Materials and Methods). Using a *P*-value < 0.001 (enriched binding ratio ≥ 1.5), we identified 37 promoters bound by Tac1p (Table 6). These included the promoters of genes known to be regulated by Tac1p: *CDR1* (10.5), *IFU5* (3.0), *PDR16* (2.1), *RTA3* (1.8) and *CDR2* (1.7) (16, 85), thus validating our ChIP-chip procedure and showing that Tac1p binds *in vivo* to the promoter of these genes to regulate their expression. *HSP12*, also known to be regulated by Tac1p, had a binding ratio of 1.2 (*P*-value=0.09) and thus was not significantly bound by Tac1p. These experiments also identified several new targets, including genes involved in lipid metabolism, oxidative stress response as well as genes of unknown function (see Discussion). On two occurrences, Tac1p binding was found at promoters of two genes located on opposite strands (thus sharing the same probe on the chip): *UGA33* (orf19.7317) and *SUC1* (orf19.7319) as well as *LPE10* (orf19.3455) and *KIC2* (orf19.3456) (Table 6). While the expression data did not allow to discriminate which one of the *LPE10* or *KIC2* genes is regulated by Tac1p, we found that *SUC1* was up-regulated in a *TAC1*-dependent manner in 3 out of the 4 clinical isolates tested by expression microarrays (Table S1) while *UGA33* expression was unchanged in 3 out of the 4 clinical isolates, suggesting that *SUC1*, a



sucrose uptake zinc cluster regulator (37), is a target of Tac1p. The identification of several promoters bound *in vivo* by Tac1p under non-activating conditions (i.e. in the absence of drugs or gain-of-function mutations) demonstrates that Tac1p is at least constitutively bound to its targets and suggests the possible involvement of post-binding mechanisms for Tac1p-mediated transcriptional activation (see Discussion).

**TABLE 6.** List of Tac1p-enriched promoters ( $P$ -value < 0.001)

Systematic name <sup>a</sup>	CGD/NRC name <sup>b</sup>	CandidaDB name <sup>c</sup>	<i>S. cerevisiae</i> ortholog <sup>d</sup>	GO terminology <sup>e</sup>	BR <sup>f</sup>	$P$ value <sup>g</sup>	E 5674/5457 <sup>h</sup>	E SZY31/5457 <sup>i</sup>
<b>orf19.6000</b>	<i>CDR1</i>	<i>CDR1</i>	<i>PDR5</i>	Transporter activity	10.5	0.0000	4.4*	-1.0
orf19.6869	<i>AST2</i>	<i>IPF8041</i>	<i>AST2</i>	Peptidase activity	4.1	0.0000	1.6	1.9
orf19.769	<i>IFE1</i>	<i>IFE1</i>	<i>BDH2</i>		3.3	0.0000		
<b>orf19.2568</b>	<i>IFU5</i>	<i>IFU5</i>	<i>WWM1</i>		3.0	0.0000	5.4*	1.5
<b>orf19.86</b>	<i>GPX2</i>	<i>GPX1</i>	<i>HYR1</i>	Glutathione peroxidase activity	2.8	0.0000	4.0*	-1.2
orf19.3406		<i>IPF9898</i>	<i>YHL008C</i>		2.5	0.0000	-2.7*	-1.5
orf19.7166		<i>IPF2186</i>	<i>YGR110W</i>		2.8	0.0000	5.0	1.2
<u>orf19.7042</u>		<i>IPF3080</i>			2.1	0.0000	5.5*	1.3
orf19.93		<i>IPF14895</i>	<i>MIC17</i>		2.1	0.0000	1.5	-1.1
orf19.1027	<i>PDR16</i>	<i>PDR17</i>	<i>PDR16</i>	Phosphatidylinositol transporter activity	2.1	0.0000	20.0 <sup>j</sup>	1.2 <sup>j</sup>
orf19.3395		<i>IPF9483</i>	<i>YHR048W</i>		2.0	0.0000		
<u>orf19.5877</u>	<i>ATF1</i>	<i>IPF1837</i>	<i>ATF1</i>	Alcohol <i>O</i> -acetyltransferase activity	2.0	0.0000	2.8*	1.2
<u>orf19.6627</u>		<i>IPF2557</i>			1.9	0.0000	2.6*	-1.0
<b>orf19.23</b>	<i>RTA3</i>	<i>RTA3</i>	<i>RSB1</i>	Phospholipid-translocating ATPase activity	1.8	0.0000	41.0*	1.0
<u>orf19.6501</u>		<i>IPF3931</i>	<i>YJU3</i>		1.8	0.0000	4.6*	1.1
orf19.5037		<i>IPF17054</i>			1.8	0.0000	7.7	2.1
<b>orf19.4898</b>		<i>IPF8950</i>	<i>FMP52</i>		1.8	0.0001	3.4	1.1
orf19.1267	<i>CAJ1</i>	<i>IPF10278</i>	<i>CAJ1</i>	Chaperone regulator activity	1.7	0.0001	2.5	-1.2
<b>orf19.1887</b>		<i>IPF6464</i>	<i>YEH1</i>		1.7	0.0001	4.5	1.2
orf19.691	<i>GPD2</i>	<i>GPD2</i>	<i>GPD1</i>	GAPDH (NAD <sup>+</sup> ) activity	1.7	0.0001	1.1	1.1
orf19.2175		<i>IPF19998</i>	<i>AIF1</i>	Oxoreductase activity	1.7	0.0001	3.3	1.3
orf19.1444	<i>ENT2</i>	<i>IPF17555.3</i>	<i>ENT2</i>	Cytoskeletal adaptor activity	1.7	0.0002	1.5	1.1
<b>orf19.5958</b>	<i>CDR2</i>	<i>CDR2</i>	<i>PDR5</i>	Transporter activity	1.7	0.0003	50.5*	-1.3
orf19.3455 <sup>k</sup>	<i>LPE10<sup>k</sup></i>	<i>IPF9782<sup>k</sup></i>	<i>LPE10</i>	Magnesium ion transporter activity	1.6	0.0003	1.7	-1.7
<u>orf19.1089</u>	<i>PEX11</i>	<i>PEX11</i>	<i>PEX11</i>	Peroxisome organization and biogenesis	1.6	0.0003	1.8*	-2.4
orf19.1665	<i>MNT1</i>	<i>MNT1</i>	<i>KTR1</i>	Alpha-1,2-mannosyltransferase activity	1.6	0.0003		
orf19.7306		<i>IPF5987</i>	<i>YPR127W</i>		1.7	0.0003	2.1	1.1
<u>orf19.7319<sup>k</sup></u>	<i>SUC1<sup>k</sup></i>	<i>SUC1<sup>k</sup></i>	<i>MAL13</i>	Transcription factor activity	1.6	0.0003	5.1*	1.2
orf19.1718	<i>ZCF8</i>	<i>IPF19769</i>			1.7	0.0004	-1.6	-1.8
orf19.406	<i>ERG1</i>	<i>ERG1</i>	<i>ERG1</i>	Squalene monooxygenase activity	1.7	0.0005	-1.6	1.2
orf19.7603		<i>IPF660</i>	<i>YMR244C-A</i>		1.6	0.0005		
<u>orf19.5005</u>	<i>OSM2</i>	<i>OSM2</i>	<i>OSM1</i>	Fumarate reductase (NADH) activity	1.6	0.0005	2.0*	1.2
orf19.577		<i>IPF7353</i>	<i>YDL057C</i>		1.6	0.0006	2.3	1.5
<b>orf19.5257</b>	<i>LCB4</i>	<i>LCB4</i>	<i>LCB4</i>	D-Erythro-sphingosine kinase activity	1.6	0.0007	4.0*	1.1
<u>orf19.5525</u>		<i>IPF4328</i>	<i>YMR315W</i>		1.5	0.0008	2.3*	1.1
orf19.4476	<i>IFD6</i>		<i>YPL088W</i>	Aryl-alcohol dehydrogenase activity	1.6	0.0009	2.2	1.2
orf19.951		<i>IPF1548</i>			1.6	0.0009	-1.5	1.1

<sup>a</sup> orf19 nomenclature according to the assembly 19 version. Systematic names in bold are modulated in the four sets of isolates, whereas those underlined are modulated at least in strain 5674.

<sup>b</sup> Gene name according to CGD (<http://www.candidagenome.org/>) or the NRC *Candida albicans* database (<http://candida.bri.nrc.ca/candida/index.cfm?page=CaGeneSearch>).

<sup>c</sup> Gene name according to CandidaDB (<http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>).

<sup>d</sup> *S. cerevisiae* ortholog or best hit according to CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

<sup>e</sup> GO terminology according to CGD.

<sup>f</sup> BR, binding ratio. Probes were spotted in duplicate on the ChIP-chip arrays (H. Hogues, H. Lavoie, A. Sellam, M. Mangos, T. Roemer, E. Purisima, A. Nantel, and M. Whiteway, submitted for publication). The binding ratio with the most significant  $P$  value is shown.

<sup>g</sup>  $P$  value of the corresponding binding ratio.

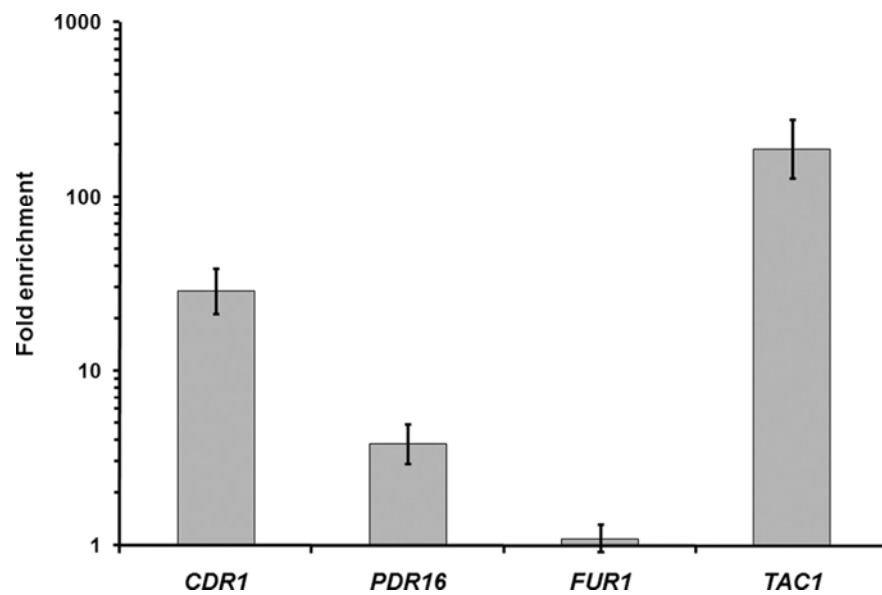
<sup>h</sup> E 5674/5457, expression ( $n$ -fold) of the gene in strain 5674 relative to that in strain 5457. An asterisk (\*) indicates that expression ( $n$ -fold) is statistically significant (see Table S1 in the supplemental material).

<sup>i</sup> E SZY31/5457, expression ( $n$ -fold) of the gene in strain SZY31 relative to that in strain 5457.

<sup>j</sup> Value obtained by Q-PCR.

<sup>k</sup> The intergenic oligonucleotide probe corresponds to a common promoter of two adjacent genes. The orf19.3455 probe is shared by *LPE10* and *KIC2*; the orf19.3719 probe is shared by *SUC1* and *UGA33*.

Using quantitative real-time PCR, we confirmed the binding of Tac1p to the *CDR1* and *PDR16* promoters, with enrichment ratios of  $29.1 \pm 4.0$  and  $4.1 \pm 0.2$ , respectively (Fig. 3). As a control, we investigated binding of Tac1p to the promoter of the *FUR1* gene, which was not enriched in the ChIP-chip experiments nor modulated in the azole-resistant clinical isolates, and found no significant enrichment of that promoter by Q-PCR ( $1.1 \pm 0.2$ ), confirming the validity of the data obtained in the ChIP-chip experiments (Fig. 3).



**FIGURE 3.** *In vivo* enrichment of Tac1p binding at the *CDR1*, *PDR16* and *TAC1* promoters using Q-PCR. The CAI4 and SZY63 strains were submitted to ChIP (3 biological replicates) and the recovered DNA samples were analyzed by Q-PCR, using Universal ProbeLibrary probes (Roche) for the *PDR16*, *TAC1*, *SPS4* and *FUR1* promoters or a TaqMan probe (IDT) for the *CDR1* promoter. Fold enrichments are presented in log scale: 3.8 for the *PDR16* promoter (95% confidence interval: 4.0, 5.0), 28.8 for the *CDR1* promoter (95% confidence interval: 21.4, 38.9), 189.3 for the *TAC1* promoter (95% confidence interval: 128.6, 278.6) and 1.1 for the *FUR1* promoter (95% confidence interval: 0.9, 1.3), which was used as a negative control.

Although our results suggested that the expression of the *TAC1* gene is controlled by Tac1p in an autoregulatory loop, the ChIP-chip data showed no enrichment for Tac1p at its own promoter (Table S2), supporting an indirect auto-regulation mechanism. However, the fact that the *TAC1* promoter contains a DRE-like motif located between positions -1051

and -1060 relative to the ATG translation start codon (Table 7; see below) and that the *TAC1* oligo printed on the intergenic chips is located at position -480 may have prevented us from detecting Tac1p binding at the *TAC1* promoter. Therefore, we used for Q-PCR a set of TaqMan probe and primers hybridizing close to this DRE motif (Table 2). Under these conditions, we observed a strong enrichment of the *TAC1* promoter ( $179.6 \pm 25.2$ ) (Fig. 3). These results strongly support a direct autoregulatory loop controlling *TAC1* expression (see Discussion).

**Identification of potential Tac1p-binding motifs.** Tac1p belongs to the fungal-specific family of zinc cluster transcription factors that contain a DNA-binding domain formed by six cysteines coordinating two zinc atoms (48). Zinc cluster factors can bind as homodimers to CGG triplets with various orientations (everted, inverted, or direct repeats) and spacing (48). The *CDR1* and *CDR2* DRE consists of a direct CGG repeat with 4 intervening nucleotides (CGGAA/TATCGG), a configuration also found in the promoter of the other Tac1p-regulated genes *RTA3* and *IFU5* (16, 20). We thus looked for a DRE motif in the promoter of the 37 genes identified by the ChIP-chip experiments, using 1.5 kb of promoter sequence and the motif definition  $CGGN_4CGG$  which allows for complete degeneracy for the 4 nucleotides between the CGG repeats. In addition to *CDR1*, *CDR2*, *RTA3* and *IFU5*, this analysis identified 8 new genes containing the  $CGGN_4CGG$  sequence: *AST2*, *ATF1*, *PEX11*, *IFD6* and 4 ORFs of unknown function (orf19.7166, orf19.7042, orf19.6627 and orf19.4898), for a total of 15 matches in 12 genes (Table 7). As a control, we searched the  $CGGN_4CGG$  motif in 1.5 kb of promoter sequence from 6,068 orfs and found an average of 1.5 match per 37 promoters, yielding a 10-fold enrichment for the presence of the  $CGGN_4CGG$  sequence in the Tac1p-bound promoters. We also searched the 37 enriched promoters for the motif  $CGGN_3CGG$  since our unpublished data indicated that a CGGATTCGG sequence in the *PDR16* promoter is involved in its transcriptional activation by Tac1p. This analysis identified 7 genes (including *PDR16*), one of them with three  $CGGN_3CGG$  motifs (Table 7). Searching the 6,068 promoter sequences yielded an

average of 2.2 genes per 37 promoters, resulting in a 3.2-fold enrichment for that sequence in the Tac1p-bound promoters.

**TABLE 7.** DRE motifs found in the Tac1p target promoters

Motif definition	Systematic name <sup>a</sup>	CGD name <sup>b</sup>	Motif <sup>c</sup>	Strand <sup>d</sup>	Position <sup>e</sup>				
CGGN <sub>4</sub> CGG	orf19.6000	<i>CDR1</i>	<u>CGGATATCGG</u>	S	-457				
	orf19.6869	<i>AST2</i>	CGGCTAACGG	A	-262				
	orf19.2568	<i>IFU5</i>	<u>CGGAAATCGG</u>	A	-235				
	orf19.7166			CGGGTAACGG	S	-292			
				CGGAGAACGG	S	-285			
	orf19.7042			CGGATAACGG	S	-731			
				CGGTTACCGG	A	-632			
				CGGATTACGG	A	-639			
	orf19.5877	<i>ATF1</i>		CGGATATCGG	A	-206			
				CGGATATCGG	A	-176			
	orf19.23	<i>RTA3</i>		<u>CGGAACTCGG</u>	S	-595			
				CGGGTGACGG	S	-232			
				<u>CGGAAATCGG</u>	S	-220			
				CGGGGAACGG	A	-340			
				CGGTTGTCGG	A	-339			
				CGGAGCACGG	A	-1054 <sup>f</sup>			
				orf19.10700	<i>TAC1</i>				
	CGGN <sub>3</sub> CGG	orf19.3406	<i>PDR16</i>		CGGCAACGG	A	-332		
					CGGATTCCGG	S	-558		
CGGTTCCGG					S	-358			
CGGAACCGG					A	-351			
CGGGGGCGG					A	-250			
orf19.2175		<i>LPE10</i>			CGGAAGCGG	A	-167		
					CGGCTGCGG	S	-246		
					CGGAATCGG	S	-797		
					CGGGCGCGG	A	-1161		
					CGGAAACGG	A	-1040		
					orf19.10700 <sup>g</sup>	<i>TAC1</i>			
					orf19.1718	<i>ZCF8</i>			
orf19.6869	<i>AST2</i>								
orf19.10700 <sup>g</sup>	<i>TAC1</i>								

<sup>a</sup> orf19 nomenclature according to the assembly 19 version.

<sup>b</sup> Gene name at CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

<sup>c</sup> The underlined motifs have been described previously (16). Consensus sequences were obtained using the AlignX program (component of Vector NTI Advance 10.1.1; Invitrogen) and the WebLogo application (<http://weblogo.berkeley.edu/>) (17). The consensus sequence for CGGN<sub>2</sub>CGG motifs is CGGATAACGG, with nucleotide frequencies of 1.0, 1.0, 1.0, 0.6, 0.6, 0.7, 0.5, 1.0, 1.0, and 1.0, respectively. The consensus sequence for CGGN<sub>3</sub>CGG motifs is CGGAAGCGG, with nucleotide frequencies of 1.0, 1.0, 1.0, 0.5, 0.5, 0.4, 1.0, 1.0, and 1.0, respectively.

<sup>d</sup> S, sense strand; A, antisense strand.

<sup>e</sup> Nucleotide position from the ATG translation start site.

<sup>f</sup> Position in contig19.20170, upstream of orf19.10700; position in contig.10170, upstream of orf19.3188, is -1051 due to sequence polymorphisms.

<sup>g</sup> Present only in contig.20170 due to a sequence polymorphism (underlined) (CGGAAACGG).

Finally, we examined whether the CGGN<sub>3,4</sub>CGG motifs appear in the promoter region of the genes whose expression was modulated in all 4 resistant isolates (31 up-regulated and 12 down-regulated) compared to their matched parental strains. We found 7 up-regulated genes containing the CGGN<sub>4</sub>CGG motif, 5 of which also identified by the ChIP-chip experiments (*CDR1*, *CDR2*, *IFU5*, *RTA3*, orf19.4898; the two other ones being

*TAC1* and orf19.3047) as well as two up-regulated genes with the CGGN<sub>3</sub>CGG motif (*TAC1* and orf19.344) (Table 7). Finally, searching the down-regulated genes identified one gene with the CGGN<sub>4</sub>CGG motif (*SOD5*) and one gene with the CGGN<sub>3</sub>CGG motif (*OPT6*).

**Expression and location data mining.** When merging the expression and location data, we identified 8 genes whose promoters were bound by Tac1p *in vivo* and which were up-regulated in the four azole-resistant clinical isolates in a *TAC1*-dependent manner, thus qualifying these genes as *bona fide* Tac1p targets. These genes were *CDR1* and *CDR2*, *GPXI* (putative glutathione peroxidase), *LCB4* (putative sphingosine kinase), *RTA3* (putative phospholipid flippase) as well as three genes of unknown function: *IFU5*, orf19.1887, and orf19.4898 (Table 6, in bold, and Table 4). We also identified 9 genes whose promoters were bound by Tac1p *in vivo* and that were significantly modulated in a *TAC1*-dependent manner in at least strain 5674, the isolate displaying the strongest fold change in gene expression. These genes were orf19.5877 (*ATF1*, alcohol acetyltransferase), orf19.1089 (*PEX11*, fatty acid oxidation), orf19.5005 (*OSM2*, fumarate reductase), orf19.7319 (*SUC1*, sucrose metabolism) as well as 5 ORFs of unknown function (orf19.6627, orf19.7042, orf19.5525, orf19.3406 and orf19.6501) (Table 6, underlined, and Table S1). These results suggest that, in addition to its function in azole drug resistance, Tac1p regulates other cellular functions such as lipid metabolism and oxidative stress response (see Discussion).

### III.5. Discussion

To identify the Tac1p regulon, we combined genome-wide expression and location analyses, two technologies with complementary strengths and limitations. Expression profiling is extremely valuable since it can identify all of the changes in transcript abundance associated with the perturbation of a specific transcriptional regulator, however it cannot distinguish between direct or indirect effects at individual target promoters. Location profiling is a very powerful tool to identify all the direct targets of a specific transcription factor, however it does not allow the determination of whether the bound factor acts as an activator or a repressor of these targets. Each method also gives rise to false positives and false negatives. Merging the results from the two approaches thus generates data that is most complete and cross-validated.

While merging the expression and location data sets for Tac1p, we found that, out of 37 genes whose promoter was bound by Tac1p, 20 (64%) did not have their expression modulated (Table 6). Possible technical explanations for this limited overlap are that some of these genes did not pass the stringent criteria applied to the expression microarray data or that they represent false positives. However, a biological explanation could be that the expression of the bound promoters is not modulated in response to gain-of-function mutations in Tac1p but rather in response to other potential Tac1p-activating signals. We also found that, out of 43 modulated genes, 35 (81%) were not identified in the location profiling experiments, suggesting that these genes are indirect targets of Tac1p (i.e. controlled by Tac1p-regulated transcription factors and/or other transcriptional regulators) or that they are not bound by Tac1p under non-activating conditions (see below). It is also possible that the detection of Tac1p binding to some of these targets may have been prevented by the fact that their Tac1p-binding site is too far from the oligonucleotide sequence printed on the intergenic chip, as we found for *TAC1*. Lastly, some of these genes could have been missed by using a  $P$ -value  $< 0.001$  as the cut-off in the location array

experiments. This seems to be the case for the *SIP3* gene whose expression was up-regulated in the four azole-resistant isolates in a *TAC1*-dependent manner and which had a binding ratio of 1.6 but a *P*-value of 0.0014. Taken together, combining the expression and location profiling data allowed us to identify many new genes which unambiguously belong to the Tac1p regulon and thereby gain new insights into the biological functions of Tac1p.

Previously, we examined the gene expression profiles of matched isolates 2, 3, 15, and 17 using an earlier generation microarray (61). In that analysis we identified 5 genes as being co-regulated with *CDR1* and *CDR2*. Two of these, *GPX1* and *RTA3*, were found in the present study to be up-regulated in all four matched isolate sets studied, whereas a third, *ERG2*, was found to be up-regulated in three of these isolate sets. Likewise, of the 14 genes we previously found to be down-regulated in association with azole resistance in isolate 17, orf19.3475, orf19.2060, and orf19.5760 were found to be down-regulated in all four isolate sets, and *FET34* was found to be down-regulated in three of the four in this study. Using the same early generation arrays, Coste *et al* examined the gene expression profiles of isolate C56 as well as strain DSY2926 (isolate C43 expressing a *TAC1* allele carrying a gain-of-function mutation) compared to that of their parent isolate C43 (16). They identified 7 genes to be up-regulated in common between these two experimental conditions. In addition to *CDR1* and *CDR2*, these included *RTA3* and *HSP12*, both of which were found to be up-regulated in all four matched isolate sets examined in the present study. In a separate study by the same group, Karababa *et al* examined the gene expression profiles of isolate C56 compared to parent isolate C43 as well as strain CAF2-1 exposed to the *CDR1*- and *CDR2*-inducing agent fluphenazine compared to this strain grown in the absence of drug (36). In addition to *CDR1* and *CDR2*, they observed 7 genes to be commonly up-regulated between these two conditions. These included *HSP12*, *GPX1*, *RTA3*, orf19.344, *IFU5*, orf19.1862 and orf19.7284, all of which were found in the present study to be up-regulated in either three or all of the four clinical isolates examined. In this report, we used a more recent generation microarray together with well-



characterized sets of azole resistant clinical isolates and a *tac1Δ/tac1Δ* mutant, which allowed us to identify 36 additional genes whose expression is modulated in azole-resistant strains, dependent upon Tac1p.

Known Tac1p targets such as *CDR1*, *CDR2*, *IFU5* and *RTA3*, are induced in a *TAC1*-dependent manner upon exposure of the cells to fluphenazine or estradiol or upon expression of a gain-of-function *TAC1* allele in a *tac1Δ/tac1Δ* background (16, 20). This indicates that the activation of Tac1p by such inducers or by gain-of-function mutations is required for Tac1p-mediated transcriptional regulation. Our ChIP-chip experiments were done with cells grown in rich media, under uninduced conditions (45). We found that, under these conditions, Tac1p binds to its target promoters, indicating that this binding is constitutive or at least partially constitutive since it cannot be excluded that Tac1p binding increases in the presence of an inducer or an activating mutation. Our functional characterization of the epitope-tagged Tac1p strain showed that Tac1p binding to its targets is not due to an activating effect of introducing the HA tag at the C-terminus of Tac1p (Fig. S1). It was recently reported that the *S. cerevisiae* zinc cluster regulator Pdr1p, which controls the expression of the multidrug transporters *PDR5*, *SNQ2* and *YOR1* (6), also binds constitutively to its target promoters *in vivo* (24). Likewise, the *S. cerevisiae* zinc cluster transcription factor War1p, which controls the expression of the ABC transporter Pdr12p in response to weak acid stress, has been shown to constitutively bind to the *PDR12* promoter *in vivo* (43). Thus, the mechanisms by which Tac1p activates transcription in response to drugs or to gain-of-function mutations appear to be similar to those already documented for zinc cluster factors in *S. cerevisiae* and most likely involve post-binding mechanisms such as loss of interaction with a repressor protein, as proposed for Upc2p and Ecm22p (18) or recruitment of coactivator complexes (SAGA, Mediator, SWI/SNF) as shown for Pdr1p (30).

Our analyses of the Tac1p-bound promoters for the presence of a DRE-like motif CGGN<sub>4</sub>CGG allowed us to identify 8 new Tac1p targets, in addition to *CDR1*, *CDR2*,

*RTA3* and *IFU5*, containing this sequence (Table 7). The fact that 25 of the Tac1p-bound promoters do not contain this motif suggests that Tac1p may recognize additional configurations of the CGG triplets, including monomeric CGG triplets or CGG triplets with different spacing and/or orientations (48). The latest proposition is supported by our unpublished data that a CGGATTCGG sequence in the *PDR16* promoter is involved in its transcriptional activation by Tac1p and the enrichment of the CGGN<sub>3</sub>CGG motif in the Tac1p-bound promoters (Table 7). Alternatively, Tac1p may bind upstream or downstream of the DNA sequences analyzed (1.5 kb of upstream sequences). Finally, it is also possible that Tac1p binds to some of its targets indirectly, through its association with other DNA-binding proteins. For instance, the *S. cerevisiae* zinc cluster proteins Rsc30p and Rsc3p, which are part of the chromatin remodelling complex, have been shown to bind indirectly to DNA (2). Whether or not the DRE motifs identified in the Tac1p-bound promoters are functional as well as the sequences/factors mediating Tac1p binding to its target promoters in the absence of a classical DRE remain to be experimentally determined.

We previously showed that strain 5674 overexpresses the *TAC1* gene and that introduction of a *TAC1* allele carrying the N972D gain-of-function mutation in a *tac1Δ/tac1Δ* strain leads to the constitutive upregulation of the *TAC1* transcript, which suggested that Tac1p is positively autoregulated, directly or indirectly (85). We show in the present study that i) *TAC1* is upregulated in three additional azole-resistant isolates in which the Tac1p pathway is activated (Table 4); ii) the *TAC1* promoter contains a DRE motif, and iii) Tac1p binds *in vivo* to its own promoter (Fig. 3). Taken together, our findings support the proposition that *TAC1* expression is controlled by a direct positive autoregulatory loop. This situation is similar to *S. cerevisiae* Pdr3p, which binds *in vivo* to two pleiotropic drug response elements (PDRE) located in the *PDR3* promoter to transactivate its own expression (27). It appears that direct self-regulatory loops are a common feature among zinc cluster transcription factors in yeast, including Pdr3p and Yrr1p (pleiotropic drug resistance), Hap1p (respiration) and Stb5p (pentose phosphate pathway) (48). Studies in budding yeast have shown that transcription factor

autoregulation is necessary to respond to environmental stresses. As examples, autoregulation of *PDR3* in a *pdr1Δ* background is crucial for growth on a medium containing cycloheximide (27) and autoregulation of the basic leucine zipper transcription factor Hac1p, which controls the unfolded protein response, is required to protect the cells from prolonged endoplasmic reticulum stress (55). Similarly, autoregulation of *C. glabrata* *AMT1*, a copper-sensing transcription factor, is necessary to protect the cells upon exposure to high environmental copper levels (84). Thus, one possible outcome of Tac1p autoregulation would be an amplifiable production of the Tac1p protein necessary for rapid and sustained response to drugs and yet unknown activating signals (45).

Three previously identified Tac1p targets (*CDR1*, *CDR2*, *PDR16*) have been shown to play a role in azole drug resistance (59, 66, 68). Thus Tac1p confers azole resistance by activating different effectors, each contributing to some extent to the overall azole resistance of the cells. Additional Tac1p targets identified by our studies and co-regulated with *CDR1*, *CDR2* and *PDR16* may also play a protective role against toxic injuries. For instance, orf19.4531 is found among the group of genes differentially expressed under the gene ontology (GO) molecular function term “ATPase activity coupled to movement of substances”, including *CDR1*, *CDR2* and *RTA3* (Table 4). orf19.4531 encodes a putative ABC transporter of the PDR subfamily (to which *CDR1* and *CDR2* belong). Whether this transporter impacts azole resistance, alone or in conjunction with Cdr1p and Cdr2p, remains to be determined. This efflux pump may also protect the cell from other toxic compounds. As another example, orf19.86 (*GPXI*), which encodes a putative glutathione peroxidase, is an integral component of the glutathione and glutathione-dependent enzyme system which has been implicated in the resistance of tumor cells to anticancer agents (7, 22). Increased activity of this enzyme system is often observed in conjunction with increased activity of the ABC transporter P-glycoprotein in drug-resistant human cancer cells (9).

Although not found among the 37 promoters observed to be bound by Tac1p, *CHK1* was among the 31 genes that were consistently co-regulated with *CDR1* and *CDR2* in all four matched isolate sets. Its up-regulation in these isolates is at least influenced by Tac1p as deletion of *TAC1* in isolate 5674 reduced its expression to normal levels. Chk1p is a histidine kinase involved in a two-component signaling pathway, along with the response regulator Ssk1p, that regulates cell wall biosynthesis (10, 11). Interestingly it was recently shown that strains of *C. albicans* lacking either of these signal transduction proteins are hypersensitive to fluconazole (13). Up-regulation of *CHK1* in association with *CDR1*- and *CDR2*-mediated azole resistance suggests that, in addition to its requirement for baseline azole tolerance in azole-susceptible cells, this protein may contribute to azole resistance in clinical isolates. In the related fungal species *C. glabrata*, ATPase activity of the ABC transporter Cdr1p and the drug efflux activity of the ABC transporter Pdh1p (Cdr2p) are regulated by phosphorylation (77, 78). Likewise, phosphorylation has been shown to modulate transcriptional activity of the transcription factor Gal4p (65), and has been suggested to regulate the activity of the transcriptional regulator Pdr3p (49). It is therefore tempting to speculate that Chk1p is involved in the phosphorylation and activity of the efflux pumps Cdr1p and Cdr2p, or possibly Tac1p itself. Further investigation into the contribution of this signaling pathway to azole resistance will be required to address this question.

Our genome-wide location experiments revealed that Tac1p binds to the promoter of a group of genes involved (or predicted to be involved) in lipid metabolism. These genes are *CDR1*, *CDR2*, *PDR16*, *RTA3*, *ATF1*, *ERG1*, *LCB4*, orf19.6501, orf19.7166, and orf19.1887. With the exception of *ERG1*, all these genes were significantly up-regulated in a *TAC1*-dependent manner at least in one out of the four clinical isolates tested by expression microarrays, strongly suggesting i) that these genes are direct transcriptional targets of Tac1p and ii) a role for Tac1p in lipid metabolism. It has been shown that Rsb1p, the *S. cerevisiae* orthologue of *C. albicans* Rta3p, plays an essential role in the

translocation of long-chain bases across the plasma membrane (39), suggesting a role for Rsb1p, and thus potentially Rta3p, in regulating the sphingolipid composition of the plasma membrane. Interestingly, *S. cerevisiae* *LCB4* encodes a major sphingolipid long-chain base kinase required for synthesis of long-chain base phosphates and for the rapid incorporation of long chain bases from the culture medium into sphingolipids (29). We also found that orf19.3104, the orthologue of *S. cerevisiae* *YDC1* encoding an alkaline dihydroceramidase, is up-regulated in a *TAC1*-dependent manner in all four sets of clinical isolates (Table 4), although binding of Tac1p to the promoter of this gene was not detected. Ydc1p hydrolyzes dihydroceramide to free fatty acid and dihydrosphingosine, the substrate of *LCB4* (50). Taken together, these findings suggest a role for Tac1p in the synthesis and translocation of sphingolipids into the plasma membrane.

Likewise, *C. albicans* Cdr1p and Cdr2p have been shown to function as plasma membrane energy-dependent translocators of phospholipids, mediating their in-to-out movement (floppases) (75). Thus, Cdr1p and Cdr2p would act in concert with Rta3p to establish the asymmetry of membrane lipids in the plasma membrane. Interestingly, Tac1p binds to the promoter of the *S. cerevisiae* *AST1* homologue, orf19.6869 (*AST2*). *S. cerevisiae* Ast1p was shown to be required for the raft association and restoration of surface delivery of a mutant of the major plasma membrane proton ATPase, Pma1p, that was mistargeted to the vacuole (5). Elsewhere, it has been shown that Cdr1p is a lipid raft associated protein (34). An attractive model would be that Tac1p contributes to the raft association and proper routing of its target gene-products Cdr1p, Cdr2p and Rta3p to the plasma membrane by regulating *AST2* expression. Recent studies have demonstrated that both sphingolipids and sterols are important determinants of surface localization of Cdr1p, as reduced membrane localization of Cdr1p was associated to increased susceptibility of *C. albicans* to ketoconazole in mutants defective in ergosterol biosynthesis (53). Interestingly, we found that Tac1p binding was enriched at the *ERG1* (1.7 fold, *P*-value 0.0005) and *ERG2* (1.6 fold, *P*-value 0.0011) promoters. Moreover, *ERG2* gene expression was significantly up-regulated in a *TAC1*-dependent manner in isolates C56, Gu5 and 17 (Table

S1), suggesting a role of Tac1p in ergosterol biosynthesis. *PDR16*, another target of Tac1p, is the functional homologue of the *S. cerevisiae* *PDR16*, encoding a lipid transfer protein of the Sec14 family (58, 66). *S. cerevisiae* Pdr16p was shown to localize to lipid particles and to transport phosphatidylinositol (71). There is strong evidence showing that lipid transfer proteins exchange lipid molecules between organelle membranes and plasma membrane at membrane contact sites (33). Thus, by controlling the expression of the *PDR16* gene, Tac1p would act as a regulator of phosphatidylinositol transfer within membrane contact sites, further supporting the role of Tac1p in membrane lipid traffic.

Consistent with the potential role of Tac1p in membrane lipid metabolism, we found that the Tac1p targets orf19.7166, orf19.6501 and orf19.1887 encode three putative steryl ester hydrolases or triglycerides lipases as i) a Pfam analysis detected an  $\alpha/\beta$  hydrolase fold in their primary sequences (Pfam Entries PF04083.6 for orf19.7166 and PF00561 for orf19.1887 and orf19.6501), ii) their primary sequences contain the lipase consensus sequence motif GX SXG (21) and iii) Kyte-Doolittle hydrophathy plots revealed hydrophobic regions in the primary sequences suggesting that these proteins are potentially membrane-anchored to lipid particles (data not shown). Steryl esters and triacylglycerols are neutral lipids stored in lipid particles and serve as an energy source as well as a rapid fatty acid source needed upon lipid depletion conditions (79). The orf19.1887 protein is highly homologous to *S. cerevisiae* Yeh1p, a steryl ester hydrolase localized to lipid particles (41, 42), whereas the orf19.7166 and orf19.6501 proteins display moderate homology to the products of the *S. cerevisiae* YGR110W and *YJU3* genes. Yju3p was shown to be localized in lipid particles as well (3, 54). Another Tac1p target whose product was shown in *S. cerevisiae* to be localized in lipid particles is *ATF1*, encoding an alcohol acetyl transferase (76). This gene was significantly up-regulated in a *TAC1*-dependent manner in strain 5674 (Table S1). The fact that Atf1p localizes to lipid particles and functions in esterification process suggests that it is involved in the metabolism of lipids probably by transferring acetyl groups to free hydroxyl groups of fatty acids. Thus, in addition to be a potential regulator of membrane lipid traffic, Tac1p appears to be an important regulator of lipid

mobilization in *C. albicans*, a function needed for rapid restoration of membrane lipids upon lipid depletion conditions (79).

Our studies identified two Tac1p target genes, *GPXI* and *SOD5*, which have been shown to be involved in the oxidative stress response. We provide strong evidence that Tac1p directly regulates the expression of *GPXI*, which is implicated in response to oxidative stress (44). Interestingly, although the *C. albicans* genome encodes two other putative glutathione peroxidases (encoded by orf19.85 and orf19.87) with high homology to Gpx1p, only Gpx1p was found to be overproduced upon treatments with diamide or hydrogen peroxide (44), suggesting that, among the three putative glutathione peroxidases, *GPXI* plays an important role in oxidative stress response. It was also shown that *S. cerevisiae* *GPXI* encodes a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase which protects the cell against phospholipid hydroperoxides during oxidative stress (4).

*SOD5*, a copper, zinc superoxide dismutase found in the cell wall of *C. albicans*, has been shown to be important in protection against osmotic and oxidative stress (51). Since *SOD5* seems to play an important role in this process, it is interesting that the gene is in fact down-regulated in all four azole resistant clinical isolates studied. Martchenko, *et al.* showed that while deleting *SOD5* does not decrease cell viability, susceptibility to hydrogen peroxide under nutrient poor conditions is increased (51). Indeed, we have previously shown that azole resistant isolate 5674, while resistant to diamide, is hypersusceptible to hydrogen peroxide (31). While this hypersusceptibility to hydrogen peroxide could be explained by the down-regulation of *SOD5*, resistance to diamide could be attributed to the up-regulation of the *CDR2* gene by Tac1p since *CDR2* expression was shown to confer diamide resistance in *S. cerevisiae* (31). Taken together, these observations indicate that *TAC1* differentially protects the cell against different oxidative stresses.

### **III.6.Acknowledgments**

We would like to thank Osman Zin-Al Abdin, Perrine Bomme and Qing Zhang for their excellent technical assistance. We are indebted to François Robert and Simon Drouin for their assistance with the ChIP-chip experiments and to Tracey Rigby for performing the CGH experiments. We are grateful to Raphaëlle Lambert and Pierre Chagnon from the IRIC's Genomic platform for their support with the Q-PCR experiments and to Sébastien Lemieux and Martin Larose for their assistance with the statistical and bio-informatic analyses. We would also like to thank Dominique Sanglard, Spencer Redding, and Ted White for providing clinical isolates used in this study.

This work was supported by research grants to P.D.R. from the National Institutes of Health (R01 AI058145) and to M.R. from the Canadian Institutes of Health Research (MT-15679 and HOP-67260). S.Z. and S.S. are supported by doctoral studentships from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This is NRC publication number 49522.



### III.7. References

1. **Albert, T. J., J. Norton, M. Ott, T. Richmond, K. Nuwaysir, E. F. Nuwaysir, K. P. Stengele, and R. D. Green.** 2003. Light-directed 5'→3' synthesis of complex oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res.* **31**: e35.
2. **Angus-Hill, M. L., A. Schlichter, D. Roberts, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and B. R. Cairns.** 2001. A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol. Cell.* **7**: 741-751.
3. **Athenstaedt, K., D. Zweyck, A. Jandrositz, S. D. Kohlwein, and G. Daum.** 1999. Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**: 6441-6448.
4. **Avery, A. M., and S. V. Avery.** 2001. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* **276**: 33730-33735.
5. **Bagnat, M., A. Chang, and K. Simons.** 2001. Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol. Biol. Cell.* **12**: 4129-4138.
6. **Balzi, E., and A. Goffeau.** 1995. Yeast multidrug resistance: the PDR network. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**: 71-76.
7. **Black, S. M., and C. R. Wolf.** 1991. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. *Pharmacol. Ther.* **51**: 139-154.
8. **Boeke, J. D., F. LaCroute, and G. R. Fink.** 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 345-346.
9. **Buser, K., F. Joncourt, H. J. Altermatt, M. Bacchi, A. Oberli, and T. Cerny.** 1997. Breast cancer: pretreatment drug resistance parameters (GSH-system, ATase, P-glycoprotein) in tumor tissue and their correlation with clinical and prognostic characteristics. *Ann. Oncol.* **8**: 335-341.
10. **Calera, J. A., and R. Calderone.** 1999. Histidine kinase, two-component signal transduction proteins of *Candida albicans* and the pathogenesis of candidosis. *Mycoses.* **42 Suppl 2**: 49-53.
11. **Calera, J. A., G. H. Choi, and R. A. Calderone.** 1998. Identification of a putative histidine kinase two-component phosphorelay gene (*CaHK1*) in *Candida albicans*. *Yeast.* **14**: 665-674.
12. **Care, R. S., J. Trevethick, K. M. Binley, and P. E. Sudbery.** 1999. The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol. Microbiol.* **34**: 792-798.
13. **Chauhan, N., M. Kruppa, and R. Calderone.** 2007. The Ssk1p response regulator and Chk1p histidine kinase mutants of *Candida albicans* are hypersensitive to

- fluconazole and voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, in press. (AAC00929-7).
14. **Coste, A., A. Selmecki, A. Forche, D. Diogo, M. E. Bougnoux, C. d'Enfert, J. Berman, and D. Sanglard.** 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot. Cell* doi:10.1128/EC.00151-07.
  15. **Coste, A., V. Turner, F. Ischer, J. Morschhauser, A. Forche, A. Selmecki, J. Berman, J. Bille, and D. Sanglard.** 2006. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics*. **172**: 2139-2156.
  16. **Coste, A. T., M. Karababa, F. Ischer, J. Bille, and D. Sanglard.** 2004. *TAC1*, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot. Cell*. **3**: 1639-1652.
  17. **Crooks, G. E., G. Hon, J. M. Chandonia, and S. E. Brenner.** 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*. **14**: 1188-1190.
  18. **Davies, B. S., H. S. Wang, and J. Rine.** 2005. Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 7375-7385.
  19. **De Deken, X., and M. Raymond.** 2004. Constitutive activation of the *PDR16* promoter in a *Candida albicans* azole-resistant clinical isolate overexpressing *CDR1* and *CDR2*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2700-2703.
  20. **de Micheli, M., J. Bille, C. Schueller, and D. Sanglard.** 2002. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol. Microbiol.* **43**: 1197-1214.
  21. **Derewenda, Z. S., and U. Derewenda.** 1991. Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem. Cell Biol.* **69**: 842-851.
  22. **Doroshov, J. H., S. Akman, F. F. Chu, and S. Esworthy.** 1990. Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones. *Pharmacol. Ther.* **47**: 359-370.
  23. **Drouin, S., and F. Robert.** Genome-wide location analysis of chromatin-associated proteins by ChIP on chip: controls matter. *Methods*, in press.
  24. **Fardeau, V., G. Lelandais, A. Oldfield, H. Salin, S. Lemoine, M. Garcia, V. Tanty, S. Le Crom, C. Jacq, and F. Devaux.** 2007. The central role of *PDR1* in the foundation of yeast drug resistance. *J. Biol. Chem.* **282**: 5063-5074.
  25. **Feigal, D. W., M. H. Katz, D. Greenspan, J. Westenhause, W. Winkelstein, Jr., W. Lang, M. Samuel, S. P. Buchbinder, N. A. Hessol, and A. R. Lifson.** 1991. The prevalence of oral lesions in HIV-infected homosexual and bisexual men: three San Francisco epidemiological cohorts. *AIDS*. **5**: 519-525.
  26. **Fonzi, W. A., and M. Y. Irwin.** 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics*. **134**: 717-728.

27. **Franz, R., S. L. Kelly, D. C. Lamb, D. E. Kelly, M. Ruhnke, and J. Morschhauser.** 1998. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 3065-3072.
28. **Franz, R., M. Ruhnke, and J. Morschhauser.** 1999. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses.* **42**: 453-458.
29. **Funato, K., R. Lombardi, B. Vallee, and H. Riezman.** 2003. Lcb4p is a key regulator of ceramide synthesis from exogenous long chain sphingoid base in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**: 7325-7334.
30. **Gao, C., L. Wang, E. Milgrom, and W. C. Shen.** 2004. On the mechanism of constitutive Pdr1 activator-mediated *PDR5* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for enhanced recruitment of coactivators and altered nucleosome structures. *J. Biol. Chem.* **279**: 42677-42686.
31. **Gauthier, C., S. Weber, A. M. Alarco, O. Alqawi, R. Daoud, E. Georges, and M. Raymond.** 2003. Functional similarities and differences between *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1543-1554.
32. **Hokamp, K., F. M. Roche, M. Acab, M. E. Rousseau, B. Kuo, D. Goode, D. Aeschliman, J. Bryan, L. A. Babiuk, R. E. Hancock, and F. S. Brinkman.** 2004. ArrayPipe: a flexible processing pipeline for microarray data. *Nucleic Acids Res.* **32**: W457-459.
33. **Holthuis, J. C., and T. P. Levine.** 2005. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 209-220.
34. **Insenser, M., C. Nombela, G. Molero, and C. Gil.** 2006. Proteomic analysis of detergent-resistant membranes from *Candida albicans*. *Proteomics.* **6 Suppl 1**: S74-81.
35. **Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura.** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
36. **Karababa, M., A. T. Coste, B. Rognon, J. Bille, and D. Sanglard.** 2004. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 3064-3079.
37. **Kelly, R., and K. J. Kwon-Chung.** 1992. A zinc finger protein from *Candida albicans* is involved in sucrose utilization. *J. Bacteriol.* **174**: 222-232.
38. **Kelly, S. L., A. Arnoldi, and D. E. Kelly.** 1993. Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 1034-1038.
39. **Kihara, A., and Y. Igarashi.** 2002. Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene, *RSB1*, involved in sphingoid long-chain base release. *J. Biol. Chem.* **277**: 30048-30054.
40. **Klein, R. S., C. A. Harris, C. B. Small, B. Moll, M. Lesser, and G. H. Friedland.** 1984. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **311**: 354-358.

41. **Koffel, R., and R. Schneiter.** 2006. *Yeh1* constitutes the major sterol ester hydrolase under heme-deficient conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot. Cell. **5**: 1018-1025.
42. **Koffel, R., R. Tiwari, L. Falquet, and R. Schneiter.** 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* *YLL012/YEH1*, *YLR020/YEH2*, and *TGL1* genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for sterol ester hydrolysis. Mol. Cell. Biol. **25**: 1655-1668.
43. **Kren, A., Y. M. Mamnun, B. E. Bauer, C. Schuller, H. Wolfger, K. Hatzixanthis, M. Mollapour, C. Gregori, P. Piper, and K. Kuchler.** 2003. War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. Mol. Cell. Biol. **23**: 1775-1785.
44. **Kusch, H., S. Engelmann, D. Albrecht, J. Morschhauser, and M. Hecker.** 2007. Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. Proteomics. **7**: 686-697.
45. **Lee, T. I., N. J. Rinaldi, F. Robert, D. T. Odom, Z. Bar-Joseph, G. K. Gerber, N. M. Hannett, C. T. Harbison, C. M. Thompson, I. Simon, J. Zeitlinger, E. G. Jennings, H. L. Murray, D. B. Gordon, B. Ren, J. J. Wyrick, J. B. Tagne, T. L. Volkert, E. Fraenkel, D. K. Gifford, and R. A. Young.** 2002. Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. Science. **298**: 799-804.
46. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. Methods. **25**: 402-408.
47. **Lopez-Ribot, J. L., R. K. McAtee, L. N. Lee, W. R. Kirkpatrick, T. C. White, D. Sanglard, and T. F. Patterson.** 1998. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 2932-2937.
48. **MacPherson, S., M. Larochelle, and B. Turcotte.** 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**: 583-604.
49. **Mamnun, Y. M., R. Pandjaitan, Y. Mahe, A. Delahodde, and K. Kuchler.** 2002. The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers in vivo. Mol. Microbiol. **46**: 1429-1440.
50. **Mao, C., R. Xu, A. Bielawska, Z. M. Szulc, and L. M. Obeid.** 2000. Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. J. Biol. Chem. **275**: 31369-31378.
51. **Martchenko, M., A. M. Alarco, D. Harcus, and M. Whiteway.** 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. Mol. Biol. Cell. **15**: 456-467.
52. **Morschhauser, J.** 2002. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. Biochim. Biophys. Acta. **1587**: 240-248.

53. **Mukhopadhyay, K., T. Prasad, P. Saini, T. J. Pucadyil, A. Chattopadhyay, and R. Prasad.** 2004. Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1778-1787.
54. **Natter, K., P. Leitner, A. Faschinger, H. Wolinski, S. McCraith, S. Fields, and S. D. Kohlwein.** 2005. The spatial organization of lipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* derived from large scale green fluorescent protein tagging and high resolution microscopy. *Mol. Cell. Proteomics.* **4**: 662-672.
55. **Ogawa, N., and K. Mori.** 2004. Autoregulation of the *HAC1* gene is required for sustained activation of the yeast unfolded protein response. *Genes Cells.* **9**: 95-104.
56. **Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, R. A. Santillan, M. Martinez, D. Calabrese, D. Sanglard, and T. F. Patterson.** 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2676-2684.
57. **Pfaller, M. A., C. Grant, V. Morthland, and J. Rhine-Chalberg.** 1994. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 506-509.
58. **Phillips, S. E., P. Vincent, K. E. Rizzieri, G. Schaaf, V. A. Bankaitis, and E. A. Gaucher.** 2006. The diverse biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**: 21-49.
59. **Prasad, R., P. De Wergifosse, A. Goffeau, and E. Balzi.** 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* **27**: 320-329.
60. **Ren, B., F. Robert, J. J. Wyrick, O. Aparicio, E. G. Jennings, I. Simon, J. Zeitlinger, J. Schreiber, N. Hannett, E. Kanin, T. L. Volkert, C. J. Wilson, S. P. Bell, and R. A. Young.** 2000. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science.* **290**: 2306-2309.
61. **Rogers, P. D., and K. S. Barker.** 2003. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1220-1227.
62. **Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter.** 1990. *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
63. **Ruhnke, M., A. Eigler, I. Tennagen, B. Geiseler, E. Engelmann, and M. Trautmann.** 1994. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2092-2098.

64. **Rustchenko, E. P., D. H. Howard, and F. Sherman.** 1994. Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. *J. Bacteriol.* **176**: 3231-3241.
65. **Sadowski, I., C. Costa, and R. Dhanawansa.** 1996. Phosphorylation of Gal4p at a single C-terminal residue is necessary for galactose-inducible transcription. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4879-4887.
66. **Saidane, S., S. Weber, X. De Deken, G. St-Germain, and M. Raymond.** 2006. *PDR16*-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **60**: 1546-1562.
67. **Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans, and J. Bille.** 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 241-253.
68. **Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod, and J. Bille.** 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology.* **143 ( Pt 2)**: 405-416.
69. **Sanglard, D., K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod, and J. Bille.** 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.
70. **Schmitt, M. E., T. A. Brown, and B. L. Trumpower.** 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3091-3092.
71. **Schnabl, M., O. V. Oskolkova, R. Holic, B. Brezna, H. Pichler, M. Zagorsek, S. D. Kohlwein, F. Paltauf, G. Daum, and P. Griac.** 2003. Subcellular localization of yeast *Sec14* homologues and their involvement in regulation of phospholipid turnover. *Eur. J. Biochem.* **270**: 3133-3145.
72. **Schneider, B. L., W. Seufert, B. Steiner, Q. H. Yang, and A. B. Futcher.** 1995. Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **11**: 1265-1274.
73. **Selmecki, A., A. Forche, and J. Berman.** 2006. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science.* **313**: 367-370.
74. **Sherman, F.** 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**: 3-21.
75. **Smriti, S. Krishnamurthy, B. L. Dixit, C. M. Gupta, S. Milewski, and R. Prasad.** 2002. ABC transporters Cdr1p, Cdr2p and Cdr3p of a human pathogen *Candida albicans* are general phospholipid translocators. *Yeast.* **19**: 303-318.
76. **Verstrepen, K. J., S. D. Van Laere, J. Vercammen, G. Derdelinckx, J. P. Dufour, I. S. Pretorius, J. Winderickx, J. M. Thevelein, and F. R. Delvaux.** 2004. The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase Atf1p is localized in lipid particles. *Yeast.* **21**: 367-377.
77. **Wada, S., M. Niimi, K. Niimi, A. R. Holmes, B. C. Monk, R. D. Cannon, and Y. Uehara.** 2002. *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters

- show phosphorylation-dependent pumping properties. *J. Biol. Chem.* **277**: 46809-46821.
78. **Wada, S., K. Tanabe, A. Yamazaki, M. Niimi, Y. Uehara, K. Niimi, E. Lamping, R. D. Cannon, and B. C. Monk.** 2005. Phosphorylation of *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporter Cdr1p regulates drug efflux activity and ATPase stability. *J. Biol. Chem.* **280**: 94-103.
  79. **Wagner, A., and G. Daum.** 2005. Formation and mobilization of neutral lipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 1174-1177.
  80. **White, T. C.** 1997. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1482-1487.
  81. **White, T. C.** 1997. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14alpha demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1488-1494.
  82. **White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 382-402.
  83. **White, T. C., M. A. Pfaller, M. G. Rinaldi, J. Smith, and S. W. Redding.** 1997. Stable azole drug resistance associated with a substrain of *Candida albicans* from an HIV-infected patient. *Oral Dis.* **3 Suppl 1**: S102-109.
  84. **Zhou, P., and D. J. Thiele.** 1993. Rapid transcriptional autoregulation of a yeast metalloregulatory transcription factor is essential for high-level copper detoxification. *Genes Dev.* **7**: 1824-1835.
  85. **Znaidi, S., X. De Deken, S. Weber, T. Rigby, A. Nantel, and M. Raymond.** The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates *PDR16* expression in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.*, in press.

#### **IV. Chapitre 4 : Genome-wide location analysis of *Candida albicans* Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance**

Le contenu de ce chapitre a été publié dans la revue *Eukaryotic Cell* en 2008.

Des données supplémentaires électroniques de ce chapitre sont accessibles sur l'adresse :

<http://ec.asm.org/cgi/content/full/EC.00070-08/DC1>.

**Znaidi, S.**, Weber, S., Al-Abdin, O.Z., Bomme, P., Saidane, S., Drouin, S., Lemieux, S., De Deken, X., Robert, F. et Raymond, M. (2008). Genomewide location analysis of *Candida albicans* Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance. *Eukaryot. Cell.* 7:836-847.

Contribution des auteurs : L'estimation de ma contribution est de 55%. Weber a généré, avec l'aide de De Deken, l'allèle étiqueté d'Upc2p et a effectué les essais spots et buvardage Western de la figure 1. Al-abdin a effectué les buvardages Northern de la figure 4. Bomme et Saidane ont effectué les expériences de PCR quantitative. Drouin a analysé les données de ChIP-chip (normalisation et calcul du ratio d'enrichissement). Lemieux a supervisé les analyses bioinformatiques. J'ai écrit la totalité du contenu du manuscrit sous la supervision de ma directrice de recherche Martine Raymond.



**Genome-wide location analysis of *Candida albicans* Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance**

Running title: Identification of the *Candida albicans* Upc2p regulon

Sadri Znaidi<sup>1</sup>, Sandra Weber<sup>1</sup>, Osman Zin Al-Abdin<sup>1</sup>, Perrine Bomme<sup>1,2</sup>, Saloua Saidane<sup>1</sup>, Simon Drouin<sup>3</sup>, Sébastien Lemieux<sup>1</sup>, Xavier De Deken<sup>1,‡</sup>, François Robert<sup>3</sup> and Martine Raymond<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada; <sup>2</sup> Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, France; <sup>3</sup> Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, Québec, Canada (Affiliated with Université de Montréal).

\*Corresponding author. Mailing address: Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, Québec, Canada H3C 3J7. Phone: (514) 343-6746. Fax: (514) 343-6843.

---

<sup>‡</sup>Present address: IRIBHM, ULB, Campus Erasme, Brussels, Belgium.

## IV.1. Abstract

Upc2p, a transcription factor of the zinc cluster family, is an important regulator of sterol biosynthesis and azole drug resistance in *Candida albicans*. To better understand Upc2p function in *C. albicans*, we used genome-wide location profiling (ChIP-chip) to identify its transcriptional targets *in vivo*. A triple HA epitope, introduced at the C-terminus of Upc2p, conferred a gain-of-function effect to the fusion protein. Location profiling identified 202 bound promoters (P-value < 0.05). Over-represented functional groups of genes whose promoters were bound by Upc2p included 12 genes involved in ergosterol biosynthesis (*NCPI*, *ERG11*, *ERG2*, others), 18 genes encoding ribosomal subunits (*RPS30*, *RPL32*, *RPL12*, others), 3 genes encoding drug transporters (*CDR1*, *MDR1*, *YOR1*), 4 genes encoding transcription factors (*INO2*, *ACE2*, *SUT1*, *UPC2*) and 6 genes involved in sulfur amino acid metabolism (*MET6*, *SAM2*, *SAH1*, others). Bioinformatic analyses suggested that Upc2p binds to the DNA motif 5'-vnCGbdTr that includes the previously characterized Upc2p-binding site 5'-TCGTATA. Northern blot analysis showed that enriched binding correlates with increased expression for the analyzed Upc2p targets (*ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *YOR1*, *SUT1*, *SMF12*, *CBP1*). Analysis of *ERG11*, *MDR1* and *CDR1* transcripts in wild-type and *upc2Δ/upc2Δ* strains grown under Upc2p activating conditions (lovastatin treatment and hypoxia) showed that Upc2p regulates its targets in a complex manner, acting as an activator or as a repressor depending upon the target and the activating condition. Taken together, our results indicate that Upc2p is a key regulator of ergosterol metabolism. They also suggest that Upc2p may contribute to azole resistance by regulating the expression of drug efflux pump-encoding genes in addition to ergosterol biosynthesis genes.

## IV.2. Introduction

*Candida albicans* is an important human fungal pathogen, both in terms of its clinical significance as well as its use as an experimental model for scientific investigation. This opportunistic pathogen is a natural component of the human flora, colonizing skin and the gastrointestinal and genitourinary tracts (4). Although many infections involve colonization of surface mucosal membranes (oral thrush and vaginal candidiasis, for example), immunosuppressed patients can be subjected to potentially lethal systemic infections (45).

Many antifungal drugs used to treat *C. albicans* infections function by targeting ergosterol, the analogue of cholesterol in mammalian cells and the major sterol of fungal cell membranes. Polyenes, such as amphotericin B, directly bind to ergosterol and perturb general membrane functions, resulting in a low selectivity and high toxicity (2,35). Azoles, including fluconazole and voriconazole, are more widely used and target the enzyme lanosterol demethylase (Erg11p) in the ergosterol biosynthesis pathway – with the consequence that ergosterol is depleted and replaced by unusual sterols, altering the fluidity of the membrane and the activity of membrane-bound proteins (e.g. enzymes involved in cell wall synthesis and transporters) (2,35). However, the fungistatic rather than fungicidal activity of azole drugs leads to the frequent emergence of *C. albicans* azole-resistant cells, an important clinical problem, particularly in chronically immunosuppressed patients (HIV-infected or undergoing prolonged chemotherapy) (2,39,55). Molecular analyses of azole-resistant clinical isolates have shown that they carry mutations in the *ERG11* gene and/or constitutively overexpress genes responsible for their drug-resistant phenotype: *CDR1* and *CDR2* (homologous transporters of the ATP-binding cassette family functioning as multidrug efflux pumps and phospholipid flippases), *MDR1* (multidrug transporter of the major facilitator superfamily), *PDR16* (phospholipid transfer protein) and *ERG11* (2,38,39,55). The stable overexpression of *CDR1*, *CDR2*, *PDR16* and *MDR1* in *C.*

*albicans* clinical isolates results from the acquisition of activating mutations in transcription factors (17,18,57). It was shown that the constitutive overexpression of *CDR1*, *CDR2* and *PDR16* in azole-resistant isolates is due to gain-of-function mutations in the transcription factor Tac1p (11,12,59), while *MDR1* overexpression is the consequence of activating mutations in Mrr1p (31). *ERG11* expression is controlled by the transcription factor Upc2p (28,43), however Upc2p activating mutations in *C. albicans* clinical isolates have not been reported to date. A hallmark of the Tac1p, Mrr1p and Upc2p proteins is that they belong to the zinc cluster family of transcription factors, which is only found in fungi (29). Thus it appears that this family of regulators plays an important role in the adaptation of *C. albicans* cells to drug pressure as well as to other general stresses.

Because it includes the targets of many antifungal drugs, understanding transcriptional control of sterol homeostasis in fungi is medically important. Sterol regulation has been studied in *S. cerevisiae* (13,48). In this yeast, sterol biosynthesis is an aerobic process (Erg11p needs oxygen during lanosterol demethylation). Under aerobiosis, yeast does not import exogenous sterols (referred to as aerobic sterol exclusion) (23). Under anaerobic conditions, sterol biosynthesis is compromised and cells become capable of taking up exogenous sterols. Key transcription factors regulating sterol biosynthesis and uptake have been identified in *S. cerevisiae*, including Upc2p, Ecm22p and Sut1p, all of them members of the zinc cluster family (15,33). In response to sterol depletion, Upc2p (Uptake control 2) and its paralogue Ecm22p bind to the promoters of the *ERG2* and *ERG3* genes via a Sterol Response Element (SRE, TCGTATA) to activate their transcription (51). Upc2p also plays a role in the uptake of sterols under anaerobic conditions, by regulating the expression of genes coding for cell wall mannoproteins (*DAN/TIR*) and ABC transporters (*AUS1*, *PDR11*) (56). Interestingly, gain-of-function mutations in the C-terminal domain of Upc2p result in aerobic sterol uptake, most likely by preventing its interaction with a repressor, a situation that would mimic sterol deprivation (15). In line with this, one recent report showed that hypoxia activates Upc2p as a result of sterol depletion, since ergosterol biosynthesis also requires oxygen (14).

In *C. albicans*, only one close homolog of *S. cerevisiae* Upc2p and Ecm22p has been identified (28,43). We and others have shown that *C. albicans* cells lacking *UPC2* are hypersensitive to azole drugs and fail to activate the expression of several *ERG* genes in response to azole treatment (28,43). The *upc2Δ/upc2Δ* mutants showed reduced cholesterol uptake, indicating that *C. albicans* Upc2 plays a role in sterol uptake as well (43), while displaying impaired growth under anaerobic conditions (28). This latter finding is important, since *C. albicans* is able to cause superficial skin infections as well as deep-seated infections, suggesting that its ability to switch between normoxia and hypoxia is a major determinant of its virulence (41). We showed that *C. albicans* Upc2p binds *in vitro* to an SRE located in the *ERG2* promoter, TCGTATAA (28), while one recent study showed that azole response elements (ARE), located in the *ERG11* promoter ( $P_{ERG11}$ ) and including a perfect SRE are crucial for the induction of a  $P_{ERG11}$ -luciferase fusion (36). The activity of this ARE is *UPC2*-dependant, suggesting that Upc2p regulates *ERG* genes through direct binding to these AREs (36). In this paper, we used genome-wide location profiling (ChIP-chip), a technology that combines chromatin immunoprecipitation (ChIP) and DNA microarrays (chips), to identify genes whose promoters are bound *in vivo* by Upc2p, in order to better understand Upc2p function in *C. albicans*.

### IV.3. Materials and Methods

**Strains and growth media.** The *C. albicans* strains used in this study are listed in Table 1. Strains SGY243 and its *upc2Δ* derivative were grown in yeast peptone dextrose (YPD) broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented or not with the indicated drugs at 30°C with vigorous shaking or under hypoxia at 30°C in an anaerobic jar without shaking. The pCaEXP integrants (Table 1) were grown in synthetic complete (SC) medium lacking uracil (SC-ura) (42), in SC medium lacking uracil, methionine and cysteine (SC-ura, -met, -cys) to induce the *MET3* promoter ( $P_{MET3}$ ) or in SC-ura supplemented with methionine (2.5 mM) and cysteine (2.5 mM) (SC-ura+met+cys) under  $P_{MET3}$ -repressing conditions. The *Escherichia coli* MC1061 bacterial strain was used for DNA cloning and maintenance of the plasmid constructs.

**TABLE 1.** Strains used in this study.

Strain	Parental strain	Genotype	Reference
SGY243 (parental)		<i>ade2/ade2 Δura3::ADE2/Δura3::ADE2</i>	22
SGY243 <i>Δupc2</i>	SGY243	<i>upc2Δ4-178::hisG/upc2Δ5-177::hisG/upc2Δ4-528::hisG/upc2Δ5-701::hisG</i>	28
SGY243-CaEXP-A	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub></i>	This study
SGY243-CaEXP-B	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub></i>	This study
SGY243-UPC2-A	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub>-UPC2</i>	This study
SGY243-UPC2-B	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub>-UPC2</i>	This study
SGY243-UPC2-HA-A	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub>-UPC2-HA<sub>3</sub> sequence</i>	This study
SGY243-UPC2-HA-B	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub>-UPC2-HA<sub>3</sub> sequence</i>	This study

**Generation of an HA-tagged Upc2p-expressing strain and derivatives.** A DNA fragment overlapping positions -63 to +2136 (relative to the ATG translation start site) of the *C. albicans* *UPC2* gene was PCR-amplified with *Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) from *C. albicans* strain SC5314 genomic DNA using primers 5'-ATATGGATCCTTTCAACCACTATTACTACCT (introduces a *Bam*HI site, underlined) and 5'-TATACTGCAGctaGCGGCCGCCTTTCATATTCATAAACCCATT (introduces sequentially a *Pst*I site, underlined; a TAG stop codon, lower case letters; and a *Not*I site,

underlined, respectively). The resulting fragment (2,225 bp) was digested with *Bam*HI and *Pst*I and cloned into the corresponding sites of plasmid pCaEXP (6), generating plasmid pCaEXP-UPC2. A HA<sub>3</sub> (triple hemagglutinin) –encoding sequence (111 bp) was released from plasmid pMPY-3×HA (40) by a *Not*I enzymatic digestion and cloned into the *Not*I site of plasmid pCaEXP-UPC2, generating plasmid pCaEXP-UPC2-HA<sub>3</sub>. DNA sequencing was performed to ascertain the in-frame cloning of the fragments and that no unintended mutations were introduced during the amplification process. The pCaEXP, pCaEXP-UPC2 and pCaEXP-UPC2-HA<sub>3</sub> plasmids were digested with *Stu*I and the resulting fragments were individually used to transform strain SGY243 (Table 1).

***Candida albicans* transformation.** *C. albicans* transformations were conducted as described in MacPherson *et al.* (28), using a modified standard lithium acetate procedure. The transformed cells were plated on SC-ura plates and incubated for 3 days at 30°C.

**Antifungal drugs and susceptibility testing.** Stock solutions of ketoconazole (Medisca) were prepared at a concentration of 0.25 mg/ml in dimethyl sulfoxide (DMSO). Azole susceptibility testing was performed using spot assays. Cells were grown overnight on SC-ura-met-cys plates and resuspended in water to an OD<sub>600</sub> of 0.1. Tenfold serial dilutions of each strain were spotted onto SC-ura-met-cys plates supplemented with 6 ng/ml of ketoconazole or with the solvent alone (DMSO). The plates were incubated for three days at 30°C.

**Total protein preparation and Western blotting.** Total protein was prepared as described for *S. cerevisiae* (37), from 2 O.D. units of two independent strains carrying the vector alone (strains SGY243-CaEXP-A and SGY243-CaEXP-B) and two independent strains expressing *UPC2-HA<sub>3</sub>* (SGY243-UPC2-HA-A and SGY243-UPC2-HA-B) (Table 1) grown overnight in SC-ura-met-cys ( $P_{MET3}$ -inducing conditions) or in SC-ura supplemented with 2.5 mM methionine and 2.5 mM cysteine (SC-ura+met+cys,  $P_{MET3}$ -repressing conditions). Extracts were boiled for 1 min, and 25 µl (out of 100 µl total) was separated by electrophoresis on an SDS–10% polyacrylamide gel. Proteins were

transferred to a nitrocellulose membrane with a Trans Blot SD Semi-Dry transfer apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) and the membrane incubated with a mouse anti-HA monoclonal antibody (12CA5, Roche) at a dilution of 1:1000 followed by incubation with rabbit anti-mouse immunoglobulin G antibodies coupled to alkaline phosphatase (Bio-Rad). The membrane was then developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate *p*-toluidine salt and nitroblue tetrazolium chloride substrates, as recommended by the manufacturer (Bio-Rad).

**Chromatin immunoprecipitation-on-chip (ChIP-chip) and data analysis.** Three independent cultures (50 ml each) of strains SGY243-CaEXP-A (untagged, control strain) and SGY243-UPC2-HA-A (tagged strain) (Table 1) were grown overnight in SC-ura+met+cys, diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.005 in SC-ura-met-cys (to induce P<sub>MET3</sub>) and grown until the OD<sub>600</sub> reached 1.0. The subsequent steps of DNA crosslinking, DNA shearing, ChIPs, DNA labeling with the Cy dyes, hybridizations to intergenic DNA microarrays and data analyses were conducted exactly as described in Liu *et al.* (25). Briefly, cultures were treated with 1% formaldehyde (crosslinking) and snap-frozen in liquid nitrogen. Total cell extracts were prepared by bead beating followed by sonication to shear the DNA. The extracts were then incubated overnight with a mouse monoclonal anti-HA antibody (Santa Cruz Biotech) coupled to magnetic beads (Dynabeads Pan Mouse IgG, Dynal Biotech, Brown Deer, WI) at 4°C. Purified immunoprecipitated DNA (40 µl out of 50 µl in 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) was used for amplification and Cy5/Cy3 dye (Cy5/Cy3 Mono-Reactive Dye Packs, Amersham Biosciences) labeling. Both pools of labeled DNA from the tagged strain (SGY243-UPC2-HA-A, Cy5-labeled) and the untagged control strain (SGY243-CaEXP-A, Cy3-labeled) were mixed and hybridized to a *C. albicans* intergenic DNA microarray described elsewhere (H. Hogues, H. Lavoie, A. Sellam, M. Mangos, T. Roemer, E. Purisima, A. Nantel and M. Whiteway, submitted for publication). Scanning and data analyses ( $n=3$ ) were conducted as described previously (25).



**Quantitative real-time PCR.** Q-PCR was performed with three independent SGY243-CaEXP-B and SGY243-UPC2-HA-B ChIP samples prepared as described above. Quantification of the recovered DNA was performed using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Molecular Probes: Invitrogen) as previously described (25). The DNA concentration ranged from 9.2 pg/μl to 12.0 pg/μl for the tagged strain and 38.6 pg/μl to 60.0 pg/μl for the untagged strain (25 μl total volumes). Q-PCR assays were conducted using the Universal ProbeLibrary (Roche Applied Science), the TaqMan (Integrated DNA Technologies, IDT) (25) or the SYBR® Green (Applied Biosystems) methodologies. The different primers and probe combinations used for Q-PCR are listed in Table 2.

**TABLE 2.** Primers used for quantitative real-time PCR binding assays.

Promoter	Primer or probe <sup>a</sup>	Primer or probe sequence (5'-3')	Location of fragment for amplification <sup>b</sup>
<i>ERG11</i>	F R Universal ProbeLibrary probe 5 (catalog no. 04685024001)	TAAACGAGATAACGACATTATTAGGG TGTCCATAGAGTGTAAAGTTTGTTC AAT CAGCCACA	-458 to -372
<i>CDR1</i>	F R TaqMan probe	GGTGCACACACACACAAAACACACA TTGAGCTCCCACTATCCGATCCCTA CCGCCCTCACTCTGTTCCATACAAAT	-435 to -341
<i>MDR1</i>	F R TaqMan probe	GGCGGATTTACTCCTGATACAATC GCGACGGGCTGTTGAGTAACTAT AGCTCGTTTAGTTGTTCCCATTCGCA	-580 to -401
<i>UPC2</i>	F R TaqMan probe	AACACGTGCCATCTGTACCACAA TGCAGAAATGTGGGCTCAGAAAT GGTTTACCTTGACCAACCAGAAATGGATCA	-985 to -786
<i>FUR1</i>	F R Universal ProbeLibrary probe 27 (catalog no. 04687582001)	GGTGCTTTTGGGAGAATGAA CTTCCTCAAACAAAACCTGCAA GCTGCCTG	-987 to -913
<i>SPS4<sup>c</sup></i>	F R Universal ProbeLibrary probe 15 (catalog no. 04685148001)	TACAGTTGCCCCAGTCAACA TGTCTTGGAACGGAAACTCA TCCTGCTC	-636 to -574
<i>SUT1<sup>d,e</sup></i>	F R	GGCGAGGAAGAGTCATCCGAAATA GGGCGTAGCTCTTCTTGCTTAGT	-1203 to -1057
<i>ACT1<sup>d</sup></i>	F R	CTCACCAAGATTTATTGCCAAC CACCCTACCCATTTGTCATATT	-865 to -619

<sup>a</sup> F, forward primer; R, reverse primer. The TaqMan probes were from IDT, and the Universal ProbeLibrary probes were from Roche.

<sup>b</sup> Position with respect to the ATG start codon.

<sup>c</sup> *orf19.7568*.

<sup>d</sup> Q-PCRs for the *SUT1* and *ACT1* promoters were performed using the Sybr green methodology.

<sup>e</sup> *orf19.4342*.

Optimal specific primer sequences and probes for the *ERG11* (target), *FURI* (control for statistical analyses) and *SPS4* (orf19.7568, reference for normalization) promoters were obtained using the Universal ProbeLibrary web-based ProbeFinder software (version 2.34, Roche Applied Sciences) available on the Roche Applied Science website ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)) as previously described (25). TaqMan probes and specific forward and reverse primers for the *CDR1*, *MDR1* and *UPC2* target promoters were selected using the PrimerQuest tool from the IDT website (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>).

Q-PCR reaction mixtures were prepared using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc.) according to the manufacturer's instructions. For reactions using probes from the Universal ProbeLibrary, 6 pg of ChIP DNA, 250 nM of each forward and reverse primer, 100 nM of the probe, 5 µl of the TaqMan Universal PCR Master Mix and water were combined in a final volume of 10 µl. Q-PCR reactions using the TaqMan probe were prepared using the same conditions except that the probe and the primers (forward and reverse) were added to a final concentration of 100 nM and 200 nM, respectively. For Q-PCR reactions using the SYBR® Green methodology for the *SUT1* (target) and *ACT1* (reference for normalization) promoters, the conditions were as follows: 10 µl of 2X SYBR® Green Master Mix, 0.05 µl of 100 µM forward or reverse primers, 6 pg of DNA and water were combined in a final volume of 20 µl.

Q-PCR reactions were performed in MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Inc.) using an ABI 7900 HT Real-Time PCR instrument with 1 cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Each biological replicate sample (three) was processed in duplicate. Data analysis was performed using the Sequence Detection System software (SDS 2.2.2; ABI). For each sample,  $C_T$  values were determined using the SDS software. The fold enrichments of the targets (*ERG11*, *CDR1*, *MDR1*, *UPC2* and *SUT1* promoters) were calculated using the relative quantification according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, where  $\Delta C_T = C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ reference (SPS4 or ACT1 promoter)}}$  and

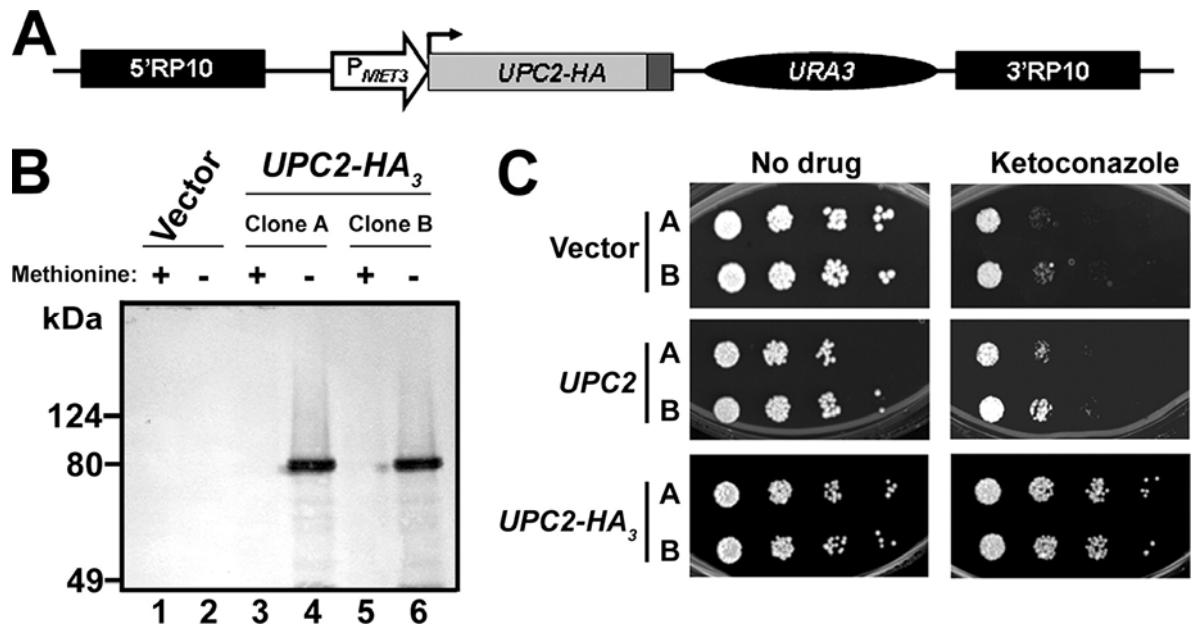
$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ test (tagged ChIP sample)} - \Delta C_T \text{ calibrator (untagged ChIP sample)}$  (26). The *FURI* promoter was used as a negative control to confirm the fold enrichment obtained using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. Statistical analyses were performed using the R software ([www.r-project.org](http://www.r-project.org) version 2.5.1) and the  $\Delta\Delta C_T$ 's were compared using Welch's *t*-test. The statistical significance threshold was set at  $\alpha = 0.001$ .

**Bioinformatic analyses.** For over-represented functional categories grouping of Upc2 targets (Table 3), 37 out of the 202 Upc2-bound targets ( $P < 0.05$ ) were removed from the analysis, since their promoters are shared by two genes located on opposite strands, thus preventing us from identifying which of the two genes is regulated by Upc2. The sequences were then used as input for functional grouping using the Candida Genome Database (CGD) GO Term Finder tool (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>). The three ontologies: “Biological Process”, “Molecular Function” and “Cellular Component” were selected. GO Term Finder calculates a p-value for the over-represented GO terms (relative to the 4096 annotated *C. albicans* genes), using a binomial distribution (<http://www.candidagenome.org/help/goTermFinder.html>). If some GO terms contain overlapping gene lists, the GO term with the largest number of genes was selected. The p-value cutoff was  $P < 0.02$ . For Motif discovery analyses (Fig. 3), up to 1.0 kb of promoter sequences upstream of the ATG translation start site of the 202 Upc2p-enriched promoters were retrieved from the Regulatory Sequence Analysis Tools database (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) such that overlap with neighbouring genes was prevented and used as input for motif discovery using the Suite for Computational identification Of Promoter Elements (SCOPE) program (<http://genie.dartmouth.edu/scope/>) (7,9). This program allows accurate determination of potential transcription factor binding sites in a set of promoter sequences using three different motif discovery algorithms (7,9). To search for putative SRE sequences within the 202 target promoters (Table 4), the same sequences analyzed with the SCOPE program were used as input for the DNA-pattern matching “TCGTATA” using the RSA tool Pattern matching tool (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>).

**Northern blotting.** *C. albicans* strains SGY243-CaEXP-B, SGY243-UPC2-B and SGY243-UPC2-HA-B were grown overnight at 30°C in 10 ml of SC-ura-met-cys medium, diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.005 in 100 ml of the same medium and grown to an OD<sub>600</sub> of 1.0. The cells were subsequently harvested and frozen at -80°C prior to RNA extraction. For lovastatin treatment, strains SGY243 (parental, wild-type) and the *upc2*Δ/Δ derivative (Table 1) were grown overnight at 30°C in 10 ml of YPD medium, diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.16 in 50 ml of the same medium and exposed or not to 25 μg/ml of hydrolyzed lovastatin for 24 h. Lovastatin (Sigma) was hydrolyzed in ethanolic NaOH (15% [vol/vol] ethanol, 0.25% [wt/vol] NaOH) as previously described (27) except that the incubation time at 60°C was 2.5 h. Aliquots of stock solutions (20 mg/ml) were stored at -20°C. For growth under hypoxia, the strains were pre-grown under the same conditions and diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.16 in 250-ml flasks containing 50 ml of YPD medium. The flasks were then incubated in a BBL GasPak™ anaerobic jar under conditions described by the manufacturer (BD Biosciences) at 30°C for 24h without shaking. 40 to 60 OD<sub>600</sub> units of cells (from the lovastatin-treated, hypoxia-grown and control cells) were then collected and stored at -80°C prior to RNA extraction. Total RNA was extracted using the hot phenol method (58). Northern blotting was performed as previously described (38). The *UPC2*, *ERG11*, *CDRI*, *MDRI* and *ACT1* probes used for the Northern blot experiments have been described elsewhere (28,38). The *YORI* probe consisted of a <sup>32</sup>P-radiolabeled 4486-bp PCR-amplified fragment from CAI4 genomic DNA overlapping positions -16 to +4470 relative to the ATG translation start site of the *YORI* ORF. The *CBP1*, *SMF12* and *SUT1* probes consisted of <sup>32</sup>P-radiolabeled 525-bp, 254-bp and 279-bp PCR-amplified fragments from SC5314 genomic DNA overlapping positions +945 to +1469, +1 to +254 and +715 to +993 (relative to the ATG translation start site) in each ORF, respectively. The membranes were exposed to a FUJIFILM Imaging Plate screen for 24 h. The signal was quantified using the Multi Gauge program, version 2.3 (FUJIFILM). The membranes were subsequently exposed to Kodak XAR films at -80°C.

## IV.4. Results

**Epitope-tagging of Upc2p.** We used the *URA3*-based pCaEXP vector (6) to construct a *C. albicans* strain carrying a triple HA (HA<sub>3</sub>) epitope at the C-terminus of Upc2p (Fig. 1). The pCaEXP expression system allows regulated gene expression in *C. albicans* by cloning genes under the control of the *MET3* promoter, which is repressed in the presence of methionine and activated in its absence (6). This system also permits high-efficiency integration at the *RP10* locus (6). The *UPC2* gene was PCR-amplified using a primer that introduces a *NotI* site upstream of the stop codon and cloned into pCaEXP. The *NotI* site enabled the subsequent in-frame cloning of a 111-bp *NotI* DNA fragment coding for HA<sub>3</sub> (see Materials and Methods for details) (Fig. 1A). Western blotting showed that the expression of the tagged proteins, from two independent clones, is induced in the absence of methionine and repressed by its presence (Fig. 1B, lanes 3-6), while the negative control strain did not show any signal (Fig. 1B, lanes 1 and 2). The strains were also phenotypically characterized on P<sub>MET3</sub>-inducing media supplemented or not with ketoconazole (Fig. 1C). Interestingly, while expression of ectopic *UPC2* did not significantly alter azole resistance of the cells as compared to the control strain (Fig. 1C, middle panel), expression of the *UPC2-HA<sub>3</sub>* allele showed marked resistance to ketoconazole (Fig. 1C, lower panel). This indicates that introduction of the HA<sub>3</sub> tag at the C-terminus of Upc2p functions as a gain-of-function mutation, probably preventing Upc2p from interacting with a repressor, a situation mimicking sterol deprivation as previously suggested for *S. cerevisiae* Upc2p (15) (see Discussion).



**FIGURE 1.** Strategy for Upc2p epitope tagging and characterization of the Upc2p-HA<sub>3</sub>-expressing strains by Western blot and spot assay. (A) Schematic representation of the *UPC2-HA<sub>3</sub>* integration cassette. Upc2p was tagged at its C-terminus with a triple HA epitope (dark gray box) in *C. albicans* strain SGY243 using the pCaEXP expression system (6), which allows integration of the cassette carrying the *UPC2-HA<sub>3</sub>* allele (*UPC2-HA*, light gray box) within the *RP10* locus (black box). Expression of the *UPC2-HA<sub>3</sub>* allele is under the control of the *MET3* promoter (P<sub>MET3</sub>, open arrow), which is induced in the absence of methionine. (B) Western blot analyses of total protein extracts from control (Vector) or *UPC2-HA<sub>3</sub>*-expressing clones SGY243-*UPC2-HA-A* (Clone A) or SGY243-*UPC2-HA-B* (Clone B) grown in the absence (-) or in the presence (+) of 2.5 mM methionine. The proteins were analyzed with a mouse monoclonal anti-HA antibody. The molecular weight markers are indicated on the left. (C) The drug resistance profiles of *C. albicans* integrants carrying the empty vector (Vector), un-tagged *UPC2* (*UPC2*) and *UPC2-HA<sub>3</sub>* (*UPC2-HA<sub>3</sub>*) were analyzed by spot assay on SC-ura-met-cys plates in the absence (No drug) or in the presence of ketoconazole (0.06 µg/ml).

**Identification of Upc2p binding sites *in vivo*.** We performed location profiling ( $n=3$ ) of the *UPC2-HA<sub>3</sub>*-expressing strain (SGY243-*UPC2-HA-B*) relative to the empty vector control strain (SGY243-CaEXP-B) (Table 1) (See Materials and Methods for details). Under these conditions, we expected to identify the transcriptional targets of a constitutively active form of Upc2p. Using a *P*-value (*P*) cutoff of  $< 0.05$ , we found 202 bound targets with an enriched binding ratio of 1.5 and above, the highest significantly enriched target being the ergosterol biosynthesis gene *NCPI* (5.7 fold-enrichment) (see

Table S1 for the complete data set). Thirty-seven target promoters out of 202 were common to two genes located on opposite strands (i.e. sharing the same probe on the chip), preventing us from identifying which one of the two genes is a target of Upc2p.

We used the Gene Ontology Term Finder tool from the Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>) to identify functional groupings among the 165 bound targets with unshared promoters which are significantly over-represented relative to the annotated *C. albicans* genome (see Materials and Methods for details). As expected, Upc2p binding was significantly enriched at promoters of ergosterol biosynthesis genes, including *ERG5* (4.0-fold), *ERG25* (7.8-fold), *ERG11* (8.2-fold), *ERG6* (3.0-fold), *NCP1* (5.7-fold), *ERG9* (1.9-fold), *ERG24* (1.6-fold), *ERG4* (1.6-fold), *ERG2* (1.8-fold), *ERG251* (2.6-fold), *ERG1* (1.5-fold) and *ERG10* (1.5-fold) (Table S1), grouped into the functional category “Ergosterol metabolic process” which itself was the most over-represented category among the GO terms identified ( $P = 3 \times 10^{-10}$ ) (Table 3). These results highlight a major role for Upc2p in controlling the ergosterol biosynthesis pathway. Upc2p binding was also enriched at its own promoter (1.9-fold), suggesting an autoregulatory loop controlling *UPC2* expression (Table 3). Genes grouped into the GO term “Ergosterol metabolic process” were also found in the parent over-represented category “Lipid metabolic process” ( $P = 5.5 \times 10^{-4}$ ) in addition to 5 genes involved or predicted to be involved in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis (orf19.4903), glucosylceramide synthesis (*Hsx11*), lipid mobilization (orf19.4982 and orf19.2050, encoding putative triglyceride lipases highly homologous to *S. cerevisiae* *TGL1*), phospholipid metabolism (orf19.1181, encoding a putative diacylglycerol pyrophosphate phosphatase) and lipid trafficking (*CDRI*). Upc2p also appeared to be implicated in the integrity of the hyphal cell wall as a significant proportion of the enriched targets are localized or predicted to be localized to the hyphal cell wall. Strikingly, Upc2p binding was enriched at the promoters of 17 genes implicated in the assembly of ribosomal subunits, including 11 genes encoding proteins implicated in the assembly of the large subunit and 6 genes involved in the assembly of the small subunit (Table 3). These genes

were grouped into the over-represented GO term “Ribosome” in addition to *EFT2*, encoding a putative translation elongation factor (a total of 18 genes,  $P = 1.0 \times 10^{-3}$ ). Another over-represented category was “Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter” ( $P = 1.5 \times 10^{-2}$ ). The finding that Upc2p binds to promoters of transcription factor-encoding genes suggests that Upc2p might indirectly regulate other metabolic pathways, at least those implicating *INO2* (putative regulator of ribosomal proteins-encoding genes) and *ACE2* (putative regulator of morphogenesis). *SHA3*, although encoding a Serine/Threonine kinase, is associated with the GO term “Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter” probably because it was predicted in *S. cerevisiae* to modulate the activity of a transcription factor regulating hexose transporter-encoding genes (50). Another transcription factor-encoding gene whose promoter was significantly bound by Upc2p is *SUTI* (orf19.4342), a zinc cluster regulator which was shown in *S. cerevisiae* to control sterol uptake (33), although this gene was not associated to the GO term “Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter”. Interestingly, Upc2p binds also to the promoters of the drug-efflux pump-encoding genes *CDRI* (1.6-fold), *MDRI* (4.2-fold) and *YORI* (1.6-fold). This constitutes a new finding with respect to the transcriptional regulation of *CDRI* and *MDRI* and azole resistance. Finally, a significant proportion of bound promoters was grouped into different categories, including thioredoxin peroxidase activity, pyrimidine nucleoside metabolic process and sulfur metabolic process (Table 3).



**TABLE 3.** Over-represented functional categories in Upc2 ChIP-chip data ( $P < 0.02$ )

GO category <sup>a</sup>	Frequency of GO category for:		$P$ value <sup>d</sup>	Genes <sup>e</sup>
	Study sample <sup>b</sup>	<i>C. albicans</i> genome <sup>c</sup>		
Ergosterol metabolic process (GO:0008204, P) <sup>f</sup>	7.8% (13)	0.7% (29)	$3.0 \times 10^{-10}$	<i>ERG10, ERG251, ERG2, ERG5, ERG11, ERG9, ERG25, NCP1, ERG6, ERG1, ERG24, ERG4, UPC2</i>
Cytosol (GO:0005829, C)	13.3% (22)	5.4% (221)	$9.6 \times 10^{-5}$	<i>RPS30, orf19.3572.3, orf19.2309.2, RPL32, ERG10, GLK1, ATX1, RPL12, MET6, RPS1, orf19.4931.1, RPL15A, RPL17B, RPL19A, orf19.6882.1, RPL37B, RPL39, RPS13, orf19.2329.1, RPS23A, RPS6A, ACE2</i>
Lipid metabolic process (GO:0006629, P) <sup>f</sup>	11.5% (19)	4.9% (201)	$5.5 \times 10^{-4}$	<i>ERG10, ERG251, ERG2, HSX11, ERG5, ERG11, orf19.1181, ERG9, ERG25, CDR1, orf19.4903, NCP1, ERG6, ERG1, ERG24, ERG4, UPC2, orf19.4982, orf19.2050</i>
Hypchal cell wall (GO:0030446, C)	4.2% (7)	0.8% (36)	$7.3 \times 10^{-4}$	<i>AHP1, orf19.251, IPP1, MET6, SAM2, TSA1, TSA1B</i>
Ribosome (GO:0005840, C)	10.9% (18)	4.7% (195)	$1.0 \times 10^{-3}$	<i>RPS30, orf19.3572.3, orf19.2309.2, RPL32, RPL12, RPS1, orf19.4931.1, RPL15A, RPL17B, RPL19A, orf19.6882.1, RPL37B, RPL39, RPS13, orf19.2329.1, RPS23A, RPS6A, EFT2</i>
Structural molecule activity (GO:0005198, F)	12.7% (21)	6.3% (257)	$1.8 \times 10^{-3}$	<i>RPS30, orf19.3572.3, orf19.2309.2, RPL32, RPL12, orf19.6665, orf19.3583, RPS1, orf19.4931.1, RPL15A, RPL17B, RPL19A, orf19.6882.1, RPL37B, RPL39, RPS13, orf19.2329.1, RPS23A, RPS6A, CDC12, orf19.121</i>
Thioredoxin peroxidase activity (GO:0008379, F)	1.8% (3)	0.1% (7)	$3.0 \times 10^{-3}$	<i>AHP1, TSA1, TSA1B</i>
Drug binding (GO:0008144, F)	1.8% (3)	0.1% (8)	$4.4 \times 10^{-3}$	<i>ERG11, CDR1, EFT2</i>
Endoplasmic reticulum (GO:0005783, C)	9.6% (16)	4.9% (200)	$7.6 \times 10^{-3}$	<i>ERG251, ERG2, ERG5, ERG11, orf19.1181, KAR2, ERG9, ERG25, orf19.4903, ERG6, CPY1, ERG1, ERG24, ERG4, orf19.1376, orf19.5830</i>
Pyrimidine nucleoside metabolic process (GO:0006213, P)	1.2% (2)	0.0% (4)	$1.2 \times 10^{-2}$	<i>URA3, orf19.1137</i>
Drug transporter activity (GO:0015238, F)	1.8% (3)	0.2% (12)	$1.3 \times 10^{-2}$	<i>MDR1, CDR1, YOR1</i>
Soluble fraction (GO:0005625, C)	5.4% (9)	2.2% (92)	$1.3 \times 10^{-2}$	<i>ERG10, AHP1, GRP2, IPP1, IMH3, MET6, HSP60, EFT2, ASC1</i>
Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0045944, P)	2.4% (4)	0.7% (23)	$1.5 \times 10^{-2}$	<i>INO2, SHA3, ACE2, UPC2</i>
Sulfur metabolic process (GO:0006790, P)	3.6% (6)	1.2% (51)	$1.8 \times 10^{-2}$	<i>BIO2, CYS3, GCSI, MET6, SAM2, SAH1</i>
Lipid particle (GO:0005811, C)	2.4% (4)	0.6% (25)	$1.9 \times 10^{-2}$	<i>ERG6, ERG1, orf19.4982, orf19.2050</i>

<sup>a</sup> Grouping of the Upc2p targets identified in ChIP-chip data according to GO terminology by using the online CGD GO Term Finder tool (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>). The GO accession number, followed by the corresponding ontology classification for each GO category, is shown in parentheses. P, biological process; C, cellular component; F, molecular function.

<sup>b</sup> The number of genes in each category is shown in parentheses. Percentages were calculated based on the number of genes in each GO category divided by the total number of genes in the study sample (165 genes).

<sup>c</sup> The number of genes in the annotated genome associated with each category is shown in parentheses. Percentages were calculated based on the number of genes in each category divided by the total number of annotated genes of the *C. albicans* genome, according to the CGD (4,096 genes).

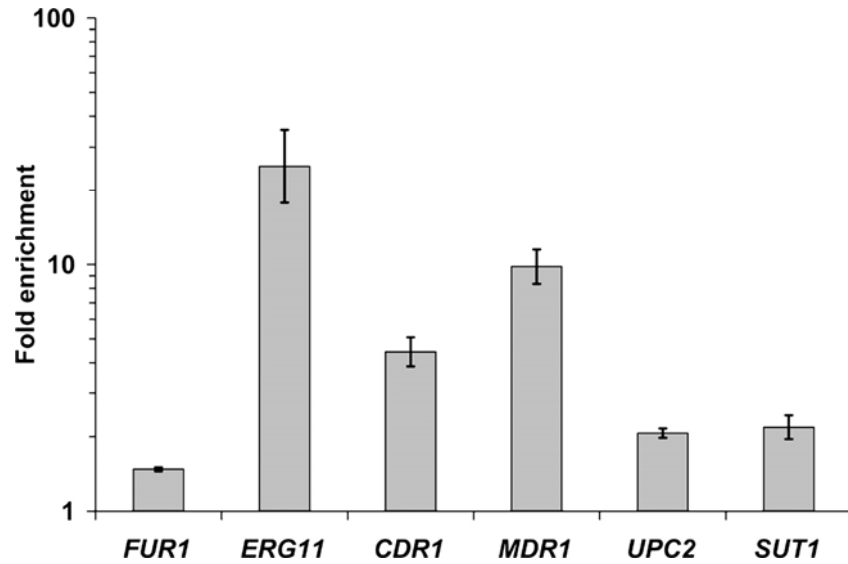
<sup>d</sup>  $P$  values for the overrepresented categories were calculated using a binomial distribution, as described on the GO Term Finder tool website (<http://www.candidagenome.org/help/goTermFinder.shtml>). The  $P$  value cutoff used was  $<0.02$ .

<sup>e</sup> Gene names or *orf19* nomenclature according to the CGD. Some genes were associated with more than one GO category.

<sup>f</sup> The selection criteria for GO term groups with overlapping gene lists (see Materials and Methods for details) were not applied to these two groups, in order to show that "ergosterol metabolic process" was the most significantly overrepresented functional category.

To confirm our ChIP-chip results, the *UPC2-HA<sub>3</sub>* and control strains used for the ChIP-chip experiment were submitted to ChIP (3 biological replicates) and the recovered DNA samples were analyzed by quantitative real time PCR analysis (see Materials and Methods for details) (Fig. 2). We confirmed the enrichment of Upc2p binding at the

promoters of *ERG11* (25.1-fold), *CDR1* (4.4 -fold), *MDR1* (9.8-fold), *UPC2* (2.1-fold) and orf19.4342 (*SUT1*, 2.2-fold) (Fig. 2).



**FIGURE 2.** Quantification of the *in vivo* enrichment of Upc2p binding at selected promoter targets using Q-PCR. The SGY243-CaEXP-B and SGY243-UPC2-HA-B strains were submitted to chromatin immunoprecipitation (three biological replicates) and the recovered DNA samples analyzed by Q-PCR, using Universal ProbeLibrary probes (Roche Diagnostics) for the *ERG11*, *FUR1* and *SPS4* (reference) promoters, TaqMan probes for the *CDR1*, *MDR1* and *UPC2* promoters and the SYBR Green dye for the *SUT1* and *ACT1* (reference) promoters. Fold enrichments (n-fold) are presented in log scale: 25.1 for *ERG11* (95% confidence interval of 17.8, 35.2) , 4.4 for *CDR1* (95% confidence interval of 3.9, 5.1), 9.8 for *MDR1* (95% confidence interval of 8.3, 11.5), 2.1 for *UPC2* (95% confidence interval 2.0, 2.2), 2.2 for *SUT1* (95% confidence interval, 2.0, 2.4 ) and 1.5 for *FUR1* (95% confidence interval of 1.5, 1.5), which was used as a negative control. Error bars denote standard deviations. All five tested promoters are significantly enriched compared to the *FUR1* control, using a Welch's two sample t-test ( $\alpha = 0.001$ ).

**Identification of potential Upc2p binding motifs.** We have previously shown that *C. albicans* Upc2p binds *in vitro* to the SRE 5'-TCGTATA, found in the promoter of the *ERG2* gene (28). Using an *in vivo* reporter transactivation assay, one recent study showed that an azole responsive enhancer element (ARE) including one perfect SRE is involved in the *UPC2*-dependant induction of a *P<sub>ERG11</sub>-r-LUC* fusion (36). We thus searched for the

SRE motif (TCGTATA) in the promoters of the 202 genes identified by ChIP-chip, using up to 1000 bp of promoter sequence upstream of the ATG translation start site and preventing overlap with neighboring genes (i.e. by clipping upstream sequences when a predicted upstream ORF was located within positions -1000 to -1 bp relative to the ATG codon). This analysis identified 40 matches for a total of 36 SRE-containing promoters, including the promoters of 8 *ERG* genes in addition to *UPC2* (Table 4). As a control, we searched for the TCGTATA motif in equivalent promoter regions from the 6,045 ORFs of the *C. albicans* genome and found an average of 12.3 promoters containing this motif out of 202, yielding a 2.9-fold enrichment for the presence of putative SREs in the Upc2p targets (data not shown). The fact that only 36 out of the 202 enriched promoter sequences contain putative SREs suggested that Upc2p might recognize different motifs in the promoters of its targets. We thus conducted a motif search analysis using the SCOPE program (<http://genie.dartmouth.edu/scope/>), which allows the accurate detection of conserved putative transcription factor binding sites among a given set of promoter sequences using three independent motif discovery algorithms (7,9) (see Materials and Methods for details). We found the following three highest scoring motifs: AyAGCCckh (significance value of 47.2, 12.9% coverage), vnCGbdTr (significance value of 47.1, 82.2% coverage) and GAAAAA (significance value of 35.0, 95.5% coverage). Interestingly, the vnCGbdTr motif (Fig. 3), which was found in 166 promoters out of 202, includes the previously characterized SRE motif TCGTATA present in several *ERG* genes (Table 4), suggesting that the SRE is a variant of a more general recognition sequence for Upc2p.

**TABLE 4.** Upc2p target promoters containing a perfect putative SRE (TCGTATA)

Functional category and ORF <sup>a</sup>	Gene name <sup>b</sup>	Binding ratio <sup>c</sup>	<i>P</i> value <sup>d</sup>	Starting position <sup>e</sup>	Ending position <sup>e</sup>	Strand <sup>f</sup>
<b>Lipid metabolic process</b>						
<i>orf19.5178</i>	<i>ERG5</i>	4.0	0.0000	-577	-571	-
<i>orf19.3732</i>	<i>ERG25</i>	7.8	0.0000	-429	-423	-
<i>orf19.922</i>	<i>ERG11</i>	8.2	0.0000	-232	-226	+
<i>orf19.922</i>	<i>ERG11</i>	8.2	0.0000	-486	-480	-
<i>orf19.1631</i>	<i>ERG6</i>	3.0	0.0001	-555	-549	+
<i>orf19.391</i>	<i>UPC2</i>	1.9	0.0052	-437	-431	-
<i>orf19.1598</i>	<i>ERG24</i>	1.6	0.0265	-139	-133	-
<i>orf19.2050</i>	<i>TGL1</i>	1.6	0.0306	-9	-3	-
<i>orf19.4631</i>	<i>ERG252</i>	2.6	0.0318	-499	-493	-
<i>orf19.4631</i>	<i>ERG252</i>	2.6	0.0318	-119	-113	-
<i>orf19.406</i>	<i>ERG1</i>	1.5	0.0354	-373	-367	+
<i>orf19.1591</i>	<i>ERG10</i>	1.5	0.0377	-264	-258	+
<b>Organelle organization and biogenesis</b>						
<i>orf19.7221</i>	<i>SET3</i>	7.1	0.0008	-682	-676	+
<i>orf19.7221</i>	<i>SET3</i>	7.1	0.0008	-541	-535	+
<i>orf19.7221</i>	<i>SET3</i>	7.1	0.0008	-718	-712	-
<i>orf19.3363</i>	<i>VTC4</i>	3.0	0.0135	-601	-595	-
<i>orf19.121</i>	<i>ARC18</i>	1.7	0.0226	-459	-453	+
<i>orf19.6942</i>	<i>ORC3</i>	1.5	0.0394	-156	-150	+
<b>Vesicle-mediated transport</b>						
<i>orf19.2911</i>	<i>SEC3</i>	1.5	0.0447	-745	-739	+
<i>orf19.1376</i>	<i>SSO2</i>	1.5	0.0477	-811	-805	-
<b>Translation</b>						
<i>orf19.3415.1</i>	<i>RPL32</i>	1.7	0.0239	-473	-467	+
<i>orf19.493</i>	<i>RPL15A</i>	1.6	0.0397	-241	-235	+
<b>Amino acid and derivative metabolic process</b>						
<i>orf19.3911</i>	<i>SAH1</i>	2.5	0.0005	-383	-377	-
<i>orf19.657</i>	<i>SAM2</i>	2.3	0.0064	-521	-515	+
<b>Unknown or other</b>						
<i>orf19.1691</i>		3.7	0.0000	-713	-707	-
<i>orf19.6852</i>		2.5	0.0006	-295	-289	-
<i>orf19.1350</i>		18.5	0.0027	-742	-736	+
<i>orf19.6348</i>		2.0	0.0037	-826	-820	+
<i>orf19.1563</i>	<i>ECM3</i>	2.0	0.0039	-309	-303	-
<i>orf19.664</i>		4.5	0.0108	-472	-466	+
<i>orf19.1958</i>		1.8	0.0140	-171	-165	-
<i>orf19.4659</i>	<i>PRP21</i>	1.9	0.0158	-600	-594	-
<i>orf19.2286</i>		1.7	0.0176	-100	-94	+
<i>orf19.5491.1<sup>g</sup></i>	<i>ATP14</i>	1.7	0.0192	-282	-276	-
<i>orf19.3781</i>		1.6	0.0236	-337	-331	+
<i>orf19.4357<sup>h</sup></i>		1.9	0.0240	-219	-213	+
<i>orf19.4214</i>		1.8	0.0342	-584	-578	+
<i>orf19.3705</i>		1.5	0.0377	-415	-409	-
<i>orf19.3659<sup>h</sup></i>		1.5	0.0406	-366	-360	+
<i>orf19.496</i>	<i>MSH1</i>	1.5	0.0493	-346	-340	+
<i>orf19.496</i>	<i>MSH1</i>	1.5	0.0493	-209	-203	-

<sup>a</sup> *orf19* nomenclature according to the CGD assembly 19 version. Grouping of the SRE-containing promoter sequences into functional categories was carried out using the CGD GO Slim Mapper tool (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermMapper>).

<sup>b</sup> Gene name according to the CGD (<http://www.candidagenome.org/>) or the National Research Council of Canada *C. albicans* database (<http://candida.bri.nrc.ca/candida/index.cfm?page=CaGeneSearch>).

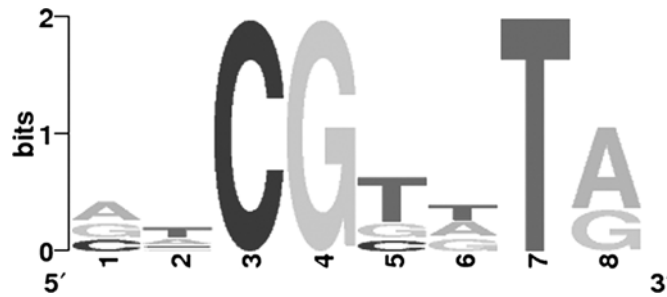
<sup>c</sup> Binding ratio from the ChIP-chip data. Probes were spotted in duplicate onto the ChIP-chip arrays (Hogues et al., submitted). The binding ratio with the most significant *P* value is shown.

<sup>d</sup> *P* value for the corresponding binding ratio.

<sup>e</sup> Limits (starting and ending positions) of the putative SRE sequence relative to the ATG translation start site.

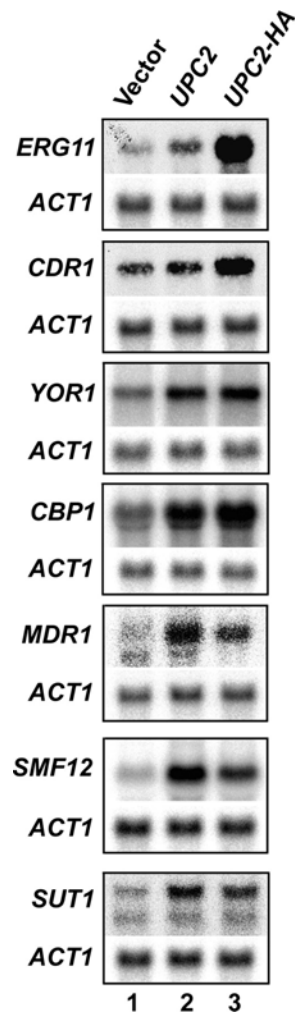
<sup>f</sup> +, sense strand; -, antisense strand.

<sup>g</sup> The intergenic oligonucleotide probe corresponds to a common promoter of two adjacent genes.



**FIGURE 3.** Motif logo of a conserved consensus sequence in the Upc2p-target promoters. DNA sequences of the 202 Upc2p-enriched promoters were retrieved from the Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT) website (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) (see Materials and methods for details) and used as input for motif discovery, using the Suite for Computational identification Of Promoter Elements (SCOPE) program (<http://genie.dartmouth.edu/scope/>) (7,9).

**Increased *in vivo* Upc2p binding correlates with increased expression of Upc2p targets.** To test whether the expression of the Upc2p target genes identified by ChIP-chip was also modulated, we prepared total RNA from strains SGY243-CaEXP-B (vector control), SGY243-UPC2-B, expressing the *UPC2* gene and SGY243-UPC2-HA-B, expressing the *UPC2-HA<sub>3</sub>* allele (Table 1), grown under the same conditions as for the ChIP-chip experiments. We then performed Northern blot analyses using probes for different Upc2p targets (Fig. 4). All the tested genes displayed basal levels of expression in the control strain (Fig. 4, lane 1). As expected, *ERG11* expression was strongly upregulated as a consequence of the activating effect of the HA<sub>3</sub> tag, consistent with the role of Upc2p as a transcriptional regulator of the *ERG11* gene (28,43). Interestingly, we found that the Upc2p target genes responded differentially to *UPC2* or *UPC2-HA<sub>3</sub>* overexpression (Fig. 4, lanes 2 and 3). *ERG11* and *CDR1* were upregulated mostly as a consequence of the activating effect of the HA<sub>3</sub> tag in Upc2p, *MDR1*, *SMF12* and *SUT1* were upregulated mostly as a consequence of Upc2p overexpression, whereas *YORI* and *CBP1* were upregulated at similar levels under both conditions. The *ACT1* control gene showed no change in expression (Fig. 4). Taken together, these results showed that increased binding of Upc2p-HA<sub>3</sub> to its targets correlates with their increased expression.



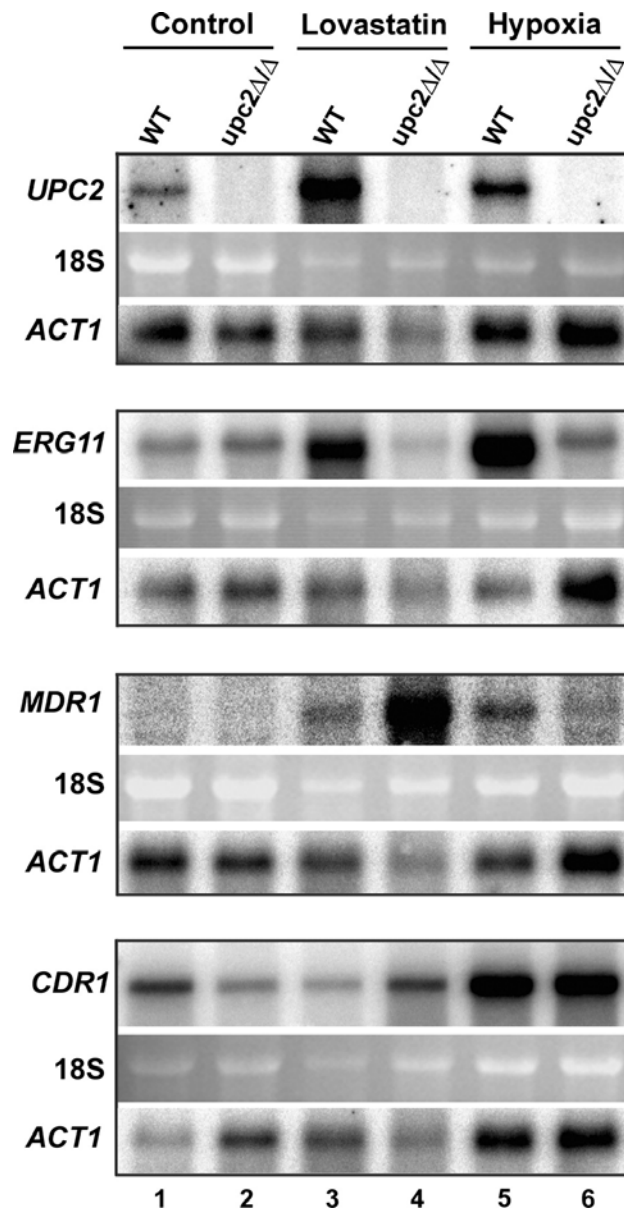
**FIGURE 4.** Northern blot analysis of the SGY243-derived integrants. Total RNA was prepared from strains SGY243-UPC2-HA-B (*UPC2-HA*), SGY243-UPC2-B (*UPC2*) and the control SGY243-CaEXP-B strain (Vector). RNA samples (20  $\mu$ g) were electrophoresed, transferred to nylon membranes and probed with the indicated probes. The membranes were deprobed and subsequently re-hybridized with the *ACT1* control probe. The membranes were exposed to a phosphoscreen for 24 h.

**Transcriptional response of *ERG11*, *MDR1* and *CDR1* to Upc2p-activating signals.** Upc2 was shown in *S. cerevisiae* to activate the expression of its target genes under hypoxia or by treating cells with specific inhibitors of the ergosterol biosynthetic pathway, such as lovastatin (HMG-CoA reductase inhibitor) or azoles (14). In *C. albicans*, some

experimental evidence supports that Upc2p is similarly activated. First, *ERG11* is upregulated following azoles or lovastatin treatments (46) or under hypoxia (41). Second, *C. albicans upc2Δ/upc2Δ* mutants display altered growth on a medium containing azole drugs or lacking oxygen (28). Our finding that Upc2p binds *in vivo* to the promoters of genes involved in clinical azole resistance, namely *ERG11*, *MDR1* and *CDR1*, prompted us to determine whether the expression of these genes is regulated in response to Upc2p-activating signals. The SGY243 wild-type strain and its *upc2Δ/upc2Δ* mutant derivative were grown for 24 hours in the presence of lovastatin, under hypoxia or under untreated conditions (control). Total RNA was prepared from treated and untreated cells and subjected to Northern blotting using *UPC2*-, *ERG11*-, *MDR1*- and *CDR1*- specific probes (Fig. 5). *UPC2* displayed basal expression in untreated wild-type cells (Fig. 5 lane 1) which was undetectable in the *upc2Δ/upc2Δ* mutant (Fig. 5, lane 2). *UPC2* expression was strongly induced upon lovastatin or hypoxic treatment (Fig. 5, lanes 3 and 5), potentially as a consequence of an autoregulatory mechanism and/or the activation of another transcription factor acting upstream of Upc2p. As expected, the *ERG11* gene was upregulated upon lovastatin treatment as well as under hypoxia (Fig. 5, lanes 3 and 5). This induction was totally abolished in the *upc2Δ/upc2Δ* mutant, demonstrating that Upc2p is essential for the drug- or hypoxia-induced upregulation of *ERG11* (Fig. 5, lanes 4 and 6). Under lovastatin treatment, *MDR1* expression was slightly induced in the wild-type strain (Fig. 5, lane 3) yet strongly upregulated in the *upc2Δ/upc2Δ* mutant (Fig. 5, lane 4). Conversely, while *MDR1* expression was slightly induced in wild-type cells grown under hypoxia (Fig. 5, lane 5), this induction was abrogated in the *upc2Δ/upc2Δ* mutant (Fig. 5, lane 6). These observations demonstrate that Upc2p is a transcriptional regulator of the *MDR1* gene, acting as a transcriptional repressor upon lovastatin treatment and as a transcriptional activator under hypoxia. Interestingly, we found that Upc2p participates in maintaining the basal expression levels of *CDR1* (under untreated conditions), as a slight but reproducible decrease in *CDR1* basal expression was observed in the *upc2Δ/upc2Δ* mutant as compared to the wild-type strain when the signal was normalized with the *ACT1*

control signal (Fig. 5, compare lanes 1 and 2). Furthermore, *CDRI* expression was downregulated in the wild-type strain by lovastatin (Fig. 5, lanes 1 and 3) and this downregulation was abolished in the *upc2Δ/upc2Δ* mutant (Fig. 5, compare lanes 3 and 4), suggesting that Upc2p acts as a repressor of *CDRI* in the presence of lovastatin. Finally, *CDRI* expression was induced by hypoxia in the wild-type strain and the *upc2Δ/upc2Δ* mutant at similar levels (Fig. 5, lanes 5 and 6), indicating that hypoxia-induced *CDRI* expression is mediated by another regulator. Since SGY243 was found to carry four copies of the *UPC2* gene (29), suggesting that partial or complete chromosome 1 tetrasomy may have occurred in that strain, we repeated these experiments using strain BWP17 and its *upc2Δ/upc2Δ* mutant derivative (43). Similar results were obtained (data not shown), indicating that aneuploidy did affect gene expression in an atypical way in the SGY243 background. Taken together, our results show that Upc2p is a transcriptional regulator of the azole resistance genes *ERG11*, *CDRI* and *MDRI*. They also reveal that Upc2p regulates the expression of its targets in a complex manner, acting as a transcriptional activator or a repressor depending upon the target and the activating signal.





**FIGURE 5.** Northern blot analysis of the SGY243 and *upc2Δ/upc2Δ* strains. The wild-type SGY243 strain (WT) and the *upc2Δ* homozygous mutant (*upc2Δ/Δ*) were treated or not (Control) with 25  $\mu$ g/ml of hydrolyzed Lovastatin or grown under hypoxia for 24 hours in YPD medium. Total RNA was prepared and RNA samples (25  $\mu$ g) were electrophoresed, transferred to nylon membranes and probed with *UPC2*-, *ERG11*-, *MDR1*- and *CDR1*-specific probes (indicated on the left). *C. albicans* 18S rRNA ethidium bromide staining (18S) was used as a loading control. The membranes were deprobed and rehybridized with the *ACT1* probe as a transfer control. The membranes were exposed to a phosphoscreen for 24 h.

## IV.5. Discussion

In the present study, we used the ChIP-chip technology to identify genes whose promoters are bound by *C. albicans* Upc2p *in vivo* with the goal of better understanding its biological function. In the course of these experiments, we found that tagging Upc2p at its C-terminus confers a hyperactive state to the fusion protein. This was not surprising, as several transcription factors of the zinc cluster family become hyperactive when mutated. Some examples include *S. cerevisiae* Pdr1p and Pdr3p, implicated in pleiotropic drug resistance (8,34,44), War1p, involved in response to weak acids (19) and Leu3p, involved in branched chain amino acid biosynthesis and ammonia assimilation (52,53). Furthermore, such activating mutations are naturally selected in azole-resistant *C. albicans* isolates, resulting in hyperactivity of the zinc cluster transcription factors Tac1p (11,12,59) or Mrr1p (31). It has been shown that substituting amino acids at the C-terminus of *S. cerevisiae* Upc2p with residues containing bulky lateral chains results in transcriptional hyperactivity (15). Thus, the presence of the bulky HA<sub>3</sub> tag may act similarly and prevent *C. albicans* Upc2p from interacting with a repressor, a situation which would mimic sterol deprivation, as proposed for *S. cerevisiae* Upc2p (15). Whether this repressor molecule is a distinct protein or an intrinsic negative regulatory domain in Upc2p remains to be determined.

Our Upc2p-HA<sub>3</sub> expression system has some advantages and limitations. For instance, the pCaEXP system permits high levels of expression of the fusion gene at any time during growth of the cells, simply by removing methionine from the medium. This is an advantage for nuclear proteins that are expressed at very low levels and are difficult to immunoprecipitate. Also, the constitutive transcriptional activity of Upc2p conferred by the HA tag allowed us to identify its targets in the absence of inducers, a situation that would mimic Upc2p gain-of-function mutations in azole-resistant clinical strains. Such mutations have not been reported yet, although some azole-resistant strains overexpress

*ERG11* (11,54), potentially as a consequence of mutations in Upc2p. One recent study in *S. cerevisiae* used a similar expression system to identify the transcriptional targets of the zinc cluster regulator Leu3p and showed that overexpressing as well as constitutively activating a Leu3p-MBP fusion increased both the sensitivity and the relevance of the ChIP-chip results (49). Furthermore, it has been shown that overexpression of transcription factors mimics their physiological activation and is a reliable straightforward strategy to identify their transcriptional targets (10). However, this approach often leads to cell growth inhibition, probably due to signals that sense aberrant pathway activation and inhibit the cell cycle (10,47). In fact, a growth inhibition effect was observed in cells overexpressing *UPC2* or *UPC2-HA<sub>3</sub>* as their colony size was smaller than that of the control cells (Fig. 1C, left panel). Since Upc2p was not expressed at its endogenous normal levels and not physiologically activated, our binding data may not exactly reflect the activity of Upc2p upon treatment with its inducers (such as lovastatin, azoles or growth under hypoxia) or may be somewhat different from the natural binding sites of Upc2p. It is also possible that some Upc2p targets were missed by this strategy. Nevertheless, our results showing that endogenous Upc2p controls the expression of *ERG11*, *MDR1* and *CDR1* (Fig. 5) suggest that the genes that were identified by ChIP-chip using our system are *bona fide* Upc2p transcriptional targets.

Our study demonstrates that *C. albicans* Upc2p binds *in vivo* to the promoters of several ergosterol biosynthesis genes and other genes involved or predicted to be involved in lipid metabolism, grouped into the most significantly over-represented functional category “Ergosterol metabolic process” as well as into the parental GOterm “Lipid metabolic process” (Table 3). This highlights a major role for Upc2p in sterol homeostasis. We found that Upc2p binds *in vivo* to the promoter of the *SUT1* gene (orf19.4342) (Table 3, Fig. 2), encoding an atypical zinc cluster regulator highly homologous to *S. cerevisiae* Sut1p. It has been shown that *S. cerevisiae* Sut1p controls sterol uptake (5,33), suggesting that, in *C. albicans*, Upc2p and Sut1p might interact in a sterol regulatory network. In *S. cerevisiae*, sterol uptake occurs through upregulation of the ATP-binding cassette

transporters Aus1p and Pdr11p or the Dan/Tir mannoproteins under anaerobic conditions (1,3,56). A search for candidate proteins which would function similarly in *C. albicans*, using BLASTP analyses, did not detect clear Dan/Tir homologs but identified four proteins with high homology to Aus1p and Pdr11p, namely Snq2p, Cdr1p, Cdr2p, Cdr11p and Cdr4p. Our ChIP-chip data showed an enrichment of Upc2p binding at the promoters of *CDR1* (1.6-fold enrichment,  $P = 0.03$ ) and *CDR4* (1.4-fold enrichment,  $P = 0.06$ ) (Table S1). Thus, one could hypothesize that these two ABC transporters are candidates for sterol transport in *C. albicans*. Interestingly, among the hypoxic genes whose promoters were bound *in vivo* by Upc2p is *CBP1*, which was shown in *C. albicans* to encode a corticosteroid binding protein (30). This is important as *C. albicans* appears to uptake steroids from the host under hypoxia, possibly as metabolic precursors of sterols. Northern blotting showed that *CBP1* induction under hypoxia is strictly *UPC2*-dependant (data not shown). This suggests that Upc2p plays a role in corticosteroid uptake from mammals and reflects a potential role for Upc2p in the adaptation of *C. albicans* to hypoxic conditions in the host.

An important finding was that Upc2p acts as a transcriptional activator or as a repressor of *MDR1*, depending on the activating signal (Fig. 5). Studies in *S. cerevisiae* showed that the zinc cluster regulator Hap1p, which controls the expression of *ERG* genes (*ERG2*, *ERG5* and *ERG11*) in response to hypoxia, can act as a transcriptional activator or as a repressor depending on heme levels (20). The conversion of Hap1p into a transcriptional repressor occurs through recruitment of the Tup1p-Ssn6p co-repressor complex (20). Thus, it is possible that Upc2p uses a similar mechanism to repress the expression of some of its target genes. Also, it will be interesting to find out how Upc2p interacts with Mrr1p to control *MDR1* expression (30).

Among the over-represented functional groups of genes whose promoters were bound by Upc2p were “Sulfur metabolic process”, “Ribosome” and “Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter” (Table 3). Two out of the six genes

involved in sulfur metabolic process, *SAM2* and *MET6*, encode enzymes catalyzing reactions involved in the biosynthesis of precursors of the Erg6p substrate S-Adenosyl-methionine (16). This may explain why Upc2p binds to the promoters of genes involved in sulfur metabolic process. Upc2p also binds to the promoters of genes encoding components of the ribosomal subunits, suggesting a role for Upc2p in translation. As ergosterol is an important component of the membranes in yeast, altering the ergosterol biosynthetic process would have major impacts on the general metabolism within the cell. Thus, it would not be surprising that Upc2p directly controls processes that would be affected as a result of sterol deprivation in the cell, such as translation. This is also reflected by our finding that Upc2p binds to the promoters of transcription factor-encoding genes such as Ace2p, which is implicated in the regulation of several metabolic pathways including glycolysis, respiration and filamentation (32), or Ino2p, which is predicted to be involved in regulating the expression of ribosomal genes in *C. albicans* (21).

As Upc2p is activated upon treatment with azoles or during growth under hypoxia, we expected an overlap between our ChIP-chip data and data from genome-wide expression profiling of *C. albicans* response to azole treatment or hypoxia (16,24,41). Genome-wide transcriptional profiling of *C. albicans* response to hypoxia showed that 6 genes involved in ergosterol metabolism, namely *ERG11*, *ERG251*, *ERG3*, *ERG5*, *UPC2* and *ERG10*, were significantly upregulated relative to untreated cells (41). Interestingly, we show here that upregulation of *ERG11* during hypoxia is strictly *UPC2*-dependant (Fig. 5). Furthermore, 5 out of these 6 genes had their promoters bound *in vivo* by Upc2p in our present report (Table 3), suggesting that their induction by hypoxia is mediated by Upc2p as well. We also found other genes which were both upregulated under hypoxia and had their promoters bound by Upc2p in our study, including *CBP1* (orf19.7323), *GRP2* (orf19.4309), *CPY1* (orf19.1339), orf19.1964, orf19.251 and *AHP1* (orf19.2762). Several genes whose promoters were bound *in vivo* by Upc2p in the present report were also shown to be upregulated in response to azoles, including the ergosterol biosynthetic genes *ERG2*, *ERG10*, *ERG11*, *ERG25*, *ERG251* and *NCPI* (16,24). Interestingly, a large number of

ribosomal genes were found to be differentially upregulated 2.5 to 5.2-fold upon exposure to itraconazole (16), among them *RPL15A*, *RPL14B*, *RPS17B*, *RPL32* and *RPL17B* also had their promoters bound by Upc2p (Table 3). Genes involved in sulfur metabolic process, one of the over-represented functional groups of genes whose promoters are bound by Upc2p, were also found to be modulated upon itraconazole treatment including *SAM2*, *MET6*, *SAH1* and *BIO2* (16). Thus, our study highlights how the ChIP-chip technology can help providing mechanistic explanations to expression array data.

## **IV.6. Acknowledgments**

We are indebted to Raphaëlle Lambert and Pierre Chagnon from the IRIC's Genomic platform for their support with the Q-PCR experiments. We would also like to thank Jean Barbeau for the GasPak™ anaerobic jar. This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.R. (MT-15679 and HOP-67260) and to F.R. (MOP-82891). Work by S.L. was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, 312023-2005) and from CIHR (CTP-79843). S.Z. and S.S. are supported by doctoral studentships from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). S.D. is supported by a doctoral studentship from the Institut de recherches cliniques de Montréal/CIHR Cancer Research Program. F.R. holds a CIHR new investigator award.

## IV.7. References

1. **Abramova, N. E., B. D. Cohen, O. Sertil, R. Kapoor, K. J. Davies, and C. V. Lowry.** 2001. Regulatory mechanisms controlling expression of the DAN/TIR mannoprotein genes during anaerobic remodeling of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**:1169-1177.
2. **Akins, R. A.** 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **43**:285-318.
3. **Alimardani, P., M. Regnacq, C. Moreau-Vauzelle, T. Ferreira, T. Rossignol, B. Blondin, and T. Berges.** 2004. SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. *Biochem. J.* **381**:195-202.
4. **Berman, J. and P. E. Sudbery.** 2002. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat. Rev. Genet.* **3**:918-930.
5. **Bourot, S. and F. Karst.** 1995. Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* SUT1 gene involved in sterol uptake. *Gene* **165**:97-102.
6. **Care, R. S., J. Trevethick, K. M. Binley, and P. E. Sudbery.** 1999. The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol. Microbiol.* **34**:792-798.
7. **Carlson, J. M., A. Chakravarty, C. E. DeZiel, and R. H. Gross.** 2007. SCOPE: a web server for practical de novo motif discovery. *Nucleic Acids Res.* **35**:W259-W264.
8. **Carvajal, E., H. B. van den Hazel, A. Cybularz-Kolaczowska, E. Balzi, and A. Goffeau.** 1997. Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Mol. Gen. Genet.* **256**:406-415.
9. **Chakravarty, A., J. M. Carlson, R. S. Khetani, and R. H. Gross.** 2007. A novel ensemble learning method for de novo computational identification of DNA binding sites. *BMC. Bioinformatics.* **8**:249.
10. **Chua, G., Q. D. Morris, R. Sopko, M. D. Robinson, O. Ryan, E. T. Chan, B. J. Frey, B. J. Andrews, C. Boone, and T. R. Hughes.** 2006. Identifying transcription



factor functions and targets by phenotypic activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:12045-12050.

11. **Coste, A., A. Selmecki, A. Forche, D. Diogo, M. E. Bougnoux, C. d'Enfert, J. Berman, and D. Sanglard.** 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot. Cell.*
12. **Coste, A., V. Turner, F. Ischer, J. Morschhauser, A. Forche, A. Selmecki, J. Berman, J. Bille, and D. Sanglard.** 2006. A mutation in *Tac1p*, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* **172**:2139-2156.
13. **Daum, G., N. D. Lees, M. Bard, and R. Dickson.** 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:1471-1510.
14. **Davies, B. S. and J. Rine.** 2006. A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **174**:191-201.
15. **Davies, B. S., H. S. Wang, and J. Rine.** 2005. Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol. Cell Biol.* **25**:7375-7385.
16. **De Backer, M. D., T. Ilyina, X. J. Ma, S. Vandoninck, W. H. Luyten, and H. Vanden Bossche.** 2001. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1660-1670.
17. **De Deken, X. and M. Raymond.** 2004. Constitutive activation of the *PDR16* promoter in a *Candida albicans* azole-resistant clinical isolate overexpressing *CDR1* and *CDR2*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2700-2703.
18. **de Micheli, M., J. Bille, C. Schueller, and D. Sanglard.** 2002. A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol. Microbiol.* **43**:1197-1214.
19. **Gregori, C., B. Bauer, C. Schwartz, A. Kren, C. Schuller, and K. Kuchler.** 2007. A genetic screen identifies mutations in the yeast *WAR1* gene, linking transcription factor phosphorylation to weak-acid stress adaptation. *FEBS J.* **274**:3094-3107.

20. **Hickman, M. J. and F. Winston.** 2007. Heme levels switch the function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between transcriptional activator and transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.* **27**:7414-7424.
21. **Hoppen, J., M. Dietz, G. Warsow, R. Rohde, and H. J. Schuller.** 2007. Ribosomal protein genes in the yeast *Candida albicans* may be activated by a heterodimeric transcription factor related to Ino2 and Ino4 from *S. cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* **278**:317-330.
22. **Kelly, R., S. M. Miller, M. B. Kurtz, and D. R. Kirsch.** 1987. Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step gene disruption to isolate *ura3* mutants. *Mol. Cell Biol.* **7**:199-208.
23. **Lewis, T. A., F. R. Taylor, and L. W. Parks.** 1985. Involvement of heme biosynthesis in control of sterol uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **163**:199-207.
24. **Liu, T. T., R. E. Lee, K. S. Barker, R. E. Lee, L. Wei, R. Homayouni, and P. D. Rogers.** 2005. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2226-2236.
25. **Liu, T. T., S. Znaidi, K. S. Barker, L. Xu, R. Homayouni, S. Saidane, J. Morschhauser, A. Nantel, M. Raymond, and P. D. Rogers.** 2007. Genome-wide expression and location analyses of the *Candida albicans* Tac1p regulon. *Eukaryot. Cell* **6**:2122-2138.
26. **Livak, K. J. and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
27. **Lorenz, R. T. and L. W. Parks.** 1990. Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1660-1665.
28. **MacPherson, S., B. Akache, S. Weber, D. De, X, M. Raymond, and B. Turcotte.** 2005. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1745-1752.
29. **MacPherson, S., M. Larochelle, and B. Turcotte.** 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:583-604.

30. **Malloy, P. J., X. Zhao, N. D. Madani, and D. Feldman.** 1993. Cloning and expression of the gene from *Candida albicans* that encodes a high-affinity corticosteroid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:1902-1906.
31. **Morschhauser, J., K. S. Barker, T. T. Liu, J. Blass-Warmuth, R. Homayouni, and P. D. Rogers.** 2007. The Transcription Factor Mrr1p Controls Expression of the MDR1 Efflux Pump and Mediates Multidrug Resistance in *Candida albicans*. *PLoS. Pathog.* **3**:e164.
32. **Mulhern, S. M., M. E. Logue, and G. Butler.** 2006. *Candida albicans* transcription factor Ace2 regulates metabolism and is required for filamentation in hypoxic conditions. *Eukaryot. Cell* **5**:2001-2013.
33. **Ness, F., S. Bourot, M. Regnacq, R. Spagnoli, T. Berges, and F. Karst.** 2001. SUT1 is a putative Zn[II]2Cys6-transcription factor whose upregulation enhances both sterol uptake and synthesis in aerobically growing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Eur. J. Biochem.* **268**:1585-1595.
34. **Nourani, A., D. Papajova, A. Delahodde, C. Jacq, and J. Subik.** 1997. Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain. *Mol. Gen. Genet.* **256**:397-405.
35. **Odds, F. C., A. J. Brown, and N. A. Gow.** 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **11**:272-279.
36. **Oliver, B. G., J. L. Song, J. H. Choiniere, and T. C. White.** 2007. cis-Acting elements within the *Candida albicans* ERG11 promoter mediate the azole response through transcription factor Upc2p. *Eukaryot. Cell* **6**:2231-2239.
37. Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter. *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual.* 1990. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
38. **Saidane, S., S. Weber, D. De, X. G. St Germain, and M. Raymond.** 2006. PDR16-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **60**:1546-1562.
39. **Sanglard, D. and F. C. Odds.** 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* **2**:73-85.

40. **Schneider, B. L., W. Seufert, B. Steiner, Q. H. Yang, and A. B. Futcher.** 1995. Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**:1265-1274.
41. **Setiadi, E. R., T. Doedt, F. Cottier, C. Noffz, and J. F. Ernst.** 2006. Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J. Mol. Biol.* **361**:399-411.
42. **Sherman, F.** 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**:3-21.
43. **Silver, P. M., B. G. Oliver, and T. C. White.** 2004. Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Eukaryot. Cell* **3**:1391-1397.
44. **Simonics, T., Z. Kozovska, D. Michalkova-Papajova, A. Delahodde, C. Jacq, and J. Subik.** 2000. Isolation and molecular characterization of the carboxy-terminal pdr3 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **38**:248-255.
45. **Sims, C. R., L. Ostrosky-Zeichner, and J. H. Rex.** 2005. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch. Med. Res.* **36**:660-671.
46. **Song, J. L., C. N. Lyons, S. Holleman, B. G. Oliver, and T. C. White.** 2003. Antifungal activity of fluconazole in combination with lovastatin and their effects on gene expression in the ergosterol and prenylation pathways in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **41**:417-425.
47. **Sopko, R., D. Huang, N. Preston, G. Chua, B. Papp, K. Kafadar, M. Snyder, S. G. Oliver, M. Cyert, T. R. Hughes, C. Boone, and B. Andrews.** 2006. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol. Cell* **21**:319-330.
48. **Sturley, S. L.** 2000. Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**:155-163.
49. **Tang, L., X. Liu, and N. D. Clarke.** 2006. Inferring direct regulatory targets from expression and genome location analyses: a comparison of transcription factor deletion and overexpression. *BMC. Genomics* **7**:215.
50. **Vagnoli, P. and L. F. Bisson.** 1998. The SKS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for long-term adaptation of snf3 null strains to low glucose. *Yeast* **14**:359-369.
51. **Vik, A. and J. Rine.** 2001. Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **21**:6395-6405.

52. **Wang, D., Y. Hu, F. Zheng, K. Zhou, and G. B. Kohlhaw.** 1997. Evidence that intramolecular interactions are involved in masking the activation domain of transcriptional activator Leu3p. *J. Biol. Chem.* **272**:19383-19392.
53. **Wang, D., F. Zheng, S. Holmberg, and G. B. Kohlhaw.** 1999. Yeast transcriptional regulator Leu3p. Self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J. Biol. Chem.* **274**:19017-19024.
54. **White, T. C.** 1997. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1482-1487.
55. **White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382-402.
56. **Wilcox, L. J., D. A. Balderes, B. Wharton, A. H. Tinkelenberg, G. Rao, and S. L. Sturley.** 2002. Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**:32466-32472.
57. **Wirsching, S., S. Michel, G. Kohler, and J. Morschhauser.** 2000. Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J. Bacteriol.* **182**:400-404.
58. **Wodicka, L., H. Dong, M. Mittmann, M. H. Ho, and D. J. Lockhart.** 1997. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* **15**:1359-1367.
59. **Znaidi, S., D. De, X. S. Weber, T. Rigby, A. Nantel, and M. Raymond.** 2007. The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates PDR16 expression in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **66**:440-452.

## V. Chapitre 5: Identification of the *Candida albicans*

### Cap1p regulon

Le contenu de ce chapitre a été publié dans la revue *Eukaryotic Cell* en 2009.

Des données supplémentaires électroniques de ce chapitre sont accessibles sur l'adresse :

<http://ec.asm.org/cgi/content/full/8/6/806/DC1>.

**Znaidi, S.**, Barker, K.S., Weber, S., Alarco, A.M., Liu, T.T., Boucher, G., Rogers, P.D. et Raymond, M. (2009). Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon. *Eukaryot. Cell.* 8:806-20.

Contribution des auteurs : L'estimation de ma contribution est de 55%. Barker, avec l'aide de Liu, a effectué les expériences de biopuces d'expression, a généré les données de PCR quantitative pour les expériences d'expression et a participé à la rédaction (25%). Weber a généré les allèles étiquetés de Cap1, a effectué les essais spots et le buvardage Western de la figure 1. Alarco a généré l'allèle *CAP1-CSE*. Boucher a effectué des analyses bioinformatiques et m'a aidé à visualiser les données sur le fureteur du génome. Al-abdin a effectué les buvardages Northern de la figure 4. J'ai écrit la majeure partie (85%) du contenu du manuscrit sous la supervision de ma directrice de recherche Martine Raymond.

**Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon**

Sadri Znaidi<sup>1</sup>, Katherine S. Barker<sup>2,3</sup>, Sandra Weber<sup>1</sup>, Anne-Marie Alarco<sup>1,‡</sup>, Teresa T. Liu<sup>2,3</sup>, Geneviève Boucher<sup>1</sup>, P. David Rogers<sup>2,3</sup> and Martine Raymond<sup>1,4\*</sup>

Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Quebec, Canada H3T 1J4<sup>1</sup>; Departments of Clinical Pharmacy, Pharmaceutical Sciences, Molecular Sciences, and Pediatrics, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, Tennessee, 38163<sup>2</sup>; Children's Foundation Research Center of Memphis, Le Bonheur Children's Medical Center, Memphis, Tennessee, 38103<sup>3</sup>; Department of Biochemistry, Université de Montréal, Quebec, Canada H3T 1J4<sup>4</sup>

\*Corresponding author. Mailing address: Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7. Phone: (514) 343-6746. Fax: (514) 343-6843.

---

‡Present address: Génome Québec, Montréal, Quebec, Canada H3B 1S6.

## V.1. Abstract

Cap1p, a transcription factor of the basic region-leucine zipper family, regulates oxidative stress response (OSR) in *Candida albicans*. Alteration of its C-terminal cysteine-rich domain (CRD) results in Cap1p nuclear retention and transcriptional activation. To better understand the function of Cap1p in *C. albicans*, we used genome-wide location profiling (ChIP-on-chip) to identify its transcriptional targets *in vivo*. A triple-hemagglutinin epitope was introduced at the C-terminus of wild-type Cap1p (Cap1p-HA<sub>3</sub>) or hyperactive Cap1p with an altered CRD (Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>). Location profiling using whole-genome oligonucleotide tiling microarrays identified 89 targets bound by Cap1p-HA<sub>3</sub> or Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> (binding ratio  $\geq 2$ -fold,  $P \leq 0.01$ ). Strikingly, Cap1p binding was not only detected at the promoter region of its target genes but also at their 3'-end and within their open-reading frame, suggesting that Cap1p may associate with the transcriptional or the chromatin remodeling machinery to exert its activity. Overrepresented functional groups of the Cap1p targets ( $P \leq 0.02$ ) included 11 genes involved in OSR (*CAP1*, *GLR1*, *TRX1*, *SOD1*, *CAT1*, others), 13 genes involved in response to drugs (*PDR16*, *MDR1*, *FLU1*, *YCF1*, *FCR1*, others), 4 genes involved in phospholipid transport (*PDR16*, *GIT1*, *RTA2*, orf19.932) and 3 genes involved in the regulation of nitrogen utilization (*GST3*, orf19.2693, orf19.3121), suggesting that Cap1p has other cellular functions in addition to OSR. Bioinformatic analyses of the bound sequences suggest that Cap1p recognizes the DNA motif 5'- MTKASTMA. Finally, transcriptome analyses showed that increased expression generally accompanies Cap1p binding at its targets, indicating that Cap1p functions as a transcriptional activator.



## V.2. Introduction

*Candida albicans* is an opportunistic human fungal pathogen that causes superficial infections in healthy patients. However, in patients with impaired immunity *C. albicans* can cause life-threatening invasive infections including systemic candidiasis or candidemia. In the United States, candidemia represents the fourth most common cause of nosocomial bloodstream infections (7). Several options in the treatment of invasive candidiasis are available to clinicians, including the administration of azole derivatives, amphotericin B preparations or the echinocandin antifungal agents; while for the treatment of mucocutaneous infections, azoles are preferred over other antifungals due to their low toxicity, increased efficacy and availability for both topical and oral use (21,50).

Azoles, including both imidazoles (e.g. ketoconazole, KCZ) and triazoles (e.g. fluconazole, FLC), inhibit the function of the lanosterol demethylase enzyme Erg11p, a component of the ergosterol biosynthesis pathway, leading to the accumulation of methylsterols, sterol depletion and consequently to growth arrest (1). This fungistatic property of azoles coupled to their repeated use in the clinic renders the surviving *C. albicans* cells prone to the selection of mutations conferring azole resistance. Clinical azole resistance in *Candida* spp. is a challenging problem for clinicians. Azole resistance develops particularly in HIV-infected patients with recurrent episodes of oropharyngeal or esophageal candidiasis (18). The molecular mechanisms of clinical azole resistance in *C. albicans* involve i) mutations in the target of azoles, Erg11p, resulting in altered drug binding and/or ii) the constitutive overexpression of genes responsible for the drug resistance phenotype: *CDR1* and *CDR2*, encoding ATP-binding cassette (ABC) transporters, *MDR1*, encoding a transporter of the major facilitator superfamily, *PDR16*, coding for a phospholipid transferase, and/or *ERG11* (1,40,46,55,56). Recent studies revealed the direct involvement in clinical azole resistance of gain-of-function mutations in genes encoding transcription factors of the fungal-specific zinc cluster family (42). It was

shown that activating mutations in the transcription factor Tac1p (Transcriptional activator of CDR genes) leads to the constitutive overexpression of its target genes *CDR1*, *CDR2* and *PDR16* in clinical isolates of *C. albicans* (15-17,38,70). Similarly, *MDR1* constitutive overexpression is due to gain-of-function mutations in the zinc cluster transcription factor Mrr1p (Multidrug resistance regulator) (19,47). Finally, an activating mutation in the transcription factor Upc2p (Uptake control) was shown to be responsible for clinical azole resistance and the upregulation of *ERG11* and, to a lesser extent, *MDR1* (20).

Genome-wide location and/or expression studies have shown that several targets of the transcription factors Tac1p, Upc2p and Mrr1p have established or predicted roles in oxidative stress response (OSR) (20,38,47,71), suggesting that multidrug resistance and OSR are interconnected processes in *C. albicans*. Studies of the OSR in *Saccharomyces cerevisiae* have shown that Yap1p, a basic region leucine-zipper (bZIP) transcription factor homologous to mammalian activating protein 1 (AP-1), is a key regulator of this process (27,48). Yap1p binds to Yap1 Recognition Elements (YRE), TTA(C/G)T(A/C)A, located in the promoter of its target genes (49) and controls the expression of genes encoding the majority of antioxidants and thiol-oxidoreductases such as the glutathione reductase *GLR1* or the thioredoxin reductase *TRR1* (27,48). Yap1p is also essential for the response to cadmium or drug exposures and can be activated by chemicals (e.g. diamide), antifungal agents (e.g. benomyl), ionizing radiation or toxic endogenous cellular metabolites (e.g. methylglyoxal) (2,27,43,45,48,49). Interestingly, Yap1p confers azole resistance in *S. cerevisiae* by activating the expression of *FLR1*, the functional homolog of *C. albicans* *MDR1* (2). Yap1p is activated by a mechanism acting on its nuclear export (33,34). In response to high levels of oxidants, Yap1p undergoes redox conformational changes caused by intramolecular bond formation between cysteine residues within the C-terminal cysteine-rich domain of the protein (CRD) (33,34). This prevents the interaction of Yap1p with the nuclear exportin Crm1p, leading to nuclear retention and transcriptional activation (27,35,48,67).

The *C. albicans* *CAP1* gene encodes the functional homolog of Yap1p and has been isolated based on its ability to confer azole resistance when expressed in *S. cerevisiae* (2,3,68). The mechanisms whereby Cap1p exerts its function are reminiscent of *S. cerevisiae* Yap1p, as a truncation of the Cap1p CRD (*CAP1-TR*) or mutagenesis of the third cysteine residue of the Cap1p CRD (*C477A CAP1*) results in enhanced resistance to toxic compounds including azoles, the heavy metal cadmium and the oxidative stress-inducing agent 4-nitroquinoline *N*-oxide (4-NQO) as well as Cap1p constitutive transcriptional activation and nuclear retention (3,68). Interestingly, the Cap1p-TR protein was shown to constitutively activate *MDR1* expression in azole-susceptible *C. albicans* cells, demonstrating that *MDR1* is a direct or indirect target of Cap1p (3). However, deleting *CAP1* in an azole-resistant strain overexpressing *MDR1* did not decrease *MDR1* RNA levels (3), indicating that another transcription factor is responsible for the constitutive overexpression of *MDR1* in that strain, possibly Mrr1p. In addition, Cap1p is involved in protecting *C. albicans* against the oxidative stress induced by neutrophils during the course of the immune response (13,24). The OSR in *C. albicans* involves oxidant sensing and response to oxidative damage via two major pathways that appear to act distinctly, namely the Cap1p pathway and the high osmolarity glycerol (HOG) mitogen-activated protein kinase (through a mechanism involving Ssk1p) pathway (13,22). These pathways respond differently to OSR in a concentration- and/or oxidant-dependant manner, reflecting a complex process. For instance, while *CAP1* is required for growth on both low and high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *HOG1* is only required for growth on high peroxide levels (22). Also, a *CAP1*-deficient strain appears to be more susceptible to cadmium but more resistant to menadione than a *HOG1*-deficient strain (4). Genome-wide expression and proteomics studies have shown that Cap1p regulates the expression of many genes involved in OSR as well as other metabolic pathways including energy metabolism and substance transport (3,36,63,64); however, it was not determined whether Cap1p regulates these genes directly. In this paper, we used genome-wide location and expression analyses to better characterize the Cap1p regulon as well as Cap1p function in *C. albicans*.

### V.3. Materials and Methods

**Strains and growth media.** The *C. albicans* strains used in this study are listed in Table 1. The pCaEXP integrants (Table 1) were grown in synthetic complete (SC) medium lacking uracil (SC-ura) (59), in SC medium lacking uracil, methionine and cysteine (SC-ura, met, cys) to induce the *MET3* promoter ( $P_{MET3}$ ) or in SC-ura supplemented with methionine (2.5 mM) and cysteine (2.5 mM) (SC-ura+met+cys) for  $P_{MET3}$ -repressing conditions. Strains CAI4 and its *cap1* $\Delta$  derivatives were grown in YPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, 1% dextrose) supplemented or not with the indicated drug. The *Escherichia coli* MC1061 strain was used for DNA cloning and maintenance of the plasmid constructs.

**TABLE 1.** Strains used in this study

Strain	Parental strain	Relevant genotype	Reference
SGY243 (parental)		<i>ade2/ade2 Δura3::ADE2/Δura3::ADE2</i>	31
SGY243-CaEXP-A	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub></i>	This study
SGY243-CaEXP-B	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub></i>	This study
SGY243-CaEXP-CAP1-HA-A	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub>-CAP1-HA<sub>3</sub> sequence</i>	This study
SGY243-CaEXP-CAP1-HA-B	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub>-CAP1-HA<sub>3</sub> sequence</i>	This study
SGY243-CaEXP-CAP1-CSE-HA-A	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub>-CAP1-CSE-HA<sub>3</sub> sequence</i>	This study
SGY243-CaEXP-CAP1-CSE-HA-B	SGY243	<i>RP10::(pCaEXP) URA3 P<sub>MET3</sub>-CAP1-CSE-HA<sub>3</sub> sequence</i>	This study
CAI4 (parental)		<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	23
CJD21/PMK	CJD21	<i>cap1Δ::hisG/cap1Δ::hisG::(pPMK)</i>	3
CJD21/PMK-CAP1	CJD21	<i>cap1Δ::hisG/cap1Δ::hisG::(pPMK) CAP1</i>	3
CJD21/PMK-CAP1-CSE	CJD21	<i>cap1Δ::hisG/cap1Δ::hisG::(pPMK) CAP1-CSE</i>	This study

**Generation of plasmids and Cap1p-expressing strains.** Plasmid PMK-CAP1-CSE was obtained by site directed mutagenesis of PMK-CAP1 (3), such that residues C477, S478 and E479 were replaced with alanine residues in the protein sequence of Cap1p. DNA fragments overlapping positions -36 to +1497 (relative to ATG translation start site) of the *C. albicans* *CAP1* gene and corresponding to the wild-type or the mutated (*CAP1-CSE*) allele of *CAP1* were PCR-amplified with *Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) from plasmids PMK-CAP1 or PMK-CAP1-CSE, respectively, using primers 5'-ATATGGATCCAACAACCATTTTCAACTATCC (introduces a *Bam*HI



**Total protein preparation and Western blotting.** Total protein extracts were prepared as described for *S. cerevisiae* (54), from 2 O.D. units of two independent strains expressing *CAP1-HA<sub>3</sub>* (SGY243-CaEXP-CAP1-HA clones A and B) or *CAP1-CSE-HA<sub>3</sub>* (SGY243-CAP1-CSE-HA clones A and B) (Table 1) grown overnight in SC-ura-met-cys ( $P_{MET3}$ -inducing conditions) or in SC-ura supplemented with 2.5 mM methionine and 2.5 mM cysteine (SC-ura+met+cys,  $P_{MET3}$ -repressing conditions). Extracts were boiled for 1 min, and 25  $\mu$ l out of 100  $\mu$ l total extracts were separated by electrophoresis on an SDS–10% polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane with a Trans Blot SD Semi-Dry transfer apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) and the membrane incubated with a mouse anti-HA monoclonal antibody (12CA5, Roche) at a dilution of 1:1000 followed by incubation with rabbit anti-mouse immunoglobulin G antibodies coupled to alkaline phosphatase (Bio-Rad). The membrane was then developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate *p*-toluidine salt and nitroblue tetrazolium chloride substrates, as recommended by the manufacturer (Bio-Rad).

**Chromatin immunoprecipitation-on-chip (ChIP-chip) and data analysis.**

Three independent cultures (50 ml each) of strains SGY243-CaEXP-A (untagged, control strain) and SGY243-CAP1-HA-A or SGY243-CAP1-CSE-HA-A (tagged strains) (Table 1) were grown overnight in SC-ura+met+cys, diluted to an  $OD_{600}$  of 0.005 in SC-ura-met-cys (to induce  $P_{MET3}$ ) and grown until  $OD_{600}$  reached 1.0. The subsequent steps of DNA crosslinking, DNA shearing, ChIPs, DNA labeling with the Cy dyes, hybridizations to intergenic DNA microarrays and data analyses were conducted exactly as described in Liu *et al.* (38). Both pools of labeled DNA from the tagged strain (SGY243-CAP1-HA-A or SGY243-CAP1-CSE-HA-A, Cy5-labeled) and the corresponding untagged control strain (SGY243-CaEXP-A, Cy3-labeled) were mixed and hybridized to a *C. albicans* whole-genome tiled-oligonucleotide DNA microarray described elsewhere (61). Hybridization was performed as recommended by the manufacturer (NimbleGen<sup>®</sup> systems, Inc). Scanning of the slides ( $n = 3$ ) was performed using a GenePix 4000B scanner (Molecular Devices).

Scanned images were pre-processed using the NimbleScan™ software (version 2.4, NimbleGen® systems, Inc). General Feature Format (GFF) reports were created for the Cy5 (tagged strain) or Cy3 (untagged control strain) intensity signals from each independent replicate, then imported into the TileScope program (<http://tilescope.gersteinlab.org:8080/mosaic/pipeline.html>) (69). Quantile normalization was applied to the data (69). The parameters used were as follows: window size of 400 bp, MaxGap of 60 bp and MinRun of 120 bp. The replicate data were combined and peak-finding (i.e. Cap1p-binding sites) was determined using the following criteria: pseudo-median signal threshold of  $\geq 2$ -fold and p-value cut-off of  $\leq 0.01$  (69). Complete dataset for each experiment is available at the Gene Expression Omnibus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>) under series number GSE15104.

**Quantitative real-time PCR for confirmation of the ChIP-chip data.** Q-PCR was performed with three independent SGY243-CaEXP-A and SGY243-CAP1-HA-A or SGY243-CAP1-CSE-HA-A ChIP samples prepared as described above. Quantification of the recovered DNA was performed using the Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Molecular Probes: Invitrogen) as previously described (38). The DNA concentration ranged from 0.08 ng/μl to 0.60 ng/μl for the tagged strains and 0.61 ng/μl to 1.22 ng/μl for the untagged strains. Q-PCR assays were conducted using the Universal ProbeLibrary (Roche Applied Science) or the TaqMan (Integrated DNA Technologies, IDT) methodologies (38). The different primers and probe combinations used for Q-PCR are listed in Table 2. Optimal specific primer sequences and probes for the *CIP1*, *IFR1* (targets), *FUR1* (control for statistical analyses by *t* test) and *SPS4* (orf19.7568, reference for normalization) promoters were obtained using the Universal ProbeLibrary web-based ProbeFinder software (version 2.34, Roche Applied Sciences) available on the Roche Applied Science website ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)) as previously described (38). Design of the TaqMan probe and specific forward and reverse primers for the *MDR1* target promoter have been described previously (71). Q-PCR reaction mixtures, Q-PCR conditions and data analyses were performed as described previously (71). Statistical

significance was determined using Welsh's two-sample  $t$  test. The statistical significance threshold was set at  $\alpha=0.05$ .



**TABLE 2.** Primers used for quantitative real-time PCR binding assays

Promoter	Primers/probe sequences <sup>a</sup> (5'-3')	Amplicon location <sup>b</sup>
<i>MDR1</i>	F: GGCGGATTACTCCTGATACA ACTC R: GCGACGGGCTGTTGAGTAAA CTAT P <sup>c</sup> : AGCTCGTTTAGTTGTTCCCATT CGCA	-580 → -401
<i>CIP1</i>	F: CCAATACAATTTAGTAAGCAGA AACA R: TTTCATAACAAATCAATAACAA CAACC P <sup>d</sup> : CAGCCACA	-583 → -457
<i>IFR1</i>	F: CGTTTATTCAATAGGATTGAG AAGG R: AATGGTGGGCAAGTATCAAAAC P <sup>e</sup> : TTCCACCA	-127 → -50
<i>FUR1</i>	F: GGTGCTTTTGGGAGAATGAA R: CTTCTCAAAAACAAAAGTCAA P <sup>f</sup> : GCTGCCTG	-987 → -913
<i>SPS4<sup>g</sup></i>	F: TACAGTTGCCCCAGTCAACA R: TGTCTTGGAACGGAAACTCA P <sup>h</sup> : TCCTGCTC	-636 → -574

<sup>a</sup> F, forward; R, reverse; P, probe.

<sup>b</sup> Position according to the ATG start codon.

<sup>c</sup> TaqMan probe (Integrated DNA Technologies).

<sup>d</sup> Probe no. 5 from Universal ProbeLibrary (catalogue no. 04685024001; Roche).

<sup>e</sup> Probe no. 31 from Universal ProbeLibrary (catalogue no. 04687647001).

<sup>f</sup> Probe no. 27 from Universal ProbeLibrary (catalogue no. 04687582001).

<sup>g</sup> *orf19.7568*.

<sup>h</sup> Probe no. 15 from Universal ProbeLibrary (catalogue no. 04685148001).

**Bioinformatic analyses.** Visualization of the ChIP-chip results was conducted using a custom-designed *C. albicans* genome browser, representing the original assembly 19 of the *C. albicans* genome as described in the *Candida* Genome Database (CGD, <http://www.candidagenome.org/cgi-bin/gbrowse/candida/>). To group the over-represented functional categories of Cap1p targets (Table 2), 152 hits out of the 306 Cap1p-HA<sub>3</sub>- or Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>-bound targets were removed from the analysis as they were not clearly associated with specific ORFs (see Results for details). The *orf19* nomenclatures of the genes were then used as input for functional grouping using the CGD GO Term Finder tool (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>). The three Ontologies: “Biological Process”, “Molecular Function” and “Cellular Component” were selected. GO

Term Finder calculates a p-value for the over-represented GO terms (relative to the 6334 annotated *C. albicans* genes), using a hypergeometric distribution with Multiple Hypothesis Correction (<http://www.candidagenome.org/help/goTermFinder.html>). If some GO terms contained overlapping gene lists, the GO term with the largest number of genes was selected. The p-value cutoff was  $P \leq 0.02$ . For Motif discovery analyses, DNA sequences covered by the 189 or 117 peaks identified in Cap1p-HA<sub>3</sub>- or Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>-binding data, respectively, were extracted and used as input for motif discovery using the Suite for Computational identification Of Promoter Elements (SCOPE) program (<http://genie.dartmouth.edu/scope/>) (10,12). This program allows accurate determination of potential transcription factor binding sites in a set of sequences using three different motif discovery algorithms (10,12). To search for the TTASTAA motif within Cap1p-bound sequences, the same sequences analyzed with the SCOPE program were used as input for the DNA-pattern matching “TTASTAA” using the Regulatory Sequence Analysis (RSA) tool Pattern matching tool (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>). As a control, up to 1.0 kb of promoter sequences upstream of the ATG translation start site of the 6093 promoters of the *C. albicans* ORFs were retrieved from the RSA Tools database (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>). To search for the MTKASTMA sequence (where M designates A or C, K designates G or T and S designates C or G) within the promoter region of the genes modulated in CJD21/PMK-CAP1-CSE versus CJD/PMK-CAP1 (Table 5), up to 1.0 kb of promoter sequence upstream of the ATG translation start site of each gene was retrieved from the Assembly 21 genome sequence, such that overlap with neighbouring ORFs was prevented, and used as input for the DNA-pattern matching “MTKASTMA” using the RSA tool Pattern matching tool.

**RNA isolation.** Strains were grown overnight in 10 ml YPD at 30°C. The next day, an aliquot of the overnight culture was used to inoculate 200 ml YPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, 1% dextrose) to a starting optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.2. This culture was grown for 3 hours as before, cells were collected by centrifugation, and cell pellets were immediately frozen and stored at -80°C until RNA isolation. Benomyl-

exposed cultures were treated with 25 µg/ml benomyl (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) for 30 minutes before cells were harvested. Three independently-obtained sets of cell cultures were used. RNA was isolated from frozen cell pellets using the hot phenol method (57). Briefly, cells were resuspended in 12 ml AE buffer (50 mM sodium acetate pH 5.2, 10 mM EDTA) at room temperature after which 800 µl 25% SDS and 12 ml acid phenol (Fisher Scientific; Houston, TX) were added. The cell lysate was then incubated 10 minutes at 65°C with vigorous shaking each minute, cooled on ice 5 minutes, and subjected to centrifugation for 15 minutes at 11,952 x g. Supernatants were transferred to new tubes containing 15 ml chloroform, mixed, and subjected to centrifugation at 200 x g for 10 minutes. RNA was precipitated from the resulting aqueous layer by mixing that portion in new tubes with one volume of isopropanol and 0.1 volume of 2 M sodium acetate pH 5.0 and subjecting the mixture to centrifugation at 17,211 x g for 35 minutes at 4°C. The supernatants were removed, the pellet was resuspended in 10 ml 70% ethanol, and the RNA collected by centrifugation at 17,211 x g for 20 minutes at 4°C. Supernatants were again removed, and RNA was resuspended in 50–200 µl DEPC-treated water. RNA was stored at -80°C until needed.

**cRNA synthesis and microarray hybridization.** Immediately prior to cDNA and subsequent cRNA synthesis, the purity and concentration of RNA samples were determined from  $A_{260}/A_{280}$  readings and RNA integrity was determined by capillary electrophoresis using the RNA 6000 Nano Laboratory-on-a-Chip kit and Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) as per the manufacturer's instructions. First and second strand cDNA was synthesized from 15 µg total RNA using the SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) and oligo-dT24-T7 primer (PrOligo) according to the manufacturer's instructions. cRNA was synthesized and labelled with biotinylated UTP and CTP by *in vitro* transcription using the T7 promoter-coupled double stranded cDNA as template and the Bioarray HighYield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics). Double-stranded cDNA synthesized from the previous steps was washed twice with 70% ethanol

and suspended in 22  $\mu$ l of RNase-free water. The cDNA was incubated as recommended with reaction buffer, biotin-labeled ribonucleotides, dithiothreitol, RNase inhibitor mix, and T7 RNA polymerase for 5 h at 37°C. The labeled cRNA was separated from unincorporated ribonucleotides with a CHROMA SPIN-100 column (Clontech) and ethanol precipitated at –20°C overnight.

The cRNA pellet was suspended in 10  $\mu$ l of RNase-free water and 10  $\mu$ g was fragmented at 95°C for 35 min in 200 mM Tris-acetate (pH 8.1), 500 mM potassium acetate, 150 mM magnesium acetate. The fragmented cRNA was hybridized for 16h at 45°C to either *C. albicans* Affymetrix GeneChip arrays (CAN04a530004N; manufactured by NimbleExpress) or to an Affymetrix custom expression array (CAN07, 49-5241 array format with 11- $\mu$ m features) for *C. albicans*. Arrays were washed at 25°C with 6  $\times$  SSPE, 0.01% Tween 20 followed by a stringent wash at 50°C with 100 mM MES, 0.1 M NaCl, 0.01% Tween 20. Hybridizations and washes employed the Affymetrix Fluidics Station 450 using their standard EukGE-WS2v5 protocol. The arrays were then stained with phycoerythrin-conjugated streptavidin (Molecular Probes) and the fluorescence intensities were determined using the GCS 3000 high-resolution confocal laser scanner (Affymetrix). The scanned images were analyzed using software resident in GeneChip Operating System v2.0 (GCOS; Affymetrix). Sample loading and variations in staining were standardized by scaling the average of the fluorescent intensities of all genes on an array to a constant target intensity of 250. The signal intensity for each gene was calculated as the average intensity difference, represented by  $[\Sigma(\text{PM} - \text{MM})/(\text{number of probe pairs})]$ , where PM and MM denote perfect-match and mismatch probes, respectively.

**Gene expression microarray data analysis.** The scaled gene expression values from GCOS software were imported into GeneSpring 7.2 software (Agilent Technologies) for preprocessing and data analysis. Probesets were deleted from subsequent analysis if they were called absent by the Affymetrix criterion and displayed an absolute value below 20 in all experiments. The expression value of each gene was normalized to the median

expression of all genes in each chip as well as the median expression for that gene across all chips in the study. Pairwise comparison of gene expression was performed for each matched experiment. Microarray data can be found at the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>) under series number GSE14258.

**Quantitative real-time PCR for expression data.** Real-time PCR was performed in follow-up experiments to validate the microarray results. First-strand cDNAs were synthesized from 2  $\mu$ g of total RNA in a 21- $\mu$ l reaction volume using the SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCRs were performed in triplicate using the 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Independent PCRs were performed using the same cDNA for both the gene of interest and the 18S rRNA, using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Gene-specific primers were designed for the gene of interest and the 18S rRNA using Primer Express software (Applied Biosystems) and the Oligo Analysis & Plotting Tool (QIAGEN, Valencia, CA) and are shown in Table 3. The PCR conditions consisted of AmpliTaq Gold activation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. A dissociation curve was generated at the end of each PCR cycle to verify that a single product was amplified using software provided with the 7000 Sequence Detection System. The change in fluorescence of SYBR Green I dye in every cycle was monitored by the system software, and the threshold cycle ( $C_T$ ) above the background for each reaction was calculated. The  $C_T$  value of 18S rRNA was subtracted from that of the gene of interest to obtain a  $\Delta C_T$  value. The  $\Delta C_T$  value of an arbitrary calibrator (e.g., untreated sample) was subtracted from the  $\Delta C_T$  value of each sample to obtain a  $\Delta\Delta C_T$  value. The gene expression level relative to the calibrator was expressed as  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Statistical analysis was performed using R software (www.r-project.org version 2.5.0). Relative fold changes were compared using a two-sample t-test. The statistical significance threshold was set at  $\alpha=0.05$ .

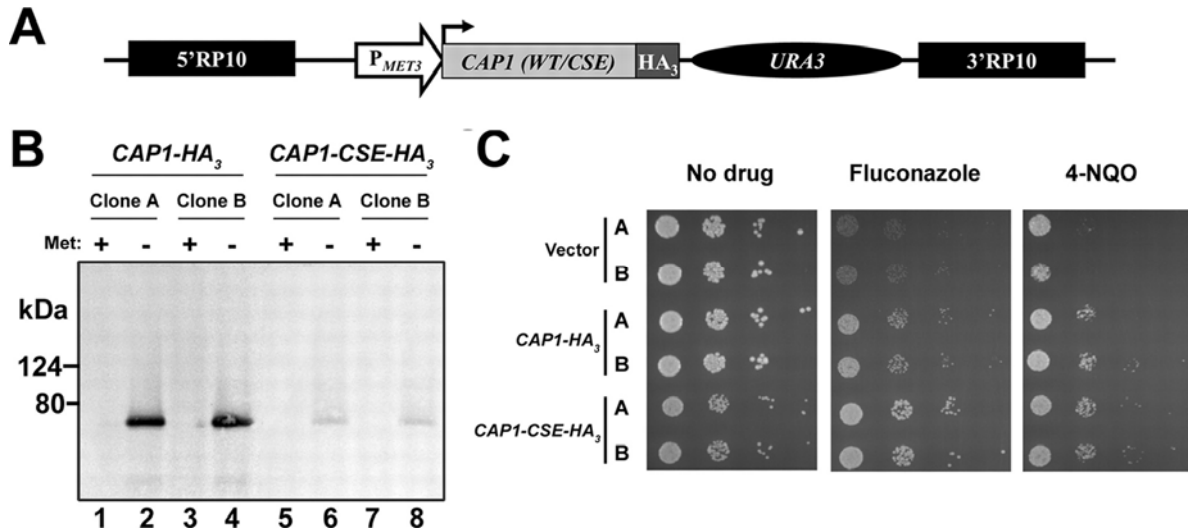
**TABLE 3.** Primers used for quantitative real-time PCR expression analysis

Gene	Primer pair <sup>a</sup>	Amplicon size (bp)
<i>18S</i>	F: 5'-CACGACGGAGTTTCACAAGA-3' R: 5'-CGATGGAAGTTTGAGGCAAT-3'	135
<i>MDR1</i>	F: 5'-ACATAAATACTTTGCCCATCCAGAA-3' R: 5'-AAGAGTTGGTTTGTAATCGGCTAA-3'	82
<i>GLRI</i>	F: 5'-ATCAACAACAACACTATGGCTCCAAC-3' R: 5'-CAGATCCACCACCAATGACTAAATA-3'	51

<sup>a</sup> F, forward; R, reverse.

## V.4. Results

**Epitope-tagging of Cap1p.** To immunoprecipitate Cap1p, we fused it to a C-terminal triple-hemagglutinin epitope (HA<sub>3</sub>) using the pCaEXP expression system (Fig. 1A, see Materials and Methods). Cap1p-HA<sub>3</sub> expression is driven by the *MET3* promoter, which is induced in the absence of methionine and repressed in its presence (9). To test the function of a constitutively activated Cap1p, we also constructed a *C. albicans* strain expressing an HA<sub>3</sub>-tagged Cap1p carrying the amino acid substitutions C477A, S478A and E479A (*CAP1-CSE-HA<sub>3</sub>* allele) (Fig. 1A, see Materials and Methods). These substitutions are equivalent to those introduced in *S. cerevisiae* Yap1p (C629A, S630A and E631A, respectively), leading to a constitutively activated Yap1p protein (65). Immunoblotting showed that, under inducing conditions, the tagged wild-type Cap1p protein was readily detectable whereas much lower levels of the Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> protein were detected (Fig. 1B). It therefore seems that mutation of the CSE mutation is accompanied by a decrease in protein stability, as previously observed for the *CAP1-TR* allele (3). The strains were also characterized phenotypically by spot assay on P<sub>MET3</sub>-inducing media containing the azole antifungal agent FLC or the oxidative stress-inducing agent 4-NQO (Fig. 1C). This experiment showed that overexpression of the *CAP1-HA<sub>3</sub>* or *CAP1-CSE-HA<sub>3</sub>* allele conferred resistance to FLC and 4-NQO, with the *CAP1-CSE-HA<sub>3</sub>* allele conferring slightly higher resistance to FLC than the *CAP1-HA<sub>3</sub>* allele (Fig. 1C). Taken together, these results showed that both proteins were properly tagged and functional and that the CSE mutation in *CAP1-CSE-HA<sub>3</sub>* functions as a gain-of-function mutation.

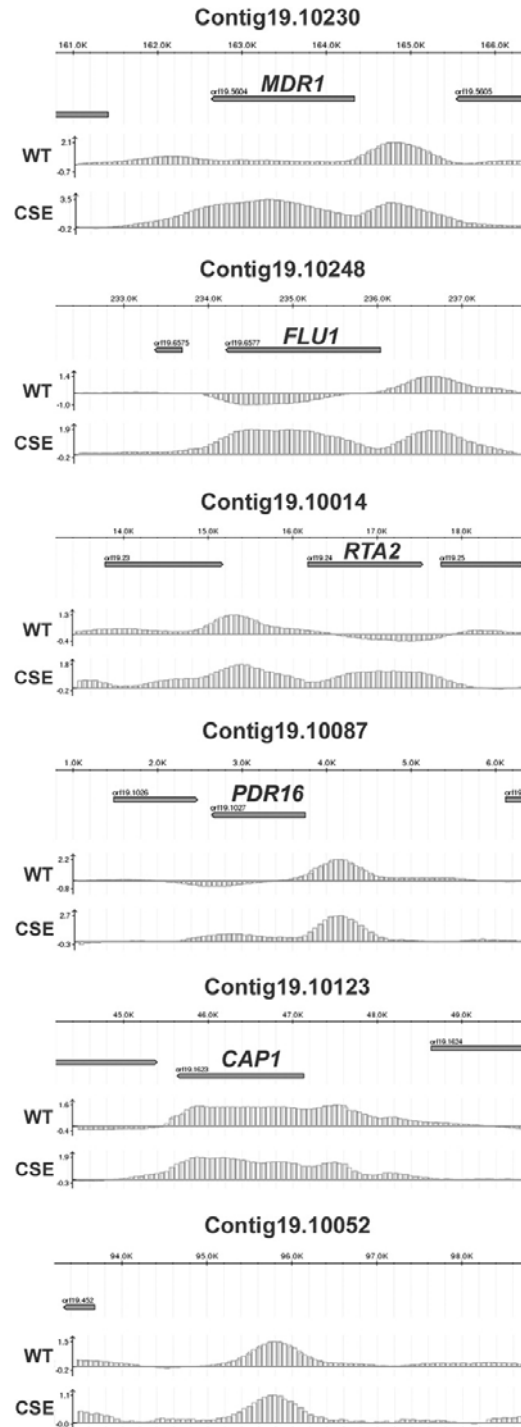


**FIGURE 1.** Strategy for tagging Cap1p with a triple-HA epitope and characterization of the tagged strains. (A) Schematic representation of the *CAP1*-tagging cassette. The wild-type or the mutated version of the *CAP1* gene (*CAP1* (WT/CSE), light grey box), cloned as an in-frame fusion with a triple-hemagglutinin tag (HA<sub>3</sub>, dark grey box) in plasmid pCaEXP (9), is under the control of the *MET3* promoter (P<sub>MET3</sub>, open arrow) and is followed by the *C. albicans* *URA3* marker (black oval). The 5' and 3' fragments of the *RP10* gene (5'RP10; 3'RP10, black boxes) are flanking the cassette and allow targeted integration at the *RP10* locus (9). (B) Western blot analysis of strains expressing HA<sub>3</sub>-tagged versions of the *CAP1* gene (*CAP1*-HA<sub>3</sub> or *CAP1*-CSE-HA<sub>3</sub>). Total proteins were extracted from two independent clones of the SGY243 transformants (A and B) grown in the absence (-) or in the presence (+) of 2.5 mM methionine (Met). Western blots were performed using the anti-HA antibody 12CA5. The positions of the molecular mass standards are indicated on the left (kDa). (C) Drug resistance profiles of *C. albicans* strains expressing HA<sub>3</sub>-tagged *CAP1* alleles. Two independent transformants (A, B) for each of the *CAP1*-HA<sub>3</sub>- or *CAP1*-CSE-HA<sub>3</sub>-expressing strains or the strain carrying the empty vector as negative control (vector), were analysed by spot assay for their ability to grow on SC-ura-met plates in the absence or the presence of 2 µg/ml of fluconazole or 1.5 µM of 4-nitroquinoline *N*-oxide. The plates were incubated for two days at 30°C.

**Identification of Cap1p binding sites *in vivo*.** We performed genome-wide location profiling (ChIP-chip) of Cap1p-HA<sub>3</sub> or Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> using *C. albicans* whole-genome oligonucleotide tiling microarrays (61) (see Materials and Methods). We identified 189 and 117 hits (i.e. peaks) for Cap1p-HA<sub>3</sub> and Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>, respectively (log<sub>2</sub>-transformed pseudo-median signal intensity cutoff of  $\geq 1$ ,  $P \leq 0.01$ ) (Tables S1 and S2; the complete binding dataset is found at the GEO database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/> under series number GSE15104).



We visualized the ChIP-chip data using a *C. albicans* genome browser, representing the entire assembly 19 (see Materials and Methods). We found that a high proportion of Cap1p-binding peaks clearly associated with ORFs, totaling 89 target genes for Cap1p-HA<sub>3</sub> or Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> (60 of the 89 genes were common to both proteins; 23 additional genes were specific to Cap1p-HA<sub>3</sub> while 6 additional genes were specific to Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>) (Tables S1 and S2, Fig. 2). In some cases, more than one peak associated with one ORF, while in one occurrence one peak associated with two ORFs (orf19.3121 and orf19.3122) (Tables S1 and S2). Interestingly, we also found that 101 Cap1p-HA<sub>3</sub>-binding peaks and 35-Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>-binding peaks did not clearly associate with defined ORFs, including peaks that were located in intergenic regions (see bottom panel in Fig. 2 for an example), suggesting that these regions may encode unidentified ORFs or small RNAs. Strikingly, Cap1p binding was not only detected at the promoter region of its target genes but also at their 3'-end and within their open-reading frame (Fig. 2). This surprising binding profile could be explained by the association of Cap1p with chromatin-associated proteins and/or the transcriptional machinery (see Discussion). Finally, it is noteworthy that Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> signal was often increased relative to that of Cap1p-HA<sub>3</sub> at common targets (Tables S1 and S2, Fig. 2).



**FIGURE 2.** Cap1p-binding at selected *C. albicans* genomic regions. Plotted are the normalized  $\log_2$ -transformed signal intensities (lower graphs of each panel) of HA<sub>3</sub>-tagged wild-type (WT)- or hyperactive (CSE)-Cap1p binding (y-axis) versus the corresponding position of each signal (x-axis) in selected *C. albicans* genomic regions from assembly 19 (the corresponding contig19 number is indicated at the top of each panel).

Log<sub>2</sub>-transformed signal intensity values are indicated at the left of the y-axis. The y-axis intercept is the value 0 (i.e. binding ratio = 1). Location of each selected region from the corresponding contig19 is shown on the scaled upper axis of each panel (K, kilobases). The spacing is 1.0 kb between each major graduation and 0.2 kb between each minor graduation. The orientation of each open reading frame is depicted by the arrowed grey rectangle. Negative enrichment values in the *FLUI*, *RTA2* and *PDR16* panels may be due to background noise, preferential amplification or normalization biases inherent to the ChIP-chip technology (6,51).

We used the Gene Ontology Term Finder tool from the Candida Genome Database (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>) to identify functional groupings among the 89 Cap1p-HA<sub>3</sub>- or Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>-target genes that were significantly over-represented relative to the annotated *C. albicans* genome (Table V-4, see Materials and Methods). As expected, Cap1p binding was significantly enriched at the loci of target genes involved or predicted to be involved in oxidative stress response, including *CIP1*, orf19.2262, *CCPI*, *SOD1*, orf19.3537, *GLRI*, *GCSI*, *MDR1*, *CAT1* and *TRX1*, grouped into the functional category “Response to oxidative stress” which was among the most over-represented categories of the GO terms identified ( $P = 4.1 \times 10^{-6}$ ). In line with this finding, the functional grouping “Oxidoreductase activity” was also among the over-represented GO terms ( $P = 1.1 \times 10^{-6}$ ) including 19 genes, such as the superoxide dismutase-encoding gene *SOD1*, the predicted old yellow enzyme-family members-encoding genes *OYE2*, *OYE23* and *OYE32* or the peroxidase-encoding genes *CAT1* and *CCPI*. Genes grouped into the GO term “Response to chemical stimulus”, the most over-represented functional category ( $P = 5.0 \times 10^{-9}$ ), were also found in the parent over-represented category “Response to stimulus” ( $P = 5.9 \times 10^{-6}$ ) in addition to 4 genes involved or predicted to be involved in oxidative stress response (*GRE2* and orf19.6757), transcriptional regulation of morphogenesis (*EFG1*) and response to DNA damage (*YIMI*). Interestingly, Cap1p also bound to genes previously shown to be involved in azole resistance including *PDR16* (55), *RTA2* (29), *MDR1* (66) and *FLUI* (8) grouped into the over-represented functional category “Response to drug” ( $P = 2.0 \times 10^{-6}$ ) (Fig. 2). Other over-represented functional categories include “Hyphal cell wall”, “Response to cadmium ion”, “Phospholipid transport” and “Regulation of nitrogen utilization”.

**TABLE 4.** Over-represented functional categories in Cap1p ChIP-chip data ( $P \leq 0.02$ )

GO term <sup>a</sup>	CGD accession no. (ontology classification) <sup>b</sup>	% Frequency <sup>c</sup> (no. of genes)	% Genome frequency <sup>d</sup> (no. of genes)	<i>P</i> value <sup>e</sup>	Genes <sup>f</sup>
Response to chemical stimulus <sup>g</sup>	GO:0042221 (P)	27 (24)	5.4 (342)	$5.0 \times 10^{-09}$	<i>PDR16, SSA2, CIP1, CAPI, orf19.2262, CCPI, RTA2, SOD1, RIB1, orf19.3537, SHA3, GLR1, GCSI, CDR4, HXK2, RHR2, MDR1, CAT1, CYS3, YCF1, FLU1, FCRI, ALS6, TRX1</i>
Oxidoreductase activity	GO:0016491 (F)	21.3 (19)	4.6 (293)	$1.1 \times 10^{-06}$	<i>IFD6, EBPI, RNR22, orf19.2262, CCPI, SOD1, OYE32, GRE2, orf19.3234, OYE23, OYE2, orf19.3537, ADHI, GLR1, GRP2, ERO1, orf19.5517, CAT1, orf19.6757</i>
Response to oxidative stress	GO:0006979 (P)	12.4 (11)	1.3 (84)	$4.1 \times 10^{-06}$	<i>CIP1, CAPI, orf19.2262, CCPI, SOD1, orf19.3537, GLR1, GCSI, MDR1, CAT1, TRX1</i>
Response to stimulus <sup>g</sup>	GO:0050896 (P)	31.5 (28)	10.2 (647)	$5.9 \times 10^{-06}$	<i>PDR16, SSA2, CIP1, CAPI, orf19.2262, CCPI, RTA2, SOD1, RIB1, GRE2, orf19.3537, SHA3, GLR1, GCSI, CDR4, HXK2, RHR2, MDR1, EFG1, CAT1, CYS3, YCF1, FLU1, orf19.6757, FCRI, ALS6, TRX1, YIM1</i>
Response to drug	GO:0042493 (P)	14.6 (13)	2.3 (145)	$2.0 \times 10^{-05}$	<i>PDR16, CAPI, RTA2, SOD1, RIB1, GCSI, CDR4, RHR2, MDR1, CYS3, YCF1, FLU1, FCRI</i>
Cell fraction	GO:000267 (C)	15.7 (14)	3.3 (212)	$6.5 \times 10^{-05}$	<i>PDR16, SSA2, EBPI, orf19.251, orf19.2693, PDC11, orf19.3121, PGII, ADHI, GRP2, RHR2, orf19.5517, CCC1, GST3</i>
Hyphal cell wall	GO:0030446 (C)	5.6 (5)	0.6 (35)	$6.2 \times 10^{-03}$	<i>SSA2, EBPI, orf19.251, PDC11, ADHI</i>
Response to cadmium ion	GO:0046686 (P)	3.4 (3)	0.1 (6)	$1.2 \times 10^{-02}$	<i>CIP1, CAPI, GCSI</i>
Phospholipid transport	GO:0015914 (P)	4.5 (4)	0.3 (17)	$1.7 \times 10^{-02}$	<i>PDR16, GIT1, RTA2, orf19.932</i>
Regulation of nitrogen utilization	GO:0006808 (P)	3.4 (3)	0.1 (7)	$2.0 \times 10^{-02}$	<i>orf19.2693, orf19.3121, GST3</i>

<sup>a</sup> Grouping of the Cap1p (Cap1p-HA<sub>3</sub> or Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>) targets identified in ChIP-chip data according to GO terminology determined by using the online CGD GO Term Finder tool (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>). Analysis conducted in September 2008.

<sup>b</sup> Ontology classification: P, biological process; C, cellular component; F, molecular function.

<sup>c</sup> Percentages were calculated based on the number of genes in each GO category divided by the total number (89 genes).

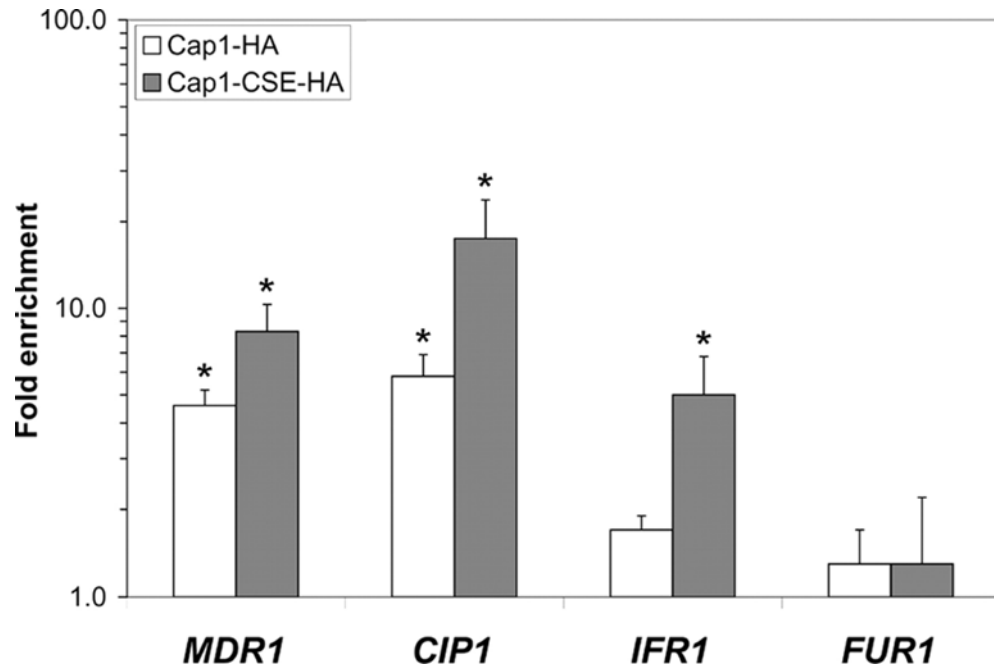
<sup>d</sup> Percentages were calculated based on the number of genes in each category divided by the total number of annotated genes of the *C. albicans* genome, according to CGD (6,334 genes).

<sup>e</sup> *P* values for the overrepresented categories were calculated using a hypergeometric distribution with multiple hypothesis correction (i.e., Bonferroni's correction) as described in the GO Term Finder tool website (<http://www.candidagenome.org/help/goTermFinder.shtml>). The *P* value cutoff used was  $\leq 0.02$ .

<sup>f</sup> Gene name or orf19 nomenclature according to CGD. Some genes were attributed to more than one GO term.

<sup>g</sup> The selection criteria for GO term groups with overlapping gene lists (see Materials and Methods for details) was not applied to these two groups, in order to show that "Response to chemical stimulus" was the most significantly overrepresented functional category.

Using quantitative real-time PCR, we confirmed the binding of Cap1p to the *MDR1*, *CIP1* and *IFR1* promoters, with enrichment ratios ( $\pm$  standard deviations) of  $4.6 \pm 0.6$ ,  $5.8 \pm 1.1$  and  $1.7 \pm 0.2$ , respectively, for Cap1p-HA<sub>3</sub> binding and  $8.3 \pm 2.0$ ,  $17.4 \pm 6.4$  and  $5.0 \pm 1.8$ , respectively, for Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> binding (Fig. 3). As a control, we investigated binding of Cap1p to the promoter of the *FUR1* gene, which was not enriched in the ChIP-chip experiments and found no significant enrichment of that promoter by Q-PCR ( $1.3 \pm 0.4$  for Cap1p-HA<sub>3</sub> and  $1.3 \pm 0.9$  for Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>) (Fig. 3), confirming the validity of the data obtained in the ChIP-chip experiments.



**FIGURE 3.** Quantification of the *in vivo* enrichment of Cap1p-HA<sub>3</sub> (Cap1-HA) and Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> (Cap1-CSE-HA) binding at the *MDR1*, *CIP1*, *IFR1* and *FUR1* targets using Q-PCR. SGY243-CaEXP-A (untagged, control strain) and SGY243-CAP1-HA-A or SGY243-CAP1-CSE-HA-A (tagged strains) were submitted to chromatin immunoprecipitation (three biological replicates) and the recovered DNA samples analyzed by Q-PCR, using Universal ProbeLibrary probes (Roche Diagnostics) for the *CIP1*, *IFR1*, *FUR1* and *SPS4* (reference for normalization) targets and a TaqMan probe for the *MDR1* target. Fold enrichments (n-fold) are presented in logarithmic scale. Error bars denote standard deviations. Asterisks denote statistical significance using Welch's two-sample *t* test ( $P \leq 0.05$ ).

**Identification of potential Cap1p binding motifs.** Recent studies in *C. albicans* have characterized the *cis*-acting elements controlling *MDR1* expression upon treatment with the antifungal agent benomyl or the oxidative stress inducer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and suggested that YRE-like sequences found in the promoter of *MDR1* were responsible for its induction upon treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (26,28,53). Furthermore, it was shown that an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-response element (HRE), including two YRE-like sequences, TTASTAA, located between positions -561 and -520 relative to the ATG translation start site of *MDR1* were required for this induction in a Cap1p-dependent manner (53). These data suggested that Cap1p binds to the promoter regions of its target genes via this YRE-like element. Our data show that Cap1p-HA<sub>3</sub>-binding peak reached its maximal intensity within a region encompassing roughly

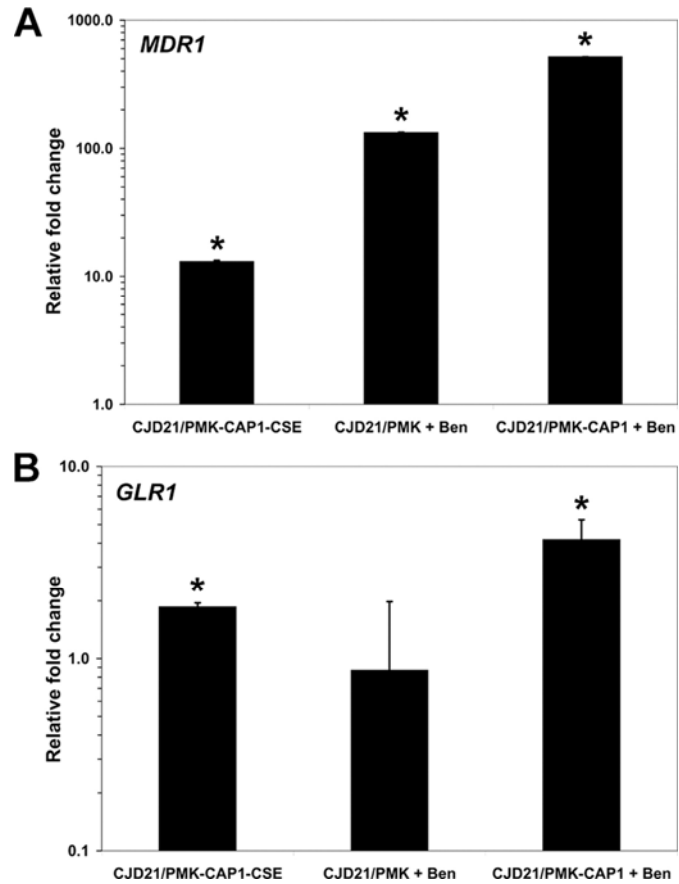
positions -250 to -600 of the *MDR1* promoter (Fig. 2, Table S1), consistent with published observations (53). To determine if the TTASTAA motif was significantly enriched in our ChIP-chip data, we looked at its occurrence in the 189 Cap1p-HA<sub>3</sub>- or the 117 Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>-bound sequences (see Materials and Methods) and identified a total of 93 and 61 TTASTAA-containing sequences, respectively. As a control, we searched for the TTASTAA motif in the promoter regions from the 6,093 ORFs of the *C. albicans* genome, using up to 1000 bp of promoter sequence upstream of the ATG translation start site of each ORF, and found an average of 49 (per 189) and 30 (per 117) promoters containing this motif yielding 1.9- and 2.0-fold enrichments for the presence of TTASTAA in Cap1p-HA<sub>3</sub> and Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> targets, respectively. The fact that 96 (out of 189) and 56 (out of 117) sequences do not contain the TTASTAA motif suggested that Cap1p might recognize different sequence motifs. We thus conducted a motif search using the SCOPE program (<http://genie.dartmouth.edu/scope/>), which allows the accurate detection of conserved putative transcription factor binding sites among a given set of promoter sequences using three independent motif discovery algorithms (10,12) (see Materials and Methods). This analysis identified the MTKASTMA motif (Fig. 4), which includes the palindrome sequence TKASTMA, in both the Cap1p-HA<sub>3</sub> (significance value of 340.6, 66.1% coverage) and Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> (significance value of 196.0, 64.1% coverage) bound sequences, suggesting that Cap1p can bind to a more degenerate recognition sequence in *C. albicans*.



**FIGURE 4.** Motif logo of a conserved sequence in Cap1p-HA<sub>3</sub>- or Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>-enriched DNA fragments. The 189 Cap1p-HA<sub>3</sub>- or 117 Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>-bound sequences were used as input for motif discovery, using the Suite for Computational identification Of Promoter Elements (SCOPE) program

(<http://genie.dartmouth.edu/scope/>) (10,12). The highest scoring motif, MTKASTMA, common to both conditions (Cap1p-HA<sub>3</sub> and Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub>) is shown.

**Global gene expression profile.** To test whether the expression of the Cap1p target genes identified by ChIP-chip was modulated by the CSE mutation, we compared the gene expression profiles of strains CJD21/PMK-CAP1-CSE versus CJD21/PMK-CAP1 (Table 1). Three independent RNA samples per strain were hybridized to custom-designed Affymetrix *C. albicans* microarrays and the data analyzed as described in the Materials and Methods. Genes were considered as differentially expressed if (i) their average fold change (*n*-fold) in expression was  $\geq 2.0$ , (ii) their expression changed by at least 2.0-fold in each experiment, and (iii) the fold change (*n*-fold) was considered statistically significant by Student's T-test. Based on these criteria, we found 51 differentially-expressed genes (Table 5), including *GLR1*, *GRE2*, *OYE32*, *CIP1*, *MDR1*, orf19.2262, orf19.3537, orf19.5060, orf19.1167, orf19.1340, orf19.5517 and orf19.6757, all of which are involved in response to oxidative stress or coding for oxidoreductases (the complete expression dataset is found at GEO under series number GSE14258). Indeed, using the GO term Finder tool at CGD, we found that "Response to oxidative stress" and "Oxidoreductase activity" were the most significantly overrepresented GO terms among the 51 modulated genes ( $P = 0.004$  and  $P = 0.01$ , respectively). We performed real-time RT-PCR assays to validate the expression array results (see Materials and Methods) and confirmed the differential expression of *MDR1* and *GLR1* with relative expression changes ( $\pm$  standard errors) of  $13.1 \pm 0.3$  and  $1.9 \pm 0.1$ , respectively (Fig. 5).



**FIGURE 5.** Quantitative real-time RT-PCR analysis of (A) *MDR1* and (B) *GLR1* genes differentially expressed in the microarray experiments. Bars in each graph indicate log-transformed relative fold change in RNA expression of the sample indicated compared to its control: CJD21/PMK-CAP1-CSE versus CJD21/PMK-CAP1, CJD21/PMK + Benomyl (Ben) versus CJD21/PMK + DMSO and CJD21/PMK-CAP1 + Ben versus CJD21/PMK-CAP1 + DMSO. Asterisks denote statistical significance by the *t* test ( $P \leq 0.05$ ). Error bars denote standard errors.

When combining the expression and location data, we found that among the 51 differentially expressed genes, 26 also showed increased Cap1p-HA<sub>3</sub> or Cap1-CSE-HA<sub>3</sub> binding at their promoters in our ChIP-chip data (Table 5). Interestingly, all of these genes were upregulated, including *GLR1*, *GRE2*, *OYE32*, orf19.1340, orf19.2262, orf19.3537, orf19.5517 and orf19.6757, coding for oxidoreductases, *ARR3*, *MDR1* and *OPT8* coding for transporters and orf19.3121, *ZCF29* and orf19.2693, coding for transcriptional regulators (Table 5). Taken together, these data showed that increased expression of several Cap1p targets accompanies Cap1p binding at these targets, indicating that Cap1p is a



transcriptional activator. Our results also suggest that many genes differentially expressed in response to the CSE mutation, including all the downregulated genes (Table 5), are indirect Cap1p targets.

**TABLE 5.** List of genes whose expression is modulated in CJD21/PMK-CAP1-CSE versus CJD21/PMK-CAP1.

Systematic name <sup>a</sup>	CGD name <sup>b</sup>	Molecular function <sup>c</sup>	Relative level of gene expression ( <i>n</i> -fold) <sup>d</sup>	Cap1p-CSE-HA <sub>3</sub> binding ratio <sup>e</sup>	Cap1p-HA <sub>3</sub> binding ratio <sup>f</sup>	MTKASTMA motif <sup>g</sup>	Starting position <sup>h</sup>	Ending position <sup>h</sup>	Strand <sup>i</sup>
orf19.3121		Transcription corepressor activity	145.3	1.9	1.2	ATTACTAA	-177	-170	D
orf19.3131	<i>OYE32</i>	NADPH dehydrogenase activity	79.2	3.3	1.6	ATTAGTAA	-39	-32	D
orf19.113	<i>CIP1</i>		67.5	2.0	1.2	CTTAGTAA	-744	-737	D
orf19.5604	<i>MDR1</i>	Fluconazole transporter activity	57.9	2.5	1.8	CTTAGTAA	-573	-566	R
						ATGACTCA	-737	-730	D
						ATTAGTAA	-533	-526	D
orf19.1763	<i>IFR1</i>		38.2	2.5	1.2	ATTAGTAA	-304	-297	D
						ATTAGTAA	-161	-154	D
orf19.2285			27.2	1.2	1.7	ATTACTAA	-120	-113	D
orf19.3150	<i>GRE2</i>	Oxidoreductase activity	25.9	1.8	1.7	CTTAGTAA	-390	-383	D
orf19.1149	<i>MRF1</i>	DNA binding	18.1	1.3	1.4	ATGAGTCA	-561	-554	D
orf19.2262		NADPH:quinone reductase activity	17.7	1.8					
orf19.2693		Transcription corepressor activity	12.7	1.4	1.7	CTTAGTAA	-162	-155	D
orf19.1167		Sulfonate dioxygenase activity	11.9	—	—	CTTAGTAA	-239	-232	D
orf19.3122	<i>ARR3</i>	Arsenite transmembrane transporter activity	11.2	1.9	1.2	ATTACTAA	-329	-322	D
						ATTAGTCA	-178	-171	D
						CTTAGTCA	-968	-961	R
orf19.7531			10.4	—	—	ATTACTAA	-79	-72	D
orf19.7042			9.9	1.9	1.9	ATTACTAA	-709	-702	D
						ATGAGTAA	-339	-332	D
						ATTACTAA	-214	-207	D
orf19.1237	<i>ARO9</i>	Aromatic amino acid transaminase activity	7.7	—	—	ATTAGTAA	-153	-146	D
orf19.6898			7.0	—	1.4	ATTAGTCA	-426	-419	D
						ATTAGTAA	-340	-333	D
						CTGACTAA	-516	-509	R
orf19.251			7.0	2.0	1.5	ATTAGTAA	-939	-932	D
						ATTACTAA	-725	-718	D
orf19.847	<i>YMI1</i>	Endopeptidase activity	5.4	1.4	1.3	ATTAGTAA	-169	-162	D
orf19.5770	<i>OPT8</i>	Oligopeptide transporter activity	5.3	—	1.4	CTGACTAA	-243	-236	D
orf19.1340		Aldehyde reductase activity	5.2	—	1.2	ATTAGTCA	-156	-149	D
orf19.4757	<i>NAR1</i>		4.9	—	—	ATTACTAA	-113	-106	D
orf19.5259			4.9	—	—				
orf19.344			4.9	1.4	1.4	ATTACTAA	-505	-498	D
orf19.747	<i>NBP35</i>	4-Iron, 4-sulfur cluster binding	4.8	—	—				
orf19.5060	<i>GCS1</i>	Glutamate-cysteine ligase activity	4.5	—	—				
orf19.2862	<i>RIB1</i>	Cyclohydrolase activity	4.0	1.3	1.3	ATTACTAA	-913	-906	D
						ATTACTAA	-882	-875	D
						ATTAGTAA	-808	-801	D
						CTTAGTAA	-612	-605	R
						CTTAGTAA	-139	-132	R
orf19.4449		Superoxide dismutase copper chaperone activity	3.6	1.2	—	ATTACTAA	-114	-107	D
orf19.6757	<i>GCY1</i>	Aldehyde reductase activity	3.1	1.3	1.5				
orf19.2396	<i>IFR2</i>		3.1	1.5	1.2	CTTAGTCA	-33	-26	D
orf19.1162			3.1	—	—				
orf19.3537		Sulfiredoxin activity	3.0	—	1.2	ATGACTAA	-257	-250	D
						ATGAGTAA	-56	-49	R
orf19.5517		Alcohol dehydrogenase (NADP <sup>+</sup> ) activity	2.9	2.0	—	ATTACTAA	-180	-173	D
orf19.4337		Monocarboxylic acid transmembrane transporter activity	2.8	—	—	ATTAGTCA	-538	-531	D
						ATGACTCA	-601	-594	R
						ATGAGTAA	-389	-382	R
orf19.3668	<i>HGT2</i>	Glucose transmembrane transporter activity	2.6	—	—	ATTACTAA	-239	-232	D
orf19.5133	<i>ZCF29</i>	Specific RNA polymerase II transcription factor activity	2.5	1.3	1.2	ATTACTAA	-64	-57	D
orf19.3130			2.5	—	—	CTTAGTAA	-144	-137	D
orf19.4147	<i>GLR1</i>	Glutathione-disulfide reductase activity	2.5	1.2	1.4	ATTAGTAA	-230	-223	D
orf19.3139			2.4	—	—	ATTACTAA	-307	-300	D
orf19.6610		Microtubule binding	2.4	—	—				

Systematic name <sup>a</sup>	CGD name <sup>b</sup>	Molecular function <sup>c</sup>	Relative level of gene expression ( <i>n</i> -fold) <sup>d</sup>	Cap1p-CSE-HA <sub>3</sub> binding ratio <sup>e</sup>	Cap1p-HA <sub>3</sub> binding ratio <sup>f</sup>	MTKASTMA motif <sup>g</sup>	Starting position <sup>h</sup>	Ending position <sup>h</sup>	Strand <sup>i</sup>
orf19.6464			2.2	—	—	ATGACTAA	-697	-690	D
						CTGACTCA	-463	-456	D
						ATTACTAA	-90	-83	D
						ATTACTCA	-167	-160	R
orf19.5257		D-erythro-sphingosine kinase activity	2.2	—	—	ATTAGTAA	-681	-674	D
orf19.105	<i>HAL22</i>	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase activity	2.2	—	—	CTTACTCA	-359	-352	D
orf19.4906			2.1	—	—	CTTACTCA	-791	-784	D
						ATTAGTAA	-333	-326	D
orf19.5811	<i>MET1</i>	Uroporphyrin III C-methyltransferase activity	2.0	—	—				
orf19.7589			0.5	—	—				
orf19.2256			0.5	—	—				
orf19.4900		Alpha-1,3-mannosyltransferase activity	0.5	—	—	ATTAGTAA	-404	-397	R
orf19.1866		Hydrogen ion-transporting ATPase activity; rotational mechanism	0.5	—	—				
orf19.3523	<i>CRK1</i>	Mitogen-activated protein kinase activity	0.5	—	—				
orf19.1996	<i>CHAI</i>	Ammonia-lyase activity	0.5	—	—	ATTACTCA	-922	-915	R
						ATTACTAA	-201	-194	R
orf19.5485	<i>MEC3</i>	DNA binding	0.3	—	—				

<sup>a</sup> orf19 nomenclature according to the assembly 19 version.

<sup>b</sup> Gene name according to the CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

<sup>c</sup> Descriptions using GO terminology according to the CGD.

<sup>d</sup> Expression (*n*-fold) of the gene in strain CJD21/PMK-CAP1-CSE relative to that in strain CJD21/PMK-CAP1.

<sup>e</sup> Corresponding log<sub>2</sub>-transformed pseudomedian binding ratio in Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> ChIP-chip data (see Table S1 in the supplemental material). If more than one peak was associated with a target gene, the average log<sub>2</sub>-transformed pseudomedian binding ratio is shown. A dash indicates that binding peaks around the locus of the corresponding gene were not detected using our criteria (see Materials and Methods).

<sup>f</sup> Corresponding log<sub>2</sub>-transformed pseudomedian binding ratio in Cap1p-HA<sub>3</sub> ChIP-chip data (see Table S2 in the supplemental material). If more than one peak was associated with a target gene, the average log<sub>2</sub>-transformed pseudomedian binding ratio is shown. A dash indicates that binding peaks around the locus of the corresponding gene were not detected using our criteria (see Materials and Methods).

<sup>g</sup> MTKASTMA sequence within the promoter region of the corresponding gene (see Materials and Methods).

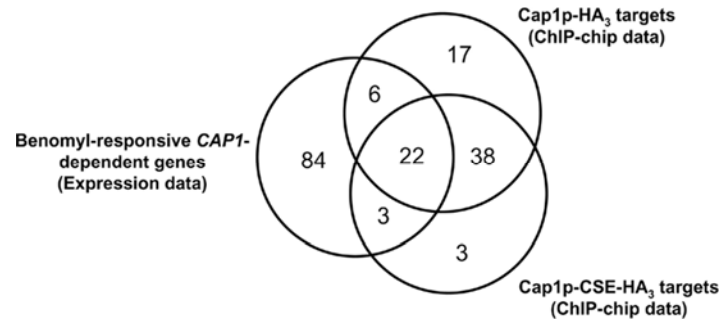
<sup>h</sup> Limits (starting and ending) of the MTKASTMA sequence relative to the ATG translation start site.

<sup>i</sup> D, sense strand; R, antisense strand.

**Transcriptional response of Cap1p targets to benomyl treatment.** Previous studies have shown that the genes responding to benomyl overlap significantly with those responding to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thus to oxidative stress (30,36), suggesting that benomyl is an inducer of Cap1p activity. To identify genes whose expression is induced by benomyl in a *CAP1*-dependent manner, we examined the gene expression profiles of the *CAP1*-expressing *C. albicans* strain CJD21/PMK-CAP1 treated with benomyl vs. treated with DMSO and the *CAP1*-deficient related strain CJD21/PMK also treated with benomyl vs. treated with DMSO (see Materials and Methods). When the gene expression profiles of benomyl-treated and diluent-treated CJD21/PMK-CAP1 were compared, 432 genes were found to be differentially expressed using our criteria (see Materials and Methods) (Table S3). Similarly, when benomyl-treated and diluent-treated *CAP1*-deficient *C. albicans* gene expression profiles were compared, 232 genes were found to be differentially expressed

using our criteria (see Materials and Methods) (Table S4). By considering only those genes differentially-expressed in the *CAP1*-expressing strain in response to benomyl as compared to CJD21/PMK in response to benomyl, we found a set of 115 genes whose expression fit these criteria, qualifying them as genes induced by benomyl in a *CAP1*-dependent manner (Table S5). We validated the expression microarray data by confirming the *CAP1*-dependant benomyl induction of *MDR1* and *GLR1* using real-time PCR (Fig. 5). This experiment showed that strain CJD21/PMK-CAP1 displayed a 517-fold induction of *MDR1* expression in response to benomyl treatment while the *CAP1*-deficient mutant CJD21/PMK displayed a 133-fold increase in *MDR1* RNA upon treatment with benomyl (Fig. 5A), most likely due to the contribution of another transcriptional regulator (see Discussion). In addition, benomyl-treated CJD21/PMK-CAP1 displayed a 4.2-fold change in *GLR1* expression whereas CJD21/PMK treated with benomyl showed no significant change in *GLR1* expression (Fig. 5B), demonstrating that Cap1p is the major regulator of *GLR1* expression in response to benomyl.

Interestingly, among the 115 genes responding to benomyl in a *CAP1*-dependant manner, 31 were also identified as target genes of Cap1p-HA<sub>3</sub> or Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> in our ChIP-chip data, as illustrated in the Venn diagram representing the overlap between the ChIP-chip dataset and the benomyl-induced *CAP1*-dependant genes dataset (Fig. V-6). These 31 genes include *CAP1* itself, *MDR1*, *EBP1*, *OYE32*, *OYE23* and *GLR1* (Table V-6), all of which are involved in oxidative stress response. Taken together, these results indicate that benomyl induces Cap1p activity and suggest that it activates the OSR via Cap1p in *C. albicans* (see Discussion).



**FIGURE V-6.** Venn diagram of the overlap between benomyl-responsive *CAP1*-dependant genes dataset (left circle) and the Cap1p-HA<sub>3</sub> (right upper circle) and Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> (right lower circle) ChIP-chip datasets. The numbers in the Venn diagram indicate numbers of genes.

**TABLE 6.** List of Cap1p-bound targets whose expression is modulated upon benomyl treatment in a *CAP1*-dependant manner.

Systematic name <sup>a</sup>	CGD name <sup>b</sup>	Molecular function <sup>c</sup>	Relative change in gene expression ( <i>n</i> -fold) <sup>d</sup>	Cap1p-CSE-HA <sub>3</sub> binding ratio <sup>e</sup>	Cap1p-HA <sub>3</sub> binding ratio <sup>f</sup>
orf19.3121		Transcription corepressor activity	574.6	1.9	1.2
orf19.1623	<i>CAP1</i>	Transcription factor activity	453.7	1.5	1.5
orf19.2285			228.3	1.2	1.7
orf19.125	<i>EBP1</i>	NADPH dehydrogenase activity	127.8	3.1	2.1
orf19.1763	<i>IFR1</i>		97.1	2.5	1.2
orf19.3433	<i>OYE23</i>	NADPH dehydrogenase activity	90.6	2.7	2.2
orf19.3234		NADPH dehydrogenase activity	58.2	1.3	1.2
orf19.720	<i>GST3</i>	Transcription corepressor activity	48.5	1.5	1.4
orf19.6898			33.7	—	1.4
orf19.2262			25.7	1.8	—
orf19.3131	<i>OYE32</i>	NADPH dehydrogenase activity	25.7	3.3	1.6
orf19.2396	<i>IFR2</i>		18.9	1.5	1.2
orf19.3122	<i>ARR3</i>	Arsenite transmembrane transporter activity	17.3	1.9	1.2
orf19.3395			15.7	—	1.2
orf19.3537			10.1	—	1.2
orf19.5770	<i>OPT8</i>	Oligopeptide transporter activity	8.7	—	1.4
orf19.7042			6.1	1.9	1.9
orf19.5517		Alcohol dehydrogenase (NADP+) activity	5.3	2.0	—
orf19.6586			5.1	1.4	1.6
orf19.847	<i>YIM1</i>	Peptidase activity	4.7	1.4	1.3
orf19.5604	<i>MDR1</i>	Multidrug transporter activity	4.4	2.5	1.8
orf19.932		Phospholipid-translocating ATPase activity	4.3	1.2	1.2
orf19.4449		Superoxide dismutase copper chaperone activity	3.9	1.2	—
orf19.4147	<i>GLR1</i>	Glutathione-disulfide reductase activity	3.8	1.2	1.4
orf19.2862	<i>RIB1</i>	Cyclohydrolase activity	3.7	1.3	1.3
orf19.4907			3.5	1.4	1.7
orf19.344			3.3	1.4	1.2
orf19.6554			2.6	—	1.3
orf19.5133	<i>ZCF29</i>	Specific RNA polymerase II transcription factor activity	2.4	1.3	1.2
orf19.6402	<i>CYS3</i>	Cystathionine gamma-lyase activity	2.3	—	1.2
orf19.251			2.0	2	1.5

<sup>a</sup> orf19 nomenclature according to the assembly 19 version.

<sup>b</sup> Gene name according to the CGD (<http://www.candidagenome.org/>).

<sup>c</sup> Described using GO terminology according to the CGD.

<sup>d</sup> Average (*n* = 3) relative change in gene expression of CJD21/PMK-CAP1 treated with benomyl versus CJD21/PMK treated with benomyl.

<sup>e</sup> Corresponding log<sub>2</sub>-transformed pseudomedian binding ratio in Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> ChIP-chip data (see Table S1 in the supplemental material). If more than one peak was associated with a target gene, the average log<sub>2</sub>-transformed pseudomedian binding ratio is shown. A dash indicates that binding-peaks around the locus of the corresponding gene were not detected using our criteria (see Materials and Methods).

<sup>f</sup> Corresponding log<sub>2</sub>-transformed pseudomedian binding ratio in Cap1p-HA<sub>3</sub> ChIP-chip data (see Table S2 in the supplemental material). If more than one peak was associated with a target gene, the average log<sub>2</sub>-transformed pseudomedian binding ratio is shown. A dash indicates that binding-peaks around the locus of the corresponding gene were not detected using our criteria (see Materials and Methods).

## V.5. Discussion

The bZIP transcription factor Cap1p undergoes nuclear retention upon activation by oxidative stress, while in cells grown in the absence of Cap1p-activating conditions, Cap1p shows diffuse cytoplasmic localization (68). It was also shown that Cap1p nuclear localization is constitutive when the activating mutation C477A is introduced in Cap1p (68). In this study, we introduced a similar gain-of-function mutation in Cap1p to identify the Cap1p regulon, hypothesizing that this alteration, by shifting Cap1p cellular localization to the nucleus, would result in increased Cap1p binding to its targets. We used the methionine-regulatable promoter (pCaEXP expression system) to drive high expression of the *CAP1-HA<sub>3</sub>* or *CAP1-CSE-HA<sub>3</sub>* alleles. We found that upon this forced overexpression, both Cap1p-HA<sub>3</sub> and Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> bind to DNA *in vivo*. It is likely that forced overexpression of *CAP1-HA<sub>3</sub>* leads to an accumulation of the protein in the nucleus by overcoming Crm1p export activity. However, our finding that in most cases Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> binding was increased relative to that of Cap1p-HA<sub>3</sub> at common targets (Fig. 2, Tables S1 and S2) is consistent with the hypothesis that Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> levels in the nucleus were higher than those of Cap1p-HA<sub>3</sub> as a result of the CSE mutation. It is also consistent with our observation that the Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> cells are more resistant to FLC than the Cap1p-HA<sub>3</sub> cells (Fig. 1C). Other explanations could be that Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> affinity to DNA is higher than that of Cap1p-HA<sub>3</sub> or that the introduction of the HA<sub>3</sub> tag in Cap1p has affected its nuclear localization. Previous studies used transcription factor-overexpression approaches to study genome-wide transcription factor function (14,60,71). This strategy appears to mimic transcription factor physiological activation, presumably by increasing promoter occupancy of target genes as a consequence of supraphysiological levels of the protein (14). Importantly, this approach increases both the sensitivity and relevance of the data (14,60,62) as reflected in our present study since several known potential direct Cap1p targets were bound by Cap1p (Fig. 2, Tables S1 and S2). However, we can not rule out the

possibility that overexpression of Cap1p and/or the introduction of the triple-HA epitope-tag in Cap1p drive non-physiological binding *in vivo*, resulting in spurious binding, which may explain the identification of peaks in genome regions with no obvious ORFs (see example in Fig. 2, lower panel). Also, transcription factor-overexpression often causes cell growth inhibition (14,71). In the present study, a growth inhibition effect was also detected, as colonies overexpressing *CAP1-CSE-HA<sub>3</sub>* were clearly smaller than control colonies, whereas a slight growth inhibition was detected in *CAP1-HA<sub>3</sub>*-expressing colonies (Fig. 2C). Thus, it is possible that an additive growth inhibition effect was caused by Cap1p hyperactivity.

A previous study was performed to compare genes co-regulated with *MDR1* in azole-resistant *C. albicans* strains with those induced in response to benomyl (30). Several genes that responded to benomyl treatment in a *CAP1*-dependent manner (Table S5) were shown to be benomyl-responsive by Karababa *et al.*, including the stress genes orf19.3121, *OYE23*, *EBP1*, orf19.2262, *OYE32*, *IFR2*, orf19.251, orf19.5517, *TTR1* and the transporter genes *MDR1*, *ARR3*, and *SNQ2* (30). In addition, genes of unknown function that were defined as *CAP1*-dependent upon benomyl treatment in our study were also found to be benomyl-responsive by Karababa *et al.* such as orf19.2285, orf19.6898, *PRN1*, orf19.7042, orf19.6586, *YIMI*, orf19.2043 and orf19.1162. Using our criteria ( $P \leq 0.01$ , binding ratio  $\geq 2$ ), we found a majority of these genes to be bound *in vivo* by Cap1p (except *TTR1*, *SNQ2*, *PRN1*, orf19.2043 and orf19.1162) (Tables S1 and S2), indicating a direct transcriptional regulation by Cap1p. Another previous study examined the *C. albicans* response to hydrogen peroxide, an inducer of oxidative stress (64), although using a microarray with only partial coverage of the *C. albicans* genome. As expected, several genes responsive to benomyl treatment in a *CAP1*-dependent manner overlapped with those responsive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, including the stress genes *EBP1*, *OYE23*, orf19.2262, *OYE32*, orf19.5517, *TTR1*, orf19.251, *IFR2*, and *GLR1*. Another report by Wang *et al* aimed at identifying genes differentially expressed under untreated conditions in a wild-type *C. albicans* strain versus a *cap1Δ/cap1Δ* mutant, also termed basal or stress-absent conditions (63). This study

identified 48 downregulated genes in the *cap1* mutant relative to the wild-type strain among which only *EBP1*, *OYE23*, *OYE32*, orf19.2262, *ARR3*, *ZRT2* and orf19.868 were bound by Cap1p in the present study (Tables S1 and S2), suggesting that many genes found by Wang *et al* that were differentially expressed under untreated conditions are indirect Cap1p targets.

A striking finding was that Cap1p binds not only to the promoter region of its target genes, but also within the ORF and the 3'-region including the transcriptional termination region (Fig. 2, Tables S1 and S2). Interestingly, binding of Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> within the ORFs was more frequent than that of Cap1p-HA<sub>3</sub> (Fig. 2, Tables S1 and S2), suggesting that activation of Cap1p enhances its propensity to occupy intragenic regions. To our knowledge, this is the first report of such a transcription factor binding profile in *C. albicans*. Previous studies reported similar associations of transcription factors to both promoter and coding regions of their targets, including the tumor suppressor p53 and the estrogen receptor (5,11). Interestingly, binding of both transcription factors to intragenic regions overlapped with that of RNA polymerase II binding sites (5,11). Moreover, it was shown that p53 physically associated with RNA polymerase II with which it travels within target gene loci (5). The intragenic binding profile of Cap1p as well as its binding at the 3'-end of target genes is consistent with a model in which Cap1p interacts with the transcriptional machinery and travels with the RNA polymerase II across the transcribed region of the target locus, in a similar manner to p53. Interestingly, it was shown that Yap1p physically interacts with the general transcription factor TFIIA in *S. cerevisiae* and that TFIIA mutants exhibited an enhanced susceptibility to oxidative stress (32), highlighting a direct link between Yap1p and the RNA polymerase II complex. Another possibility could also be that Cap1p interacts with chromatin-associated proteins.

Previous studies have implicated the zinc cluster transcription factors Mrr1p and Upc2p in regulating *MDR1* gene-expression in *C. albicans* (19,20,47,71). While Mrr1p appears to act as a potent transcriptional activator of *MDR1* in *C. albicans* azole-resistant



clinical isolates overexpressing *MDR1* (47), Upc2p appeared to act as a moderate activator or a repressor of *MDR1* depending upon the activating signal (71). Consistently, a gain-of-function mutation in *UPC2* from a *C. albicans* azole resistant strain was shown to cause a moderate upregulation of *MDR1* (20). We previously showed that Upc2p binds to the *MDR1* promoter using chromatin immunoprecipitation experiments (71), whereas it is still unknown whether Mrr1p associates directly with the promoter region of *MDR1*. Based on previous and the present studies, Cap1p appears to be a potent activator of *MDR1* expression, as reflected by Northern blot and luciferase-reporter analyses (3,53) and by our expression microarray data (Tables 2 and S5). Another regulator that was shown to participate in the regulation of *MDR1* expression is Mcm1p by directly binding to an Mcm1p-binding motif found in the promoter of *MDR1* (52), a finding that was recently confirmed *in vivo* by genome-wide location analyses (37). Taken together, these observations suggest that a complex network of transcriptional regulators, including Cap1p, Mrr1p, Upc2p and Mcm1p, is involved in the regulation of *MDR1* in *C. albicans*. Studies are ongoing to determine whether Cap1p interacts physically with these other factors to regulate *MDR1* expression.

Among the overrepresented functional categories of genes bound *in vivo* by Cap1p were “Response to drug”, “Hyphal cell wall”, “Phospholipid transport” and “Regulation of nitrogen utilization” (Table 2), suggesting other roles for Cap1p besides the oxidative stress response. Of particular interest was the grouping of *PDR16*, *RTA2*, *MDR1* and *FLU1* into the functional category “Response to drug”. These genes were previously reported to participate in azole resistance in *C. albicans* (8,29,55,66). While *PDR16* and *MDR1* are involved in clinical azole resistance (55,66), *FLU1* and *RTA2* were shown to modulate cell-susceptibility to azoles in *C. albicans* (8,29), suggesting that Cap1p could confer azole resistance via *PDR16*, *FLU1*, *RTA2* and/or *MDR1* in *C. albicans*. Although no evidence of Cap1p gain-of-function mutations in *C. albicans* azole-resistant clinical isolates has been reported to date, a recent study has reported the constitutive overexpression of *FLU1* together with *MDR1* correlating with the development of clinical azole resistance (25).

Whether upregulation of these two major facilitator-encoding genes is mediated by Cap1p remains to be determined. Another overrepresented functional category was “Hyphal cell wall”, including *SSA2*, *EBP1*, orf19.251, *PDC11* and *ADH1*. As Cap1p appears to be important for protecting *C. albicans* against the oxidative stress induced by neutrophils during the course of the immune response (24), it might regulate processes contributing to virulence, including hyphal growth. Neutrophils induce oxidative stress through the release of nitric oxide anions, thus it would not be surprising that Cap1p regulates processes involved in nitrogen metabolism as reflected by the enrichment of the functional category “Regulation of nitrogen utilization”, including orf19.2693, orf19.3121 and *GST3*. Finally, “Phospholipid transport” was also among the overrepresented functional categories and might reflect a role for Cap1p in enhancing the dynamics of phospholipid metabolism as these molecules are highly sensitive to oxidative stress.

Benomyl is an aneuploidogen, toxic antimitotic drug also used as an antifungal agent, which is thought to exert its effect by binding to tubulin and inhibiting tubulin assembly (44). Based on previous as well as the present studies, it appears that benomyl induces the oxidative stress response in *C. albicans*. First, genes differentially expressed upon exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> overlap with those responsive to benomyl (30,36). Second, we show here that benomyl induces Cap1p activity, reflected by the upregulation of genes involved in oxidative stress in a *CAP1*-dependent manner. Indeed, the GO term “Response to oxidative stress” was among the most significantly enriched functional categories ( $P = 0.026$ ) of the *CAP1*-dependent genes responding to benomyl (data not shown). A study in *S. cerevisiae* also showed that a subset of oxidative stress response genes was upregulated rapidly after addition of benomyl (39). Interestingly, this transcriptional response involved Yap1p as the central regulator of the early response to benomyl treatment (39). Lucau-Danila *et al.* suggested that benomyl potentially acts at the level of Yap1p nuclear localization rather than at the level of DNA binding (39). Thus, it is possible that benomyl induces conformational changes within the Cap1p CRD by directly binding to the C-terminal domain of Cap1p, leading to nuclear retention of Cap1p and transcriptional

activation. However, an effect on intracellular redox balance is not excluded, as the benomyl metabolite *n*-butylisocyanate (BIC), a cleavage product of benomyl, results in inhibitory effects on dehydrogenases or glutathione reductases (44), which in turn may activate the oxidative stress response via Cap1p.

## V.6. Acknowledgments

We are indebted to Raphaëlle Lambert, Pierre Chagnon and Anne-Sophie Guenier from the IRIC Genomics platform for their support with the Q-PCR and ChIP-chip experiments, Patrick Gendron from the IRIC Bioinformatics platform for the *C. albicans* genome browser, Ramin Homayouni for assistance with expression data analysis, Mike Snyder for the design of the *C. albicans* tiling arrays and the *Candida* Genome Database for sequence information. We also thank Steve Trosok for critically reading the manuscript and Brian Wilhelm, Marie-Pier Scott-Boyer, Simon Drouin, François Robert and Sébastien Lemieux for stimulating discussions.

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.R. (MT-15679 and HOP-67260) and from the National Institutes of Health (R01 AI058145) to P.D.R. S.Z. is supported by a doctoral studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). IRIC is supported by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research, the Canadian Foundation for Innovation, and the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

## V.7. References

1. **Akins, R. A.** 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **43**:285-318.
2. **Alarco, A. M., I. Balan, D. Talibi, N. Mainville, and M. Raymond.** 1997. AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires *FLR1* encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J. Biol. Chem.* **272**:19304-19313.
3. **Alarco, A. M. and M. Raymond.** 1999. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**:700-708.
4. **Alonso-Monge, R., F. Navarro-Garcia, E. Roman, A. I. Negredo, B. Eisman, C. Nombela, and J. Pla.** 2003. The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **2**:351-361.
5. **Balakrishnan, S. K. and D. S. Gross.** 2008. The tumor suppressor p53 associates with gene coding regions and co-traverses with elongating RNA polymerase II in an *in vivo* model. *Oncogene* **27**:2661-2672.
6. **Buck, M. J. and J. D. Lieb.** 2004. CHIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* **83**:349-360.
7. **Bustamante, C. I.** 2005. Treatment of *Candida* infection: a view from the trenches! *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**:490-495.
8. **Calabrese, D., J. Bille, and D. Sanglard.** 2000. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*FLUI*) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* **146 ( Pt 11)**:2743-2754.
9. **Care, R. S., J. Trevethick, K. M. Binley, and P. E. Sudbery.** 1999. The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol. Microbiol.* **34**:792-798.
10. **Carlson, J. M., A. Chakravarty, C. E. DeZiel, and R. H. Gross.** 2007. SCOPE: a web server for practical de novo motif discovery. *Nucleic Acids Res.* **35**:W259-W264.

11. **Carroll, J. S., C. A. Meyer, J. Song, W. Li, T. R. Geistlinger, J. Eeckhoute, A. S. Brodsky, E. K. Keeton, K. C. Fertuck, G. F. Hall, Q. Wang, S. Bekiranov, V. Sementchenko, E. A. Fox, P. A. Silver, T. R. Gingeras, X. S. Liu, and M. Brown.** 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat. Genet.* **38**:1289-1297.
12. **Chakravarty, A., J. M. Carlson, R. S. Khetani, and R. H. Gross.** 2007. A novel ensemble learning method for *de novo* computational identification of DNA binding sites. *BMC. Bioinformatics.* **8**:249.
13. **Chauhan, N., J. P. Latge, and R. Calderone.** 2006. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:435-444.
14. **Chua, G., Q. D. Morris, R. Sopko, M. D. Robinson, O. Ryan, E. T. Chan, B. J. Frey, B. J. Andrews, C. Boone, and T. R. Hughes.** 2006. Identifying transcription factor functions and targets by phenotypic activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:12045-12050.
15. **Coste, A., A. Selmecki, A. Forche, D. Diogo, M. E. Bounoux, C. d'Enfert, J. Berman, and D. Sanglard.** 2007. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot. Cell* **6**:1889-1904.
16. **Coste, A., V. Turner, F. Ischer, J. Morschhauser, A. Forche, A. Selmecki, J. Berman, J. Bille, and D. Sanglard.** 2006. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* **172**:2139-2156.
17. **Coste, A. T., M. Karababa, F. Ischer, J. Bille, and D. Sanglard.** 2004. *TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*. *Eukaryot. Cell* **3**:1639-1652.
18. **de Repentigny, L., D. Lewandowski, and P. Jolicoeur.** 2004. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:729-59, table.
19. **Dunkel, N., J. Blass, P. D. Rogers, and J. Morschhauser.** 2008. Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol. Microbiol.* **69**:827-840.

20. **Dunkel, N., T. T. Liu, K. S. Barker, R. Homayouni, J. Morschhauser, and P. D. Rogers.** 2008. A Gain-of-function Mutation in the Transcription Factor Upc2p Causes Upregulation of Ergosterol Biosynthesis Genes and Increased Fluconazole Resistance in a Clinical *Candida albicans* Isolate. *Eukaryot. Cell* **7**:1180-1190.
21. **Eggimann, P., J. Garbino, and D. Pittet.** 2003. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect. Dis.* **3**:772-785.
22. **Enjalbert, B., D. A. Smith, M. J. Cornell, I. Alam, S. Nicholls, A. J. Brown, and J. Quinn.** 2006. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **17**:1018-1032.
23. **Fonzi, W. A. and M. Y. Irwin.** 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**:717-728.
24. **Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F. C. Odds, and B. Hube.** 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* **56**:397-415.
25. **Goldman, G. H., M. E. Silva Ferreira, M. E. dos Reis, M. Savoldi, D. Perlin, S. Park, P. C. Godoy Martinez, M. H. Goldman, and A. L. Colombo.** 2004. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**:25-32.
26. **Harry, J. B., B. G. Oliver, J. L. Song, P. M. Silver, J. T. Little, J. Choiniere, and T. C. White.** 2005. Drug-induced regulation of the *MDR1* promoter in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2785-2792.
27. **Herrero, E., J. Ros, G. Belli, and E. Cabiscol.** 2007. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**:1217-1235.
28. **Hiller, D., S. Stahl, and J. Morschhauser.** 2006. Multiple cis-acting sequences mediate upregulation of the *MDR1* efflux pump in a fluconazole-resistant clinical *Candida albicans* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2300-2308.
29. **Jia, X. M., Z. P. Ma, Y. Jia, P. H. Gao, J. D. Zhang, Y. Wang, Y. G. Xu, L. Wang, Y. Y. Cao, Y. B. Cao, L. X. Zhang, and Y. Y. Jiang.** 2008. *RTA2*, a novel gene involved in azole resistance in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**:631-636.

30. **Karababa, M., A. T. Coste, B. Rognon, J. Bille, and D. Sanglard.** 2004. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3064-3079.
31. **Kelly, R., S. M. Miller, M. B. Kurtz, and D. R. Kirsch.** 1987. Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step gene disruption to isolate *ura3* mutants. *Mol. Cell Biol.* **7**:199-208.
32. **Kraemer, S. M., D. A. Goldstrohm, A. Berger, S. Hankey, S. A. Rovinsky, W. Scott Moye-Rowley, and L. A. Stargell.** 2006. TFIIA plays a role in the response to oxidative stress. *Eukaryot. Cell* **5**:1081-1090.
33. **Kuge, S., M. Arita, A. Murayama, K. Maeta, S. Izawa, Y. Inoue, and A. Nomoto.** 2001. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol. Cell Biol.* **21**:6139-6150.
34. **Kuge, S., N. Jones, and A. Nomoto.** 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* **16**:1710-1720.
35. **Kuge, S., T. Toda, N. Iizuka, and A. Nomoto.** 1998. Crm1 (XpoI) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* **3**:521-532.
36. **Kusch, H., S. Engelmann, D. Albrecht, J. Morschhauser, and M. Hecker.** 2007. Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics.* **7**:686-697.
37. **Lavoie, H., A. Sellam, C. Askew, A. Nantel, and M. Whiteway.** 2008. A toolbox for epitope-tagging and genome-wide location analysis in *Candida albicans*. *BMC. Genomics* **9**:578.
38. **Liu, T. T., S. Znaidi, K. S. Barker, L. Xu, R. Homayouni, S. Saidane, J. Morschhauser, A. Nantel, M. Raymond, and P. D. Rogers.** 2007. Genome-wide expression and location analyses of the *Candida albicans* Tac1p regulon. *Eukaryot. Cell* **6**:2122-2138.
39. **Lucau-Danila, A., G. Lelandais, Z. Kozovska, V. Tanty, T. Delaveau, F. Devaux, and C. Jacq.** 2005. Early expression of yeast genes affected by chemical stress. *Mol. Cell Biol.* **25**:1860-1868.



40. **Lupetti, A., R. Danesi, M. Campa, M. Del Tacca, and S. Kelly.** 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol. Med.* **8**:76-81.
41. **MacPherson, S., B. Akache, S. Weber, D. De, X, M. Raymond, and B. Turcotte.** 2005. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1745-1752.
42. **MacPherson, S., M. Larochelle, and B. Turcotte.** 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:583-604.
43. **Maeta, K., S. Izawa, S. Okazaki, S. Kuge, and Y. Inoue.** 2004. Activity of the Yap1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis. *Mol. Cell Biol.* **24**:8753-8764.
44. **McCarroll, N. E., A. Protzel, Y. Ioannou, H. F. Frank Stack, M. A. Jackson, M. D. Waters, and K. L. Dearfield.** 2002. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutat. Res.* **512**:1-35.
45. **Molin, M., J. P. Renault, G. Lagniel, S. Pin, M. Toledano, and J. Labarre.** 2007. Ionizing radiation induces a Yap1-dependent peroxide stress response in yeast. *Free Radic. Biol. Med.* **43**:136-144.
46. **Morschhauser, J.** 2002. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1587**:240-248.
47. **Morschhauser, J., K. S. Barker, T. T. Liu, J. Blass-Warmuth, R. Homayouni, and P. D. Rogers.** 2007. The Transcription Factor Mrr1p Controls Expression of the *MDR1* Efflux Pump and Mediates Multidrug Resistance in *Candida albicans*. *PLoS. Pathog.* **3**:e164.
48. **Moye-Rowley, W. S.** 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot. Cell* **2**:381-389.
49. **Nguyen, D. T., A. M. Alarco, and M. Raymond.** 2001. Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J. Biol. Chem.* **276**:1138-1145.
50. **Pappas, P. G., J. H. Rex, J. D. Sobel, S. G. Filler, W. E. Dismukes, T. J. Walsh, and J. E. Edwards.** 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **38**:161-189.

51. **Peng, S., A. A. Alekseyenko, E. Larschan, M. I. Kuroda, and P. J. Park.** 2007. Normalization and experimental design for ChIP-chip data. *BMC. Bioinformatics.* **8**:219.
52. **Riggle, P. J. and C. A. Kumamoto.** 2006. Transcriptional regulation of *MDR1*, encoding a drug efflux determinant, in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains through an Mcm1p binding site. *Eukaryot. Cell* **5**:1957-1968.
53. **Rognon, B., Z. Kozovska, A. T. Coste, G. Pardini, and D. Sanglard.** 2006. Identification of promoter elements responsible for the regulation of *MDR1* from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiology* **152**:3701-3722.
54. Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter. *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual.* 1990. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
55. **Saidane, S., S. Weber, D. De, X. G. St Germain, and M. Raymond.** 2006. *PDR16*-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **60**:1546-1562.
56. **Sanglard, D. and F. C. Odds.** 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* **2**:73-85.
57. **Schmitt, M. E., T. A. Brown, and B. L. Trumpower.** 1990. A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**:3091-3092.
58. **Schneider, B. L., W. Seufert, B. Steiner, Q. H. Yang, and A. B. Futcher.** 1995. Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**:1265-1274.
59. **Sherman, F.** 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**:3-21.
60. **Sopko, R., D. Huang, N. Preston, G. Chua, B. Papp, K. Kafadar, M. Snyder, S. G. Oliver, M. Cyert, T. R. Hughes, C. Boone, and B. Andrews.** 2006. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol. Cell* **21**:319-330.

61. **Srikantha, T., A. R. Borneman, K. J. Daniels, C. Pujol, W. Wu, M. R. Seringhaus, M. Gerstein, S. Yi, M. Snyder, and D. R. Soll.** 2006. *TOS9* regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **5**:1674-1687.
62. **Tang, L., X. Liu, and N. D. Clarke.** 2006. Inferring direct regulatory targets from expression and genome location analyses: a comparison of transcription factor deletion and overexpression. *BMC. Genomics* **7**:215.
63. **Wang, Y., Y. Y. Cao, Y. B. Cao, D. J. Wang, X. M. Jia, X. P. Fu, J. D. Zhang, Z. Xu, K. Ying, W. S. Chen, and Y. Y. Jiang.** 2007. Cap1p plays regulation roles in redox, energy metabolism and substance transport: an investigation on *Candida albicans* under normal culture condition. *Front Biosci.* **12**:145-153.
64. **Wang, Y., Y. Y. Cao, X. M. Jia, Y. B. Cao, P. H. Gao, X. P. Fu, K. Ying, W. S. Chen, and Y. Y. Jiang.** 2006. Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. *Free Radic. Biol. Med.* **40**:1201-1209.
65. **Wemmie, J. A., S. M. Steggerda, and W. S. Moye-Rowley.** 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diamide. *J. Biol. Chem.* **272**:7908-7914.
66. **Wirsching, S., S. Michel, and J. Morschhauser.** 2000. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol. Microbiol.* **36**:856-865.
67. **Yan, C., L. H. Lee, and L. I. Davis.** 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* **17**:7416-7429.
68. **Zhang, X., M. de Micheli, S. T. Coleman, D. Sanglard, and W. S. Moye-Rowley.** 2000. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol. Microbiol.* **36**:618-629.
69. **Zhang, Z. D., J. Rozowsky, H. Y. Lam, J. Du, M. Snyder, and M. Gerstein.** 2007. Telescope: online analysis pipeline for high-density tiling microarray data. *Genome Biol.* **8**:R81.
70. **Znaidi, S., D. De, X. S. Weber, T. Rigby, A. Nantel, and M. Raymond.** 2007. The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates *PDR16* expression in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **66**:440-452.
71. **Znaidi, S., S. Weber, O. Z. Al Abdin, P. Bomme, S. Saidane, S. Drouin, S. Lemieux, D. De, X. F. Robert, and M. Raymond.** 2008. Genomewide location

analysis of *Candida albicans* Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance. Eukaryot. Cell 7:836-847.

## **VI. Chapitre 6: Zinc cluster proteins in *Candida albicans*: from glucose metabolism to drug resistance**

Le contenu de ce chapitre est en préparation pour soumission à Future Microbiology.

**Znaidi, S.**, Turcotte, B., Bouvais, G. et Raymond, M. Zinc cluster proteins in *Candida albicans*: from glucose metabolism to drug resistance. En préparation.

Contribution des auteurs : L'estimation de ma contribution est de 85%. Turcotte a contribué à la rédaction. Bouvais a effectué des analyses bioinformatiques. J'ai écrit la totalité de la revue sous la supervision de ma directrice de recherche Martine Raymond.

## REVIEW

### **Zinc cluster proteins in *Candida albicans*: from glucose metabolism to drug resistance**

Sadri Znaidi<sup>1</sup>, Bernard Turcotte<sup>2</sup>, Guillaume Bouvet<sup>1</sup>, and Martine Raymond<sup>1,3\*</sup>

Institute for Research in Immunology and Cancer<sup>1</sup>, Montreal, Québec, Canada; Department of Medicine<sup>2</sup>, Royal Victoria Hospital, McGill University, Montréal, Québec, Canada; Department of Biochemistry<sup>3</sup>, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

\*Corresponding author. Mailing address: Institut de recherche en immunologie et en oncologie, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada. Phone: (514) 343-6746. Fax: (514) 343-7383.

**Keywords.** *Candida albicans*, regulation of transcription, transcription factors, zinc cluster protein, metabolism, stress response, antifungal compounds, drug resistance, regulatory networks.

## VI.1. Summary

The zinc finger superfamily is one of the largest families of DNA-binding proteins in eukaryotes. Zinc finger domains differ with respect to the composition of their zinc-binding residues. One of these domains, which appears to be restricted to fungi, is the  $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$  binuclear cluster (or zinc cluster) motif, in which six cysteines coordinate two zinc atoms ( $\text{Zn}_2\text{Cys}_6$ ). In the model yeast *S. cerevisiae*, zinc cluster proteins are involved in the regulation of various cellular processes including primary and secondary metabolism, response to stress and drug resistance. The genome of the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans* encodes at least 81 proteins with a zinc cluster motif, characterized by the presence of the signature  $\text{CX}_2\text{CX}_6\text{CX}_{5-24}\text{CX}_2\text{CX}_{6-9}\text{C}$ . Only a few of these proteins has been functionally characterized and shown to be involved in various cellular processes, including carbohydrate metabolism and other metabolite homeostasis, response to chemical stimulus, filamentous growth, white/opaque switching and drug resistance. Many uncharacterized *C. albicans* zinc cluster proteins are clearly homologous to the products of *S. cerevisiae* genes with a known function while more than half of them do not have clear homologs in *S. cerevisiae*, suggesting that they participate in processes that are specific to *C. albicans*. The fact that these fungal-specific transcriptional regulators are involved in many important cellular functions makes them an attractive target for the development of new antifungal agents.

## VI.2. Introduction

Transcription factors are the key regulatory proteins that control the expression of sets of genes and allow the concerted execution of different cellular processes. Zinc finger transcription factors form one of the largest families of transcriptional regulators [1]. Characterized by their requirement of zinc ions for the folding of their DNA-binding domain, these factors have been classified into three classes according to their zinc binding motifs. Class I is represented by the Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> subfamily, the most abundant in eukaryotes, in which two cysteines and two histidines coordinate one zinc ion (reviewed in [2]). The Cys<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub> subfamily, or class II, is characterized by four cysteines coordinating one zinc atom. This subfamily includes the mammalian nuclear receptors [3] and the GATA transcription factors [4]. The third class, which is exclusively fungal, is the zinc binuclear cluster subfamily and possesses a well-conserved motif containing six cysteine residues which bind two zinc atoms (Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>) (reviewed in [5]). Zinc cluster proteins have been best characterized in *Saccharomyces cerevisiae*, which possesses fifty-four members with the motif CX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>CX<sub>5-12</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>6-8</sub>C (where C and X designate cysteine and X any amino acid, respectively) [5,6,7]. These proteins are involved in a wide variety of cellular processes ranging from primary and secondary metabolism to stress response and pleiotropic drug resistance [5,6,7]. *S. cerevisiae* Gal4p, the first zinc cluster transcription factor identified, has been extensively characterized and used as a model for studying transcriptional regulation in eukaryotes (reviewed in [8]) (Figure 1).

*Candida albicans* is a major opportunistic fungal pathogen of humans. It causes superficial as well as systemic infections. Infections of the skin and mucosal surfaces can occur either in healthy or immunocompromised individuals, however, systemic candidiasis, the most serious manifestation of the disease, is often seen in severely immunosuppressed patients [9,10,11]. *C. albicans* is a diploid organism and has been thought for a long time to be an asexual obligate diploid until the discovery that it undergoes mating [12]. The mating



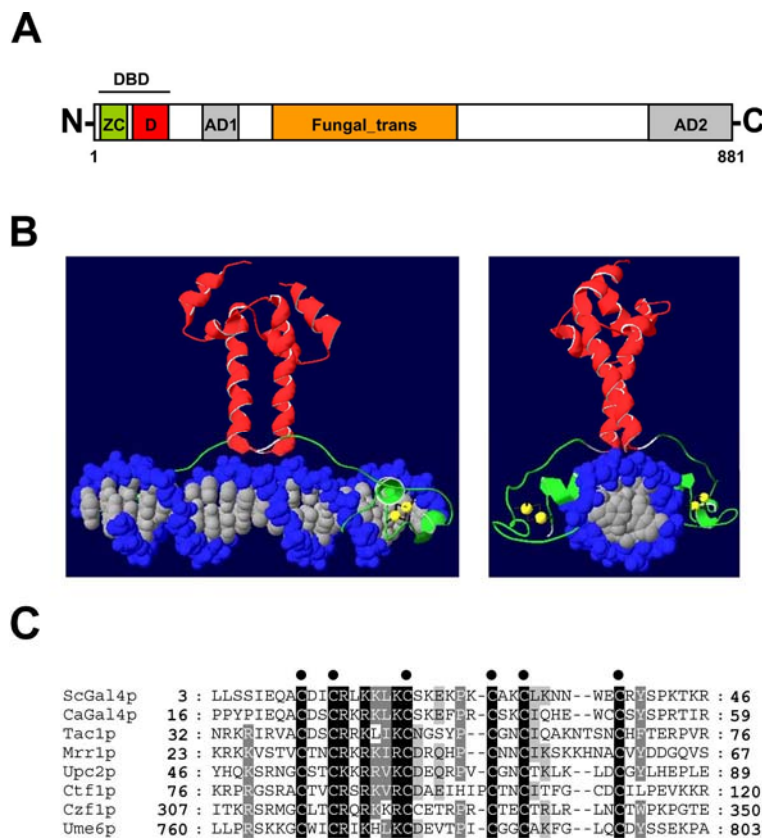
process requires loss-of-heterozygosity events at the mating-type like (*MTL*) locus, located on chromosome 5, of heterozygous  $a/\alpha$ -type mating incompetent cells to generate  $a/a$  or  $\alpha/\alpha$  mating competent cells (reviewed in Bennett and Johnson [13]). However, generation of daughter cells does not occur through meiosis, a process that has never been observed in *C. albicans*, but appears to occur through a parasexual mechanism involving concerted loss of homologous chromosomes [14]. Mating was thought to be initiated between opposite mating-type cells (heterothallism) until a recent report showing that this process can take place between cells of the same sex-determinants (homothallism) [15], suggesting a complex mating mechanism in *C. albicans*. Another feature of *C. albicans* biology is the polymorphic nature of this yeast, that is, it undergoes many morphological transitions, including white-to-opaque switching and yeast-to-hyphae transition (reviewed in Whiteway and Bachewich [16]). White-to-opaque switching is a reversible process (reviewed in Lohse and Johnson [17]) characterized by the conversion of the classical yeast form with a smooth cell-wall appearance under the microscope to an elongated cell with a rough cell-wall appearance. The opaque colonies appear grayish, as compared to white colonies which display the classical creamy color of *C. albicans* cells. This morphological property is particularly required for induction of the mating process, which occurs only in opaque cells, and was also shown to be linked to pathogenesis and virulence [17]. Filamentous growth is another important morphological characteristic of *C. albicans* [16]. The ability of *C. albicans* to switch between yeast and hyphal forms is responsible for its pathogenicity and virulence [18,19]. Indeed, *C. albicans* cells blocked at any of the two morphological states are less virulent [19]. Many growth conditions induce filamentous growth, including growth at neutral pH, high temperature (37°C), nutrient-poor medium and embedment in a semi-solid matrix [16], notably these conditions mimic that of the bloodstream and other niches in the host and thus provide interesting conditions under which one could investigate pathogenesis and virulence determinants of this filamentous fungus.

Upon publication of the diploid *C. albicans* genome (assembly 19) [20], a genome annotation effort was conducted by the *C. albicans* community and allowed to highlight

several characteristics of the genome [21]. This was followed by a recent new haploid version of the genome sequence (assembly 21) and a revision of its content [22]. It is noteworthy that the *C. albicans* genome size (15.8 megabases), the number of genes (6,090) and the proportion of introns are similar to those of *S. cerevisiae* [21,22]. In spite of these similarities, analysis of the genome suggests that *C. albicans* possesses expanded metabolic abilities as compared to *S. cerevisiae* and many genes encode proteins involved in the metabolism of nutrients that are found in the host, some examples include secreted aspartyl proteinases, lipases, high-affinity iron uptake proteins and amino acid permeases [21]. This is not surprising, as *C. albicans* and *S. cerevisiae* colonize different environmental niches. The availability of the *C. albicans* genome sequence was followed by a significant number of genetic and functional genomics studies aimed at better characterizing the transcriptional response of this opportunistic pathogen to environmental changes, including response to antifungal treatment and mechanisms of resistance, hyphal development, pathogenesis and virulence [21,23,20,24,25]. Several studies, particularly those pertaining to the regulation of gene expression and transcription factor function, have shown that *C. albicans*, like other unicellular eukaryotes, has the ability to rapidly and efficiently respond to stimuli in order to adapt to its changing environment. The *C. albicans* genome encodes roughly the same number of transcription factors as the *S. cerevisiae* genome: based on Gene Ontology, 175 genes in the *C. albicans* genome database ([www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)) versus at least 138 in *S. cerevisiae* ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). The distribution of transcription factor families or subfamilies also appear to be similar in both species. Maicas *et al.* conducted an *in silico* analysis of zinc cluster transcription factors in *C. albicans* and found at least 70 members based on a search of the *C. albicans* database at Pasteur Institute ([http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar\\_Fungail/](http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Galar_Fungail/)) [26]. Hence, zinc cluster transcription factors appear to be a major subfamily of transcriptional regulators in fungi. In this review, we present the repertoire of zinc cluster proteins in *C. albicans* and discuss their functions.

### VI.3. Structural features of zinc cluster proteins and their mechanism of activation

Like many other transcription factors, the zinc cluster proteins have a modular structure and are composed of distinct structural and functional domains [5,26,6,7] (Figure 1).



**Figure 1. Structural architecture of the prototype zinc cluster protein Gal4p of *Saccharomyces cerevisiae*.** A. Schematic representation of the primary amino acid sequence of *S. cerevisiae* Gal4p (881 amino acids). Gal4p functional domains are depicted: the DNA binding domain (DBD) comprising the Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster (ZC) region (green box; residues 9-47; Pfam entry PF00172) and the dimerization domain (D, red box; residues 50-106; Pfam entry PF03902), the Fungal\_trans domain (orange box; residues 244-505; Pfam entry PF04082) and two transcriptional activation domains [138]: an amino-terminal (AD1) and a carboxy-terminal (AD2) domains (gray boxes; residues 148-196 and 768-881, respectively). B. Left

panel, three-dimensional structure the DNA-binding domain of the *S. cerevisiae* Gal4p homodimer (ribbon representation) comprising the zinc cluster domain (colored in green) folded around two zinc atoms (yellow spheres) and the dimerization domain (colored in red) with its target DNA (space-filled representation, with the DNA backbone colored in blue) generated using the Deep View/Swiss-PdbViewer (4.0.1 version) program [139] and structural data from Hong and Marmostein [140]. Right panel, a 90° rotation of the left-panel view along the vertical axis. C. Sequence alignment of the cysteine-rich region of the (or putative) DNA-binding domains of *S. cerevisiae* (ScGal4p), *C. albicans* (CaGal4p) and selected *C. albicans* zinc cluster proteins (indicated at the left of the panel). The amino acid positions of each sequence are indicated, respectively, at the beginning and end of the alignment. The six cysteine residues of the zinc cluster motif are indicated by dots. Identical amino acid positions are black-shaded while conserved or similar residues are gray-shaded (dark gray: 6 or 7 conserved positions out of 8; light gray: 5 conserved positions out of 8).

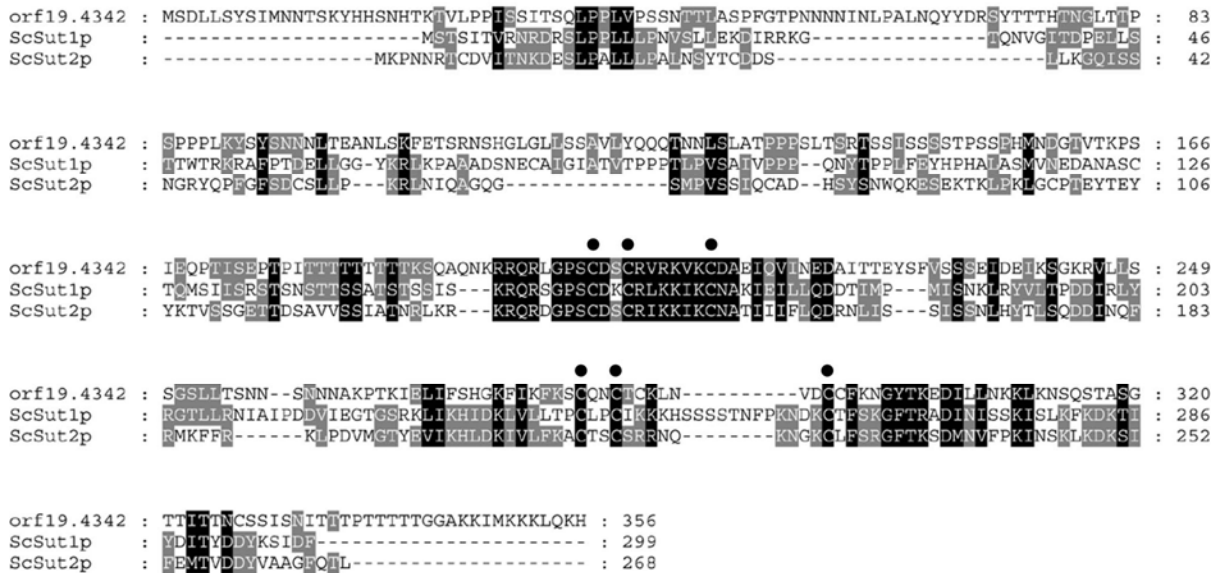
Their DNA-binding domain is usually located at the N-terminus with a few exceptions in which it is located at the C-terminus (e.g. *S. cerevisiae* Ume6p and *C. albicans* Czf1p) [27,28]. The cysteine-rich region which is part of the DNA-binding domain is followed by a linker and a coiled-coil domain which mediates homo- or heterodimerization [29,30,31] (Figure 1). Some zinc cluster proteins harbor a middle homology region (MHR) [6] which is thought to play a regulatory role [32]. The transactivation domain is generally located at the C-terminus and is rich in acidic amino acids [5]. Zinc cluster proteins bind to symmetrical and asymmetrical DNA motifs consisting of two CGG triplets with a variable spacing and oriented as direct, inverted and everted repeats [5], although there are exceptions to this rule. Many zinc cluster proteins constitutively bind to the promoter of their target genes under both activating and non-activating conditions, including Gal4p, Pdr1p, Oaf1p, Pip2p, Leu3p, Hap1p and Put3p [33,34,35,36,37,38,39], a binding property referred to as “condition invariant” [38]. The mechanisms of transcriptional activation include intramolecular conformational changes upon direct binding of ligand molecules [40,41,42]. Indeed, some zinc cluster proteins act as direct sensors of small signaling molecules [37]. These molecules include nutrients, metabolic intermediates, antifungal compounds, chemicals and other molecules such as

heme [43,37,44,45]. Gain-of-function mutations that render the protein constitutively active appeared initially to be localized in the transcriptional activation domain region or in the MHR of the protein, but many additional studies, particularly those aimed at deciphering the mechanisms of drug resistance, revealed that such mutations map to different domains of the zinc cluster proteins [46,47]. Recent studies have established functional and structural homologies among zinc cluster proteins and mammalian nuclear receptors [48,44] (reviewed in Näär and Thakur [49]). *S. cerevisiae* Pdr1p and Pdr3p and *Candida glabrata* Pdr1p, which confer multidrug resistance in these fungi by upregulating the expression of genes encoding drug-efflux pumps [50,51], act as xenobiotic receptors in a mechanistically similar manner as the mammalian xenobiotic pregnane X receptor involved in detoxification [44]. These zinc cluster proteins were shown to possess a xenobiotic-binding domain (XBD) and to interact via their activation domain with the Gal11p subunit of the mediator complex, a functional homologue of the ARC105/MED15 coactivators [44]. Striking functional similarities also exist between the *S. cerevisiae* Oaf1p/Pip2p heteromeric zinc cluster regulators of fatty acid utilization and the nuclear receptor PPAR $\alpha$ /RXR dimer, involved in peroxisomal proliferation and metabolism of fatty acids [48]. These data suggest that the evolutionary process has remodeled the structure of zinc cluster transcription factors from fungi to mammals in order to function adequately in certain conserved biological processes.

#### **VI.4. The repertoire of zinc cluster proteins in *Candida albicans***

The *C. albicans* genome encodes at least 81 proteins with a zinc cluster motif (Table 1, voir ANNEXE à la fin du présent ouvrage). The motif signature is CX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>CX<sub>5-24</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>6-9</sub>C, which is slightly different from the one found in *S. cerevisiae* due to different spacing between cysteines 3 to 4 and 5 to 6. In addition, one atypical putative zinc cluster protein, encoded by orf19.4342, is highly homologous to *S. cerevisiae* Sut1p and Sut2p and has a 69-amino acid spacing between cysteines 3 and 4 (Figure 2). The majority of *C. albicans* putative zinc cluster transcription factors have their DNA-binding domain at

their N-terminus (76 out of 81) and 32 possess the MHR domain in their amino acid sequence (Table 1). Only a small number of zinc cluster proteins have been characterized in details, including Tac1p and Mrr1p which are important regulators of azole resistance and control the expression of multidrug transporters [52,53,54,55], Upc2p, which controls the expression of the ergosterol biosynthetic genes [56,57], Czf1p, involved in filamentation and white/opaque switching [58,59,60,28,61] and Gal4p, which regulates glycolysis [62,63,64]. The function of other zinc cluster genes has also been studied (see below) but the majority of them are still uncharacterized. For these, we temporarily assigned the name “ZCF” for Zinc Cluster Factor, followed by a number (see Table 1 and the *Candida* Genome Database at [www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)).



**Figure 2. Sequence alignment of the Sut1p homologues.** Homology between the gene products of *C. albicans* orf19.4342 and *S. cerevisiae* *SUT1* and *SUT2*. Amino acid numbering is shown on the right part of the figure. Identical amino acid positions are black-shaded while conserved or similar residues are gray-shaded. The six cysteine residues of the putative zinc cluster-like domains are indicated by dots.

The putative functions of many uncharacterized *C. albicans* zinc cluster proteins can be inferred from the fact that they display high levels of sequence homology with zinc cluster proteins of known functions in *S. cerevisiae* (Table 1). This is likely the case for *ARG81*, *DAL81*, *LYS14*, *MAL13*, *PPR1*, *SEF1*, *CTA7* (alias *STB4*), *STB5*, *PUT3*, *TEA1*, *LEU3* and *UGA3* (Table 1). However, it is important to keep in mind that transcriptional rewiring between *S. cerevisiae* and *C. albicans* may have modified the function of many members of this family in *C. albicans* [65], a good example being Gal4p [63] (see below). Thus a careful assignment of the functions to these factors needs to be conducted experimentally and the name of many genes of this family, which was based on the *S. cerevisiae* nomenclature, needs to be modified accordingly, as recently suggested by Arnaud and colleagues to the *Candida* community [66].

Interestingly, a number of the *S. cerevisiae* zinc cluster proteins possess significant sequence homology with more than one gene product in *C. albicans*, suggesting the formation of small gene-families in *C. albicans* through successive gene duplication events from a shared unique ancestor (Table 2). For instance, more than one homolog of the *S. cerevisiae* *LYS14*, *UGA3*, *RDS2* and *ARG81* genes were found in *C. albicans*. Some of these duplicated ORFs are still located in close proximity in the genome, one example being the *C. albicans* *LYS142* (orf19.4778) and *LYS143* (orf19.4776) genes. Other potential duplicated ORFs within this family of regulators have no apparent *S. cerevisiae* homologues, including the *TAC1* locus region, where three homologous genes (orf19.3187, orf19.3188 and orf19.3190) are found as tandem repeats on chromosome 5 (Table 2, Figure 3A). Another example is the *CTA4* locus region on chromosome 3, where three homologous genes are found (orf19.7371, orf19.7372 and orf19.7374) (Table 2, Figure 3B). Notably, these tripartite groups of zinc cluster genes carry at their centers the loci of *TAC1* (orf19.3188) and *MRR1* (orf19.7372), respectively, encoding regulators of clinical azole resistance in *C. albicans* [53,55] (Figure 3, see below). Finally, many putative zinc cluster proteins (with ZCF nomenclature) do not have close homologues in *S. cerevisiae*

(Tables 1 and 2), suggesting that they participate in cellular processes specific to *C. albicans*.

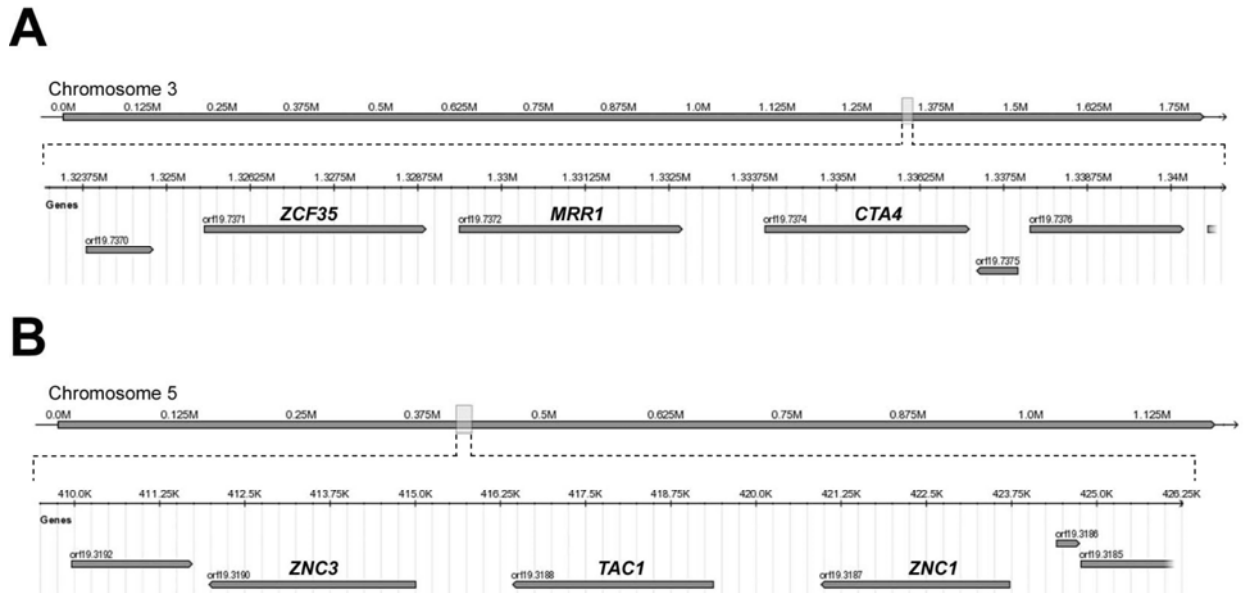
**TABLE 2.** Groups of paralogs<sup>a</sup> among *C. albicans* zinc cluster proteins

Group name <sup>b</sup>	Genes <sup>c</sup>
Lys14p family	<i>LYS14</i> (orf19.5548), <i>LYS142</i> (orf19.4778), <i>LYS143</i> (orf19.4776), <i>LYS144</i> (orf19.5380)
Sef1p paralogs	<i>SEF1</i> (orf19.3753), <i>SEF2</i> (orf19.1926)
Arg81p paralogs	<i>ARG81</i> (orf19.4766), <i>ARG83</i> (orf19.2748)
Uga3p family	<i>UGA3</i> (orf19.7570), <i>UGA32</i> (orf19.6038), <i>UGA33</i> (orf19.7317)
Tac1p family ( <i>C. albicans</i> -specific)	<i>ZNC1</i> (orf19.3187), <i>TAC1</i> (orf19.3188), <i>ZNC3</i> (orf19.3190)
Cta4p family ( <i>C. albicans</i> -specific)	<i>CTA4</i> (orf19.7374), <i>MRR1</i> (orf19.7372), <i>ZCF29</i> (orf19.5133), <i>ZCF35</i> (orf19.7371)
Ume6p paralogs	<i>UME6</i> (orf19.1822), <i>UME7</i> (orf19.2745)
Fgr27p family ( <i>C. albicans</i> -specific)	<i>FGR27</i> (orf19.6680), <i>ZCF15</i> (orf19.2753), <i>ZCF26</i> (orf19.4573), <i>ZCF25</i> (orf19.4568)
Rds2p family	<i>CWT1</i> (orf19.5849), <i>ZCF11</i> (orf19.2423), <i>ZCF23</i> (orf19.4450)
Tea1p paralogs	<i>TEA1</i> (orf19.6985), <i>ZCF41</i> (orf19.4998)

<sup>a</sup> Displaying high sequence similarity (top BLASTP e-value of 1.E-20).

<sup>b</sup> Groups containing *C. albicans* specific genes are groups with no clear *S. cerevisiae* homologs. Groups containing only two genes are named “groups of paralogs”. A Family designates the groups containing more than two genes.

<sup>c</sup> Gene name precedes the corresponding orf19 nomenclature (indicated between parentheses).



**Figure 3. Genomic locations of loci encoding highly homologous proteins with zinc cluster motifs.** The *MRR1* (A) and *TAC1* (B) loci encoding zinc cluster proteins involved in azole resistance are flanked, respectively, by loci of genes encoding highly homologous proteins. *MRR1*, on chromosome 3, is flanked by *ZCF35* of unknown function and *CTA4*, involved in nitrosative stress response, while *ZNC1* and *ZNC3* of



unknown functions flank *TAC1* on chromosome 5. The orientation of each open-reading-frame is depicted by the arrowed gray rectangle. The location of each zoomed selected region from the corresponding chromosome (depicted by the upper scaled arrow) is indicated by a rectangle. M, Megabases; K, Kilobases.

## VI.5. The functions of zinc cluster transcription factors in *Candida albicans*

Like their counterparts in *S. cerevisiae*, *C. albicans* zinc cluster proteins are involved in various processes, including antifungal drug resistance, mating, regulation of nonfermentable carbon utilization, carbohydrate metabolism, hyphal growth and pathogenesis and others (Table 3).

**TABLE 3.** Functional grouping of characterized *C. albicans* zinc cluster proteins

Functional grouping <sup>a</sup>	Genes
Carbohydrate metabolism	<i>SUC1, RGT1, GAL4</i>
Utilization of non fermentative carbons	<i>CAT8, CTF1, ASG1</i>
Regulation of filamentous growth	<i>UME6, FGR17, ZCF11, CZF1<sup>b</sup>, FGR27</i>
Production of aromatic alcohols	<i>ARO80</i>
Response to antifungal drugs	<i>TAC1, MRR1, FCRI, UPC2, ZCF18</i>
Response to chemicals	<i>WAR1, CTA4, ZCF9</i>
White-opaque switching	<i>WOR2, CZF1<sup>b</sup></i>
Cell wall integrity	<i>CWT1</i>

<sup>a</sup> Functional grouping based on characterization by mutant phenotype, biochemical or genetic experiments (see text).

<sup>b</sup> *CZF1* is involved in both hyphal growth and white-opaque switching and is thus associated with more than one functional group.

**Carbohydrate metabolism.** The prototype zinc cluster transcription factor is *S. cerevisiae* Gal4p (Figure 1). This protein has been the subject of extensive studies and used as a model of eukaryotic transcription factor function [8]. *S. cerevisiae* Gal4p is activated

upon growth of cells on a medium containing galactose as a carbon source. It controls the expression of *GAL* genes, encoding proteins required for galactose uptake and its metabolism via the glycolytic pathway [8]. *C. albicans* possesses one clear structural homolog of *S. cerevisiae* Gal4p, encoded by orf19.5338 [21]. However, sequence analyses suggested that *C. albicans* Gal4p (CaGal4p) might have a somewhat different function than *S. cerevisiae* Gal4p [21]. This was based on the observation that the *C. albicans* *GAL4* encodes a significantly smaller protein (261 amino acids) than *S. cerevisiae* Gal4p (881 amino acids) and lacks the C-terminal two-thirds of the protein that contains one of two transcription activating domains [21]. A recent study indeed showed that the function of Gal4p in *C. albicans* has rewired [63]. An initial report demonstrated that CaGal4p functions as a transcriptional activator in *C. albicans*, despite a C-terminal domain that is shorter than the corresponding domain in *S. cerevisiae* Gal4p [64]. Strikingly, CaGal4p does not regulate the expression of *GAL* genes in *C. albicans* but rather the expression of glycolytic genes (e.g. *PGI12*, *LSC2* and *LATI*) and of the *TLO* family of subtelomeric genes (whose function is unknown) by binding to the motif CGGN<sub>11</sub>CCG (where N designates any nucleotide) which is the previously characterized *S. cerevisiae* Gal4p binding site [67,63,62]. In *C. albicans*, the *GAL* genes were found to be partly regulated by a transcription factor of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> sub-family of zinc finger proteins, Cph1p [63]. Thus, despite the conservation of the *cis*-acting elements and the DNA-binding domains in both the *S. cerevisiae* and *C. albicans* Gal4p proteins, the functions of the two proteins have considerably diverged. A recent study confirmed the implication of *C. albicans* Gal4p in the glycolytic pathway, using a combination of genome-wide location and expression analyses [62]. Notably, Gal4p collaborates with Tye7p, a basic helix-loop-helix transcription factor, in the control of carbohydrate metabolism in *C. albicans* [62]. Interestingly, while Tye7p appears to act as a global regulator of carbohydrate metabolism and to determine the commitment of the cells to glycolysis, Gal4p appears to have more focused function, being rather involved in late steps of this process [62].

The first zinc cluster transcription factor identified in *C. albicans* is Suc1p. The *SUC1* gene was isolated by its ability to complement sucrose utilization defects in *S. cerevisiae* and *Candida stellatoidea* type II, a sucrase-negative mutant of *C. albicans* [68,69]. *SUC1* complements the function of *S. cerevisiae* *MAL63* encoding a positive regulator of maltose fermentation, indicating that *C. albicans* has elaborated a mechanism enabling it to use diet disaccharides as a source of glucose. Another zinc cluster regulator involved in carbohydrate metabolism is Rgt1p, which represses glucose uptake in *C. albicans* [70]. Under glucose-deplete conditions, Rgt1p downregulates the expression of glucose transporter genes (*HGT*). The activity of Rgt1p is regulated by the high-affinity sugar sensor Hgt4p, a member of the *HGT* transporter family [71,70]. Consistent with its function in glucose uptake repression, deletion of the *RGT1* gene sensitizes the cells to the toxic glucose analogue 2-deoxyglucose [70]. The Rgt1p target genes, as determined by expression profiling, possess in their promoter a putative Rgt1p-binding site (CGGANNA) identified in *S. cerevisiae* [72,70]. Interestingly, Rgt1p also regulates the expression of *GAL1* as well, whose expression in *S. cerevisiae* is controlled by Gal4p [70]. Moreover, galactose and glucose induce the expression of the same set of genes in *C. albicans* [73], suggesting that both compounds induce the activity of the same regulator. Furthermore, more than half of these induced genes carry Rgt1p-binding site in their promoters, suggesting that Cph1p and Rgt1p collaborate in regulating the expression of the *GAL* genes in *C. albicans* [73,63].

**Utilization of nonfermentatable carbon compounds.** *C. albicans* preferentially uses fermentative carbohydrates for energy production and for sustaining the dynamics of its metabolism. However, under sugar-deplete conditions, *C. albicans* uses alternative carbon sources such as glycerol, lactate, ethanol or fatty acids. The non-fermentative carbon utilization process has been better characterized in *S. cerevisiae* where it relies on a complex network of transcriptional regulation involving at least nine zinc cluster proteins as well as regulators from other classes of transcription factors [recently reviewed by

Turcotte *et al.* [74]]. In *C. albicans*, three zinc cluster proteins have been shown to be involved in the homeostasis of non-fermentative carbon compounds: Cat8p, Ctf1p and Asg1p [75,76,77].

*S. cerevisiae* Cat8p activates the expression of genes involved in gluconeogenesis and those involved in the utilization of lactate, ethanol and glycerol as carbon sources [78,79]. In *C. albicans*, Cat8p was shown to control the expression of *JEN1* encoding a lactate permease [76]. *C. albicans cat8Δ/cat8Δ* mutants grown in lactate or in glycerol have decreased *JEN1* RNA levels [76], indicating that *C. albicans* and *S. cerevisiae* Cat8p share some functional properties. However, recent studies pointed to the fact that the regulation of alternative carbon metabolism in *C. albicans* is significantly different from that in *S. cerevisiae* [80,75]. These authors showed that a *cat8Δ/cat8Δ* mutant has no apparent phenotype on media containing acetate, ethanol or glycerol as the sole carbon source and that Cat8p does not regulate the expression of the core genes required for alternative carbon metabolism (e.g. *FBP1*, *ICLI*, *FOX2*), suggesting that Cat8p function has rewired in *C. albicans* [75]. Interestingly, recent data suggest that acetate and ethanol utilization pathways appear to be controlled by Asg1p [77], another zinc cluster protein homologous to *S. cerevisiae* Asg1p (Activator of stress genes) involved in response to stress [5]. *ASG1* was recently isolated in a genetic screen aimed at identifying *C. albicans* regulators of drug resistance by phenotypic complementation of a *pdr1Δ*, *pdr3Δ* double mutation in *S. cerevisiae* [77]. An *asg1Δ/asg1Δ* mutant was unable to grow on acetate- or ethanol-containing media as unique carbon source, demonstrating that this process requires Asg1p, however these mutant were still able to grow on a glycerol-containing medium [77], suggesting the presence of another pathway mediating specifically glycerol utilization.

Fatty acids can also be used as a nonfermentatable carbon source by fungi. Ramirez and Lorenz identified a regulator of fatty acid degradation (i.e.  $\beta$ -oxidation) in *C. albicans*, Ctf1p, a structural homologue of FarA and FarB which are required for growth on fatty acids in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* [75]. Ctf1p (cutinase transcription

factor 1) encoded by orf19.1499 was named by the annotation group based on its high sequence homology with the cutinase transcription factor of *Nectria hematococca* [21] (Table 1). The homozygous *ctf1*Δ mutant showed normal growth on acetate-, ethanol- or glycerol-containing media but was unable to grow on media supplemented with fatty acids as the sole carbon source (oleate, linoleic acid and olive oil) [75], although this result was contradictory to data by *Coste et al.* showing no effect of *CTF1* deletion on a medium containing oleate [77]. Deletion of *CTF1* strongly decreased the expression of genes involved in β-oxidation, including *POT1*, *POX1* and *ECII*, as well as peroxisome biogenesis (*PEX5*), providing an additional observation supporting a role for Ctf1p in β-oxidation [75].

**Production of aromatic alcohols.** Like other microorganisms, such as bacteria, *C. albicans* senses the presence of other cells by means of signaling molecules such as the aromatic alcohol tyrosol to consequently modulate its growth rate and adapt it to cell density, a process termed quorum sensing [81,82]. Aro80p is involved in the regulation of aromatic alcohol production in both *C. albicans* [83] and *S. cerevisiae* [84]. In *S. cerevisiae*, Aro80p is activated upon growth in a medium containing aromatic amino acids, which leads to elevated expression of genes that metabolize these compounds, including the aromatic transaminase gene *ARO9* and the aromatic decarboxylase gene *ARO10* [84]. Ghosh *et al.* recently showed that in a *C. albicans aro80* mutant, aromatic alcohol production (tyrosol, tryptophol and phenethyl alcohol) was significantly lower than in the wild-type cells [83], indicating that the regulation of this process by Aro80p is conserved between *C. albicans* and *S. cerevisiae*. Whether quorum sensing is altered in the *aro80*Δ/*aro80*Δ awaits further experimentation.

**Regulation of filamentous growth.** Five genes encoding proteins with a zinc cluster motif are involved in the regulation of filamentous growth in *C. albicans* (Table 3), among which *CZF1* and *UME6* have been characterized in details, while *FGR17*, *FGR27*

and *ZCF11* were identified in functional screens and await further functional characterization.

Czf1p is the second zinc cluster transcription factor to be identified in *C. albicans* based on its ability, in a heterologous context, to interfere with pheromone-mediated cell cycle arrest in *S. cerevisiae* [85]. Czf1p was later shown to be involved in the regulation of filamentous growth under specific conditions, which was demonstrated by ectopic overexpression or deletion of the *CZF1* gene in *C. albicans* [58]. *CZF1*-overexpressing strains, embedded in Yeast-Peptone-Sucrose (YPS) agar, underwent rapid formation of hyphae [58]. Conversely, the *czf1Δ/czf1Δ* mutant showed reduced hyphal growth when embedded in YPS or in certain low-ammonia medium at 37°C [58]. The ability of Czf1p to bind directly DNA was demonstrated using *in vitro* gel shift assay [28]. *CZF1* transcript analyses showed that *CZF1* expression is induced during embedded growth and that deletion of *EFG1*, a key regulator of morphogenesis, abolishes *CZF1* expression [60]. *CZF1* negatively regulates its own expression and chromatin immunoprecipitation experiments showed that Czf1p binds *in vivo* to its own promoter [60].

The role of Ume6p in filamentous growth was hypothesized based on the observation that the gene encoding this protein is induced by serum or increasing the temperature to 37°C and is repressed by the Nrg1-Tup1 pathway that regulates filamentous growth in *C. albicans* [86]. Deletion of *UME6* significantly reduced filamentation in Spider medium (a growth medium with low nitrogen and carbon sources), at neutral pH as well as on medium supplemented with serum at 37°C compared to a wild-type strain [86]. Further analyses showed that Ume6p is required for hyphal filament extension and cells lacking *UME6* are avirulent when tested in a mouse model of systemic candidiasis [86]. Another report confirmed the implication of *UME6* in filamentous growth and virulence of *C. albicans*, and showed that *UME6* is an important downstream target of other regulators of filamentous growth including Efg1p, Cph1p and Ras1p [87]. Interestingly, *UME6* transcripts were undetectable under normal growth conditions but strongly induced under

conditions stimulating hyphal development [86,87]. Furthermore, increasing the expression levels of *UME6* is sufficient to induce *C. albicans* filamentation and to confer virulence in mice [88], suggesting that gene-dosage of *UME6* determines hyphal development and virulence. Taken together, these data suggest that Ume6p is a master regulator of *C. albicans* morphogenesis and virulence.

*FGR17* and *FGR27* have been shown to be involved in hyphal growth based on large-scale transposon mutagenesis and haploinsufficiency phenotypes [89], but further specific phenotypic and functional studies are needed to confirm and better understand their putative role in this process. A recent report showed that *ZCF11* mRNA associates with She3p, a member of the She RNA-binding complex that transports specific mRNAs to the hyphal growing tip [90], consistent with a potential role of Zcf11p in hyphal development. It ensues from these studies that members of the zinc cluster family play an important role in the regulation of filamentous growth, and potentially virulence, in *C. albicans*.

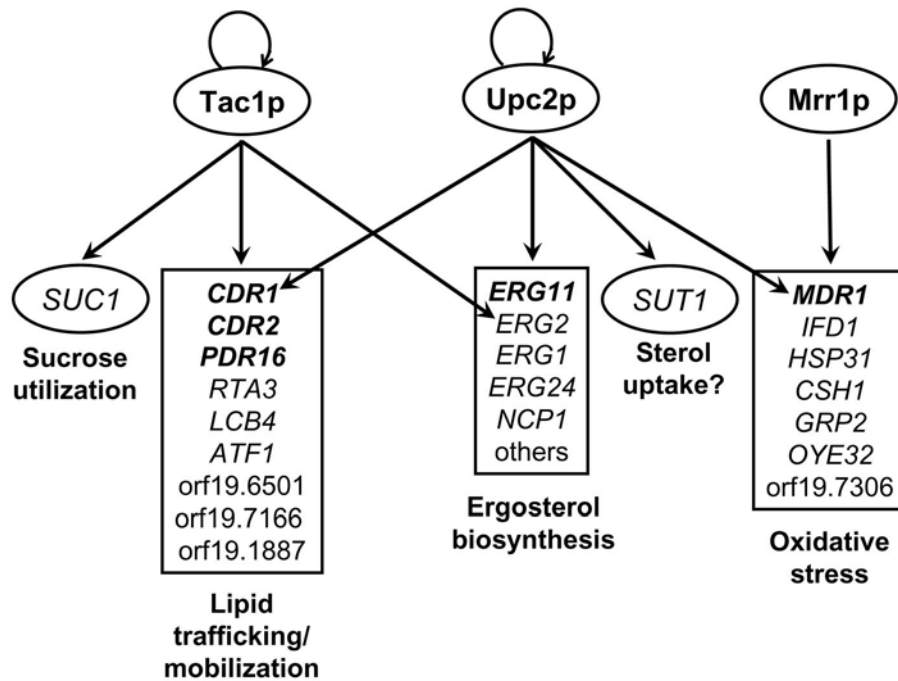
**Resistance to azole drugs and other antifungal agents.** Azoles are cornerstone antifungal agents used for the treatment of virtually all types fungal infections including superficial and invasive infections and are considered as the drugs of choice for treating all forms of candidiasis due to their low toxicity and high efficacy [91,92,93]. Azoles (e.g. fluconazole) inhibit the P450 cytochrome 14 $\alpha$ -lanosterol demethylase (encoded by the *ERG11* gene) involved in the biosynthesis of ergosterol, an important sterol of fungal membranes. However, the fungistatic nature of the azole drugs promotes the selection of mutations conferring clinical resistance [94]. The molecular mechanisms of clinical azole resistance in *C. albicans* include mutations in Erg11p as well as the constitutive upregulation of genes responsible for the drug resistance phenotype: *CDR1* and *CDR2*, encoding ATP-binding cassette (ABC) transporters, *MDR1*, encoding a transporter of the major facilitator superfamily, *PDR16*, coding for a phospholipid transferase, and/or *ERG11* [95,96,97,98,99,100]. The transcriptional regulation of drug resistance in pathogenic fungi has been recently reviewed [46,47]. Among members of the family of zinc cluster proteins,

five transcription factors have been shown to play a role in response to antifungal agents in *C. albicans* (Table 3).

Azole-resistant clinical isolates carry activating mutations in the zinc cluster transcription factor Tac1p, resulting in overexpression of *CDR1*, *CDR2* and *PDR16* [52,96,101] (Figure 4). Tac1p also controls the expression of *CDR1*, *CDR2* and *PDR16* in response to different inducing molecules, such as the neuroleptic drug fluphenazine or the steroid estradiol [53,102,101]. These data are consistent with a model in which Tac1p directly binds these inducers to upregulate its target genes, as shown for other zinc cluster factors. A homozygous *tac1* deletion in an azole-susceptible strain exhibited sensitivity to fluphenazine and terbinafine, but not to fluconazole and other antifungals such as 5-fluorocytosine and caspofungin [53,101]. Deletion of *TAC1* in an azole-resistant clinical isolate overexpressing *CDR1*, *CDR2* and *PDR16*, however, decreased the expression of the three genes as well as fluconazole resistance to levels as low as those detected in the matched-azole susceptible strain in the absence of additional molecular alterations [101], indicating that Tac1p confers azole resistance only when activated. Tac1p localizes to the nucleus and directly interacts with a drug-responsive element (DRE) (CGGA(A/T)ATCGG) located in the promoter of the *CDR1* and *CDR2* genes [53]. Using genome-wide expression and location analyses, it was shown that Tac1p is constitutively bound *in vivo* to the promoter of its targets including *CDR1*, *CDR2*, *PDR16* and several genes involved in lipid trafficking/mobilization and oxidative/osmotic stress response and is responsible for their induction in azole-resistant clinical isolates [103] (Figure 4). This study suggests that one of the biological functions of Tac1p is to enhance the trafficking and mobilization of membrane lipids in addition to protecting the cell against oxidative and osmotic stress. Several different gain-of-function mutations or deletions have been identified in *TAC1* alleles from azole-resistant strains located in various regions of the protein (N977D, N972D, A736V,  $\Delta$ M677, G980E,  $\Delta$ L962-N969, T225A, others) [52,96,53,104,101], consistent with the proposition that precise intramolecular interactions spread along the Tac1p protein are important for preventing the accessibility of the



transcriptional machinery. The mechanism whereby homozygosity of the *TAC1* mutations is achieved involves loss of heterozygosity events via genome rearrangement mechanisms including mitotic recombination between chromosome 5 homologues, chromosome 5 loss followed by duplication of the remaining copy and the formation of isochromosome 5 in *C. albicans* [52,96,105,100].



**Figure 4. Model of the transcriptional regulatory network of azole resistance in *C. albicans* clinical isolates.** The selective pressure during azole drug treatment of *C. albicans* infections leads to the selection of gain-of-function mutations in the zinc cluster proteins Tac1p, Upc2p or Mrr1p. Based on genome-wide expression and location (ChIP-on-chip) studies [107,103,55,106,110], Tac1p, Upc2p and Mrr1p form a transcriptional network regulating azole resistance by directly and positively regulating (straight arrows) the expression of genes encoding effectors of azole resistance (indicated in bold: *CDR1*, *CDR2*, *PDR16*, *ERG11* and *MDR1*). Tac1p direct targets are involved or predicted to be involved in lipid trafficking and mobilization and include *CDR1*, *CDR2*, *PDR16* and others [103]. Upc2p direct targets are involved in ergosterol biosynthesis, including *ERG11* and others [107,110]. Direct targets of Mrr1p [55,106] include genes annotated as oxidoreductases (GO:0016491) and likely involved in oxidative stress response, in addition to *MDR1*. Tac1p and Upc2p also bind and regulate the expression of other zinc cluster transcription factor genes: *SUC1* (involved in sucrose utilization) and *SUT1* (predicted to be involved in sterol uptake by homology to *S. cerevisiae* Sut1p and Sut2p), respectively. Arrowed loops indicate positive autoregulation.

Similar to Tac1p, gain-of-function mutations in the zinc cluster gene *MRR1* (for Multidrug Resistance Regulator 1) results in the constitutive overexpression of *MDR1* [54,55] (Figure 4). The *MRR1* gene was initially identified based upon its constitutive upregulation in azole-resistant clinical isolates overexpressing the *MDR1* gene, possibly due to a positive autoregulatory loop [55]. Deletion of *MRR1* in azole-resistant isolates leads to loss of *MDR1* overexpression accompanied by a marked decrease of azole resistance [55]. Decreased resistance to different metabolic inhibitors such as diamide, brefeldin A and cerulenin was also observed in the *mrr1Δ/mrr1Δ* mutants [55]. Interestingly, a significant level of azole resistance was still persisting in the *mdr1Δ/mdr1Δ* mutants as compared to the matched *mrr1Δ/mrr1Δ* mutants, consistent with the contribution of at least another Mrr1p target in the clinical azole resistance phenotype of these isolates [55]. Mrr1p also controls the induction of *MDR1* RNA by the oxidative stress inducers benomyl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [55], suggesting a role for Mrr1p in oxidative stress response (Figure 4). Like other members of the zinc cluster protein family, it is possible that Mrr1p directly binds these inducer molecules to activate the expression of its target genes. Analyses of the *MRR1* sequences from different isolates identified gain-of-function point mutations that conferred azole resistance, including G997V, P683S, G878E, Q350L, located in different regions of the protein [54]. These mutations are accompanied by loss of heterozygosity events on chromosome 3 where *MRR1* is located [54]. Genome-wide location and expression analyses showed that Mrr1p binds *in vivo* to the promoter of *MDR1* as well as to the promoter of other genes co-upregulated with *MDR1* in clinical isolates and potentially involved in oxidative stress response [55,106] (Figure 4).

Another mechanism of clinical azole resistance is the overexpression of *ERG11* due to activating mutations (G648D and A643T) in the zinc cluster transcription factor Upc2p [107,108] (Figure 4). Like its budding yeast counterparts ScUpc2p and ScEcm22p [109], *C. albicans* Upc2p plays a major role in the regulation of ergosterol biosynthesis (*ERG*) genes and is responsible for a marked increase in mRNA levels of these genes upon fluconazole

treatment [56,57]. A homozygous *C. albicans upc2Δ* mutant is susceptible to several antifungal compounds including azoles, terbinafine, fenpropimorph, and to the statin drug lovastatin [56,57]. Upc2p binds to DNA through the sequence TCGTATA, found in the promoter of several *ERG* genes [56,5]. Like other conditions leading to sterol depletion, such as treatment with lovastatin or growth under hypoxia, azole treatment activates Upc2p [110]. This activation is possibly achieved via an ergosterol-sensing mechanism by Upc2p. Upc2p is also important for aerobic sterol uptake in *C. albicans*, as demonstrated by a discernible reduction in [<sup>14</sup>C] cholesterol accumulation in a *upc2Δ/upc2Δ* strain [57]. Interestingly, while a *S. cerevisiae upc2Δ ecm22Δ* strain is able to grow under anaerobic conditions, growth of a *C. albicans upc2Δ* strain is severely impaired, emphasizing intrinsic differences between these two fungal species [56]. Induction of *ERG11* gene expression by Upc2p under azole treatment requires functional azole-responsive enhancer elements (ARE), which include a perfect SRE in the promoter of *ERG11* [111]. Upc2p does not only regulate the expression of *ERG11* but also that of *CDR1* and *MDR1* in *C. albicans*, although moderately [107,110]. Consistently, a gain-of-function mutation in a *UPC2* allele isolated from an azole resistant clinical strain was shown to confer elevated expression of both *ERG11* and, to a less extent, *MDR1*, demonstrating that Upc2p acts as a moderate activator of *MDR1* in clinical isolates [107] (Figure 4). Genome-wide location studies showed that Upc2p bound *in vivo* to the promoters of *ERG11*, *CDR1* and *MDR1* as well as other *ERG* genes [110] confirming the role of Upc2p in sterol metabolism (Figure 4). Upc2p also binds *in vivo* to its own promoter indicating positive autoregulation [110] an observation confirmed using transactivation assays with a *UPC2* promoter-luciferase reporter fusion tested in a *upc2Δ/upc2Δ* background under different Upc2p-activating conditions [112]. Thus, the fact that Upc2p binds to the promoter of *CDR1* and *MDR1* further suggests a complex interplay between Tac1, Mrr1p and Upc2p in the modulation of clinical azole resistance in *C. albicans* (Figure 4). Interestingly, Upc2p binds to the promoter of orf19.4342, an atypical zinc cluster gene whose product is highly homologous to *S. cerevisiae* Sut1p and Sut2p (Figure 2), and modulates its expression [110]. Sut1p and

Sut2p are involved in sterol uptake and biosynthesis in *S. cerevisiae* [113,114,115,116,117]. Whether or not *C. albicans* Sut1p is involved in sterol metabolism awaits experimental evidences. One could thus speculate that Upc2p may regulate sterol uptake in *C. albicans* by regulating the expression of *SUT1* (Figure 4).

The *FCR1* gene (orf19.6817), encoding a Ser/Thr-rich zinc cluster protein, was isolated by screening a *C. albicans* genomic DNA library for functional complementation of an *S. cerevisiae* mutant (*pdr1Δpdr3Δ*) hypersensitive to fluconazole [118]. This complementation requires the multidrug transporter-gene *PDR5*, the functional homolog of *CDR1* and *CDR2*, consistent with the hypothesis that Fcr1p regulates the expression of *PDR5* in *S. cerevisiae* and, by extension, that of *CDR1* and *CDR2* in *C. albicans* [118]. Unexpectedly, it was found that deleting *FCR1* in *C. albicans* resulted in hyperresistance of the cells to fluconazole, demonstrating that *FCR1* is rather a negative regulator of azole resistance [118]. A report by Shen *et al.* showed that Fcr1p negatively regulates *CDR1* expression in *C. albicans*, although this was observed under unusual experimental conditions [119]. Finally, *ZCF18* was found to confer resistance to virgineone, an antifungal compound synthesized by the saprophytic fungus *Lachnum virgineum*, in a genome-wide haploinsufficiency fitness test screen [120]. Further experiments are needed to confirm the function of Zcf18p and to understand its role in virgineone resistance.

**Response to chemicals.** Response to weak organic acid exposure is a stress response that protects the cell from the toxicity of organic food preservatives or organic acids produced by other microbes such as benzoic, sorbic or acetic acids [121]. *C. albicans* War1p, the functional homolog of *S. cerevisiae* War1p [122], is a regulator of weak acid stress response [123]. Deletion of *WARI* renders the mutant cells hypersensitive to sorbate and, conversely, overexpression of *WARI* results in increased resistance to this compound [123]. Another regulator of adaptation to stress induced by chemicals is Cta4p, which confers resistance to nitric oxide (NO) [124]. NO is generated by macrophages as part of the immune response against pathogens and is thus a natural chemical to which pathogens,

such as *C. albicans*, elaborated protection mechanisms enabling them to resist to its toxicity and survive inside the human body. A NO-responsive element (NORE) consisting of TATTACCGTCCGG found in the promoter of the *YHB1* gene, which encodes a flavohemoglobin conferring protection against NO, was shown to be bound by five regulators of the zinc cluster family using affinity chromatography [124]. Among these regulators was Cta4p, whose deletion was shown to confer hypersensitivity to NO [124]. Deletion of *CTA4* prevents the upregulation of the *YHB1* gene upon nitrosative stress, demonstrating that Cta4p is a transcriptional activator of this gene [124]. Cta4p was shown to constitutively bind to the promoter of the *YHB1* gene [124], as often observed for other members of the zinc cluster family. Finally, the zinc cluster protein Zcf9p was found to confer resistance to toxic ergosterol analogs in a genome-wide haploinsufficiency fitness test assay aimed at characterizing the effect of potential natural antifungal compounds in *C. albicans* [125]. Interestingly, the DNA binding domain of Zcf9p shows moderate homology to that of Upc2p which controls ergosterol biosynthesis. Additional functional studies are needed to understand how *ZCF9* confers protection against these toxic analogs.

**White/opaque switching.** One fascinating feature of *C. albicans* is its capacity to undergo morphology switching between a white and an opaque forms [13,126]. As mentioned above, this property is crucial for *C. albicans* ability to undergo mating, as the opaque form is the mating-competent form [13,126]. White-opaque switching is also a rare event that can be maintained for many generations and a strict condition of its occurrence is homozygosity at the *MTL* locus on chromosome 5 [13]. The zinc cluster proteins Czf1p (which also regulates filamentous growth, see above) and Wor2p were shown to be important determinants of white/opaque switching in *C. albicans* [59,61]. These two proteins are part of a transcriptional regulatory network regulating white-opaque switching, together with Efg1p and Wor1p, in order to maintain the mating-competent opaque state [61]. The hypothesis that Czf1p and Wor2p are involved in white-opaque switching was based on the observation that these genes are upregulated during the white-to-opaque transformation [61]. Deletion of *CZF1* and *WOR2* has a striking effect on white-opaque

switching, with the mutant cells forming opaque colonies much less frequently than the parental wild-type strains [61]. Moreover, ectopic expression of *CZF1* or *WOR2* resulted in opaque cell formation in **a/a** mating-competent cells [61], which further demonstrates the role of these two genes in the induction of the opaque state. Even though *CZF1* contributes to the initiation of the opaque state, it is not required for the inheritance of the opaque state in the subsequent generations [61]. This latter property rather requires *WOR2* [61]. A recent study showed that anaerobic induction of the white–opaque switch is controlled by Czf1p [59], although this was observed in the WO-1 strain that carries additional genomic alterations [59].

**Cell wall integrity.** One zinc cluster protein was shown to be involved in cell wall integrity in *C. albicans* and was therefore named cell wall transcriptional factor (Cwt1p) [127]. Cwt1p displays strong sequence similarity with *S. cerevisiae* Rds2p, a regulator of gluconeogenesis [128,129]. A *cwt1Δ/cwt Δ* mutant displays altered cell wall composition and sensitivity to calcofluor white, congo red and sodium dodecyl sulfate [127]. Cwt1p is mainly expressed during stationary phase and genome-wide expression experiments showed that it regulates the expression of genes involved in different cellular processes including cell wall architecture, protein translation, ribosome biogenesis and a significant number of transcription factor-encoding genes, suggesting that Cwt1p has pleiotropic functions in *C. albicans* [130]. *S. cerevisiae* Rds2p and *C. albicans* Cwt1p belong to a subfamily of 6 homologous proteins in these two yeasts, including in addition to the Rds2p and Cwt1p pair of orthologs, two other pairs of proteins with high sequence homology; one pair consisting of *GSM1* (*YJL103C*) and *ZCF11* (orf19.2423) and another pair represented by *ERT1* (*YBR239C*) and *ZCF23* (orf19.4450). However, the functions of these transcription factors are still unknown.

## VI.6. Conclusion

As observed in a wide variety of organisms, techniques for monitoring gene expression and location of transcription factors on a genome-wide scale have greatly facilitated the characterization of transcriptional regulators in *C. albicans*, as exemplified here with zinc cluster proteins. These global approaches will be invaluable in deciphering the transcriptional regulatory networks involved in the biology and pathogenesis of this fungus. In particular, deciphering the transcriptional regulatory network of zinc cluster proteins will improve our understanding of how *C. albicans* adapt to its changing environment. For example, the model for azole resistance network (depicted in Figure 4) suggests that two important biological pathways are linked to azole resistance: membrane lipid metabolism (lipid trafficking and mobilization, sterol biosynthesis and uptake) and the response to oxidative stress. Thus, analysis of transcriptional regulatory networks using functional genomic tools provides an efficient approach to explain how some transcriptional modules are linked to precise stress responses or other relevant biological pathways.

## VI.7. Future perspectives

Following the pioneering studies performed more than twenty-five years ago on *S. cerevisiae* Gal4p, a large number of zinc cluster proteins have been studied in various fungi. Based on the plethora of sequenced genomes of a wide variety of organisms, it is clear that the cysteine-rich motif of zinc cluster proteins is exclusively fungal. This observation raises the possibility that these proteins could be targets for new antifungal agents. For example, many members of the *C. albicans* family have not been characterized and it is likely that some of them are essential, as observed in *S. cerevisiae*. Thus, a compound that would inhibit the activity of an essential zinc cluster protein could be an attractive candidate for an antifungal drug. Alternatively, a compound targeting most (if not

all) zinc cluster proteins may even be more advantageous. X-ray studies of the DNA binding domains of a number zinc cluster proteins show a remarkable similarity in the three-dimensional structure of the zinc cluster region [5]. This similarity raises the possibility that a single compound would target more than one zinc cluster protein. As stated above, these transcriptional regulators are involved in several important processes such as metabolism and stress response. As a result, even a partial inhibition of the activity of zinc cluster proteins should have a profound impact on *C. albicans* growth. An approach aimed at targeting multiple members of this family (as opposed to targeting a single-essential member) offers the advantage that it would virtually prevent the appearance of resistant strains via mutations in a particular gene encoding a zinc cluster protein. Treatment with a combination of compound targeting zinc cluster proteins and, for example, azoles could be even more effective. Again, because of the conservation of the zinc cluster motif in fungi, targeting this class of factor offers the possibility that a compound active in *C. albicans* may also work in other pathogenic fungi such as *Aspergillus nidulans* or *Cryptococcus neoformans*. Clearly, a proof-of-principle compound would be invaluable to validate this hypothesis and to explore the usefulness of using zinc cluster proteins as targets for antifungal drugs.



## **VI.8. Acknowledgments**

The authors would like to thank Johanne Duhaime and Sandra Weber for assistance in sequence analyses. We are grateful for the availability of the *Candida* Genome Database, which made the identification of the *C. albicans* zinc cluster factors possible. We apologize to our colleagues whose work could not be cited due to space limitations.

## **VI.9. Financial & competing interests disclosure**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.R (MOP-84341, III-94587) and CIHR (grant # MOP-84231) to B.T. S.Z. was supported by a doctoral studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

## VI.10. References

1. Urnov FD: A feel for the template: zinc finger protein transcription factors and chromatin. *Biochem.Cell Biol.* 80(3), 321-333 (2002).
2. Laity JH, Lee BM, Wright PE: Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 11(1), 39-46 (2001).
3. Rastinejad F: Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 11(1), 33-38 (2001).
4. Scazzocchio C: The fungal GATA factors. *Curr.Opin.Microbiol.* 3(2), 126-131 (2000).
5. MacPherson S, Larochelle M, Turcotte B: A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 70(3), 583-604 (2006).
6. Schjerling P , Holmberg S: Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 24(23), 4599-4607 (1996).
7. Todd RB , Andrianopoulos A: Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal.Genet.Biol.* 21(3), 388-405 (1997).
8. Traven A, Jelicic B, Sopta M: Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep.* 7(5), 496-499 (2006).
9. Eggimann P, Garbino J, Pittet D: Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect.Dis.* 3(12), 772-785 (2003).
10. Pfaller MA , Diekema DJ: Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin.Microbiol.Rev.* 20(1), 133-163 (2007).
11. Sims CR, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH: Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch.Med.Res.* 36(6), 660-671 (2005).

12. Hull CM, Raisner RM, Johnson AD: Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289(5477), 307-310 (2000).
13. Bennett RJ , Johnson AD: Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu.Rev.Microbiol.* 59, 233-255 (2005).
14. Forche A, Alby K, Schaefer D, Johnson AD, Berman J, Bennett RJ: The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS.Biol.* 6(5), e110- (2008).
15. Alby K, Schaefer D, Bennett RJ: Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* 460(7257), 890-893 (2009).
16. Whiteway M , Bachewich C: Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu.Rev.Microbiol.* 61, 529-553 (2007).
17. Lohse MB , Johnson AD: White-opaque switching in *Candida albicans*. *Curr.Opin.Microbiol.* (2009).
18. Kumamoto CA , Vinces MD: Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 7(11), 1546-1554 (2005).
19. Whiteway M , Oberholzer U: *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr.Opin.Microbiol.* 7(4), 350-357 (2004).
20. Jones T, Federspiel NA, Chibana H *et al*: The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101(19), 7329-7334 (2004).
21. Braun BR, van Het HM, d'Enfert C *et al*: A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS.Genet.* 1(1), 36-57 (2005).
22. van Het HM, Rast TJ, Martchenko M *et al*: Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol.* 8(4), R52- (2007).
23. Garaizar J, Brena S, Bikandi J, Rementeria A, Ponton J: Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 6(7), 987-998 (2006).

24. Wilson D, Thewes S, Zakikhany K *et al*: Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. *FEMS Yeast Res.* 9(5), 688-700 (2009).
25. Nantel A: The long hard road to a completed *Candida albicans* genome. *Fungal.Genet.Biol.* 43(5), 311-315 (2006).
26. Maicas S, Moreno I, Nieto A, Gomez M, Sentandreu R, Valentin E: In Silico Analysis for Transcription Factors With Zn(II)(2)C(6) Binuclear Cluster DNA-Binding Domains in *Candida albicans*. *Comp Funct.Genomics* 6(7-8), 345-356 (2005).
27. Anderson SF, Steber CM, Esposito RE, Coleman JE: UME6, a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*, contains a C-terminal Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster that binds the URS1 DNA sequence in a zinc-dependent manner. *Protein Sci.* 4(9), 1832-1843 (1995).
28. Vines MD , Kumamoto CA: The morphogenetic regulator Czf1p is a DNA-binding protein that regulates white opaque switching in *Candida albicans*. *Microbiology* 153(Pt 9), 2877-2884 (2007).
29. Akache B, MacPherson S, Sylvain MA, Turcotte B: Complex interplay among regulators of drug resistance genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 279(27), 27855-27860 (2004).
30. King DA, Zhang L, Guarente L, Marmorstein R: Structure of a HAP1-DNA complex reveals dramatically asymmetric DNA binding by a homodimeric protein. *Nat.Struct.Biol.* 6(1), 64-71 (1999).
31. Mamnun YM, Pandjaitan R, Mahe Y, Delahodde A, Kuchler K: The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers in vivo. *Mol.Microbiol.* 46(5), 1429-1440 (2002).
32. Poch O: Conservation of a putative inhibitory domain in the GAL4 family members. *Gene* 184(2), 229-235 (1997).
33. Fardeau V, Lelandais G, Oldfield A *et al*: The central role of PDR1 in the foundation of yeast drug resistance. *J.Biol.Chem.* 282(7), 5063-5074 (2007).
34. Karpichev IV, Durand-Heredia JM, Luo Y, Small GM: Binding characteristics and regulatory mechanisms of the transcription factors controlling oleate-

- responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 283(16), 10264-10275 (2008).
35. Ren B, Robert F, Wyrick JJ *et al*: Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 290(5500), 2306-2309 (2000).
  36. Selleck SB , Majors JE: In vivo DNA-binding properties of a yeast transcription activator protein. *Mol.Cell Biol.* 7(9), 3260-3267 (1987).
  37. Sellick CA , Reece RJ: Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends Biochem.Sci.* 30(7), 405-412 (2005).
  38. Harbison CT, Gordon DB, Lee TI *et al*: Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* 431(7004), 99-104 (2004).
  39. Hickman MJ , Winston F: Heme levels switch the function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between transcriptional activator and transcriptional repressor. *Mol.Cell Biol.* 27(21), 7414-7424 (2007).
  40. Des Etages SA, Saxena D, Huang HL, Falvey DA, Barber D, Brandriss MC: Conformational changes play a role in regulating the activity of the proline utilization pathway-specific regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* 40(4), 890-899 (2001).
  41. Wang D, Hu Y, Zheng F, Zhou K, Kohlhaw GB: Evidence that intramolecular interactions are involved in masking the activation domain of transcriptional activator Leu3p. *J.Biol.Chem.* 272(31), 19383-19392 (1997).
  42. Wang D, Zheng F, Holmberg S, Kohlhaw GB: Yeast transcriptional regulator Leu3p. Self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J.Biol.Chem.* 274(27), 19017-19024 (1999).
  43. Sellick CA , Reece RJ: Modulation of transcription factor function by an amino acid: activation of Put3p by proline. *EMBO J.* 22(19), 5147-5153 (2003).
  44. Thakur JK, Arthanari H, Yang F *et al*: A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* 452(7187), 604-609 (2008).
  45. Zhang L , Hach A: Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell Mol.Life Sci.* 56(5-6), 415-426 (1999).
  46. Morschhauser J: Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal.Genet.Biol.* (2009).

47. Sanglard D, Coste A, Ferrari S: Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* 9(7), 1029-1050 (2009).
48. Phelps C, Gburcik V, Suslova E *et al*: Fungi and animals may share a common ancestor to nuclear receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103(18), 7077-7081 (2006).
49. Naar AM , Thakur JK: Nuclear receptor-like transcription factors in fungi. *Genes Dev.* 23(4), 419-432 (2009).
50. Balzi E , Goffeau A: Yeast multidrug resistance: the PDR network. *J.Bioenerg.Biomembr.* 27(1), 71-76 (1995).
51. Tsai HF, Krol AA, Sarti KE, Bennett JE: *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. *Antimicrob.Agents Chemother.* 50(4), 1384-1392 (2006).
52. Coste A, Turner V, Ischer F *et al*: A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* 172(4), 2139-2156 (2006).
53. Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D: TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot.Cell* 3(6), 1639-1652 (2004).
54. Dunkel N, Blass J, Rogers PD, Morschhauser J: Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol.Microbiol.* 69(4), 827-840 (2008).
55. Morschhauser J, Barker KS, Liu TT, BlaB-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD: The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS.Pathog.* 3(11), e164- (2007).
56. MacPherson S, Akache B, Weber S, De D, X, Raymond M, Turcotte B: *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob.Agents Chemother.* 49(5), 1745-1752 (2005).

57. Silver PM, Oliver BG, White TC: Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Eukaryot.Cell* 3(6), 1391-1397 (2004).
58. Brown DH, Jr., Giusani AD, Chen X, Kumamoto CA: Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol.Microbiol.* 34(4), 651-662 (1999).
59. Ramirez-Zavala B, Reuss O, Park YN, Ohlsen K, Morschhauser J: Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS.Pathog.* 4(6), e1000089- (2008).
60. Vinces MD, Haas C, Kumamoto CA: Expression of the *Candida albicans* morphogenesis regulator gene CZF1 and its regulation by Efg1p and Czf1p. *Eukaryot.Cell* 5(5), 825-835 (2006).
61. Zordan RE, Miller MG, Galgoczy DJ, Tuch BB, Johnson AD: Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS.Biol.* 5(10), e256- (2007).
62. Askew C, Sellam A, Epp E *et al.*: Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. *PLoS.Pathog.* 5(10), e1000612- (2009).
63. Martchenko M, Levitin A, Hogues H, Nantel A, Whiteway M: Transcriptional rewiring of fungal galactose-metabolism circuitry. *Curr.Biol.* 17(12), 1007-1013 (2007).
64. Martchenko M, Levitin A, Whiteway M: Transcriptional activation domains of the *Candida albicans* Gcn4p and Gal4p homologs. *Eukaryot.Cell* 6(2), 291-301 (2007).
65. Rokas A , Hittinger CT: Transcriptional rewiring: the proof is in the eating. *Curr.Biol.* 17(16), R626-R628 (2007).
66. Arnaud MB, Costanzo MC, Shah P, Skrzypek MS, Sherlock G: Gene Ontology and the annotation of pathogen genomes: the case of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 17(7), 295-303 (2009).
67. Marmorstein R, Carey M, Ptashne M, Harrison SC: DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* 356(6368), 408-414 (1992).
68. Kelly R , Kwon-Chung KJ: A zinc finger protein from *Candida albicans* is involved in sucrose utilization. *J.Bacteriol.* 174(1), 222-232 (1992).

69. Kwon-Chung KJ, Hicks JB, Lipke PN: Evidence that *Candida stellatoidea* type II is a mutant of *Candida albicans* that does not express sucrose-inhibitable alpha-glucosidase. *Infect.Immun.* 58(9), 2804-2808 (1990).
70. Sexton JA, Brown V, Johnston M: Regulation of sugar transport and metabolism by the *Candida albicans* Rgt1 transcriptional repressor. *Yeast* 24(10), 847-860 (2007).
71. Brown V, Sexton JA, Johnston M: A glucose sensor in *Candida albicans*. *Eukaryot.Cell* 5(10), 1726-1737 (2006).
72. Kim JH, Polish J, Johnston M: Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. *Mol.Cell Biol.* 23(15), 5208-5216 (2003).
73. Brown V, Sabina J, Johnston M: Specialized sugar sensing in diverse fungi. *Curr.Biol.* 19(5), 436-441 (2009).
74. Turcotte B, Liang XB, Robert F, Soontornngun N: Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res.* (2009).
75. Ramirez MA , Lorenz MC: The transcription factor homolog CTF1 regulates {beta}-oxidation in *Candida albicans*. *Eukaryot.Cell* 8(10), 1604-1614 (2009).
76. Soares-Silva I, Paiva S, Kotter P, Entian KD, Casal M: The disruption of JEN1 from *Candida albicans* impairs the transport of lactate. *Mol.Membr.Biol.* 21(6), 403-411 (2004).
77. Coste AT, Ramsdale M, Ischer F, Sanglard D: Divergent functions of three *Candida albicans* zinc-cluster transcription factors (CTA4, ASG1 and CTF1) complementing pleiotropic drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 154(Pt 5), 1491-1501 (2008).
78. Hedges D, Proft M, Entian KD: CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 15(4), 1915-1922 (1995).
79. Tachibana C, Yoo JY, Tagne JB, Kacherovsky N, Lee TI, Young ET: Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8. *Mol.Cell Biol.* 25(6), 2138-2146 (2005).



80. Ramirez MA , Lorenz MC: Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryot.Cell* 6(2), 280-290 (2007).
81. Kruppa M: Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* 52(1), 1-10 (2009).
82. Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM: Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl.Environ.Microbiol.* 72(6), 3805-3813 (2006).
83. Ghosh S, Kebaara BW, Atkin AL, Nickerson KW: Regulation of aromatic alcohol production in *Candida albicans*. *Appl.Environ.Microbiol.* 74(23), 7211-7218 (2008).
84. Iraqui I, Vissers S, Andre B, Urrestarazu A: Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 19(5), 3360-3371 (1999).
85. Whiteway M, Dignard D, Thomas DY: Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89(20), 9410-9414 (1992).
86. Banerjee M, Thompson DS, Lazzell A *et al*: UME6, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. *Mol.Biol.Cell* 19(4), 1354-1365 (2008).
87. Zeidler U, Lettner T, Lassnig C *et al*: UME6 is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 9(1), 126-142 (2009).
88. Carlisle PL, Banerjee M, Lazzell A, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL, Kadosh D: Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106(2), 599-604 (2009).
89. Uhl MA, Biery M, Craig N, Johnson AD: Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C.albicans*. *EMBO J.* 22(11), 2668-2678 (2003).
90. Elson SL, Noble SM, Solis NV, Filler SG, Johnson AD: An RNA transport system in *Candida albicans* regulates hyphal morphology and invasive growth. *PLoS.Genet.* 5(9), e1000664- (2009).

91. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ *et al*: Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin.Infect.Dis.* 48(12), 1695-1703 (2009).
92. Ostrosky-Zeichner L , Pappas PG: Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 34(3), 857-863 (2006).
93. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD *et al*: Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin.Infect.Dis.* 38(2), 161-189 (2004).
94. Anderson JB: Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat.Rev.Microbiol.* 3(7), 547-556 (2005).
95. Akins RA: An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med.Mycol.* 43(4), 285-318 (2005).
96. Coste A, Selmecki A, Forche A *et al*: Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot.Cell* 6(10), 1889-1904 (2007).
97. Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S: Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol.Med.* 8(2), 76-81 (2002).
98. Morschhauser J: The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim.Biophys.Acta* 1587(2-3), 240-248 (2002).
99. Saidane S, Weber S, De D, X, St Germain G, Raymond M: PDR16-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Mol.Microbiol.* 60(6), 1546-1562 (2006).
100. Selmecki A, Gerami-Nejad M, Paulson C, Forche A, Berman J: An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. *Mol.Microbiol.* 68(3), 624-641 (2008).
101. Znaidi S, De D, X, Weber S, Rigby T, Nantel A, Raymond M: The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates PDR16 expression in *Candida albicans*. *Mol.Microbiol.* 66(2), 440-452 (2007).
102. de Micheli M, Bille J, Schueller C, Sanglard D: A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol.Microbiol.* 43(5), 1197-1214 (2002).

103. Liu TT, Znaidi S, Barker KS *et al*: Genome-wide expression and location analyses of the *Candida albicans* Tac1p regulon. *Eukaryot.Cell* 6(11), 2122-2138 (2007).
104. Coste AT, Crittin J, Bauser C, Rohde B, Sanglard D: Functional analysis of cis- and trans- acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system. *Eukaryot.Cell* (2009).
105. Selmecki A, Forche A, Berman J: Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* 313(5785), 367-370 (2006).
106. Sellam A, Askew C, Epp E, Lavoie H, Whiteway M, Nantel A: Genome-wide mapping of the coactivator Ada2p yields insight into the functional roles of SAGA/ADA complex in *Candida albicans*. *Mol.Biol.Cell* 20(9), 2389-2400 (2009).
107. Dunkel N, Liu TT, Barker KS, Homayouni R, Morschhauser J, Rogers PD: A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot.Cell* 7(7), 1180-1190 (2008).
108. Heilmann CJ, Schneider S, Barker KS, Rogers PD, Morschhauser J: An A643T mutation in the transcription factor Upc2p causes constitutive ERG11 upregulation and increased fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob.Agents Chemother.* (2009).
109. Vik A , Rine J: Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 21(19), 6395-6405 (2001).
110. Znaidi S, Weber S, Al Abdin OZ *et al*: Genomewide location analysis of *Candida albicans* Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance. *Eukaryot.Cell* 7(5), 836-847 (2008).
111. Oliver BG, Song JL, Choiniere JH, White TC: cis-Acting elements within the *Candida albicans* ERG11 promoter mediate the azole response through transcription factor Upc2p. *Eukaryot.Cell* 6(12), 2231-2239 (2007).
112. Hoot SJ, Oliver BG, White TC: *Candida albicans* UPC2 is transcriptionally induced in response to antifungal drugs and anaerobicity through Upc2p-dependent and -independent mechanisms. *Microbiology* 154(Pt 9), 2748-2756 (2008).
113. Alimardani P, Regnacq M, Moreau-Vauzelle C *et al*: SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose

- synergistic action is sufficient for this process. *Biochem.J.* 381(Pt 1), 195-202 (2004).
114. Bourot S , Karst F: Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* SUT1 gene involved in sterol uptake. *Gene* 165(1), 97-102 (1995).
  115. Ness F, Bourot S, Regnacq M, Spagnoli R, Berges T, Karst F: SUT1 is a putative Zn[II]2Cys6-transcription factor whose upregulation enhances both sterol uptake and synthesis in aerobically growing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Eur.J.Biochem.* 268(6), 1585-1595 (2001).
  116. Regnacq M, Alimardani P, El Moudni B, Berges T: SUT1p interaction with Cyc8p(Ssn6p) relieves hypoxic genes from Cyc8p-Tup1p repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* 40(5), 1085-1096 (2001).
  117. Rutzler M, Reissaus A, Budzowska M, Bandlow W: SUT2 is a novel multicopy suppressor of low activity of the cAMP/protein kinase A pathway in yeast. *Eur.J.Biochem.* 271(7), 1284-1291 (2004).
  118. Talibi D , Raymond M: Isolation of a putative *Candida albicans* transcriptional regulator involved in pleiotropic drug resistance by functional complementation of a *pdr1 pdr3* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 181(1), 231-240 (1999).
  119. Shen H, An MM, Wang dJ *et al*: Fcr1p inhibits development of fluconazole resistance in *Candida albicans* by abolishing CDR1 induction. *Biol.Pharm.Bull.* 30(1), 68-73 (2007).
  120. Ondeyka J, Harris G, Zink D *et al*: Isolation, structure elucidation, and biological activity of virgineone from *Lachnum Wirgineum* using the genome-wide *Candida albicans* fitness test. *J.Nat.Prod.* 72(1), 136-141 (2009).
  121. Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M: Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* 147(Pt 10), 2635-2642 (2001).
  122. Kren A, Mamnun YM, Bauer BE *et al*: War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Mol.Cell Biol.* 23(5), 1775-1785 (2003).
  123. Lebel K, MacPherson S, Turcotte B: New tools for phenotypic analysis in *Candida albicans*: the WAR1 gene confers resistance to sorbate. *Yeast* 23(4), 249-259 (2006).

124. Chiranand W, McLeod I, Zhou H *et al*: CTA4 transcription factor mediates induction of nitrosative stress response in *Candida albicans*. *Eukaryot.Cell* 7(2), 268-278 (2008).
125. Xu D, Jiang B, Ketela T *et al*: Genome-wide fitness test and mechanism-of-action studies of inhibitory compounds in *Candida albicans*. *PLoS.Pathog.* 3(6), e92- (2007).
126. Hull CM , Heitman J: Fungal mating: *Candida albicans* flips a switch to get in the mood. *Curr.Biol.* 12(22), R782-R784 (2002).
127. Moreno I, Pedreno Y, Maicas S, Sentandreu R, Herrero E, Valentin E: Characterization of a *Candida albicans* gene encoding a putative transcriptional factor required for cell wall integrity. *FEMS Microbiol.Lett.* 226(1), 159-167 (2003).
128. Moreno I, Tutrone N, Sentandreu R, Valentin E: *Saccharomyces cerevisiae* Rds2 transcription factor involvement in cell wall composition and architecture. *Int.Microbiol.* 11(1), 57-63 (2008).
129. Soontorngun N, Larochelle M, Drouin S, Robert F, Turcotte B: Regulation of gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rds2. *Mol.Cell Biol.* 27(22), 7895-7905 (2007).
130. Moreno I, Castillo L, Sentandreu R, Valentin E: Global transcriptional profiling of *Candida albicans* *cwt1* null mutant. *Yeast* 24(4), 357-370 (2007).
131. Li D , Kolattukudy PE: Cloning of cutinase transcription factor 1, a transactivating protein containing Cys6Zn2 binuclear cluster DNA-binding motif. *J.Biol.Chem.* 272(19), 12462-12467 (1997).
132. Vershon AK , Pierce M: Transcriptional regulation of meiosis in yeast. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12(3), 334-339 (2000).
133. Lan CY, Rodarte G, Murillo LA *et al*: Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol.Microbiol.* 53(5), 1451-1469 (2004).
134. Maccallum DM, Castillo L, Nather K *et al*: Property differences among the four major *Candida albicans* strain clades. *Eukaryot.Cell* 8(3), 373-387 (2009).
135. Groom KR, Heyman HC, Steffen MC, Hawkins L, Martin NC: *Kluyveromyces lactis* SEF1 and its *Saccharomyces cerevisiae* homologue bypass the unknown essential function, but not the mitochondrial RNase P function, of the *S. cerevisiae* RPM2 gene. *Yeast* 14(1), 77-87 (1998).

136. Kaiser B, Munder T, Saluz HP, Kunkel W, Eck R: Identification of a gene encoding the pyruvate decarboxylase gene regulator CaPdc2p from *Candida albicans*. *Yeast* 15(7), 585-591 (1999).
137. Gray WM , Fassler JS: Isolation and analysis of the yeast TEA1 gene, which encodes a zinc cluster Ty enhancer-binding protein. *Mol.Cell Biol.* 16(1), 347-358 (1996).
138. Johnston M: A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Rev.* 51(4), 458-476 (1987).
139. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC: SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31(13), 3381-3385 (2003).
140. Hong M, Fitzgerald MX, Harper S, Luo C, Speicher DW, Marmorstein R: Structural basis for dimerization in DNA recognition by Gal4. *Structure.* 16(7), 1019-1026 (2008).

## VII. Discussion et perspectives

### VII.1. Régulation de la résistance aux antifongiques azolés par le facteur de transcription Tac1p

#### VII.1.1. Contrôle de l'expression du gène *PDR16* par Tac1p et implication d'un second facteur dans la régulation transcriptionnelle de *CDR1* et *PDR16*

La démonstration, au chapitre 2, que Tac1p contrôle l'expression de *PDR16* en plus de *CDR1* et *CDR2* reflète un rôle encore plus important de ce facteur de transcription dans la régulation de la résistance clinique aux antifongiques azolés. Tac1p régule directement l'expression de *PDR16* en se liant *in vivo* à son promoteur, comme décrit au chapitre 3. *PDR16* ne semble pas avoir un motif DRE classique, puisqu'une recherche de la séquence CGGN<sub>4</sub>CGG (ou N désigne un nucléotide quelconque) au promoteur de *PDR16* n'a pas révélé de motif répondant à ce critère. Par contre, le motif CGGATTCGG (CGGN<sub>3</sub>CGG), retrouvé à la position -558 pb relativement au premier nucléotide du codon initiateur de *PDR16*, constitue une séquence ressemblant au DRE et pouvant agir comme un site de liaison de Tac1p. Des données de ChIP-chip récentes, sur une biopuce pangénomique, ont montré que le pic d'enrichissement de la liaison de Tac1p au promoteur de *PDR16* couvre les positions -300 pb à -600 pb relativement au codon initiateur de *PDR16* (Louhichi, F. et Raymond, M., données non publiées). Des études dans notre laboratoire d'essais de transactivation du gène rapporteur luciférase fusionné à différentes constructions du promoteur de *PDR16* ( $P_{PDR16-luc}$ ) ont montré que la délétion de la région comprise entre les nucléotides aux positions -664 pb et -494 pb abolit la transactivation de  $P_{PDR16-luc}$  par la fluphénazine dans la souche sensible 5457 ou sa transactivation constitutive dans l'isolat résistant aux azoles 5674 (De Deken et Raymond, non publié). La mutation de la séquence CGGATTCGG qui se trouve dans cette région du promoteur permettra de déterminer son impact dans la transactivation de  $P_{PDR16-luc}$  et de vérifier si Tac1p se lie *in vivo* au promoteur de *PDR16* via ce motif.

Alors que l'expression de *CDR2* est indétectable dans les souches sensibles aux azoles, celle de *CDR1* et *PDR16* est détectée à des niveaux basaux (Coste *et al.*, 2004; Saidane *et al.*, 2006). La délétion de *TAC1* dans la souche sensible SC5314 n'altère pas l'expression basale de *CDR1* et *PDR16* (chapitre 2, Figure 5). Il existe donc un facteur de transcription autre que Tac1p qui contrôle l'expression basale de ces deux gènes. Notre découverte que l'expression de *CDR1* et *PDR16* est encore inductible par la fluphénazine en l'absence de *TAC1*, révèle la participation d'un autre facteur dans leur contrôle transcriptionnel, probablement celui responsable aussi de leur expression basale. L'observation qu'une délétion des séquences du promoteur de *PDR16* comprises entre les positions -664 pb et -494 pb abolisse l'induction par la fluphénazine du gène rapporteur suggère que les éléments *in cis* reconnus par ce second régulateur sont inclus dans cet intervalle. Il est donc possible que des mutations activatrices (i.e. du type gain de fonction) dans ce facteur de transcription inconnu mènent à des niveaux suffisamment élevés de *CDR1* et *PDR16* pour conférer la résistance aux azoles. Un candidat pouvant jouer le rôle de régulateur de ces deux gènes est Upc2p qui se lie *in vivo* à leur promoteur (chapitre 4). Upc2p semble maintenir l'expression basale de *CDR1* (chapitre 4). Upc2p se lie au promoteur de *PDR16* avec un enrichissement de ~1.5 fois, mais ce résultat ne paraît pas dans la liste des gènes cibles car il ne respectait pas les critères seuils utilisés pour inclure un gène comme cible d'Upc2p. Un essai quantitatif par PCR a montré un enrichissement de 8.6 fois du promoteur de *PDR16* (n=1) après l'immunoprécipitation d'Upc2p (P. Bomme et M. Raymond, données non publiées). Des expériences de buvardage du type Northern au laboratoire ont détecté une baisse de l'induction de l'expression des gènes *CDR1* et *PDR16* dans une souche *upc2Δ/upc2Δ*, ce qui renforce l'hypothèse de l'implication d'Upc2p dans la régulation de ces deux gènes (F. Louhichi et M. Raymond, données non publiées). Par contre, l'analyse de l'expression à l'échelle du génome suite à l'expression d'un allèle d'*UPC2* ayant une mutation gain de fonction identifiée dans une souche clinique résistante aux azoles ne montre pas des taux de transcrits élevés de *CDR1* et/ou *PDR16* (Dunkel *et al.*, 2008b); du moins, pas dans les conditions et le design expérimentaux mis au point par



les auteurs de l'étude. Un autre candidat est la protéine Ndt80p qui est un régulateur positif de l'expression de *CDR1* (Chen *et al.*, 2004a) et se lie *in vivo* à son promoteur (Sellam *et al.*, 2009b). La création d'un double mutant *tac1Δ/tac1Δ*, *upc2Δ/upc2Δ* et *tac1Δ/tac1Δ*, *ndt80Δ/ndt80Δ* permettrait de vérifier cette hypothèse en déterminant si l'induction résiduelle de *PDR16* et *CDR1* est abolie dans ces double mutants. Deux autres candidats possibles sont les facteurs de transcription Znc1p et Znc2p (Coste *et al.*, 2004). Ces deux facteurs de transcription sont hautement homologues à Tac1p et leurs loci sont localisés de part et d'autre du locus de *TAC1*, suggérant que les trois gènes sont issus de la duplication d'un gène ancestral (voir chapitre 6). Chez *S. cerevisiae*, deux régulateurs hautement homologues, Pdr1p et Pdr3p, régulent par redondance l'expression de *PDR5* et *PDR16* (DeRisi *et al.*, 2000). Ces deux protéines sont fonctionnellement homologues à Tac1p. Il est donc possible que, par analogie à Pdr1p et Pdr3p, Tac1p, Znc1p et Znc2p soient fonctionnellement redondants en ce qui a trait à l'induction de l'expression des gènes *CDR1* et *PDR16* par la fluphénazine ou les œstrogènes (Coste *et al.*, 2004; de Micheli *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2006). Une étude récente a montré que l'expression de *ZNC1* est induite suite au traitement par la progestérone, qui active Tac1p, renforçant l'idée que *ZNC1* est un candidat à la régulation transcriptionnelle de la résistance aux azoles (Banerjee *et al.*, 2008a).

### VII.1.2. Mécanismes d'activation de Tac1p

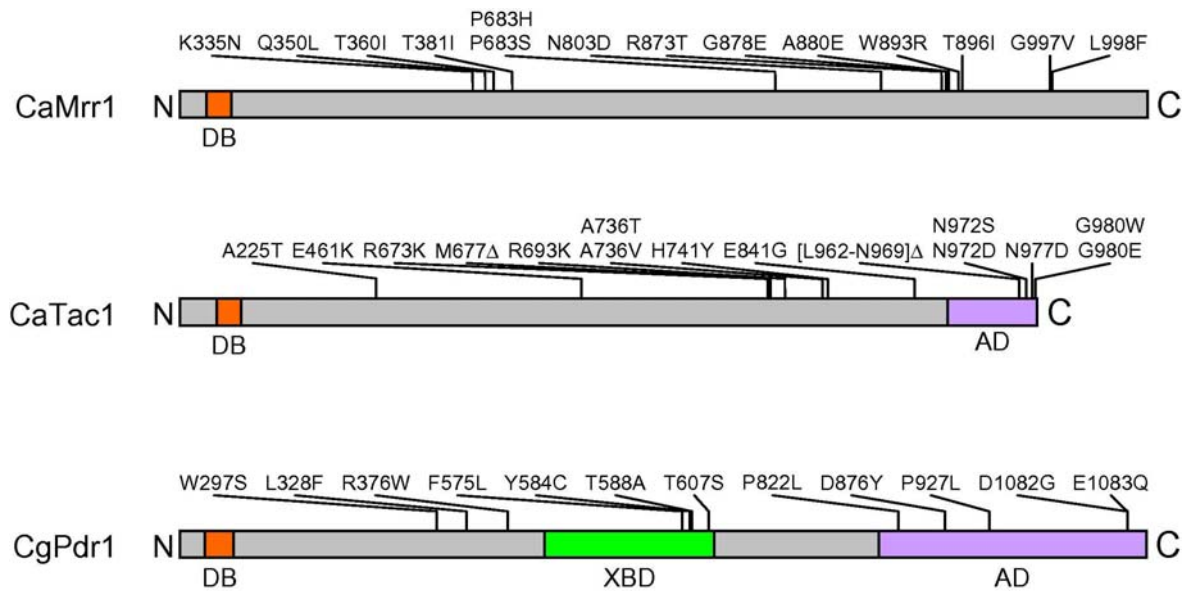
La délétion de *TAC1* dans la souche 5674, qui surexprime *CDR1*, *CDR2* et *PDR16*, était suffisante pour ramener les niveaux des transcrits des trois gènes ainsi que la MIC du fluconazole à des niveaux aussi bas que ceux observés dans la souche parentale sensible 5457 (chapitre 2). Par contre, la délétion de *TAC1* dans la souche sensible SC5314 n'a pas d'effet sur la susceptibilité du mutant au Fluconazole. Ce résultat est important, car il suggère que Tac1p confère la résistance aux azoles uniquement lorsqu'il est activé par des mutations activatrices ou par des inducteurs de son activité. Un résultat similaire a été rapporté dans l'étude de la caractérisation du facteur de transcription Mrr1p, qui contrôle

l'expression du gène *MDRI* (Morschhauser *et al.*, 2007). Cette étude a montré qu'une délétion de *MRR1* dans la souche SC5314 n'avait pas d'effet sur la susceptibilité au fluconazole (Morschhauser *et al.*, 2007). Les auteurs ont expliqué ce résultat par le fait que *MDRI* n'est pas exprimé à des niveaux détectables dans les souches sensibles et donc la présence ou l'absence du facteur de transcription contrôlant son expression n'a pas d'impact sur la résistance aux azoles via *MDRI* dans ces souches. Ceci corrèle avec la démonstration que la délétion de *MDRI* dans une souche sensible aux azoles n'a pas d'effet sur la susceptibilité au fluconazole (Sanglard *et al.*, 1996;Wirsching *et al.*, 2000b), ce qui renforce l'idée que *MDRI* n'est pas exprimé dans des conditions normales de croissance (i.e. en dehors d'un stress quelconque). Donc, comme dans le cas de Tac1p, Mrr1p ne confère la résistance aux azoles que lorsqu'il est activé par des mutations du type gain de fonction ou par des inducteurs de son activité (e.g. diamide, bénomyl).

Tac1p peut être activé transitoirement par la fluphénazine (Coste *et al.*, 2004;de Micheli *et al.*, 2002), les stéroïdes femelles œstradiol (de Micheli *et al.*, 2002) et progestérone (Banerjee *et al.*, 2008a) et la Rhodamine 6G (De Deken et Raymond, non publié). Une étude a démontré que l'exposition de *C. albicans* pendant 24 h à la progestérone augmente la MIC de différents dérivés azolés *in vitro* et corrèle avec une augmentation des transcrits de *CDRI* (Larsen *et al.*, 2006). La pertinence clinique d'un tel résultat reste à vérifier *in vivo* chez des patientes souffrant de candidose. Une autre étude récente montre la remarquable conservation de la réponse transcriptionnelle au traitement par la progestérone chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* via Pdr1p/Pdr3p et Tac1p, respectivement (Banerjee *et al.*, 2008a). Tac1p semble donc être un récepteur de stéroïdes chez *C. albicans*. D'ailleurs, la fluphénazine et la rhodamine 6G, qui activent elles aussi Tac1p, sont des composés ayant des similarités structurales avec les stéroïdes. Ils possèdent des noyaux cycliques qui pourraient mimer un noyau stérane stéroïdien.

Tac1p est aussi activé de façon constitutive par des mutations activatrices et une telle mutation a été caractérisée au chapitre 2. Tout comme les autres mutations du type

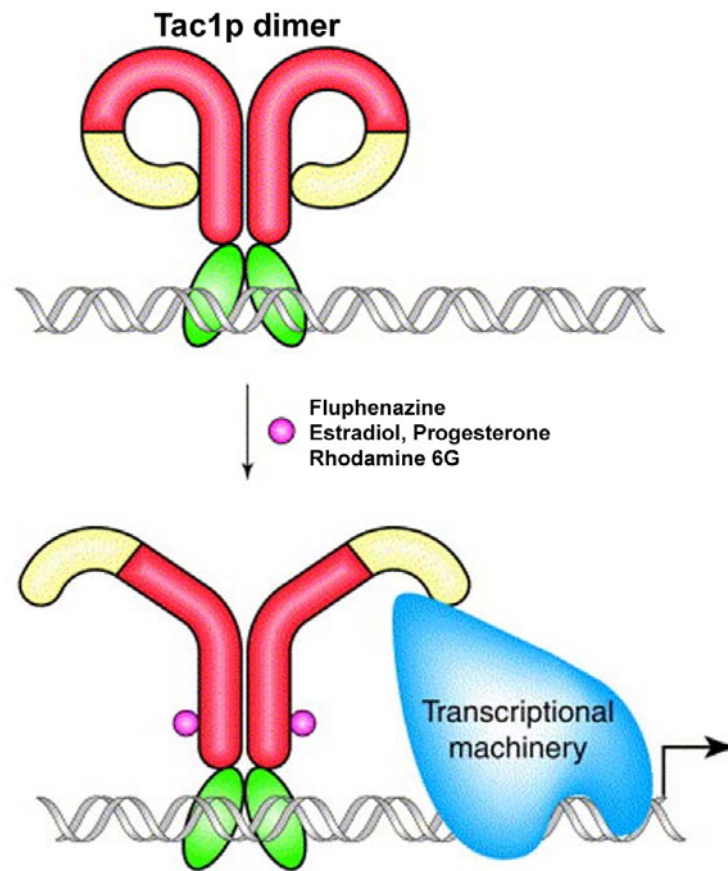
gain de fonction identifiées à date dans Tac1p (Figure VII-1), celle-ci mène à une expression élevée et constitutive des gènes *CDR1*, *CDR2* et *PDR16* et à l'acquisition du phénotype de résistance aux azoles. Ces mutations sont localisées dans différentes régions de la protéine à l'exclusion du domaine de liaison à l'ADN, suggérant que ce dernier n'est pas impliqué dans la régulation de l'activité de Tac1p. D'autres régulateurs de la résistance clinique aux azoles de cette famille (Mrr1p chez *C. albicans* et Pdr1p chez *C. glabrata*) possèdent des mutations activatrices localisées aussi dans la région excluant le domaine de liaison à l'ADN (Figure VII-1). Chez *S. cerevisiae*, de telles mutations ont été caractérisées dans les facteurs de transcription Pdr1p et Pdr3p (Carvajal *et al.*, 1997; Kolaczowska *et al.*, 2002; Nourani *et al.*, 1997; Simonics *et al.*, 2000) ainsi que dans d'autres facteurs comme Gal4p (Gill *et al.*, 1990), Upc2p (Davies *et al.*, 2005), War1p (Gregori *et al.*, 2007), Leu3p (Wang *et al.*, 1997) et Put3p (Des Etages *et al.*, 2001). Les facteurs *zinc cluster* agissent comme des senseurs directs de molécules activatrices qui s'y lient directement (voir chapitre 6), de façon homologue à la famille des récepteurs nucléaires chez les mammifères (Thakur *et al.*, 2008), ce qui suggère que les mutations activatrices qui convertissent ces régulateurs en des protéines hyperactives miment une activation constitutive par leurs ligands. Une étude a confirmé que l'acquisition de telles mutations activatrices est accompagnée du recrutement de coactivateurs, d'éléments du médiateur et de la machinerie de remodelage de la chromatine (Gao *et al.*, 2004).



**Figure VII-1.** Localisation des mutations activatrices retrouvées dans différents régulateurs de la résistance clinique aux azoles de *C. albicans* et *C. glabrata*. Ces mutations ont été décrites dans des isolats cliniques résistants aux azoles. Le domaine de liaison à l'ADN (DB) du type zinc cluster est indiqué en orange. Le domaine de transactivation (AD) putatif est indiqué en violet et le domaine de liaison aux xénobiotiques (XBD) de Pdr1p (Thakur *et al.*, 2008) est coloré en vert. Tiré et adapté de (Morschhauser, 2009).

L'emplacement des mutations activatrices des facteurs *zinc cluster* pourrait renseigner sur les régions de la protéine qui sont impliquées dans son activation. Le fait que ces mutations ne soient pas localisées dans une région précisément délimitée suggère la présence d'une multitude de points de contact protéine-protéine impliqués dans l'activation de ces facteurs. Ceci peut refléter un mécanisme d'activation faisant intervenir un changement de la configuration (ou du repliement) d'une forme inactive de la protéine vers une forme active, avec pour conséquence la perte d'interactions intramoléculaires, le démasquage du domaine d'activation et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Figure VII-2). Une autre possibilité est la perte d'interaction avec un répresseur de l'activité transactivatrice. Ce répresseur peut être une molécule distincte ou un domaine intrinsèque de la protéine. Par exemple, une perte d'interaction entre Gal4p et le répresseur Gal80p est à l'origine de l'activation de Gal4p (Traven *et al.*, 2006). Plusieurs études ayant

pour but de comprendre les mécanismes d'activation des régulateurs Put3p et Leu3p, qui contrôlent le métabolisme des acides aminés proline et leucine, respectivement, ont démontré l'implication d'un changement de la configuration de ces protéines et le démasquage du domaine de transactivation suite à l'induction de l'activité de ces facteurs (Des Etages *et al.*, 2001; Sellick et Reece, 2003; Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Ces observations sont en concordance avec l'hypothèse selon laquelle les facteurs de transcription *zinc cluster* agissent comme des récepteurs nucléaires fongiques avec la présence d'un domaine de liaison à des ligands se liant directement à la protéine (un domaine de liaison aux xénobiotiques (XBD) pour Pdr1p de *C. glabrata* et *S. cerevisiae*) et l'activent en recrutant la machinerie transcriptionnelle et les facteurs de remodelage de la chromatine (Thakur *et al.*, 2008). Il est donc raisonnable de proposer un modèle d'activation de Tac1p semblable à celui de Put3p et Leu3p où Tac1p, en liant directement la fluphénazine, les stéroïdes ou la rhodamine ou en acquérant des mutations activatrices, subit un changement de la configuration qui expose son domaine d'activation pour recruter la machinerie transcriptionnelle (Figure VII-2). Un domaine XBD de Tac1p n'a pas encore été identifié et des expériences supplémentaires sont nécessaires pour démontrer si Tac1p est activé de la même manière que Pdr1p de *C. glabrata* et *S. cerevisiae* (Thakur *et al.*, 2008).



**Figure VII-2.** Modèle d'activation de Tac1p. Tac1p se lie à l'ADN indépendamment de la présence ou l'absence de signaux activateurs (voir chapitre 3) via son domaine de liaison à l'ADN (ovales vertes). La fluphénazine, les stéroïdes femelles ou la rhodamine 6G (sphère rose) activent Tac1p en se liant directement à un domaine de liaison aux ligands de Tac1p. La protéine Tac1p adopte un changement de configuration lui permettant de démasquer et exposer son domaine d'activation (portion jaune de la protéine) à la machinerie transcriptionnelle (colorée en bleue) qui est recrutée au promoteur des gènes cibles. Les mutations activatrices de Tac1p miment une activation constitutive par les ligands, en abolissant des interactions intramoléculaires nécessaires au masquage du domaine de transactivation de la protéine (tiré et adapté de (Sellick et Reece, 2005)).

### VII.1.3. Tac1p est une protéine résidente des promoteurs de ses gènes cibles

Tout comme Leu3p et Put3p ainsi que d'autres facteurs de la famille *zinc cluster*, Tac1p se lie aux promoteurs de ses gènes cibles de façon constitutive indépendamment de la présence ou l'absence d'inducteurs de son activité (chapitre 3 et (Selleck et Majors, 1987)). Ce résultat a été confirmé récemment par Coste *et al.* par immunoprécipitation de la chromatine (Coste *et al.*, 2009) et est en concordance avec l'observation qu'une fusion de Tac1p-GFP est localisée au noyau (Coste *et al.*, 2004). Tout comme Pdr3p ainsi que d'autres membres de la famille des protéines *zinc cluster*, Tac1p semble posséder une séquence de localisation au noyau (NLS) chevauchant avec son domaine de liaison à l'ADN riche en résidus arginine et lysine (Nikolaev *et al.*, 2003). Au laboratoire, j'ai examiné par ChIP-chip la localisation de Tac1p au génome après un traitement prolongé au kétoconazole (suffisant pour activer Tac1p probablement en réponse à une déplétion en stéroïdes) et je n'ai pas observé de différence dans l'enrichissement des cibles identifiées entre la condition traitée et non traitée (données non publiées). Tac1p était activé sous ces conditions, car l'expression des gènes *CDR1* et *CDR2* était induite (T. Liu, K. Barker et D. P. Rogers, données non publiées). Ces observations suggèrent que Tac1p est activé à une étape ultérieure à celle de sa liaison à l'ADN et concorde avec le modèle présenté à la figure VII-2. Ce modèle de régulation transcriptionnelle est référé par « condition invariante » dans l'étude par Harbison *et al.* (2004) visant à étudier le comportement à l'échelle du génome des facteurs de transcription suite à des stimuli externes (Harbison *et al.*, 2004). Chez *S. cerevisiae*, Pdr1p se lie de façon constitutive aux promoteurs de ses cibles et un traitement par la Fluphénazine ne mène pas à une modulation significative de l'intensité de l'enrichissement des fragments d'ADN immunoprécipités ni à un changement des gènes cibles (Fardeau *et al.*, 2007). D'autres études récentes impliquant les régulateurs *zinc cluster* Pip2p et Oaf1p, qui régulent l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras et la  $\beta$ -oxydation, ont montré que la liaison de ces protéines à

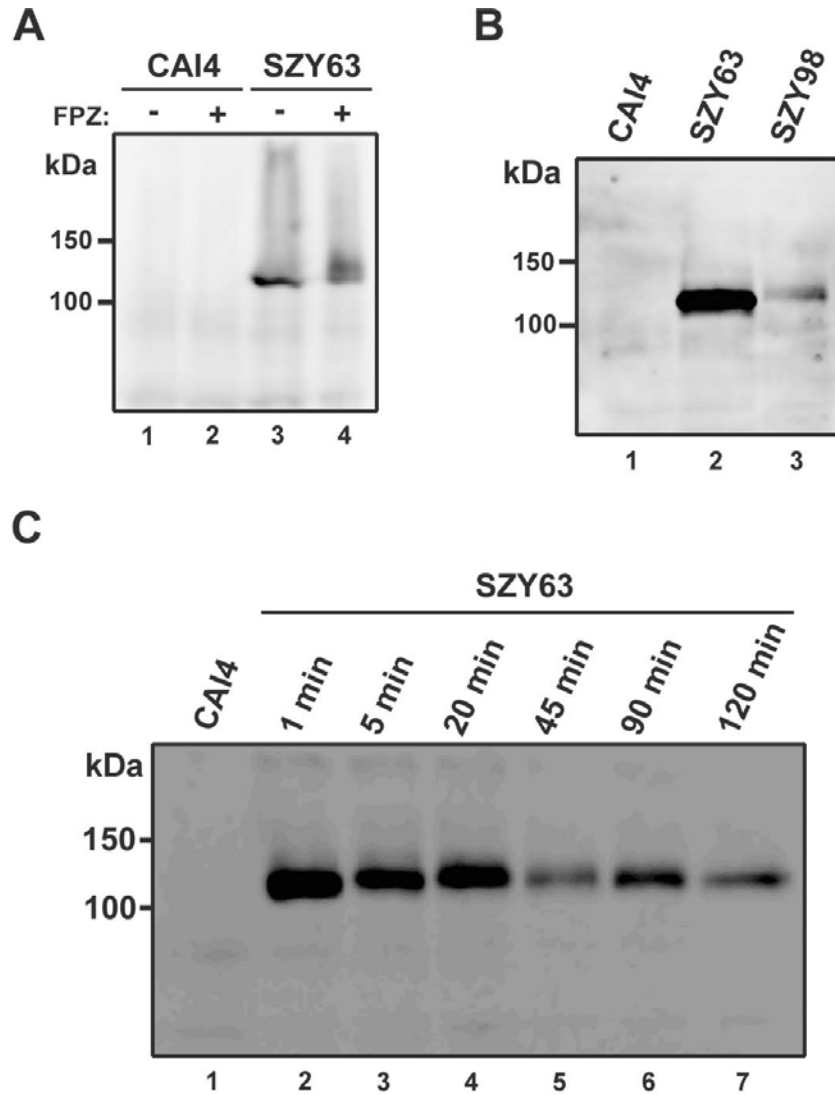
l'ADN est indépendante de la présence ou l'absence d'activateurs comme l'oléate (Karpichev *et al.*, 2008). Donc Tac1p, comme plusieurs autres membres de la famille *zinc cluster*, est une protéine résidente des promoteurs de ses gènes cibles. Une telle propriété fonctionnelle permettrait une réponse transcriptionnelle immédiate aux inducteurs de l'activité de ces régulateurs, contribuant à la rapidité de la réponse au stress ainsi qu'à d'autres signaux provenant de l'environnement.

#### **VII.1.4. Tac1p subit une modification post-traductionnelle lorsqu'il est activé**

Lors de l'étiquetage de Tac1p par l'étiquette moléculaire triple-hémagglutinine (Tac1p-HA<sub>3</sub>, chapitre 3), j'ai examiné la réponse de la protéine de fusion Tac1p-HA<sub>3</sub> aux inducteurs fluphénazine et rhodamine 6G par buvardage du type Western afin de caractériser les souches créées et déterminer si des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, accompagnent l'activation de Tac1p. Cette hypothèse est basée sur l'observation que plusieurs régulateurs de la famille *zinc cluster* sont phosphorylés suite à leur exposition à des conditions activatrices (Leverentz et Reece, 2006). Suite au traitement par la Fluphénazine, un retardement de la mobilité de la bande spécifique à Tac1p-HA<sub>3</sub> est détecté (Figure VII-3A, comparer puits 3 et puits 4). L'introduction de la mutation activatrice N972D dans la protéine Tac1p-HA<sub>3</sub> (Tac1p<sup>N972D</sup>-HA<sub>3</sub>) est aussi accompagnée d'un retardement de la mobilité de la protéine de fusion obtenue (Figure VII-3B, puits 3) ainsi que d'une diminution drastique de l'intensité de la bande spécifique correspondante (Figure VII-3B, puits 3) malgré des quantités d'extraits protéiques similaires (données non montrées). Il est possible qu'une dégradation de la protéine Tac1p accompagne son activation (voir aussi Figure VII-3C). Des études récentes ont montré que l'activation de Gal4p est couplée à sa dégradation par le protéasome (Nalley *et al.*, 2006; Traven *et al.*, 2006). Un tel mécanisme assurerait une réactivité continue des activateurs aux signaux stimulateurs, en limitant la durée de vie de la protéine active. J'ai aussi examiné le patron de migration de la protéine Tac1p-HA<sub>3</sub> au cours du temps suite à



un traitement par la Rhodamine 6G. Un retard de la migration de la bande correspondant au signal de Tac1p-HA<sub>3</sub> est détecté, notablement après 20 minutes de traitement (Figure VII-3C, puits 4). Des essais de traitement à la phosphatase  $\lambda$  dans notre laboratoire ont montré que le retard de la mobilité de la protéine Tac1p-HA<sub>3</sub> après son traitement par la fluphénazine est dû à sa phosphorylation (F. Louhichi et M. Raymond, données non publiées).



**Figure VII-3.** Caractérisation de souches de *C. albicans* exprimant des allèles *TAC1-HA<sub>3</sub>* (SZY63, voir chapitre 3) et *TACIN<sup>972D</sup>-HA<sub>3</sub>* (SZY98) par buvardage du type Western dans différentes conditions activatrices de Tac1p. **A.** Les souches SZY63 et contrôle négatif (CAI4) ont été cultivées en présence (+) ou en l'absence (-) de 50 µg.ml<sup>-1</sup> de fluphénazine pendant 30 minutes. **B.** Les souches CAI4, SZY63 et l'intégrant Tac1p<sup>N972D</sup>-HA<sub>3</sub> (SZY98) ont été cultivées sans traitement dans des conditions normales de croissance en milieu riche. **C.** La souche SZY63 a été traitée durant les temps indiqués avec la rhodamine 6G 50 µM avec comme contrôle négatif des extraits protéiques totaux de la souche parentale non étiquetée CAI4. Toutes les membranes ont été analysées par un anticorps anti-HA monoclonal de souris. Les poids moléculaires des marqueurs sont indiqués à gauche de chaque panneau.

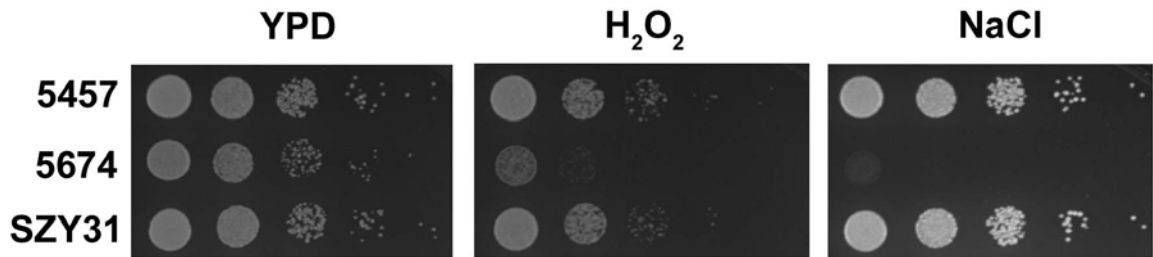
À présent on ne connaît pas la pertinence biologique de la phosphorylation des facteurs *zinc cluster* et si celle-ci est une cause ou une conséquence de l'activation transcriptionnelle (Leverentz et Reece, 2006). Des études sur Gal4p ont montré que deux formes migratoires phosphorylées de la protéine existent dont une est associée à l'activité transcriptionnelle alors que l'autre ne l'est pas (Traven *et al.*, 2006). La phosphorylation de Gal4p ne semble pas être importante pour son activité mais une mutation de la sérine phosphorylée à la position 699 en alanine affecte l'induction des gènes *GAL* lorsque *GAL80* est présent, suggérant que la phosphorylation à cette position confère la stabilisation du complexe Gal4p-Gal80p (Traven *et al.*, 2006). L'identification et la mutagenèse des sites potentiels de phosphorylation de Tac1p devraient permettre d'apprécier l'étendue de l'importance de la phosphorylation dans la fonction de Tac1p, et conséquemment de la résistance aux azoles via *CDR1*, *CDR2* et *PDR16*. Des kinases candidates à la phosphorylation de Tac1p peuvent être proposées suite à des études récentes chez *C. albicans*, *C. glabrata* et *S. cerevisiae*. Une étude par Bruno et Mitchell (2005) a démontré que la sérine/thréonine kinase Ck2p est un régulateur négatif de la résistance aux azoles et module l'expression de *CDR1* et *CDR2* (Bruno et Mitchell, 2005). Mais le fait que cette kinase agisse comme un régulateur négatif rend l'hypothèse qu'elle phosphoryle Tac1p lors de son activation improbable. Chez *S. cerevisiae*, un criblage génétique visant à identifier

des régulateurs de la résistance à des inhibiteurs de la croissance a révélé qu'une troncation de la sérine/thréonine kinase Elm1p supprime la résistance aux composés toxiques via *pdr1-3* (Souid *et al.*, 2006). Il existe un homologue structural d'Elm1p chez *C. albicans* encodé par orf19.5376, malgré une homologie plus élevée à la kinase paralogue Sak1p de *S. cerevisiae*. D'autres études dans *C. glabrata* ont montré un lien génétique entre la kinase activée par les mitogènes (kinase MAP) Slt2p et l'activation de Pdr1p suite à l'identification d'un site de reconnaissance potentiel d'une kinase MAP, P-X-S/T-P (ou X désigne un acide aminé quelconque), dans la séquence de Pdr1p (Katiyar *et al.* 2008, laboratoire du Dr Edlind, présenté au congrès *ASM conference on Candida and Candidiasis*, New Jersey, USA). L'homologue fonctionnel de Slt2p chez *C. albicans* est la protéine Mkc1p impliquée dans l'intégrité cellulaire. Il existe un site potentiel de reconnaissance par une kinase MAP, P-L-S-P, retrouvé aux positions 530-533 de la séquence primaire de la protéine Tac1p, permettant de formuler l'hypothèse que Tac1p est phosphorylé par Mkc1p. L'inactivation des gènes orf19.5376 et *MKCI* pourra être envisagée afin de tester si une perte de fonction de ces kinases altère la phosphorylation de Tac1p.

### **VII.1.5. Fonctions biologiques de Tac1p chez *C. albicans***

Les résultats détaillés aux chapitres 2 et 3 ont permis d'avancer nos connaissances sur la régulation de l'expression des gènes effecteurs de la résistance clinique aux azoles *CDR1*, *CDR2* et *PDR16* ainsi que les réseaux de régulation transcriptionnelle contrôlés par Tac1p chez *C. albicans*. Ces résultats ont permis de suggérer d'autres fonctions cellulaires de Tac1p (voir partie discussion du chapitre 3), mise à part son implication dans la résistance aux azoles. Tac1p est potentiellement impliqué dans le trafic des lipides et leur mobilisation, puisqu'il régule directement l'expression de gènes encodant (ou prédits pour encoder) des enzymes impliqués dans ces processus cellulaires (chapitre 3). Nous avons aussi proposé que Tac1p soit impliqué dans la réponse au stress oxydatif et osmotique puisqu'il régule l'expression de gènes encodant des peroxydases et superoxyde dismutases

comme *GPX2* et *SOD5* ainsi que *IFU5* et *OSM2*, encodant des protéines répondant au stress osmotique. Dans le but de vérifier phénotypiquement si Tac1p est impliqué dans la régulation des fonctions cellulaires suggérées par les expériences de ChIP-chip, j'ai examiné la croissance de souches *tac1Δ/tac1Δ* générées à partir de la souche parentale résistante aux azoles 5674 dans un milieu conférant un stress oxydatif (supplémenté de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou un stress osmotique (supplémenté de NaCl). Les résultats montrent que *TAC1* agit comme un régulateur négatif de la réponse aux stress oxydatif par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et osmotique par NaCl (Figure VII-4). Donc, lorsqu'activé par des mutations gain-de-fonction (ici la mutation N972D), Tac1p confère une hypersensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et au NaCl (Figure VII-4).



**Figure VII-4.** *TAC1* est un régulateur négatif de la réponse aux stress oxydatif et osmotique. Croissance des souches 5457 (sensible aux azoles), 5674 (résistante aux azoles) et le mutant *tac1Δ/tac1Δ* dérivé de l'isolat 5674 (SZY31) sur des milieux riches (YPD) contenant du peroxyde d'hydrogène 2.5 mM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou du chlorure de sodium 1,5 M (NaCl) à 30°C pendant 26h ou 3 jours, respectivement.

Cette observation peut-être expliquée par le fait que *SOD5* est régulé à la baisse dans les souches cliniques résistantes aux azoles avec des mutations activatrices dans Tac1p (chapitre 3). *SOD5* encode une superoxyde dismutase localisée à la membrane plasmique et ayant un rôle protecteur important contre le stress oxydatif et osmotique chez *C. albicans* (Martchenko *et al.*, 2004). En fait, Tac1p semble réguler l'adaptation au stress oxydatif de façon complexe car des études antérieures dans notre laboratoire avaient montré que la souche 5674 est résistante au diamide mais hypersensible au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gauthier *et al.*, 2003). Notamment, Tac1p régule directement et à la hausse l'expression des gènes *IFU5* et orf19.2175 (chapitre 3). *IFU5* encode une protéine hautement homologue à Wwm1p de *S.*

*cerevisiae*. Cette dernière contient un domaine WW impliqué dans les interactions protéine-protéine et s'associe directement à la protéase apparentée à la caspase Mca1p (Szallies *et al.*, 2002). La surexpression de *WWMI* chez *S. cerevisiae* provoque un arrêt de croissance et une mort cellulaire clonale (Szallies *et al.*, 2002). orf19.2175 encode une protéine annotée comme étant un régulateur positif de l'apoptose (<http://www.candidagenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=orf19.2175>) et est hautement homologue à Aif1p (*Apoptosis Inducing Factor 1*) de *S. cerevisiae*. Aif1p est une oxydoréductase mitochondriale effectrice de l'apoptose et transloquant au noyau suite à la perception de signaux proapoptotiques (Wissing *et al.*, 2004). Le fait que Tac1p confère à la fois la sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et au NaCl suggère une hypothèse attirante impliquant Tac1p dans l'induction de l'apoptose par ces composés et faisant de Tac1p un régulateur positif de l'apoptose. Cette hypothèse concorde avec l'observation que les souches cliniques résistantes aux azoles via le sentier *CDR1*, *CDR2* et *PDR16* et possédant des mutations activatrices dans Tac1p accusent un retard de croissance comparativement aux souches parentales sensibles (voir le retard de croissance de la souche 5674 dans l'essai spot de la figure VII-4, panneau YPD). Bien que l'on sache que l'acquisition de la résistance aux azoles est souvent accompagnée d'un coût de croissance (*fitness cost*) (Anderson, 2005), l'observation que Tac1p contrôle l'expression de déterminants positifs de l'apoptose en plus de conférer un phénotype d'hypersensibilité au stress oxydatif et osmotique est frappante. Le fait que Tac1p régule à la baisse le gène *SOD5* pourrait contribuer à rendre les cellules plus sensibles à l'apoptose induite par l'exposition de *C. albicans* aux stress oxydatif et osmotique, puisque Sod5p a un rôle protecteur contre ses stress (Martchenko *et al.*, 2004). Des expériences de détection de marqueurs d'apoptose dans la souche 5674 permettraient de vérifier une telle hypothèse. L'apoptose est un processus conservé chez les mycètes et a été caractérisée chez *S. cerevisiae*, *S. pombe* et *C. albicans* (Ramsdale, 2008). Elle est associée à des changements du métabolisme cellulaire, notamment une fragmentation de l'ADN nucléaire, l'activation de cysteine protéases apparentées aux caspases et l'exposition des phospholipides phosphatidylsérine à la couche externe de la

membrane plasmique, révélée par la liaison de l'annexine V (cinq) (Ramsdale, 2008). Le fait que Tac1p régule l'expression de gènes encodant des floppases (*CDR1*, *CDR2*, *RTA3*) impliqués dans le trafic des phospholipides comme la phosphatidylsérine concorde avec l'hypothèse selon laquelle Tac1p contribuerait à la régulation positive de l'apoptose. Si Tac1p avait un rôle dans l'induction de l'apoptose, il serait intrigant qu'un régulateur positif de ce processus conférant un tel désavantage soit, paradoxalement, un déterminant de la résistance aux xénobiotiques et permettant la survie dans un environnement aussi hostile. Des études dans *C. albicans* ont montré que les antifongiques, comme l'amphotéricine B, induisent l'apoptose chez *C. albicans* (Phillips *et al.*, 2003). Donc, l'apoptose semble être un mécanisme qui a évolué de façon liée à l'exposition des organismes aux xénobiotiques et agents inhibiteurs de la croissance cellulaire chez *C. albicans*.

Alternativement, Tac1p aurait-il ainsi comme rôle physiologique la détoxification des dérivés stéroïdiens toxiques? Plusieurs stéroïdes sont toxiques pour les organismes fongiques, incluant l'œstradiol, la progestérone et les dérivés 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes comme le prégnénolone (le précurseur des stéroïdes), et des mécanismes de détoxification sont requis pour la réponse à un tel stress (Cresnar et Zakelj-Mavric, 2009). À l'inverse des autres organismes fongiques, les stéroïdes semblent induire la prolifération cellulaire, la filamentation et la virulence chez *C. albicans*, quoique ces observations émanent d'expériences d'exposition de *C. albicans* aux hormones stéroïdiennes femelles, mais l'effet de stéroïdes toxiques comme le prégnénolone sur la croissance de *C. albicans* n'a pas encore été testé. La réponse au stress induit par les stéroïdes a été étudiée chez *S. cerevisiae*. Le processus de détoxification implique notamment l'action de l'acétyltransférase Atf2p qui catalyse l'acétylation de ces dérivés stéroïdiens toxiques (Cauet *et al.*, 1999), ainsi que Pdr5p et Snq2p qui les expulsent à l'extérieur de la cellule (Mahe *et al.*, 1996). Le génome de *C. albicans* encode un seul homologue de la protéine Atf2, le gène *ATF1*, et deux homologues fonctionnels de Pdr5p, les gènes *CDR1* et *CDR2*. Les gènes *ATF1*, *CDR1* et *CDR2* sont tous des cibles directes de Tac1p (chapitre 3).

L'étude par Cauet *et al.* a montré que la toxicité du prégnénolone est plus élevée lorsque la mutation *atf2Δ* est introduite dans une souche déficiente en *PDR5* et *SNQ2* (Cauet *et al.*, 1999), ce qui renforce l'hypothèse que les sentiers Pdr1p/Pdr3p de *S. cerevisiae* et Tac1p chez *C. albicans* sont impliqués dans la détoxification des dérivés stéroïdiens toxiques. Une autre étude chez *S. cerevisiae* a montré que lorsque cette levure est exposée au prégnénolone, qui lui est toxique, Atf2p catalyse rapidement son acétylation et contrairement aux stérols non toxiques, ne subit pas l'action de Say1p pour le déacétyler et le retenir dans la cellule; il se voit plutôt réexporté activement à l'extérieur de la cellule (Tiwari *et al.*, 2007) fort probablement via les transporteurs Pdr5p et Snq2p, comme en témoigne la dépendance de ce processus envers l'ATP (Tiwari *et al.*, 2007). Cauet *et al.* ont proposé que la cible des stéroïdes est le produit du gène *ERG2* et plusieurs dérivés stéroïdiens dont la progestérone ont une action inhibitrice sur Erg2p (Cauet *et al.*, 1999). Ceci dit, il est surprenant que lorsqu'il est activé, Tac1p régule justement à la hausse l'expression du gène *ERG2* en se liant *in vivo* à son promoteur (chapitre 3). Il est possible qu'une telle régulation positive de l'expression d'*ERG2* ait pour but d'élever le dosage d'Erg2p pour contrecarrer son inhibition par les stéroïdes. Toujours est-il que toutes ces hypothèses sont basées sur des expériences qui ont été effectuées dans la levure *S. cerevisiae* et la fonction des gènes orthologues impliqués dans ce sentier de détoxification peut avoir été modifiée chez *C. albicans* en raison de l'environnement naturel et la niche écologique de ce pathogène qui sont différents de ceux de la levure *S. cerevisiae*. Il est possible que la fonction de Tac1p ait évolué chez *C. albicans* pour jouer tout simplement le rôle d'un récepteur des stéroïdes afin de transmettre un signal permettant de reprogrammer le métabolisme de *C. albicans* en conséquence, comme par exemple d'induire la filamentation et d'exprimer les déterminants de virulence lorsque les cellules sont en contact avec les œstrogènes ou la progestérone. Les stéroïdes, qui dans ce cas ont une fonction plutôt signalétique, seraient par la suite métabolisés et acétylés par Atf1p pour ensuite être expulsés par les pompes Cdr1p et Cdr2p.

## VII.2. Régulation de la résistance aux antifongiques azolés par le facteur de transcription Upc2p

### VII.2.1. Upc2p régule l'expression de deux autres déterminants de la résistance clinique aux azoles, en plus d'*ERG11*

La démonstration qu'Upc2p régule directement l'expression de deux autres gènes effecteurs de la résistance clinique aux azoles, *CDR1* et *MDR1*, en plus d'*ERG11* place ce facteur de transcription à l'intersection du réseau de régulation des gènes de la résistance aux azoles chez *C. albicans*. Une récente étude de transcriptomique visant à identifier les gènes dont l'expression est modulée par la mutation activatrice G648D de Upc2p (allèle *UPC2<sup>G648D</sup>*), retrouvée dans un isolat clinique, a pu détecter une élévation des transcrits de *MDR1* par un facteur quatre (en moyenne) mais pas de modulation de l'expression du gène *CDR1* (Dunkel *et al.*, 2008b). Il devient donc évident qu'Upc2p contrôle directement l'expression de *MDR1* chez *C. albicans* dans les souches cliniques. Upc2p peut agir comme un activateur ou un répresseur de l'expression de *MDR1* selon le signal activateur (chapitre 4). Donc, il est possible qu'Upc2p confère la résistance aux azoles par la double expression de *MDR1* et *ERG11*. La contribution de chaque effecteur de la résistance peut être adressée par la délétion du gène *MDR1* ou la déplétion induite par régulation à la baisse (e.g. sous le contrôle d'un promoteur réprimé par la tétracycline) de l'expression d'*ERG11* (*ERG11* est un gène essentiel) dans la souche clinique exprimant *UPC2<sup>G648D</sup>*.

Nous avons suggéré un nouveau motif potentiel de liaison d'Upc2p au promoteur de ses cibles, VNCGBDTR, ressemblant au SRE TCGTATA (chapitre 4). Une recherche des motifs potentiel de liaison d'Upc2p aux promoteurs de *CDR1* et *MDR1* a détecté les motifs CTCGTTTA et ATCGCTTA sur le promoteur de *MDR1*, localisés aux positions (relativement au codon initiateur) -466 à -459 et -218 à -211, respectivement, et deux motifs ATCGGATA sur le promoteur de *CDR1* (sur les deux allèles), l'un localisé aux



positions -452 à -445 et chevauchant avec le DRE (-457 à -448) qui est lié par le facteur de transcription Tac1p et l'autre situé entre -360 et -353. Le fait qu'un motif ressemblant au SRE chevauche le motif DRE de reconnaissance par Tac1p suggère qu'Upc2p et Tac1p interagissent ou hétérodimérisent pour contrôler l'expression de *CDR1*. Des études antérieures ont montré que les facteurs de transcription *zinc cluster* forment un réseau d'interaction entre eux de façon complexe avec la présence d'homo- et hétérodimères (Akache *et al.*, 2004). Tout comme dans le cas de la régulation du gène *CDR1*, Upc2p pourrait contrôler en étroite collaboration avec Mrr1p l'expression du gène *MDR1*. Il devient ainsi intéressant de tester si Upc2p, Tac1p et Mrr1p interagissent physiquement, et construire des combinaisons de mutants (doubles, triples) des gènes encodant ces régulateurs pour étudier leur interdépendance dans la régulation des gènes effecteurs de la résistance aux azoles et comprendre les liens biologiques fonctionnels qui les caractérisent en exploitant la génomique fonctionnelle.

## VII.2.2. Mécanismes potentiels d'activation d'Upc2p

Plusieurs études chez *C. albicans* et *S. cerevisiae* ont visé à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation du facteur de transcription Upc2p et son rôle dans la cellule. Upc2p, comme dans le cas des protéines se liant aux éléments régulateurs de stérol (*sterol regulatory element-binding proteins*, SREBPs) chez les mammifères, est activé suite à une déplétion de la quantité des stérols cellulaires. Ceci est possible en traitant les cellules par une statine inhibant l'hydroxyméthyl-Glutaryl-Coenzyme A (HMGC<sub>o</sub>A) réductase ou bien par le traitement aux azoles qui inhibent Erg11p (chapitre 4). L'hypoxie mène aussi à une déplétion en stérols puisque les enzymes de biosynthèse de l'ergostérol nécessitent l'oxygène pour leur fonction (Davies et Rine, 2006) et comme nous l'avons vu au chapitre 4, Upc2p est activé par l'hypoxie chez *C. albicans*. Les SREBPs sont intégrés à la membrane du réticulum endoplasmique via deux hélices  $\alpha$  transmembranaires et contiennent un domaine amino-terminal capable d'agir comme un facteur de transcription de la famille *leucine-zipper* hélice-boucle-hélice

(Espenshade et Hughes, 2007). SREBP interagit avec Scap (*SREBP-cleavage activating protein*) qui est une protéine senseur de la teneur des stérols membranaires via ses domaines transmembranaires (Espenshade et Hughes, 2007). En cas de déplétion en stérols, SREBP perd son interaction avec Scap au réticulum endoplasmique (impliquant une perte d'interaction avec un troisième partenaire, Insig) et subit un clivage qui produit un facteur de transcription dont la translocation au noyau active la transcription des gènes répondant à un tel stress. Il existe une hypothèse selon laquelle Upc2p et Ecm22p sont fonctionnellement homologues aux SREBPs. Des études par le laboratoire de Theodore C. White ont examiné la localisation d'Upc2p et Ecm22p chez *S. cerevisiae* et ont montré une localisation périnucléaire et membranaire de ces protéines fusionnées à la GFP par des techniques de microscopie de fluorescence et cytométrie en flux (Marie *et al.*, 2008). La localisation de ces protéines au niveau des régions périnucléaires augmente lorsque les cellules sont traitées par les azoles (Marie *et al.*, 2008). Les auteurs ont conclu que la concentration de la localisation d'Upc2p et Ecm22p dans des ilots périnucléaires suite à leur activation par les azoles suggère un fonctionnement similaire aux SREBPs.

Comme le cholestérol, l'ergostérol est insoluble dans un solvant polaire. Donc, un mécanisme senseur de la quantité de tels stérols dans la cellule requiert une protéine ou un activateur transcriptionnel capable de sentir directement la teneur des stérols dans la membrane, puisque cette dernière constitue un solvant organique adéquat pour ces molécules. Donc, le modèle et l'hypothèse selon laquelle Upc2p peut sentir directement la teneur en stérols dans la membrane de façon fonctionnellement homologue aux SREBPs des mammifères est attirant. Mais des différences fonctionnelles notables entre Upc2p de *C. albicans* et Upc2p de *S. cerevisiae*, en plus des différences dans la biologie des deux organismes, peuvent faire qu'un tel modèle ne soit pas applicable chez *C. albicans*. On sait par exemple qu'un mutant *upc2Δ*, *ecm22Δ* de *S. cerevisiae* est capable de croître en anaérobiose, alors qu'un mutant *upc2Δ/upc2Δ* de *C. albicans* ne l'est pas (MacPherson *et al.*, 2005). L'analyse bioinformatique de la séquence primaire d'Upc2p dans le but de chercher des domaines transmembranaires potentiels n'a pas donné de résultats

convaincants, vu l'hétérogénéité des prédictions par les programmes utilisés. Dans notre laboratoire, Upc2p a pu être exprimé en fusion avec une étiquette moléculaire aminoterminal HA<sub>3</sub> à partir de son propre locus sous le contrôle de ses éléments de régulation endogènes moyennant l'approche d'étiquetage moléculaire par recombinaison homologue décrite au chapitre 3 (O. Zin Al-Abdin et M. Raymond, données non publiées). Des analyses par buvardage Western n'ont pas montré d'évidence de clivage de la protéine de fusion suite à une activation par le traitement au fluconazole (O. Zin Al-Abdin et M. Raymond, données non publiées), ce qui éloigne la possibilité que Upc2p de *C. albicans* soit activé d'une manière similaire aux SREBPs par clivage protéolytique. Le fait qu'Upc2p soit membre des facteurs de transcription *zinc cluster* converge plutôt vers un modèle d'activation similaire à celui de Tac1p (Figure VII-2) et des récepteurs nucléaires des mammifères avec un domaine liant une molécule activatrice (Thakur *et al.*, 2008). Une étude chez *S. cerevisiae* portait sur la caractérisation de la mutation activatrice d'Upc2p, G888D, et a suggéré un modèle selon lequel une perte d'interaction avec un répresseur (que ce soit une molécule distincte ou un domaine intrinsèque de la protéine) a lieu lors de l'activation d'Upc2p (Davies *et al.*, 2005). Un tel modèle est basé sur l'observation que l'introduction de n'importe quel acide aminé plus large que la glycine à la position 888 de la protéine mène à une activation constitutive du régulateur (Davies *et al.*, 2005). Ce modèle est supporté par l'identification d'une mutation activatrice d'Upc2p, G648D, dans un isolat clinique de *C. albicans* résistant aux azoles qui, de par sa localisation et nature, est équivalente à la mutation G888D chez *S. cerevisiae* et nous fait pencher plutôt vers l'adoption d'un mécanisme d'activation similaire à celui des autres membres de la famille *zinc cluster* par changement de la configuration de la protéine et exposition du domaine de transactivation à la machinerie transcriptionnelle. Par contre, on ne sait pas si Upc2p lie directement l'ergostérol et si ce facteur de transcription agit comme senseur direct d'une déplétion en stérols. On sait par contre que la HMG CoA réductase est un enzyme clé de la biosynthèse des stérols et constitue une étape déterminante dans ce processus, c'est pourquoi cet enzyme est hautement régulé que ce soit chez les mammifères ou chez la

levure (Espenshade et Hughes, 2007). Une possibilité serait que le HMG CoA (substrat de la HMG CoA réductase) lie Upc2p directement et l'active. D'autres précurseurs de biosynthèse de l'ergostérol, en s'accumulant suite à une déplétion en stérols, peuvent être aussi des ligands directs activateurs d'Upc2p.

### **VII.3. Contrôle transcriptionnel par Cap1p chez *C. albicans***

Les résultats au chapitre 5 nous ont permis de mieux comprendre le contrôle transcriptionnel par Cap1p chez *C. albicans* et d'inférer plusieurs nouvelles caractéristiques fonctionnelles de ce facteur de transcription. L'article publié a été sélectionné par l'éditeur du journal *Eukaryotic cell* comme « article d'intérêt significatif » et a fait l'objet d'une note dans la revue (*Eukaryotic Cell*, Vol.8, No.6, p. 805).

#### **VII.3.1. Yap1p et Cap1p : similarités et différences fonctionnelles**

Les études antérieures et les résultats du chapitre 5 convergent vers l'idée que Cap1p est activé de façon similaire à Yap1p de *S. cerevisiae*. D'abord, l'activité des deux protéines est dépendante de leur localisation cellulaire. Une forme active de Cap1p ou Yap1p se localise au noyau et la dynamique de cette translocation entre le cytosol et le noyau est cruciale pour la fonction des deux régulateurs (Moye-Rowley, 2003; Zhang *et al.*, 2000). Le mécanisme senseur du stress oxydatif est aussi conservé. Cap1p et Yap1p possèdent des domaines riches en cystéines qui sont cruciaux pour leur activité transcriptionnelle. Dans le chapitre 5, la mutation d'une des cystéines du domaine CRD de Cap1p (C477A) produit un régulateur constitutivement actif et ce résultat a été observé pour Yap1p en mutant la cystéine homologue (C629A) (Wemmie *et al.*, 1997). Les deux protéines répondent aussi de façon différente au stress oxydatif induit par les espèces oxygénées réactives (e.g. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et au stress oxydatif induit par réactifs chimiques thiols et les métaux lourds (e.g. le diamide et le cadmium). Une illustration est la mutation de la cystéine aux positions 477 de Cap1p et 629 de Yap1p qui rend les cellules hypersensibles

au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais confère la résistance au diamide (Alarco *et al.*, 1997;Alarco et Raymond, 1999;Zhang *et al.*, 2000). La résistance aux azoles conférée par les mutations activatrices de ces deux facteurs a lieu via la surexpression de deux gènes, *MDR1* et *FLR1*, respectivement, encodant des transporteurs fonctionnellement homologues de la famille facilitateurs majeurs (Alarco *et al.*, 1997;Alarco et Raymond, 1999;Nguyen *et al.*, 2001). Ces observations suggèrent donc une conservation de la complexité du mécanisme de régulation de la réponse au stress oxydatif par Cap1p et Yap1p et indiquent aussi la conservation des aspects mécanistiques fonctionnels activant ces deux facteurs de transcription.

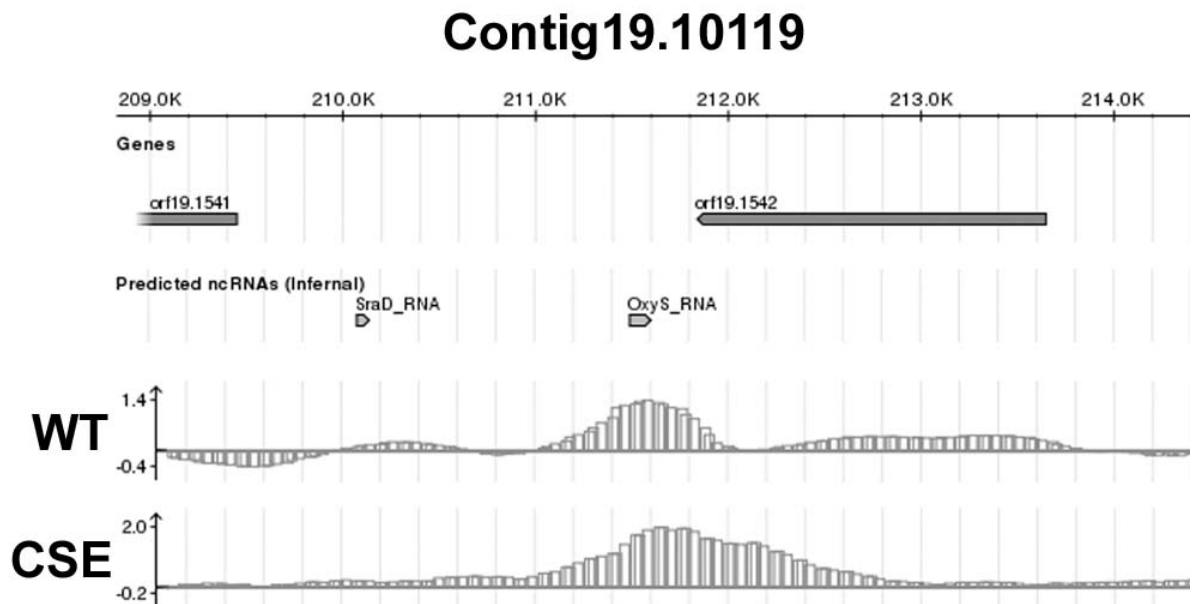
Qu'en est-il de la conservation des modules de régulation par Yap1p et Cap1p? Les résultats du ChIP-chip de Cap1p ont suggéré un motif commun de liaison de Cap1p et Yap1p au promoteur de leurs gènes cibles, T-T/G-A-C/G-T-A/C-A (TKASTMA, chapitre 5 et (Nguyen *et al.*, 2001;Salin *et al.*, 2008)) et donc les éléments de régulation *en cis* par ces deux homologues fonctionnels (YREs), n'ont pas divergé. Une étude récente par Lelandais *et al.* a montré que Cgap1p de *C. glabrata*, l'homologue fonctionnel de Yap1p de *S. cerevisiae* (Chen *et al.*, 2007), reconnaît un motif légèrement différent des YREs sur les promoteurs de ses gènes cibles, TTACAAA, en réponse à une activation par le bénomyl (Lelandais *et al.*, 2008). Plus encore, la fonction des facteurs de transcription Yap1p et Cgap1p semble avoir divergé (Lelandais *et al.*, 2008). Une divergence des éléments de régulation *en cis* liés par des facteurs de transcription fonctionnellement homologues a été démontrée chez des espèces hémiascomycètes encore plus proches comme *S. cerevisiae*, *S. bayanus* et *S. mikatae* (Borneman *et al.*, 2007). D'autres études ont montré que la fonction de facteurs de transcriptions structurellement homologues, comme Gal4p chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*, a été reprogrammée de façon spécifique à l'organisme; un concept appelé *transcriptional rewiring* (Martchenko *et al.*, 2007). Donc, les différences fonctionnelles entre Yap1p et Cgap1p ne devraient pas surprendre. Le design des expériences d'induction par le bénomyl dans l'étude par Lelandais *et al.* et sa similarité avec celui du chapitre 5 me permet de comparer, grossièrement, les modules transcriptionnels entre Yap1p, Cap1p et

Cgap1p en réponse au traitement par le bénomyl. Parmi les 229 gènes induits par le bénomyl chez *S. cerevisiae*, 94 gènes (41%) étaient dépendants de Yap1p (Lelandais *et al.*, 2008). Chez *C. glabrata*, 66 gènes (24%) étaient dépendants de Cgap1p sur les 272 gènes induits par le même agent antifongique (Lelandais *et al.*, 2008). Chez *C. albicans*, parmi les 275 gènes induits par le bénomyl, 100 gènes (36%) étaient dépendants de Cap1p (chapitre 5), ce qui s'approche de la proportion des gènes induits de façon Yap1p-dépendante chez *S. cerevisiae*. De toute évidence, ces résultats montrent d'emblée qu'il existe au moins un autre régulateur transcriptionnel chez chacun des trois organismes qui contrôle la réponse transcriptionnelle au stress induit par le bénomyl, à part les paralogues Yaps. Chez *S. cerevisiae*, Pdr1p semble seconder Yap1p dans l'induction de l'expression des gènes par le bénomyl (Lucau-Danila *et al.*, 2005) alors que chez *C. albicans*, Mrr1p est le deuxième régulateur contrôlant l'expression des gènes répondant à cet antifongique (chapitre 6 et (Morschhauser *et al.*, 2007;Rognon *et al.*, 2006)). L'étude par Lelandais *et al.* montre que parmi les 94 gènes de *S. cerevisiae* et les 66 gènes de *C. glabrata* induits par le bénomyl de façon dépendante des Yaps seulement 14 gènes sont orthologues, basée sur une analyse d'orthologie InParanoid (O'Brien *et al.*, 2005), et donc les modules des gènes régulés par Yap1p et Cgap1p en réponse au traitement par le bénomyl sont différents (Lelandais *et al.*, 2008). La même analyse des données du chapitre 5 et des données de l'étude par Lelandais *et al.* m'a permis de regrouper uniquement 15 orthologues entre les modules des gènes induits par Cap1p (100 gènes) et Yap1p (94 gènes) suite au traitement par le bénomyl. Ce nombre remonte à 23 orthologues entre les modules des gènes induits par Cap1p et Cgap1p parmi les 100 et 66 gènes régulés à la hausse répondant au bénomyl, respectivement. Il semble ainsi que la fonction de Cap1p soit plus apparentée à celle de Cgap1p qu'à celle de Yap1p, malgré d'autres propriétés fonctionnelles rapprochant Yap1p à Cap1p.

### **VII.3.2. La liaison de Cap1p aux régions « déserts de gènes » aurait une signification biologique**

Cap1p se lie à des régions « déserts de gènes », des localisations du génome qui ne codent pas pour des cadres de lecture ouverts définis (chapitre 6). Lors de la révision de l'article du chapitre 6, un examinateur a suggéré que le système utilisé pour exprimer la protéine de fusion, sous le contrôle d'un promoteur inductible fort (*MET3*) (Care *et al.*, 1999), aurait pu occasionner des liaisons de Cap1p au génome de façon artéfactuelles qui ne seraient donc pas toujours représentatives du profil de liaison réelle de Cap1p au génome de *C. albicans*. Nous avons émis l'hypothèse que ces régions peuvent encoder des cadres de lectures ouverts non encore détectés ou caractérisés ou des transcrits d'ARN non-codants. Les ARNs non-codants sont exprimés chez la levure (Ito *et al.*, 2008). Certains interfèrent dans la transcription ou ont un rôle dans la modification des histones, mais l'étendue de leur impact sur la régulation transcriptionnelle et leur fonction n'est pas encore claire (Ito *et al.*, 2008). Tout récemment, une étude vient de révéler l'existence d'une machinerie de régulation de l'expression génique par interférence à ARN chez la levure *S. castellii* et *C. albicans*, mais confirme l'absence d'un tel mécanisme chez *S. cerevisiae* (Drinnenberg *et al.*, 2009). Ce concept va certainement révolutionner la génétique et la biologie moléculaire chez la levure dans l'avenir et particulièrement chez *C. albicans*, sachant la complexité qui caractérise son génome et sa génétique. Un examen du profil de liaison de Cap1p aux régions intergéniques « déserts de gènes » a permis de détecter des liaisons de Cap1p à des localisations adjacentes à (ou chevauchant avec) des segments d'ADN prédits pour encoder des ARNs non codants (voir exemple à la figure VII-6). Ces ARNs non codants ont été prédits par des algorithmes comme Infernal, RNAz ou QRNA et certains ont été validés par des expériences d'expression à l'échelle du génome utilisant des biopuces à ADN pangénomiques (Bouvet, G., Scott-Boyer, M.P., Lemieux, S. et Raymond, M., en révision). La liaison de Cap1p à de telles régions du génome était fréquente, puisque j'ai pu dénombrer une vingtaine de régions enrichies par l'immunoprécipitation de Cap1p qui

étaient adjacentes à de telles localisations ou les chevauchaient (données non montrées). Parmi ces régions, celle de la figure VII-5 montre un pic d'enrichissement de la liaison de Cap1p à l'ADN chevauchant une séquence prédite pour encoder un homologue de l'ARN non-codant bactérien OxyS.



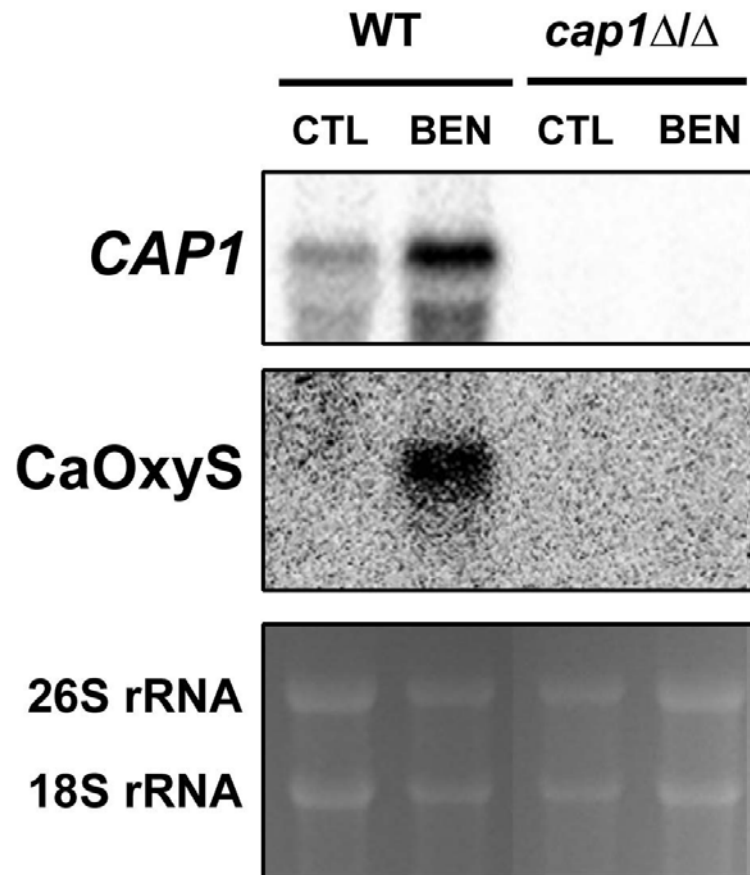
**Figure VII-5.** Profil de liaison de Cap1p-HA<sub>3</sub> (WT) et Cap1p-CSE-HA<sub>3</sub> (CSE) à une région intergénique du Contig19.10119. Le segment d'ADN annoté OxyS\_RNA est prédit pour encoder un ARN homologue à l'ARN non codant bactérien OxyS, impliqué dans la réponse au stress oxydatif chez la bactérie. Voir la légende de la figure 2 du chapitre 5 pour la description des graphiques.

OxyS est un ARN non codant de 109 nucléotides dont l'expression est induite en réponse au stress oxydatif chez *E. coli* (Altuvia *et al.*, 1997). Cet ARN agit comme un régulateur majeur qui active ou réprime l'expression de plusieurs gènes par un mécanisme antisens, en se liant à la protéine Hfq qui renforce l'hybridation d'OxyS avec ses ARNs cibles (Altuvia *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). En altérant la traduction, renforçant la



stabilité du messenger ou dégradant l'ARN messenger, l'effet des ARNs non codants dépendants de Hfq sur l'expression des gènes peut ainsi être activateur ou répresseur (Gottesman, 2004). Il est remarquable que chez *E. coli*, un mécanisme d'activation d'un régulateur répondant au stress oxydatif avec une mécanistique similaire à celle des facteurs de transcription Yap1 et Cap1p semble avoir été conservé. C'est ainsi que le génome de la bactérie encode un régulateur répondant au stress oxydatif appelé OxyR dont l'état d'oxydation du domaine riche en cystéine, comme Yap1p et Cap1p, dicte son activité (Liu *et al.*, 2005).

Dans le but de déterminer si l'ARN OxyS détecté par les algorithmes au génome de *C. albicans*, qu'on nomme CaOxyS, voit son expression modulée de manière Cap1p-dépendante *in vivo* dans des conditions physiologiques, des souches du type sauvage de *C. albicans* et un mutant *cap1Δ/cap1Δ* qui en dérive ont été traités par le bénomyl, qui induit une réponse au stress oxydatif via Cap1p. L'expression de CaOxyS a été examinée par buvardage Northern en synthétisant une sonde spécifique à CaOxyS (Figure VII-6). Comme contrôle, l'activation de Cap1p et sa réponse transcriptionnelle au bénomyl ont été pistées par la détection d'une élévation des transcrits de *CAP1* par la boucle autorégulatrice de Cap1p (chapitre 6, Figure VII-6). Comme attendu, les transcrits de *CAP1* ne sont pas détectés dans la souche *cap1Δ/cap1Δ* (Figure VII-6). Dans la souche du type sauvage, l'ARN CaOxyS est induit en réponse au bénomyl et cette induction est abolie dans la souche *cap1Δ/cap1Δ*, démontrant que CaOxyS est un transcrit d'ARN induit en réponse à un stress et dont l'expression est strictement Cap1p-dépendante (Figure VII-6).



**Figure VII-6.** Le petit ARN CaOxyS est exprimé de manière dépendante de *CAP1*. Buvardage du type Northern du profil d'expression du gène *CAP1* et de l'ARN CaOxyS dans les souches de *C. albicans* du type sauvage (WT) et du mutant *cap1* $\Delta/cap1$  $\Delta$  correspondant (*cap1* $\Delta/\Delta$ ) traités (BEN) ou non (CTL) avec 20 mg/ml de bénomyl pendant 30 minutes à 30°C. Les ARN ribosomiaux 26S et 18S servent de contrôle endogène du chargement de quantités égales d'ARN.

La détermination de la taille approximative du transcrit de CaOxyS sur le gel de migration estime une longueur de ~300 nucléotides (données non montrées). Ce résultat est fort intéressant, dans la mesure où la combinaison de plusieurs observations incluant : i) la prédiction que cet ARN est possiblement non-codant, ii) sa nature en tant qu'homologue prédit d'un ARN impliqué dans la réponse au stress oxydatif chez *E. coli*, iii) le profil de

liaison *in vivo* de Cap1p à la région qui l'encode et iv) la validation de l'expression de CaOxyS qui est induite de façon Cap1p-dépendante convergent vers l'hypothèse attirante que CaOxyS encode un ARN non-codant répondant au stress oxydatif chez *C. albicans*. Le séquençage du transcrit de CaOxyS permettrait de vérifier si cet ARN contient des codons AUG, de prédire par plusieurs algorithmes différents la présence ou l'absence de site d'initiation de la traduction et de déterminer avec précision sa taille. L'examen du phénotype sur un milieu inducteur du stress oxydatif d'un mutant perte-de-fonction de CaOxyS et d'une souche de *C. albicans* surexprimant CaOxyS permettrait de déterminer si cet ARN est fonctionnel dans la réponse au stress oxydatif. L'examen de la modulation des transcrits à l'échelle du génome peut être envisagée par la surexpression ou la délétion de CaOxyS afin de vérifier si cet ARN contrôle l'expression de gènes en réponse au stress.

La détection *in vivo* de la liaison de Cap1p à des régions intergéniques ou « déserts de gènes » pourrait ainsi avoir une signification biologique, soulignant le potentiel et la puissance de la technologie du ChIP-chip dans l'inférence des propriétés fonctionnelles de facteurs de transcription et dans la découverte de nouveaux mécanismes biologiques permettant de mieux comprendre la réponse de l'organisme aux stress.

## **VII.4. Le réseau transcriptionnel de résistance aux azoles chez *C. albicans***

### **VII.4.1. La technologie du ChIP-chip : Du design expérimental à l'identification des réseaux transcriptionnels**

La régulation transcriptionnelle est un processus complexe. Comprendre la fonction des facteurs de transcription, l'identification des modules et des réseaux transcriptionnels exige entre autres la mise en place d'un système expérimental permettant l'analyse du contrôle transcriptionnel direct par un régulateur donné. Le développement de la technologie d'immunoprécipitation de la chromatine couplée aux biopuces à ADN (ChIP-

chip) constitue une véritable révolution en génomique fonctionnelle et en combinaison aux autres techniques d'analyse de l'expression génique permet d'inférer les réseaux et modules transcriptionnels sous le contrôle de facteurs de transcription. Le ChIP-chip est aussi une technologie puissante en génomique comparative, permettant l'étude de l'évolution des modules et des réseaux de régulation transcriptionnelle des espèces, et ainsi de comprendre comment les organismes ont évolué pour répondre aux perturbations environnementales et génétiques qui influencent leur génome et leur métabolisme. Lorsqu'un facteur de transcription lie une région régulatrice d'un gène, cela suggère qu'il contrôle directement l'expression de ce gène. Par contre, les données du ChIP-chip à elles seules peuvent ne pas suffire pour identifier les cibles directes d'un régulateur et caractériser sa fonction. Par exemple, il peut y avoir des ambiguïtés lorsqu'arrive le moment d'assigner la liaison d'un facteur de transcription à un gène cible potentiel, particulièrement lorsque le facteur se localise à une région du promoteur commune à deux cadres de lecture ouverts orientés de sens opposés. Cette situation était fréquente (chapitres 3-5) et c'est ainsi que des données complémentaires d'expression à l'échelle du génome permet de mieux caractériser la localisation au génome des facteurs de transcription. De toute évidence, la combinaison de données d'expression et de ChIP-chip constitue une validation croisée des résultats obtenus. De plus, le fait de compléter les expériences de ChIP-chip par l'analyse de l'expression globale du génome permet de déterminer si un facteur de transcription module l'expression d'un gène donné. À défaut de données d'expression par biopuces, on peut utiliser les techniques de détection de transcrits comme le buvardage Northern ou la réaction de polymérisation en chaîne couplée à la transcriptase inverse sur des cibles d'intérêt, comme lors de la détermination des cibles directes d'Upc2p (Figures 4 et 5 du chapitre 4). Lorsqu'un facteur de transcription se lie *in vivo* au promoteur d'un gène cible et que l'on détecte dans ces conditions expérimentales que l'expression de ce gène est modulée à la hausse, on peut conclure que ce facteur agit comme un activateur de l'expression de ce gène. Contrairement, un facteur se liant au promoteur d'un gène dont on note une régulation à la baisse associée dans cette même condition agirait comme un répresseur de

l'expression de ce gène. Il est possible aussi qu'un facteur de transcription agisse comme un activateur et un répresseur d'un même gène, dépendamment du signal activateur, ce qui rend l'établissement du réseau transcriptionnel plus complexe. Un tel exemple s'est illustré au chapitre 4 avec la régulation du gène *MDR1* par Upc2p (voir discussion du chapitre 4). Rendant encore plus complexe ce processus est l'observation que malgré l'association du facteur de transcription au promoteur de sa cible, les niveaux d'expression d'un gène peuvent rester inchangés (chapitres 3-5), une situation qui a été observée dans des études utilisant la technologie du ChIP-chip pour caractériser la fonction de facteurs de transcription (Fardeau *et al.*, 2007; Lucau-Danila *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006). À titre d'exemple, Yap1p activé se lie aux promoteurs de ses gènes cibles sans automatiquement mener à une modulation de leur expression (Lucau-Danila *et al.*, 2005). Pdr1p qui tout comme Tac1p est un régulateur résident de ses promoteurs cibles n'induit pas nécessairement l'expression de tous ses gènes cibles liés *in vivo* suite à son activation (Fardeau *et al.*, 2007). C'est ainsi que la liaison d'un facteur de transcription aux séquences régulatrices d'un gène est nécessaire mais pas suffisante pour la modulation de l'expression de ce gène, témoignant de la nécessité d'autres mécanismes moléculaires ou d'autres signaux activateurs qui ne sont pas ceux des conditions de l'expérience dans lesquels le ChIP-chip a été effectué. D'autres explications incluent des causes inhérentes à la technique. Les données à grande échelle faisant intervenir les biopuces à ADN sont génératrices de faux positifs. On rapporte une fréquence de 6% à 10% de faux positifs dans les données d'expériences de ChIP-chip utilisant un seuil de significativité (P-value) de 0.001 et un modèle d'erreur similaire à celui utilisé aux chapitres 3 et 4 (Lee *et al.*, 2002). Paradoxalement, on estime qu'autour du tiers des « vraies » interactions entre le facteur de transcription et l'ADN ne sont pas détectées en utilisant un P-value seuil de 0.001 (Lee *et al.*, 2002), ce qui explique par exemple la détection de gènes dont l'expression est modulée mais dont les promoteurs ne sont pas liés par le facteur de transcription (chapitres 3 et 5). Il est évident qu'une autre explication, biologique en ce sens, est que ces gènes soient des cibles indirectes du régulateur.

Le design expérimental des expériences de ChIP-chip qui reflète la condition la plus pertinente biologiquement pour l'identification des cibles transcriptionnelles d'un facteur de transcription est son étiquetage moléculaire à son propre locus (chapitre 3). Idéalement, l'expérimentateur utilisera un anticorps dirigé contre la protéine, mais un tel design nécessite la production laborieuse d'un anticorps spécifique qui n'est pas toujours couronnée de succès. Le facteur de transcription Tac1p a été étiqueté par une étiquette moléculaire triple hémagglutinine (HA<sub>3</sub>) par recombinaison homologue. L'essai fonctionnel montre que la protéine de fusion est fonctionnelle et que l'introduction de l'épitope n'a pas converti le facteur en une forme hyperactive ou mené à une perte-de-fonction (chapitre 3). J'ai aussi introduit à la fois l'étiquette moléculaire et la mutation gain-de-fonction N972D au locus de *TAC1*, mais les niveaux d'expression de la protéine de fusion étaient beaucoup plus bas que ceux de Tac1p-HA<sub>3</sub> (Figure VII-3B). J'ai effectué des expériences de ChIP-chip avec la forme Tac1p<sup>N972D</sup>-HA<sub>3</sub>, mais les valeurs d'enrichissement étaient très faibles (facteur 2.8 et moins) et mêlées de « bruit de fond » (données non montrées), ce qui indique une baisse importante de la sensibilité de détection des cibles transcriptionnelles. Il est possible que la faible expression de la protéine de fusion Tac1p<sup>N972D</sup>-HA<sub>3</sub> ne permette pas une immunoprécipitation efficace. Pourtant, une telle protéine est transcriptionnellement très active. Il est possible que, dans ces conditions, la protéine possède des caractéristiques fonctionnelles incompatibles avec l'immunoprécipitation. L'utilisation du système d'expression ectopique par le promoteur *MET3* (chapitres 4 et 5) pourrait augmenter la sensibilité de détection des cibles de Tac1p. Par contre, comme indiqué dans la discussion des chapitres 4 et 5, l'utilisation d'un tel système n'est pas représentative d'une condition physiologique et peut en quelque sorte affecter la pertinence des résultats. Néanmoins, une récente étude par Tang *et al.* a comparé deux designs expérimentaux de données de localisation à l'échelle du génome de Leu3p, le facteur de transcription *zinc cluster* qui régule l'expression des gènes impliqué dans le métabolisme des acides aminés à chaînes branchées (Tang *et al.*, 2006). Cette étude a comparé les données d'expression et de localisation de Leu3p dans une condition appelée

« faible activité » versus une condition appelée « haute activité » (Tang *et al.*, 2006). La condition « faible activité » est décrite comme étant une condition dans laquelle la protéine étiquetée Leu3p est exprimée sous le contrôle de ses éléments de régulation endogène et à son propre locus pour les expériences de ChIP-chip et, pour les expériences d'expression correspondantes, une souche du type sauvage est comparée à un mutant *leu3Δ* (Tang *et al.*, 2006), des conditions similaires à celles du chapitre 3. La condition « haute activité » utilise une protéine de fusion exprimée sous le contrôle d'un promoteur fort et contenant une mutation gain-de-fonction (Tang *et al.*, 2006), un design expérimental similaire aux conditions utilisées aux chapitres 4 et 5. La comparaison des deux conditions a montré que la condition « haute activité » augmente la sensibilité et la pertinence des résultats (Tang *et al.*, 2006). La condition « faible activité » a mené à l'identification de 25 promoteurs liés par Leu3p et 307 gènes dont l'expression est régulée de façon Leu3p dépendante dont uniquement 9 sont à la fois liés et régulés (Tang *et al.*, 2006). La condition « haute activité » a permis de détecter 200 promoteurs liés par Leu3p et 250 gènes modulés en conséquence avec 44 gènes à la fois liés et régulés (Tang *et al.*, 2006). L'augmentation de la pertinence des résultats s'est traduite par l'analyse de l'ontologie des nouveaux gènes identifiés dans la condition « haute activité » qui étaient en concordance avec la fonction biologique connue de Leu3p et suggéraient de nouvelles fonctions à la protéine (Tang *et al.*, 2006). Une étude par le groupe de Brenda Andrews a montré que l'adoption d'un système de surexpression systématique de gènes permettait d'identifier et établir les sentiers métaboliques et les phénotypes associés à ces gènes, notamment ceux encodant des facteurs de transcription (Sopko *et al.*, 2006). Une autre étude a montré qu'on peut établir et définir les réseaux et modules transcriptionnels et les fonctions physiologiques de facteurs de transcription en utilisant un système de surexpression systématique de ces régulateurs, couplé à des analyses de transcriptomique (Chua *et al.*, 2006). Même si le système « haute activité » confère de tels avantages, il ne permet pas d'étudier le régulon d'un facteur de transcription sous différentes conditions activatrices et se voit limité par le fait que la protéine exprimée est à l'état constitutivement actif. Dans notre situation, l'introduction de

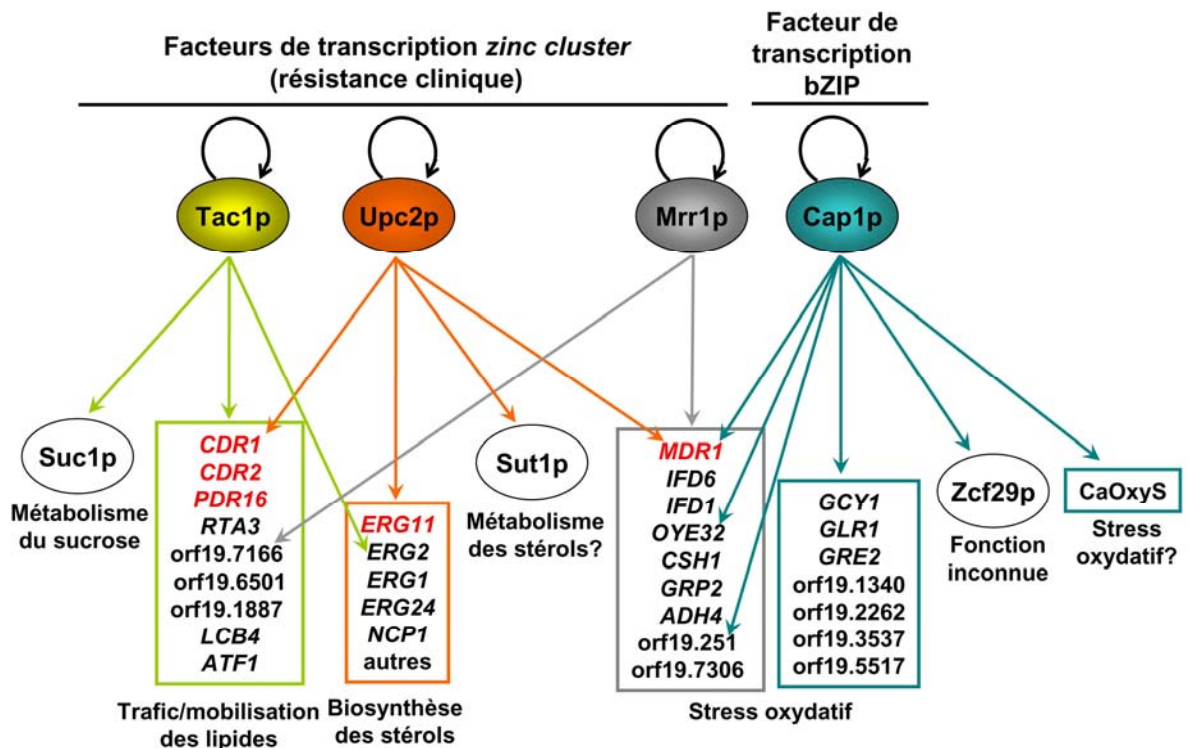
mutations gain-de-fonction dans les facteurs de transcription étudiés constitue une condition représentative de celle des isolats cliniques ayant des mutations activatrices dans des facteurs de transcription qui confèrent la résistance aux azoles. C'est donc un système pertinent permettant d'établir un réseau de régulation transcriptionnelle de la résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans*.

#### **VII.4.2. Le réseau transcriptionnel de résistance aux azoles chez *C. albicans* : constituants et inférences**

L'intégration des résultats décrits dans les chapitres précédents permet d'établir un réseau transcriptionnel impliquant les facteurs de transcription Tac1p, Upc2p et Cap1p (Figure VII-7). La construction de ce réseau se voit simplifiée par la sélection d'une condition expérimentale dans laquelle les facteurs de transcription étudiés contiennent des mutations activatrices (i.e. gain-de-fonction) mimant en quelque sorte la situation d'isolats cliniques résistants aux azoles ou, du moins, dans les conditions qui s'en rapprochent le plus possible. Ceci rend les données pertinentes et représentatives du contexte de la résistance clinique. Bien qu'il n'existe pas d'évidences de mutations activatrices de Cap1p dans des souches cliniques de *C. albicans*, on ne peut écarter la possibilité qu'il puisse exister des isolats avec de telles mutations. À titre d'exemple, une étude a caractérisé des isolats cliniques résistants aux azoles qui montraient un profil de surexpression concomitante de *MDR1* et *FLUI*, cibles de Cap1p, corrélant avec le développement de la résistance (Goldman *et al.*, 2004). Une mutation gain-de-fonction touchant Cap1p ou une mutation perte-de-fonction de l'exportine Crm1p auraient les mêmes conséquences phénotypiques et fonctionnelles, avec l'accumulation de Cap1p au noyau. De telles mutations dans Crm1p ont été caractérisées chez *S. pombe* (Carobbio *et al.*, 2001). J'ai complété ces réseaux par l'inclusion de celui de Mrr1p, en me basant sur des données publiées (Morschhauser *et al.*, 2007) et sur de récentes expériences de CHIP-chip dans notre laboratoire (voir plus bas). Les gènes inclus dans les modules transcriptionnels représentés à la figure VII-7 sont des gènes dont i) les promoteurs sont liés *in vivo* par leurs régulateurs



respectifs et ii) dont l'expression est modulée de manière dépendante de ces régulateurs. Les fonctions biologiques inférées des modules transcriptionnels sont basées sur l'étude de l'ontologie des groupes de gènes qui y sont inclus, dont certains ont des fonctions prédites. Ce réseau suggère que trois modules transcriptionnels sont reliés à la résistance aux azoles chez *C. albicans*. Le premier module inclut les gènes impliqués dans le trafic et la mobilisation des lipides membranaires, régulé par Tac1p, le second est constitué des gènes impliqués dans la biosynthèse des stérols et leur métabolisme, cibles d'Upc2p, et le troisième représente les gènes répondant au stress oxydatif encodant majoritairement des oxydoréductases en plus de *MDR1*, qui sont des cibles de Mrr1p et Cap1p (Figure VII-7).



**Figure VII-7.** Réseau transcriptionnel de résistance aux antifongiques azolés chez *C. albicans* dans des conditions d'activation constitutive des facteurs de transcription via des mutations gain-de-fonction. Les flèches colorées indiquent une régulation transcriptionnelle positive directe (i.e. confirmée par CHIP et par des analyses de transcriptomique ou de détection de transcrits spécifiques) par les facteurs de transcription Tac1p, Upc2p, Mrr1p et Cap1p de gènes effecteurs de la résistance clinique aux azoles (colorés en rouge) ainsi que

des gènes associés à leurs modules transcriptionnels. Les gènes *CDR1*, *CDR2* et *PDR16* appartiennent au module « trafic et mobilisation des lipides ». Le gène *ERG11* appartient au module « biosynthèse des stérols ». *MDR1* appartient au module « stress oxydatif » représenté par deux blocs de modules transcriptionnels, pour différencier entre les cibles de Mrr1p et celles de Cap1p, et inclut majoritairement des gènes encodant des oxydoréductases (ontologie GO:0016491). Cap1p, Tac1p et Upc2p régulent directement à la hausse l'expression d'autres facteurs de transcription de la famille *zinc cluster* (ovales blancs) : *SUC1*, impliqué dans le métabolisme du sucrose; *SUT1*, prédit pour réguler le métabolisme des stérols et *ZCF29*, de fonction inconnue et encodant un paralogue structural de Mrr1p (chapitre 6). CaOxyS : petit ARN induit de manière dépendante de Cap1p. Les flèches noires indiquent une boucle autorégulatrice positive directe.

Le réseau transcriptionnel suggère une complexité et une interaction fonctionnelle entre les régulateurs Tac1p, Upc2p, Mrr1p et Cap1p, notamment en ce qui a trait à la régulation transcriptionnelle des gènes *CDR1* et *MDR1*. *CDR1* est sous le contrôle de Tac1p et Upc2p alors que *MDR1* est sous le contrôle de Mrr1p, Cap1p et Upc2p, révélant qu'Upc2p se retrouve à l'intersection de ces sentiers de résistance. De plus, le fait que Cap1p et Mrr1p contrôlent l'expression de plusieurs gènes en commun ainsi que des modules transcriptionnels similaires suggère une interaction fonctionnelle importante entre ces deux facteurs. Il est notable que Mrr1p contrôle directement l'expression de plusieurs gènes encodant des aldo-céto réductases comme *IFD1*, *IFD6* et *CSH1*. Chez *S. cerevisiae*, la délétion de gènes encodant de telles aldo-céto réductases mène à une élévation des marqueurs du stress oxydatif incluant une déficience en glutathione et notamment une localisation nucléaire constitutive de Yap1p accompagnant une élévation des transcrits de ses cibles répondant au stress oxydatif (Chang et Petrash, 2008). D'autres facteurs de transcription *zinc cluster* sont directement régulés à la hausse par une activation constitutive de Tac1p (*SUC1*), Upc2p (*SUT1*) et Cap1p (*ZCF29*), ajoutant ainsi un autre niveau de complexité au réseau transcriptionnel. Suc1p est un régulateur positif de l'acquisition et le métabolisme du sucrose (Kelly et Kwon-Chung, 1992). La délétion du gène *TAC1* n'affecte pas la croissance des cellules sur un milieu contenant du sucrose comme seule source de carbone (données non montrées), démontrant que malgré le fait qu'il régule l'expression de *SUC1*, *TAC1* n'est pas requis pour le métabolisme du sucrose. Il est possible que

l'induction de l'expression de *SUC1* ait pour but de supplémenter les cellules en carbohydrates comme source d'énergie convertible en ATP nécessaire à la fonction des transporteurs Cdr1p et Cdr2p. Upc2p lie le promoteur du gène *SUT1 in vivo* et induit en conséquence son expression suite à son activation (chapitre 4 et Figure VII-7). Sut1p est une protéine de la famille *zinc cluster* dont la signature du domaine de liaison à l'ADN est atypique et présentant une homologie de séquence avec Sut1p de *S. cerevisiae* (chapitre 6). Des études chez *S. cerevisiae* ont montré que Sut1p contrôle l'acquisition des stérols du milieu extracellulaire via les transporteurs de la famille ATP-binding cassette Aus1p et Dan1p (Alimardani *et al.*, 2004). Ce motif de réseau supporte l'hypothèse que Sut1p soit un régulateur du métabolisme des stérols et renforce le rôle d'Upc2p dans ce processus métabolique. *ZCF29*, cible directe de Cap1p dont le transcrit est induit aussi bien par la mutation CSE que par l'activation au bénomyl (chapitre 5), est un gène encodant un facteur de transcription de la famille *zinc cluster* de fonction encore inconnue. Il est par ailleurs intrigant que ce gène encode une protéine hautement homologue à Mrr1p (chapitre 6). Des études fonctionnelles de ce facteur de transcription permettraient d'élucider son rôle dans la réponse au stress oxydatif ou le traitement par les antifongiques comme le bénomyl.

C'est ainsi que le métabolisme des lipides membranaires et le stress oxydatif semblent être étroitement liés à la résistance aux azoles (Figure VII-7). L'activité d'Upc2p est dépendante du taux intracellulaire de stérols alors que celle de Tac1p est dépendante de la présence d'inducteurs comme les stéroïdes, avec pour conséquence l'activation du trafic et la mobilisation des lipides. Cela dit, on peut comprendre pourquoi le métabolisme des lipides constitue une composante importante dans ce réseau transcriptionnel, dans la mesure où les azoles sont des inhibiteurs de la protéine Erg11p et donc du sentier de biosynthèse de l'ergostérol qui est une composante importante des membranes. Cette perturbation nécessite un rétablissement de l'équilibre lipidique au niveau de la membrane incluant la biosynthèse des stérols, le trafic des lipides membranaires et la mobilisation du stock de lipides cellulaires. Le fait que Tac1p et Upc2p constituent d'importants régulateurs de la dynamique métabolique des lipides et des stérols a donc fait que cette dernière ait évolué de

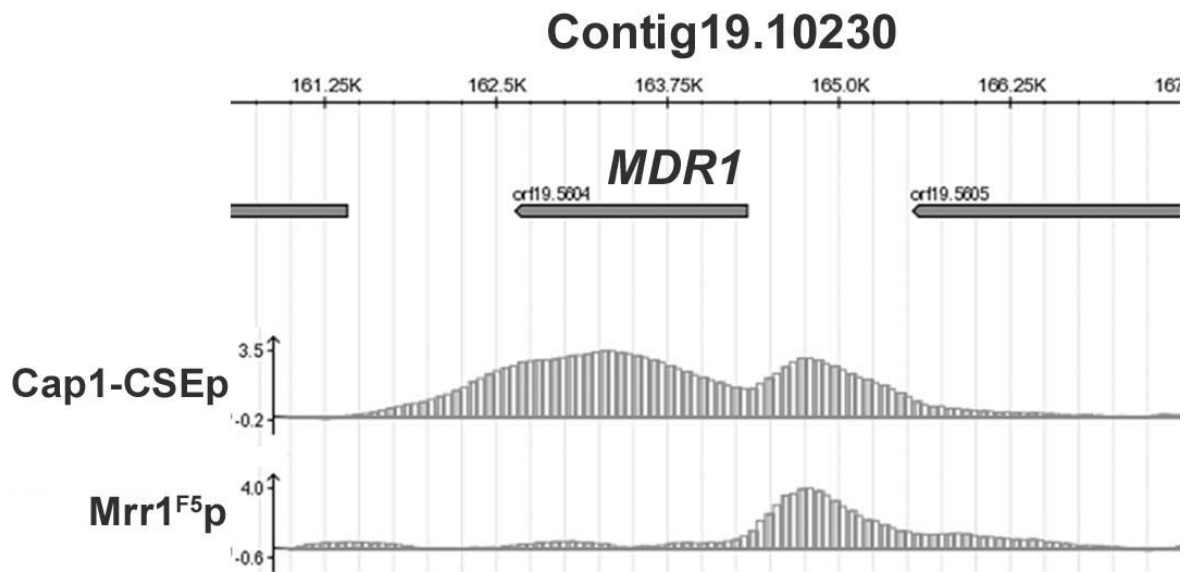
façon intimement liée à la résistance aux composés xénobiotiques et les antifongiques azolés.

Le module transcriptionnel « stress oxydatif » inclut le gène encodant Mdr1p, le transporteur facilitateur majeur conférant la résistance aux azoles et notamment au fluconazole, s'agissant du dérivé azolé ayant le plus d'affinité pour ce transporteur. Le lien entre le stress oxydatif et la résistance aux azoles est donc en majeure partie dû au fait que les régulateurs Cap1p et Mrr1p, qui répondent au stress oxydatif, contrôlent particulièrement l'expression de ce transporteur. Ainsi, les azoles ont été fortuitement, par opportunisme, des substrats de Mdr1p. La nature a donc sélectionné et conservé ce mécanisme et l'a associé au stress oxydatif au cours de l'évolution. L'étude des fonctions des transporteurs facilitateurs majeurs chez *S. cerevisiae* indique que les gènes encodant ces pompes ont étroitement évolué en liaison avec la réponse aux stress chimique et nutritionnel (Sa-Correia *et al.*, 2009). Néanmoins, il est intéressant de remarquer qu'un ou plusieurs déterminants de la résistance clinique aux azoles autre(s) que *MDR1* fait partie du régulon de Mrr1p, puisqu'une délétion de *MDR1* dans la souche possédant une mutation activatrice de Mrr1p montre un niveau résiduel significatif de résistance comparativement à la même souche dans laquelle *MRR1* a été délété (Morschhauser *et al.*, 2007). Ceci augmente la pertinence du régulon de Mrr1p dans la résistance clinique aux antifongiques azolés et impose de mieux comprendre le mécanisme de réponse au stress oxydatif par Mrr1p et Cap1p dans le but de mieux caractériser leurs modules transcriptionnels et ultimement identifier le/les effecteur(s) de la résistance aux azoles encore inconnus et cibles de Mrr1p.

Des expériences récentes de ChIP-chip effectuées dans notre laboratoire conjointement avec l'équipe du Dr Joachim Morschhauser nous a permis de déterminer les cibles de Mrr1p dans le génome (données en cours d'analyse). *MRR1<sup>F5</sup>* (allèle gain-de-fonction via la mutation P680S de la protéine) a été étiqueté par trois copies de l'épitope hémagglutinine et placé sous le contrôle du promoteur *ADHI* dans une souche

*mrr1Δ/mrr1Δ*. Cette étude a révélé que Cap1p et Mrr1p partagent un nombre important de cibles transcriptionnelles communes (données non montrées). De plus, la superposition d'une proportion importante des sites de liaison de Mrr1p au génome de *C. albicans* avec celles de Cap1p est frappante. Une telle propriété fonctionnelle est reflétée notamment au niveau du locus de *MDR1* (Figure VII-8). On note bien que, dans de telles conditions activatrices (par des mutations gain-de-fonction CSE de Cap1p ou P680S de Mrr1p), la liaison de Cap1p à sa cible *MDR1* s'étale tout au long du promoteur, de la région couvrant le cadre de lecture ouvert et de la région du terminateur transcriptionnel (voir discussion du chapitre 5), suggérant un processus dynamique en association avec la machinerie d'élongation de l'ARN polymérase, alors que la liaison de Mrr1p se retrouve confinée aux limites de la région promotrice. Il est possible que Cap1p possède un rôle dans l'élongation transcriptionnelle. Un examen de la croissance d'un mutant *cap1Δ/cap1Δ* sur un milieu contenant du 6-azauracil, un inhibiteur spécifique du processus d'élongation (Balakrishnan et Gross, 2008), permettrait de tester cette hypothèse. Ces deux « photographies *in vivo* » de l'interaction de Cap1p et Mrr1p à la région du locus de *MDR1* dans des états activés pourrait être représentative notamment de la situation où ces deux régulateurs sont activés simultanément par des inducteurs communs comme le diamide ou le bénomyl, ce qui reflèterait une étroite interaction dynamique entre ces deux régulateurs. La remarquable superposition des empreintes *in vivo* des deux régulateurs au niveau du promoteur du gène *MDR1* suggère une interaction physique directe entre les deux facteurs de transcription quand ces derniers sont activés par des inducteurs communs comme le diamide ou le bénomyl. Une étude récente a montré qu'un membre du complexe SAGA/ADA d'histone acétylase, Ada2p, est un coactivateur commun de Cap1p et Mrr1p, renforçant l'hypothèse d'un lien fonctionnel étroit entre ces deux facteurs (Sellam *et al.*, 2009a). L'identification d'un module transcriptionnel commun entre Cap1p et Mrr1p, en l'occurrence les gènes répondant au stress oxydatif (Figure VII-7), suspectait d'emblée une intime interaction fonctionnelle entre ces deux régulateurs de la résistance aux azoles qui a été confirmée par les récents résultats de l'expérience de ChIP-chip de Mrr1p et qui ouvre la voie vers

d'autres expériences afin de mieux comprendre la fonction de ces deux régulateurs ainsi que leur interdépendance fonctionnelle dans la réponse au stress oxydatif et la régulation de la résistance aux azoles.



**Figure VII-8.** Liaison de Mrr1p et Cap1p *in vivo* au génome de *C. albicans* autour du locus de *MDR1*. Le profil de Cap1-CSEp est tiré du chapitre 6, alors que celui de Mrr1<sup>F5p</sup> est issu des expériences de ChIP-chip récemment effectuées dans notre laboratoire. Noter la superposition des pics de liaison des deux régulateurs au promoteur de *MDR1*. Se référer à la figure 2 du chapitre 5 pour la description des graphiques.

Les études des réseaux transcriptionnels suggèrent que ceux-ci ont des propriétés dynamiques et complexes (Harbison *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002; Lelandais *et al.*, 2008; Salin *et al.*, 2008). Il arrive que lors d'une réponse à un stress, une combinaison de facteurs de transcription se lie au promoteur de gènes cibles communs et modulent leur expression (suggéré par les figures VII-7 et VII-8). La vision selon laquelle un seul et unique facteur de transcription est activé pour répondre à un stress quelconque et induire un module transcriptionnel précis ne peut pas toujours suffire à elle seule pour expliquer la reprogrammation du transcriptome et par conséquent du protéome afin de contrecarrer les

effets d'une perturbation de l'équilibre métabolique. Une intime interconnexion entre des régulateurs qui ne répondent forcément pas aux mêmes inducteurs et dont les mécanismes d'activation ne sont forcément pas les mêmes peuvent caractériser les réseaux transcriptionnels.

Les études contribuant à cet ouvrage ont permis de refléter une telle complexité et de mieux comprendre comment un organisme eucaryote parasite de l'homme comme *C. albicans* programme son génome afin de répondre à un stress xénobiotique inhibiteur de sa croissance. Le réseau transcriptionnel présenté à la figure VII-7 est représentatif des conditions de mutations activatrices dans les facteurs de transcription contrôlant la résistance aux antifongiques azolés. Ce réseau permet notamment de définir des modules transcriptionnels accompagnant la sélection de mutations activatrices dans des facteurs de transcription régulant la résistance clinique aux azoles. Une telle étude permet d'inférer les fonctions biologiques de ces régulateurs et de comprendre pourquoi des modules transcriptionnels précis comme les gènes impliqués dans le trafic et la mobilisation des lipides, la biosynthèse des stérols et la réponse au stress oxydatif sont étroitement liés aux mécanismes de résistance aux antifongiques azolés. Un tel réseau permet par exemple d'expliquer les altérations moléculaires ayant eu lieu dans des souches prélevées de patients sévèrement immunodéprimés avec des épisodes récurrents de candidose oropharyngée réfractaire aux azoles, comme l'étude de cas analysés au chapitre 1 (Figure I-9), ou des infections récidivantes à *Candida albicans* dans d'autres parties du corps. Ce réseau transcriptionnel caractérise aussi les souches accumulant séquentiellement des mutations activatrices dans les régulateurs Mrr1p, Upc2p et Tac1p et les modules transcriptionnels accompagnant ces altérations. Ceci illustre la puissance de la Nature à modeler le génome et conséquemment le métabolisme des êtres-vivants afin de pouvoir répondre aux contraintes d'un environnement hostile à leur croissance, à leur survie et par conséquent à leur reproduction.

Le fait qu'un mécanisme majeur de la résistance clinique aux antifongiques azolés soit régulé au niveau transcriptionnel par trois facteurs de transcription de la famille *zinc cluster* place ces derniers au niveau central en ce qui a trait au processus de la résistance clinique. Le réseau transcriptionnel présenté à la figure VII-7, obtenu en nous servant d'approches technologiques de pointe et très récentes en génomique fonctionnelle (transcriptomique et ChIP-chip) illustre cette place centrale qu'occupent Tac1p, Upc2p et Mrr1p dans la résistance clinique aux azoles. Il ouvre aussi la voie vers d'autres étapes de caractérisation des sentiers liés à ce processus, notamment ceux qui se trouvent en aval du réseau (i.e. stress oxydatif, métabolisme des lipides, régulation de l'expression d'autres facteurs de transcription de la famille *zinc cluster*). De plus, le fait que ces études soient entreprises en me servant de la levure pathogène *C. albicans* comme modèle augmente la pertinence des résultats, puisqu'il s'agit de l'espèce la plus isolée en pathologie mycosique sévère. Les approches expérimentales utilisées dans cette études peuvent ainsi être appliquées aux autres espèces opportunistes du genre *Candida* ou aux genres *Cryptococcus* et *Aspergillus* afin de mieux comprendre le comportement de ces pathogènes opportunistes à l'égard des traitements antifongiques et par conséquent de proposer des pistes thérapeutiques alternatives permettant de contrecarrer la résistance à ces traitements. De telles pistes thérapeutiques sont proposées à la section qui suit (voir section VII.5.) et proposent comme cible les facteurs de transcription *zinc cluster*. C'est ainsi que cet ouvrage illustre comment l'application de technologies de pointe en génomique fonctionnelle combinées à des approches complémentaires comme la génétique, permettent de valoriser la recherche et contribuer à long terme au bien-être de la santé humaine.



## VII.5. Les facteurs de transcription *zinc cluster* comme cible pour la production d'une nouvelle classe d'antifongiques

Le chapitre 6 décrit les fonctions des facteurs de transcription *zinc cluster* chez *C. albicans* caractérisés à ce jour. Sur les 82 gènes encodant les régulateurs de cette famille, seulement 21 gènes ont été caractérisés par au moins une approche expérimentale (chapitre 6). Chez *C. albicans*, ces facteurs sont impliqués dans une variété de sentiers métaboliques, incluant la régulation du métabolisme des carbohydrates, la réponse au stress chimique ou nutritionnel, la croissance filamenteuse, la reproduction sexuée et la résistance aux antifongiques azolés. L'implication de trois membres de ces facteurs de transcription dans la résistance clinique aux azoles fait de ces régulateurs transcriptionnels une cible attirante pour envisager le développement d'agents thérapeutiques permettant de réverser la résistance conférée par la surexpression de transporteurs multidrogues. De plus, le fait que les gènes encodant ces facteurs de transcription soient impliqués dans des processus variés du métabolisme de *C. albicans* et qu'ils soient encodés exclusivement par les génomes fongiques caractérise une spécificité intéressante à exploiter pour le développement d'inhibiteurs spécifiques n'interférant pas avec les molécules biologiques de l'organisme hôte. C'est ainsi qu'une caractérisation fonctionnelle des 61 membres de cette famille de régulateurs dont la fonction est encore inconnue permettra de mieux comprendre leur rôle biologique et potentiellement d'identifier des gènes essentiels permettant d'entrevoir le développement de molécules inhibitrices de leur fonction qui auraient un caractère antifongique (fongicide ou fongistatique). Une autre stratégie permettant de promouvoir la découverte d'agents antifongiques consiste à développer des inhibiteurs de déterminants de virulence, puisque la pression sélective est réduite sur des cibles non essentielles requis uniquement pour coloniser les organes de l'hôte. Dans cette optique, au moins un facteur de transcription *zinc cluster*, Ume6p, contrôle la virulence chez *C. albicans* (Banerjee *et al.*, 2008b; Carlisle *et al.*, 2009) et peut servir d'une telle cible.

La caractéristique qui fait la spécificité des facteurs de transcription *zinc cluster* est le domaine de liaison à l'ADN du type  $Zn_2Cys_6$ , avec deux atomes de zinc coordonnant six atomes de cystéine (chapitre 6), une configuration tridimensionnelle qui diffère des autres motifs de liaison à l'ADN connus (Vallee *et al.*, 1991). Ce motif constitue donc une cible attirante pour le développement de molécules thérapeutiques inhibitrices de la liaison de ces protéines à l'ADN. En perdant cette propriété, ces régulateurs transcriptionnels ne sont plus capables de se lier directement au promoteur de leurs gènes cibles de façon directe. Donc, une telle inhibition chimique mimerait une altération du type perte-de-fonction. Idéalement, un composé permettant d'altérer la structure du motif  $Zn_2Cys_6$  pour l'empêcher de lier l'ADN serait efficace contre toutes les protéines *zinc cluster* chez *C. albicans* ainsi que chez d'autres organismes fongiques pathogènes, une propriété exclusive aux agents antifongiques ayant un large spectre d'action.

La récente découverte que les facteurs de transcription *zinc cluster* Pdr1p et Pdr3p de *S. cerevisiae* ainsi que Pdr1p de *C. glabrata* fonctionnent de façon similaire au récepteur des xénobiotiques PXR (*Pregnane X receptor*) chez les mammifères et l'hypothèse que les protéines de la famille *zinc cluster* fonctionnent en quelque sorte comme des récepteurs nucléaires fongiques (Thakur *et al.*, 2008) a soulevé l'enthousiasme de plusieurs scientifiques afin d'envisager une stratégie permettant de trouver des molécules antagonistes des facteurs de transcription *zinc cluster*, comme le tamoxifène ou le bicatulamide qui sont des antagonistes puissants des récepteurs à estrogènes et androgènes, respectivement (Monk et Goffeau, 2008; Naar et Thakur, 2009). Une idée proposée par Näär *et al.* consiste à bloquer la liaison du domaine XBD de Pdr1p de *C. glabrata* aux azoles en exploitant l'efficacité d'un antagoniste capable de lier préférentiellement le domaine XBD sans pour autant causer une activation du régulateur, de façon analogue aux antagonistes des récepteurs à estrogènes et androgènes tamoxifène et bicatulamide (Naar et Thakur, 2009). Les auteurs stipulent qu'une telle approche, en combinaison avec les traitements standard par les azoles, viserait à prévenir l'apparition d'une résistance médiée

par Pdr1p de *C. glabrata* et par les autres régulateurs analogues de la même famille comme Tac1p ou Upc2p chez *C. albicans* (Naar et Thakur, 2009). Or, le principe de la résistance clinique repose, entre autres, sur l'acquisition de mutations gain-de-fonction dans ces régulateurs alors que est le modèle thérapeutique proposé par Näär *et al.*, est basé plutôt sur l'activation du régulateur par un ligand (référée dans l'étude par « *xenobiotic-dependent gene activation* »). Ceci ferait qu'un antagoniste des azoles n'empêche pas pour autant le développement d'une résistance, puisque ce processus implique la sélection de mutations stables sur différentes régions de la protéine qui la rendent constitutivement hyperactive (Figure VII-1). Une récente revue par Monk et Goffeau a suggéré une variante de l'approche co-thérapeutique par antagoniste suggérée ci-dessus par Näär *et al.*, qui consiste à développer un analogue azolé multifonctionnel inhibant aussi bien les régulateurs *zinc cluster*, la protéine Erg11p que la pompe Pdr5p (Monk et Goffeau, 2008). Mais pour les mêmes raisons évoquées plus haut, une telle piste, à mon avis, n'empêcherait pas le développement de la résistance par les mutations gain-de-fonction dans les régulateurs *zinc cluster* impliqués. Même si de telles analogues azolés multifonctionnels inhibent les transporteurs Mdr1p/Cdr1p/Cdr2p et la cible Erg11p, des mutations activatrices dans Tac1p, Mrr1p et Upc2p n'empêcheront pas d'autres déterminants cibles de ces facteurs comme Pdr16p ou l'effecteur de fonction inconnu cible de Mrr1p de conférer la résistance.

Une autre idée par Näär *et al.* envisage une approche co-thérapeutique qui consiste à développer des molécules bloquant l'interaction de Gal11p, composante du médiateur, avec le domaine d'activation de Pdr1p via le domaine KIX de Gal11p (Naar et Thakur, 2009). Une telle approche est intéressante, dans la mesure où l'activation de Pdr1p par des mutations activatrices mènerait à l'interaction du domaine d'activation de Pdr1p avec le domaine KIX de Gal11p, de la même façon que l'activation par la liaison d'un ligand dont l'étude avait fait l'objet (Thakur *et al.*, 2008). Évidemment, dans le cas de *C. albicans*, cette approche requiert une mécanistique d'activation des facteurs de transcription Tac1p, Upc2p et Mrr1p similaire à celle de Pdr1p de *C. glabrata*. Une telle stratégie ciblant l'interaction domaine KIX-domaine d'activation ainsi que celle visant à cibler le domaine de liaison à

l'ADN  $Zn_2Cys_6$  de la protéine *zinc cluster* me semblent, en conclusion, attirantes à exploiter pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques antifongiques ou réversant la résistance.

## Bibliographie des chapitres I et VII

- Ahmad,A., Kabir,M.A., Kravets,A., Andaluz,E., Larriba,G., et Rustchenko,E. (2008) Chromosome instability and unusual features of some widely used strains of *Candida albicans*. *Yeast* 25: 433-448.
- Ainsworth,G.C. (1955) Nomenclature, the Handmaid of Classification. *J gen Microbiol* 12: 322-323.
- Akache,B., MacPherson,S., Sylvain,M.A., et Turcotte,B. (2004) Complex interplay among regulators of drug resistance genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 27855-27860.
- Akins,R.A. (2005) An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* 43: 285-318.
- Alarco,A.M., Balan,I., Talibi,D., Mainville,N., et Raymond,M. (1997) AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J Biol Chem* 272: 19304-19313.
- Alarco,A.M., et Raymond,M. (1999) The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181: 700-708.
- Albert,T.J., Norton,J., Ott,M., Richmond,T., Nuwaysir,K., Nuwaysir,E.F. *et al.* (2003) Light-directed 5'-->3' synthesis of complex oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res* 31: e35.
- Alimardani,P., Regnacq,M., Moreau-Vauzelle,C., Ferreira,T., Rossignol,T., Blondin,B., et Berges,T. (2004) SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. *Biochem J* 381: 195-202.

- Altuvia,S., Weinstein-Fischer,D., Zhang,A., Postow,L., et Storz,G. (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* 90: 43-53.
- Altuvia,S., Zhang,A., Argaman,L., Tiwari,A., et Storz,G. (1998) The Escherichia coli OxyS regulatory RNA represses fhlA translation by blocking ribosome binding. *EMBO J* 17: 6069-6075.
- Anderson,J.B. (2005) Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* 3: 547-556.
- Babu,M.M. (2008) Computational approaches to study transcriptional regulation. *Biochem Soc Trans* 36: 758-765.
- Baginski,M., Sternal,K., Czub,J., et Borowski,E. (2005) Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim Pol* 52: 655-658.
- Balakrishnan,S.K., et Gross,D.S. (2008) The tumor suppressor p53 associates with gene coding regions and co-traverses with elongating RNA polymerase II in an in vivo model. *Oncogene* 27: 2661-2672.
- Balashov,S.V., Park,S., et Perlin,D.S. (2006) Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in Candida albicans by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2058-2063.
- Banerjee,D., Lelandais,G., Shukla,S., Mukhopadhyay,G., Jacq,C., Devaux,F., et Prasad,R. (2008a) Responses of pathogenic and nonpathogenic yeast species to steroids reveal the functioning and evolution of multidrug resistance transcriptional networks. *Eukaryot Cell* 7: 68-77.
- Banerjee,M., Thompson,D.S., Lazzell,A., Carlisle,P.L., Pierce,C., Monteagudo,C. *et al.* (2008b) UME6, a novel filament-specific regulator of Candida albicans hyphal extension and virulence. *Mol Biol Cell* 19: 1354-1365.

- Bard,M., Lees,N.D., Turi,T., Craft,D., Cofrin,L., Barbuch,R. *et al.* (1993) Sterol synthesis and viability of *erg11* (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids* 28: 963-967.
- Barker,K.S., et Rogers,P.D. (2006) Recent Insights into the Mechanisms of Antifungal Resistance. *Curr Infect Dis Rep* 8: 449-456.
- Barnett,J.A. (2008) A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast* 25: 385-417.
- Ben Yaacov,R., Knoller,S., Caldwell,G.A., Becker,J.M., et Koltin,Y. (1994) *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 648-652.
- Bennett,R.J., et Johnson,A.D. (2005) Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* 59: 233-255.
- Berman,J., et Sudbery,P.E. (2002) *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3: 918-930.
- Blais,A., et Dynlacht,B.D. (2005) Constructing transcriptional regulatory networks. *Genes Dev* 19: 1499-1511.
- Borneman,A.R., Gianoulis,T.A., Zhang,Z.D., Yu,H., Rozowsky,J., Seringhaus,M.R. *et al.* (2007) Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science* 317: 815-819.
- Bouchonville,K., Forche,A., Tang,K.E., Selmecki,A., et Berman,J. (2009) Aneuploid chromosomes are highly unstable during DNA transformation of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*.
- Brand,A., Maccallum,D.M., Brown,A.J., Gow,N.A., et Odds,F.C. (2004) Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus. *Eukaryot Cell* 3: 900-909.

- Braun,B.R., Head,W.S., Wang,M.X., et Johnson,A.D. (2000) Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* 156: 31-44.
- Braun,B.R., et Johnson,A.D. (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* 277: 105-109.
- Braun,B.R., van Het,H.M., d'Enfert,C., Martchenko,M., Dungan,J., Kuo,A. *et al.* (2005) A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet* 1: 36-57.
- Bruno,V.M., et Mitchell,A.P. (2004) Large-scale gene function analysis in *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12: 157-161.
- Bruno,V.M., et Mitchell,A.P. (2005) Regulation of azole drug susceptibility by *Candida albicans* protein kinase CK2. *Mol Microbiol* 56: 559-573.
- Buck,M.J., et Lieb,J.D. (2004) ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* 83: 349-360.
- Calderone,R.A. (2002) *Candida* and Candidiasis Washington, D.C.: ASM Press, pp. 1-472.
- Cannon,R.D., Lamping,E., Holmes,A.R., Niimi,K., Baret,P.V., Keniya,M.V. *et al.* (2009) Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 22: 291-321, Table.
- Care,R.S., Trevethick,J., Binley,K.M., et Sudbery,P.E. (1999) The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol* 34: 792-798.
- Carlisle,P.L., Banerjee,M., Lazzell,A., Monteagudo,C., Lopez-Ribot,J.L., et Kadosh,D. (2009) Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 599-604.



- Carobbio,S., Realini,C., Norbury,C.J., Toda,T., Cavalli,F., et Spataro,V. (2001) Sequence of Crm1/exportin 1 mutant alleles reveals critical sites associated with multidrug resistance. *Curr Genet* 39: 2-9.
- Carvajal,E., van den Hazel,H.B., Cybularz-Kolaczowska,A., Balzi,E., et Goffeau,A. (1997) Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Mol Gen Genet* 256: 406-415.
- Cauet,G., Degryse,E., Ledoux,C., Spagnoli,R., et Achstetter,T. (1999) Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism. *Eur J Biochem* 261: 317-324.
- Chang,Q., et Petrash,J.M. (2008) Disruption of aldo-keto reductase genes leads to elevated markers of oxidative stress and inositol auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1783: 237-245.
- Charlier,C., Hart,E., Lefort,A., Ribaud,P., Dromer,F., Denning,D.W., et Lortholary,O. (2006) Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? *J Antimicrob Chemother* 57: 384-410.
- Chen,C.G., Yang,Y.L., Shih,H.I., Su,C.L., et Lo,H.J. (2004a) CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating CDR1. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4505-4512.
- Chen,K.H., Miyazaki,T., Tsai,H.F., et Bennett,J.E. (2007) The bZip transcription factor Cgap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene CgFLR1 in *Candida glabrata*. *Gene* 386: 63-72.
- Chen,S.C., et Sorrell,T.C. (2007) Antifungal agents. *Med J Aust* 187: 404-409.
- Chen,X., Magee,B.B., Dawson,D., Magee,P.T., et Kumamoto,C.A. (2004b) Chromosome 1 trisomy compromises the virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 51: 551-565.

- Chibana,H., Beckerman,J.L., et Magee,P.T. (2000) Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res* 10: 1865-1877.
- Chibana,H., Magee,B.B., Grindle,S., Ran,Y., Scherer,S., et Magee,P.T. (1998) A physical map of chromosome 7 of *Candida albicans*. *Genetics* 149: 1739-1752.
- Chibana,H., et Magee,P.T. (2009) The enigma of the major repeat sequence of *Candida albicans*. *Future Microbiol* 4: 171-179.
- Chua,G., Morris,Q.D., Sopko,R., Robinson,M.D., Ryan,O., Chan,E.T. *et al.* (2006) Identifying transcription factor functions and targets by phenotypic activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12045-12050.
- Coste,A., Selmecki,A., Forche,A., Diogo,D., Bougnoux,M.E., d'Enfert,C. *et al.* (2007) Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 6: 1889-1904.
- Coste,A., Turner,V., Ischer,F., Morschhauser,J., Forche,A., Selmecki,A. *et al.* (2006) A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* 172: 2139-2156.
- Coste,A.T., Crittin,J., Bauser,C., Rohde,B., et Sanglard,D. (2009) Functional analysis of cis- and trans- acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system. *Eukaryot Cell*.
- Coste,A.T., Karababa,M., Ischer,F., Bille,J., et Sanglard,D. (2004) TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell* 3: 1639-1652.
- Cowen,L.E. (2008) The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol* 6: 187-198.
- Cowen,L.E., Anderson,J.B., et Kohn,L.M. (2002) Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 56: 139-165.

- Cowen,L.E., et Steinbach,W.J. (2008) Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* 7: 747-764.
- Cresnar,B., et Zakelj-Mavric,M. (2009) Aspects of the steroid response in fungi. *Chem Biol Interact* 178: 303-309.
- Davies,B.S., et Rine,J. (2006) A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174: 191-201.
- Davies,B.S., Wang,H.S., et Rine,J. (2005) Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol Cell Biol* 25: 7375-7385.
- Davis,L., et Smith,G.R. (2001) Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8395-8402.
- De Backer,M.D., Ilyina,T., Ma,X.J., Vandoninck,S., Luyten,W.H., et Vanden Bossche,H. (2001) Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1660-1670.
- De Deken,X., et Raymond,M. (2004) Constitutive activation of the PDR16 promoter in a *Candida albicans* azole-resistant clinical isolate overexpressing CDR1 and CDR2. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2700-2703.
- de Hoogt,R., Luyten,W.H., Contreras,R., et De Backer,M.D. (2000) PCR- and ligation-mediated synthesis of split-marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruption in *Candida albicans*. *Biotechniques* 28: 1112-1116.
- de Micheli,M., Bille,J., Schueller,C., et Sanglard,D. (2002) A common drug-responsive element mediates the upregulation of the *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2, two genes involved in antifungal drug resistance. *Mol Microbiol* 43: 1197-1214.

- DeRisi,J., van den,H.B., Marc,P., Balzi,E., Brown,P., Jacq,C., et Goffeau,A. (2000) Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett* 470: 156-160.
- Des Etages,S.A., Saxena,D., Huang,H.L., Falvey,D.A., Barber,D., et Brandriss,M.C. (2001) Conformational changes play a role in regulating the activity of the proline utilization pathway-specific regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 40: 890-899.
- Develoux,M. (2001) [Griseofulvin]. *Ann Dermatol Venereol* 128: 1317-1325.
- do Valle Matta,M.A., Jonniaux,J.L., Balzi,E., Goffeau,A., et van den,H.B. (2001) Novel target genes of the yeast regulator Pdr1p: a contribution of the TPO1 gene in resistance to quinidine and other drugs. *Gene* 272: 111-119.
- Dodgson,A.R., Dodgson,K.J., Pujol,C., Pfaller,M.A., et Soll,D.R. (2004) Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the *FUR1* gene of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2223-2227.
- Drinnenberg,I.A., Weinberg,D.E., Xie,K.T., Mower,J.P., Wolfe,K.H., Fink,G.R., et Bartel,D.P. (2009) RNAi in Budding Yeast. *Science*.
- Du,W., Coaker,M., Sobel,J.D., et Akins,R.A. (2004) Shuttle vectors for *Candida albicans*: control of plasmid copy number and elevated expression of cloned genes. *Curr Genet* 45: 390-398.
- Dunkel,N., Blass,J., Rogers,P.D., et Morschhauser,J. (2008a) Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol* 69: 827-840.
- Dunkel,N., Liu,T.T., Barker,K.S., Homayouni,R., Morschhauser,J., et Rogers,P.D. (2008b) A Gain-of-function Mutation in the Transcription Factor *Upc2p* Causes Upregulation of Ergosterol Biosynthesis Genes and Increased Fluconazole Resistance in a Clinical *Candida albicans* Isolate. *Eukaryot Cell* 7: 1180-1190.

- Eggimann,P., et Calandra,T. (2002) Infections fongiques sévères en réanimation. In Pathologies infectieuses en réanimation. Elsevier Masson, pp. 519-555.
- Eggimann,P., Garbino,J., et Pittet,D. (2003) Management of Candida species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis* 3: 772-785.
- Egusa,H., Soysa,N.S., Ellepola,A.N., Yatani,H., et Samaranayake,L.P. (2008) Oral candidosis in HIV-infected patients. *Curr HIV Res* 6: 485-499.
- Ellis,D. (2002) Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 49 Suppl 1: 7-10.
- Espenshade,P.J., et Hughes,A.L. (2007) Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 41: 401-427.
- Fardeau,V., Lelandais,G., Oldfield,A., Salin,H., Lemoine,S., Garcia,M. *et al.* (2007) The central role of PDR1 in the foundation of yeast drug resistance. *J Biol Chem* 282: 5063-5074.
- Favre,B., et Ryder,N.S. (1996) Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 443-447.
- Fling,M.E., Kopf,J., Tamarkin,A., Gorman,J.A., Smith,H.A., et Koltin,Y. (1991) Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol Gen Genet* 227: 318-329.
- Fonzi,W.A., et Irwin,M.Y. (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134: 717-728.
- Forche,A., Alby,K., Schaefer,D., Johnson,A.D., Berman,J., et Bennett,R.J. (2008) The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol* 6: e110.

- Franz,R., Kelly,S.L., Lamb,D.C., Kelly,D.E., Ruhnke,M., et Morschhauser,J. (1998) Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3065-3072.
- Gao,C., Wang,L., Milgrom,E., et Shen,W.C. (2004) On the mechanism of constitutive Pdr1 activator-mediated PDR5 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for enhanced recruitment of coactivators and altered nucleosome structures. *J Biol Chem* 279: 42677-42686.
- Garaizar,J., Brena,S., Bikandi,J., Rementeria,A., et Ponton,J. (2006) Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 6: 987-998.
- Gauthier,C., Weber,S., Alarco,A.M., Alqawi,O., Daoud,R., Georges,E., et Raymond,M. (2003) Functional similarities and differences between *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1543-1554.
- Gill,G., Sadowski,I., et Ptashne,M. (1990) Mutations that increase the activity of a transcriptional activator in yeast and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2127-2131.
- Goffeau,A., Barrell,B.G., Bussey,H., Davis,R.W., Dujon,B., Feldmann,H. *et al.* (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-546, 567.
- Goldman,G.H., Silva Ferreira,M.E., dos Reis,M.E., Savoldi,M., Perlin,D., Park,S. *et al.* (2004) Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 50: 25-32.
- Goodwin,T.J., et Poulter,R.T. (2000) Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans*. *Genome Res* 10: 174-191.
- Gottesman,S. (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms\*. *Annu Rev Microbiol* 58: 303-328.

- Gregori,C., Bauer,B., Schwartz,C., Kren,A., Schuller,C., et Kuchler,K. (2007) A genetic screen identifies mutations in the yeast WAR1 gene, linking transcription factor phosphorylation to weak-acid stress adaptation. *FEBS J* 274: 3094-3107.
- Griac,P. (2007) Sec14 related proteins in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771: 737-745.
- Grubb,S.E., Murdoch,C., Sudbery,P.E., Saville,S.P., Lopez-Ribot,J.L., et Thornhill,M.H. (2008) *Candida albicans*-endothelial cell interactions: a key step in the pathogenesis of systemic candidiasis. *Infect Immun* 76: 4370-4377.
- Harbison,C.T., Gordon,D.B., Lee,T.I., Rinaldi,N.J., Macisaac,K.D., Danford,T.W. *et al.* (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* 431: 99-104.
- Harry,J.B., Oliver,B.G., Song,J.L., Silver,P.M., Little,J.T., Choiniere,J., et White,T.C. (2005) Drug-induced regulation of the MDR1 promoter in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2785-2792.
- Herrero,E., Ros,J., Belli,G., et Cabiscol,E. (2007) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1217-1235.
- Hiller,D., Stahl,S., et Morschhauser,J. (2006) Multiple cis-acting sequences mediate upregulation of the MDR1 efflux pump in a fluconazole-resistant clinical *Candida albicans* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2300-2308.
- Holmes,A.R., Lin,Y.H., Niimi,K., Lamping,E., Keniya,M., Niimi,M. *et al.* (2008) ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p does to fluconazole efflux in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3851-3862.
- Hope,W.W., Taberner,L., Denning,D.W., et Anderson,M.J. (2004) Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4377-4386.
- Hull,C.M., et Johnson,A.D. (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* 285: 1271-1275.

- Hull,C.M., Raisner,R.M., et Johnson,A.D. (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* 289: 307-310.
- Ito,T., Miura,F., et Onda,M. (2008) Unexpected complexity of the budding yeast transcriptome. *IUBMB Life* 60: 775-781.
- Janbon,G., Sherman,F., et Rustchenko,E. (1998) Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5150-5155.
- Jones,T., Federspiel,N.A., Chibana,H., Dungan,J., Kalman,S., Magee,B.B. *et al.* (2004) The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7329-7334.
- Kabir,M.A., Ahmad,A., Greenberg,J.R., Wang,Y.K., et Rustchenko,E. (2005) Loss and gain of chromosome 5 controls growth of *Candida albicans* on sorbose due to dispersed redundant negative regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12147-12152.
- Kanafani,Z.A., et Perfect,J.R. (2008) Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 46: 120-128.
- Karpichev,I.V., Durand-Heredia,J.M., Luo,Y., et Small,G.M. (2008) Binding characteristics and regulatory mechanisms of the transcription factors controlling oleate-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 283: 10264-10275.
- Kelly,R., et Kwon-Chung,K.J. (1992) A zinc finger protein from *Candida albicans* is involved in sucrose utilization. *J Bacteriol* 174: 222-232.
- Kelly,S.L., Lamb,D.C., Kelly,D.E., Loeffler,J., et Einsele,H. (1996) Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. *Lancet* 348: 1523-1524.



- Kelly,S.L., Lamb,D.C., Kelly,D.E., Manning,N.J., Loeffler,J., Hebart,H. *et al.* (1997) Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett* 400: 80-82.
- Kolaczowska,A., Kolaczowski,M., Delahodde,A., et Goffeau,A. (2002) Functional dissection of Pdr1p, a regulator of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 267: 96-106.
- Kontoyiannis,D.P., et Lewis,R.E. (2002) Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 359: 1135-1144.
- Kuge,S., Arita,M., Murayama,A., Maeta,K., Izawa,S., Inoue,Y., et Nomoto,A. (2001) Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* 21: 6139-6150.
- Kuge,S., Jones,N., et Nomoto,A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* 16: 1710-1720.
- Kuge,S., Toda,T., Iizuka,N., et Nomoto,A. (1998) Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells* 3: 521-532.
- Lachke,S.A., Lockhart,S.R., Daniels,K.J., et Soll,D.R. (2003) Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun* 71: 4970-4976.
- Lamb,D.C., Kelly,D.E., Schunck,W.H., Shyadehi,A.Z., Akhtar,M., Lowe,D.J. *et al.* (1997) The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J Biol Chem* 272: 5682-5688.
- Larsen,B., Anderson,S., Brockman,A., Essmann,M., et Schmidt,M. (2006) Key physiological differences in *Candida albicans* CDR1 induction by steroid hormones and antifungal drugs. *Yeast* 23: 795-802.

- Laverdiere,M., Lalonde,R.G., Baril,J.G., Sheppard,D.C., Park,S., et Perlin,D.S. (2006) Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *J Antimicrob Chemother* 57: 705-708.
- Lee,T.I., Rinaldi,N.J., Robert,F., Odom,D.T., Bar-Joseph,Z., Gerber,G.K. *et al.* (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298: 799-804.
- Legrand,M., Lephart,P., Forche,A., Mueller,F.M., Walsh,T., Magee,P.T., et Magee,B.B. (2004) Homozygosity at the MTL locus in clinical strains of *Candida albicans*: karyotypic rearrangements and tetraploid formation. *Mol Microbiol* 52: 1451-1462.
- Lelandais,G., Tanty,V., Geneix,C., Etchebest,C., Jacq,C., et Devaux,F. (2008) Genome adaptation to chemical stress: clues from comparative transcriptomics in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida glabrata*. *Genome Biol* 9: R164.
- Leverentz,M.K., et Reece,R.J. (2006) Phosphorylation of Zn(II)2Cys6 proteins: a cause or effect of transcriptional activation? *Biochem Soc Trans* 34: 794-797.
- Lipshutz,R.J., Fodor,S.P., Gingeras,T.R., et Lockhart,D.J. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21: 20-24.
- Liu,H., Colavitti,R., Rovira,I.I., et Finkel,T. (2005) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 97: 967-974.
- Liu,X.S. (2007) Getting started in tiling microarray analysis. *PLoS Comput Biol* 3: 1842-1844.
- Lo,H.J., Kohler,J.R., DiDomenico,B., Loebenberg,D., Cacciapuoti,A., et Fink,G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949.
- Lockhart,S.R., Daniels,K.J., Zhao,R., Wessels,D., et Soll,D.R. (2003) Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2: 49-61.

- Lopez-Ribot, J.L., McAtee, R.K., Lee, L.N., Kirkpatrick, W.R., White, T.C., Sanglard, D., et Patterson, T.F. (1998) Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial candida albicans isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2932-2937.
- Lucau-Danila, A., Lelandais, G., Kozovska, Z., Tanty, V., Delaveau, T., Devaux, F., et Jacq, C. (2005) Early expression of yeast genes affected by chemical stress. *Mol Cell Biol* 25: 1860-1868.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M., et Kelly, S. (2002) Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* 8: 76-81.
- Lyons, C.N., et White, T.C. (2000) Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2296-2303.
- MacPherson, S., Akache, B., Weber, S., De, D., X, Raymond, M., et Turcotte, B. (2005) *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1745-1752.
- MacPherson, S., Larochelle, M., et Turcotte, B. (2006) A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 583-604.
- Maeta, K., Izawa, S., Okazaki, S., Kuge, S., et Inoue, Y. (2004) Activity of the Yap1 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis. *Mol Cell Biol* 24: 8753-8764.
- Mahe, Y., Lemoine, Y., et Kuchler, K. (1996) The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids in vivo. *J Biol Chem* 271: 25167-72.
- Marichal, P., Koymans, L., Willemsens, S., Bellens, D., Verhasselt, P., Luyten, W. *et al.* (1999) Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase

- (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* 145 ( Pt 10): 2701-2713.
- Marie,C., Leyde,S., et White,T.C. (2008) Cytoplasmic localization of sterol transcription factors Upc2p and Ecm22p in *S. cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* 45: 1430-1438.
- Martchenko,M., Alarco,A.M., Harcus,D., et Whiteway,M. (2004) Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* 15: 456-467.
- Martchenko,M., Levitin,A., Hogues,H., Nantel,A., et Whiteway,M. (2007) Transcriptional rewiring of fungal galactose-metabolism circuitry. *Curr Biol* 17: 1007-1013.
- Mio,T., Adachi-Shimizu,M., Tachibana,Y., Tabuchi,H., Inoue,S.B., Yabe,T. *et al.* (1997) Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* 179: 4096-4105.
- Mohr,J., Johnson,M., Cooper,T., Lewis,J.S., et Ostrosky-Zeichner,L. (2008) Current options in antifungal pharmacotherapy. *Pharmacotherapy* 28: 614-645.
- Molin,M., Renault,J.P., Lagniel,G., Pin,S., Toledano,M., et Labarre,J. (2007) Ionizing radiation induces a Yap1-dependent peroxide stress response in yeast. *Free Radic Biol Med* 43: 136-144.
- Monk,B.C., et Goffeau,A. (2008) Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science* 321: 367-369.
- Morris,M.I., et Villmann,M. (2006a) Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. *Am J Health Syst Pharm* 63: 1693-1703.
- Morris,M.I., et Villmann,M. (2006b) Echinocandins in the management of invasive fungal infections, Part 2. *Am J Health Syst Pharm* 63: 1813-1820.
- Morschhauser,J. (2002) The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1587: 240-248.

- Morschhauser, J. (2009) Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*.
- Morschhauser, J., Barker, K.S., Liu, T.T., Blass-Warmuth, J., Homayouni, R., et Rogers, P.D. (2007) The Transcription Factor Mrr1p Controls Expression of the MDR1 Efflux Pump and Mediates Multidrug Resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 3: e164.
- Moye-Rowley, W.S. (2003) Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell* 2: 381-389.
- Moye-Rowley, W.S., Harshman, K.D., et Parker, C.S. (1988) YAP1 encodes a yeast homolog of mammalian transcription factor AP-1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 2: 711-717.
- Moye-Rowley, W.S., Harshman, K.D., et Parker, C.S. (1989) Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* 3: 283-292.
- Naar, A.M., et Thakur, J.K. (2009) Nuclear receptor-like transcription factors in fungi. *Genes Dev* 23: 419-432.
- Nalley, K., Johnston, S.A., et Kodadek, T. (2006) Proteolytic turnover of the Gal4 transcription factor is not required for function in vivo. *Nature* 442: 1054-1057.
- Nantel, A. (2006) The long hard road to a completed *Candida albicans* genome. *Fungal Genet Biol* 43: 311-315.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A, vol.17, no. 9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. *NCCLS*.
- Nguyen, D.T., Alarco, A.M., et Raymond, M. (2001) Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem* 276: 1138-1145.

- Nikolaev,I., Cochet,M.F., et Felenbok,B. (2003) Nuclear import of zinc binuclear cluster proteins proceeds through multiple, overlapping transport pathways. *Eukaryot Cell* 2: 209-221.
- Nobile,C.J., et Mitchell,A.P. (2009) Large-scale gene disruption using the UAU1 cassette. *Methods Mol Biol* 499: 175-194.
- Noble,S.M., et Johnson,A.D. (2007) Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet* 41: 193-211.
- Nolte,F.S., Parkinson,T., Falconer,D.J., Dix,S., Williams,J., Gilmore,C. *et al.* (1997) Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 196-199.
- Nourani,A., Papajova,D., Delahodde,A., Jacq,C., et Subik,J. (1997) Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain. *Mol Gen Genet* 256: 397-405.
- O'Brien,K.P., Remm,M., et Sonnhammer,E.L. (2005) Inparanoid: a comprehensive database of eukaryotic orthologs. *Nucleic Acids Res* 33: D476-D480.
- Odds,F.C., Brown,A.J., et Gow,N.A. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11: 272-279.
- Osumi,M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29: 207-233.
- Panda,S., Sato,T.K., Hampton,G.M., et Hogenesch,J.B. (2003) An array of insights: application of DNA chip technology in the study of cell biology. *Trends Cell Biol* 13: 151-156.
- Pappas,P.G., Rex,J.H., Sobel,J.D., Filler,S.G., Dismukes,W.E., Walsh,T.J., et Edwards,J.E. (2004) Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38: 161-189.

- Park,S., Kelly,R., Kahn,J.N., Robles,J., Hsu,M.J., Register,E. *et al.* (2005) Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3264-3273.
- Pearce,M.A., et Howell,S.A. (1991) Restriction fragment length polymorphism analysis of azole-resistant and azole-susceptible *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol* 29: 1364-1367.
- Perlin,D.S. (2007) Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 10: 121-130.
- Pfaller,M.A., et Diekema,D.J. (2004) Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 42: 4419-4431.
- Pfaller,M.A., et Diekema,D.J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-163.
- Pfaller,M.A., Diekema,D.J., et Sheehan,D.J. (2006) Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 19: 435-447.
- Phan,Q.T., Myers,C.L., Fu,Y., Sheppard,D.C., Yeaman,M.R., Welch,W.H. *et al.* (2007) Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* 5: e64.
- Phillips,A.J., Sudbery,I., et Ramsdale,M. (2003) Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14327-14332.
- Prasad,R., De Wergifosse,P., Goffeau,A., et Balzi,E. (1995) Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* 27: 320-329.

- Ramsdale, M. (2008) Programmed cell death in pathogenic fungi. *Biochim Biophys Acta* 1783: 1369-1380.
- Redding, S., Smith, J., Farinacci, G., Rinaldi, M., Fothergill, A., Rhine-Chalberg, J., et Pfaller, M. (1994) Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. *Clin Infect Dis* 18: 240-242.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I. *et al.* (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 290: 2306-2309.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., et Morschhauser, J. (2004) The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene* 341: 119-127.
- Rex, J.H., et Pfaller, M.A. (2002) Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis* 35: 982-989.
- Roemer, T., Jiang, B., Davison, J., Ketela, T., Veillette, K., Breton, A. *et al.* (2003) Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Mol Microbiol* 50: 167-181.
- Rogers, P.D., et Barker, K.S. (2002) Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3412-3417.
- Rogers, P.D., et Barker, K.S. (2003) Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1220-1227.
- Rognon, B., Kozovska, Z., Coste, A.T., Pardini, G., et Sanglard, D. (2006) Identification of promoter elements responsible for the regulation of MDR1 from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiology* 152: 3701-3722.
- Rousset, J.-J. (1997) *Maladies parasitaires* Masson, pp. 1-192.



- Rustad,T.R., Stevens,D.A., Pfaller,M.A., et White,T.C. (2002) Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. *Microbiology* 148: 1061-1072.
- Rustchenko,E. (2007) Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 7: 2-11.
- Rustchenko,E.P., Howard,D.H., et Sherman,F. (1994) Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. *J Bacteriol* 176: 3231-3241.
- Sa-Correia,I., dos Santos,S.C., Teixeira,M.C., Cabrito,T.R., et Mira,N.P. (2009) Drug:H<sup>+</sup> antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends Microbiol* 17: 22-31.
- Safdar,A., Bannister,T.W., et Safdar,Z. (2004) The predictors of outcome in immunocompetent patients with hematogenous candidiasis. *Int J Infect Dis* 8: 180-186.
- Saidane,S., Weber,S., De,D., X, St Germain,G., et Raymond,M. (2006) PDR16-mediated azole resistance in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 60: 1546-1562.
- Salin,H., Fardeau,V., Piccini,E., Lelandais,G., Tanty,V., Lemoine,S. *et al.* (2008) Structure and properties of transcriptional networks driving selenite stress response in yeasts. *BMC Genomics* 9: 333.
- Sanglard,D. (2002) Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* 5: 379-385.
- Sanglard,D., Ischer,F., Monod,M., et Bille,J. (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2300-2305.
- Sanglard,D., Ischer,F., Monod,M., et Bille,J. (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143 ( Pt 2): 405-416.

- Sanglard,D., Ischer,F., Parkinson,T., Falconer,D., et Bille,J. (2003) *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2404-2412.
- Sanglard,D., Kuchler,K., Ischer,F., Pagani,J.L., Monod,M., et Bille,J. (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2378-2386.
- Sanglard,D., et Odds,F.C. (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2: 73-85.
- Sanyal,K., Baum,M., et Carbon,J. (2004) Centromeric DNA sequences in the pathogenic yeast *Candida albicans* are all different and unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11374-11379.
- Scannell,D.R., Butler,G., et Wolfe,K.H. (2007) Yeast genome evolution--the origin of the species. *Yeast* 24: 929-942.
- Schuetzer-Muehlbauer,M., Willinger,B., Krapf,G., Enzinger,S., Presterl,E., et Kuchler,K. (2003) The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol* 48: 225-235.
- Sellam,A., Askew,C., Epp,E., Lavoie,H., Whiteway,M., et Nantel,A. (2009a) Genome-wide mapping of the coactivator Ada2p yields insight into the functional roles of SAGA/ADA complex in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 20: 2389-2400.
- Sellam,A., Tebbji,F., et Nantel,A. (2009b) Role of Ndt80p in sterol metabolism regulation and azole resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 8: 1174-1183.
- Selleck,S.B., et Majors,J.E. (1987) In vivo DNA-binding properties of a yeast transcription activator protein. *Mol Cell Biol* 7: 3260-3267.
- Sellick,C.A., et Reece,R.J. (2003) Modulation of transcription factor function by an amino acid: activation of Put3p by proline. *EMBO J* 22: 5147-5153.

- Sellick,C.A., et Reece,R.J. (2005) Eukaryotic transcription factors as direct nutrient sensors. *Trends Biochem Sci* 30: 405-412.
- Selmecki,A., Bergmann,S., et Berman,J. (2005) Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol Microbiol* 55: 1553-1565.
- Selmecki,A., Forche,A., et Berman,J. (2006) Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* 313: 367-370.
- Selmecki,A., Gerami-Nejad,M., Paulson,C., Forche,A., et Berman,J. (2008) An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. *Mol Microbiol* 68: 624-641.
- Sheehan,D.J., Hitchcock,C.A., et Sibley,C.M. (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 40-79.
- Silver,P.M., Oliver,B.G., et White,T.C. (2004) Role of *Candida albicans* transcription factor Upc2p in drug resistance and sterol metabolism. *Eukaryot Cell* 3: 1391-1397.
- Simonics,T., Kozovska,Z., Michalkova-Papajova,D., Delahodde,A., Jacq,C., et Subik,J. (2000) Isolation and molecular characterization of the carboxy-terminal pdr3 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 38: 248-255.
- Sims,C.R., Ostrosky-Zeichner,L., et Rex,J.H. (2005) Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch Med Res* 36: 660-671.
- Sopko,R., Huang,D., Preston,N., Chua,G., Papp,B., Kafadar,K. *et al.* (2006) Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol Cell* 21: 319-330.
- Soud,A.K., Gao,C., Wang,L., Milgrom,E., et Shen,W.C. (2006) ELM1 is required for multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 173: 1919-1937.

- Souza,C.A., Silva,C.C., et Ferreira,A.V. (2003) Sex in fungi: lessons of gene regulation. *Genet Mol Res* 2: 136-147.
- Srikantha,T., Borneman,A.R., Daniels,K.J., Pujol,C., Wu,W., Seringhaus,M.R. *et al.* (2006) TOS9 regulates white-opaque switching in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 5: 1674-1687.
- Sudbery,P., Gow,N., et Berman,J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12: 317-324.
- Szallies,A., Kubata,B.K., et Duszenko,M. (2002) A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 517: 144-150.
- Tait,E., Simon,M.C., King,S., Brown,A.J., Gow,N.A., et Shaw,D.J. (1997) A *Candida albicans* genome project: cosmid contigs, physical mapping, and gene isolation. *Fungal Genet Biol* 21: 308-314.
- Tang,L., Liu,X., et Clarke,N.D. (2006) Inferring direct regulatory targets from expression and genome location analyses: a comparison of transcription factor deletion and overexpression. *BMC Genomics* 7: 215.
- Thakur,J.K., Arthanari,H., Yang,F., Pan,S.J., Fan,X., Breger,J. *et al.* (2008) A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* 452: 604-609.
- Tiwari,R., Koffel,R., et Schneider,R. (2007) An acetylation/deacetylation cycle controls the export of sterols and steroids from *S. cerevisiae*. *EMBO J* 26: 5109-5119.
- Torres,H.A., Hachem,R.Y., Chemaly,R.F., Kontoyiannis,D.P., et Raad,I.I. (2005) Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. *Lancet Infect Dis* 5: 775-785.
- Traven,A., Jelacic,B., et Sopta,M. (2006) Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep* 7: 496-499.

- Tsao,S., Rahkhoodaee,F., et Raymond,M. (2009) Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1344-1352.
- Uhl,M.A., Biery,M., Craig,N., et Johnson,A.D. (2003) Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C.albicans*. *EMBO J* 22: 2668-2678.
- Vallee,B.L., Coleman,J.E., et Auld,D.S. (1991) Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 999-1003.
- van den Hazel,H.B., Pichler,H., do Valle Matta,M.A., Leitner,E., Goffeau,A., et Daum,G. (1999) PDR16 and PDR17, two homologous genes of *Saccharomyces cerevisiae*, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. *J Biol Chem* 274: 1934-1941.
- van Het,H.M., Rast,T.J., Martchenko,M., Grindle,S., Dignard,D., Hogues,H. *et al.* (2007) Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol* 8: R52.
- Walsh,T.J., Groll,A., Hiemenz,J., Fleming,R., Roilides,E., et Anaissie,E. (2004) Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 10 Suppl 1: 48-66.
- Wang,D., Hu,Y., Zheng,F., Zhou,K., et Kohlhaw,G.B. (1997) Evidence that intramolecular interactions are involved in masking the activation domain of transcriptional activator Leu3p. *J Biol Chem* 272: 19383-19392.
- Wang,D., Zheng,F., Holmberg,S., et Kohlhaw,G.B. (1999) Yeast transcriptional regulator Leu3p. Self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J Biol Chem* 274: 19017-19024.
- Wellington,M., et Rustchenko,E. (2005) 5-Fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. *Yeast* 22: 57-70.

- Wemmie, J.A., Steggerda, S.M., et Moye-Rowley, W.S. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diamide. *J Biol Chem* 272: 7908-7914.
- White, T.C. (1997a) Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1482-1487.
- White, T.C. (1997b) The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 $\alpha$  demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1488-1494.
- White, T.C., Marr, K.A., et Bowden, R.A. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11: 382-402.
- Whiteway, M., et Bachewich, C. (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 61: 529-553.
- Wilson, R.B., Davis, D., Enloe, B.M., et Mitchell, A.P. (2000) A recyclable *Candida albicans* URA3 cassette for PCR product-directed gene disruptions. *Yeast* 16: 65-70.
- Wirsching, S., Michel, S., Kohler, G., et Morschhauser, J. (2000a) Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol* 182: 400-404.
- Wirsching, S., Michel, S., et Morschhauser, J. (2000b) Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol* 36: 856-865.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T. *et al.* (2004) An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 166: 969-974.
- Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R., et Storz, G. (1998) The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J* 17: 6061-6068.

## **ANNEXE**

### **Tableau 1 du chapitre 6**

**TABLE 1.** The *Candida albicans* family of zinc cluster proteins<sup>a</sup>

Orf19 number <sup>b</sup>	Gene name <sup>c</sup>	Length (a. a.)	Z <sub>2</sub> C <sub>6</sub> position <sup>d</sup>	FTD <sup>e</sup>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>f</sup> homolog	Function/comments	Refs <sup>g</sup>
orf19.166	<i>ASG1</i>	990	93-130	+	Asg1p	Functionally complements azole resistance susceptibility in $\Delta pdr1$ , $\Delta pdr3$ mutant of <i>S. cerevisiae</i> . Necessary to sustain growth on nonfermentable carbon sources.	[77]
orf19.255	<i>ZCF1</i>	838	8-45	+			
orf19.391	<i>UPC2</i>	712	52-91		Upc2p	Regulates <i>ERG</i> gene expression in <i>C. albicans</i> .	[57,56]
orf19.431	<i>ZCF2</i>	775	19-57				
orf19.1035	<i>WAR1</i>	947	52-95		War1p	Involved in resistance to weak organic acids.	[123]
orf19.1168	<i>ZCF3</i>	195	53-93				
orf19.1227	<i>ZCF4</i>	196	16-53				
orf19.1255	<i>ZCF5</i>	972	46-85	+			
orf19.1497	<i>ZCF6</i>	370	29-66				
orf19.1499	<i>CTF1</i>	1144	82-121	+		Regulator of $\beta$ -oxidation. Functionally complements azole resistance susceptibility in <i>pdr1</i> $\Delta$ , <i>pdr3</i> $\Delta$ mutant of <i>S. cerevisiae</i> . Displays high homology to <i>Nectria haematococca</i> CTF1 (cutinase transcription factor 1).	[77,75,131]



Orf19 number <sup>b</sup>	Gene name <sup>c</sup>	Length (a. a.)	Z <sub>2</sub> C <sub>6</sub> position <sup>d</sup>	FTD <sup>e</sup>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>f</sup> homolog	Function/comments	Refs <sup>g</sup>
orf19.1685	<i>ZCF7</i>	449	113-150				
orf19.1718	<i>ZCF8</i>	915	67-106				
orf19.1822	<i>UME6</i>	840	766-804		Ume6p	Regulator of hyphal extension and virulence. <i>S. cerevisiae</i> Ume6p regulates repression and induction of early meiotic genes.	[86,132]
orf19.1926	<i>SEF2</i>	661	25-66			Homologous to Sef1p; <i>SEF2</i> expression is repressed by <i>SFUI</i> under high-iron conditions.	[133]
orf19.2077	<i>ZCF9</i>	834	26-65			Hypersensitive to toxic ergosterol analog ECC69 and/or ECC1384.	[125]
orf19.2280	<i>ZCF10</i>	921	16-54	+			
orf19.2423	<i>ZCF11</i>	561	32-72		Ert1p	Homologous to <i>CWT1</i> . Transposon mutation affects filamentous growth.	[89]
orf19.2623	<i>ECM22</i> (alias <i>ZCF12</i> )	860	114-152				
orf19.2646	<i>ZCF13</i>	1242	31-70	+			
orf19.2647	<i>ZCF14</i>	528	31-70			Homologous to <i>CTA4</i> .	
orf19.2745	<i>UME7</i>	458	379-417			Homologous to <i>UME6</i> .	[132]

Orf19 number <sup>b</sup>	Gene name <sup>c</sup>	Length (a. a.)	Z <sub>2</sub> C <sub>6</sub> position <sup>d</sup>	FTD <sup>e</sup>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>f</sup> homolog	Function/comments	Refs <sup>g</sup>
orf19.2747	<i>RGT1</i>	1029	88-134		Rgt1p	Transcriptional repressor involved in the regulation of glucose transporter gene-expression.	[71,70]
orf19.2748	<i>ARG83</i>	974	10-49		Arg81	Clade-associated gene expression. <i>S. cerevisiae</i> Arg81p, which is involved in the regulation of arginine-responsive genes. Homologous to <i>ARG81</i> .	[134], SGD
orf19.2753	<i>ZCF15</i>	944	13-50	+		Homologous to <i>FGR27</i> .	
orf19.2808	<i>ZCF16</i>	1078	30-68				
orf19.3012	<i>ARO80</i>	1065	43-87	+	Aro80p	Regulator of aromatic alcohol biosynthesis via the Ehrlich pathway.	[83]
orf19.3127	<i>CZF1</i>	385	313-350			Transcriptional regulator of white-opaque switching frequency and hyphal growth regulator.	[61,58]
orf19.3187	<i>ZNC1</i>	922	24-61	+		Likely essential gene; homologous to <i>TAC1</i> and <i>ZNC3</i> .	[53]
orf19.3188	<i>TAC1</i>	981	38-78	+		Transcriptional activator of <i>CDR1</i> and <i>CDR2</i> encoding multidrug transporters.	[52,53]
orf19.3190	<i>ZNC3</i>	1010	64-102	+		Likely essential gene; homologous to <i>TAC1</i> and <i>ZNC1</i> .	[53]
orf19.3252	<i>DAL81</i>	878	118-158	+	Dal81p	<i>S. cerevisiae</i> Dal81p is a positive regulator	SGD

Orf19 number <sup>b</sup>	Gene name <sup>c</sup>	Length (a. a.)	Z <sub>2</sub> C <sub>6</sub> position <sup>d</sup>	FTD <sup>e</sup>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>f</sup> homolog	Function/comments	Refs <sup>g</sup>
						of genes involved in nitrogen utilization.	
orf19.3305	<i>ZCF17</i>	738	16-56				
orf19.3308	<i>STB5</i>	640	37-76	+	Stb5p	<i>S. cerevisiae</i> Stb5p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response.	SGD
orf19.3405	<i>ZCF18</i>	510	15-53			Heterozygous null mutant displays sensitivity to virgineone.	[120]
orf19.3753	<i>SEF1</i>	917	88-129	+	Sef1p	<i>Kluyveromyces lactis</i> <i>SEF1</i> and its <i>S. cerevisiae</i> homologue bypass the unknown essential function of the <i>S. cerevisiae</i> <i>RPM2</i> gene.	[135]
orf19.3876	<i>ZCF19</i>	619	42-83				
orf19.3986	<i>PPR1</i>	860	33-72	+	Ppr1p	<i>S. cerevisiae</i> Ppr1p positively regulates transcription of genes involved in uracil biosynthesis.	SGD
orf19.4145	<i>ZCF20</i>	1085	36-77				
orf19.4166	<i>ZCF21</i>	629	126-164				
orf19.4225	<i>LEU3</i>	984	80-122		Leu3p	<i>S. cerevisiae</i> Leu3p regulates genes involved in branched chain amino acid biosynthesis and ammonia assimilation.	SGD
orf19.4251	<i>ZCF22</i>	699	40-78				
orf19.4288	<i>CTA7</i> (alias 834		117-155	+	Stb4p	Activates transcription in 1-hybrid assay in	[136]

Orf19 number <sup>b</sup>	Gene name <sup>c</sup>	Length (a. a.)	Z <sub>2</sub> C <sub>6</sub> position <sup>d</sup>	FTD <sup>e</sup>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>f</sup> homolog	Function/comments	Refs <sup>g</sup>
	<i>STB4</i> )					<i>S. cerevisiae</i> .	
orf19.4342	<i>SUT1</i>	356	201-304		Sut1p	<i>S. cerevisiae</i> Sut1p regulates sterol uptake. Contains an atypical zinc cluster domain with a spacing of 69 a.a. between cysteines 3 and 4.	SGD
orf19.4450	<i>ZCF23</i>	566	18-58		Gsm1p	Homologous to <i>CWT1</i> . Gsm1p is computationally predicted to be involved in oxidative phosphorylation in <i>S. cerevisiae</i> , based on patterns of expression and sequence analysis.	SGD
orf19.4524	<i>ZCF24</i>	701	19-56	+			
orf19.4568	<i>ZCF25</i>	805	15-52	+		Homologous to <i>FGR27</i> .	
orf19.4573	<i>ZCF26</i>	830	13-50	+		Homologous to <i>FGR27</i> .	
orf19.4649	<i>ZCF27</i>	1196	237-276				
orf19.4766	<i>ARG81</i>	1100	46-85		Arg81p	<i>S. cerevisiae</i> Arg81p is involved in the regulation of arginine-responsive genes.	SGD
orf19.4767	<i>ZCF28</i>	246	192-232				
orf19.4776	<i>LYS143</i>	876	26-64			Homologous to <i>LYS14</i> .	
orf19.4778	<i>LYS142</i>	689	11-49			Homologous to <i>LYS14</i> .	
orf19.5097	<i>CAT8</i>	1056	52-90	+	Cat8p	Regulator of lactate metabolism. Homozygous null mutant shows a defect in transcription of <i>JEN1</i> encoding lactate	[76], SGD

Orf19 number <sup>b</sup>	Gene name <sup>c</sup>	Length (a. a.)	Z <sub>2</sub> C <sub>6</sub> position <sup>d</sup>	FTD <sup>e</sup>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>f</sup> homolog	Function/comments	Refs <sup>g</sup>
orf19.5133	<i>ZCF29</i>	1105	10-48	+		permease. <i>S. cerevisiae</i> Cat8p is involved in derepression of a variety of genes under non-fermentative growth conditions.	
orf19.5251	<i>ZCF30</i>	799	13-55	+		Homologous to <i>CTA4</i> .	
orf19.5338	<i>GAL4</i>	261	22-60		Gal4p	Unlike <i>S. cerevisiae</i> homologue, <i>C. albicans</i> Gal4p does not regulate the expression of <i>GAL</i> genes but regulates the expression of the <i>TLO</i> gene family members and controls glycolysis.	[63]
orf19.5380	<i>LYS144</i>	861	42-80			Homologous to <i>LYS14</i> .	
orf19.5548	<i>LYS14</i>	592	38-76		Lys14p	<i>S. cerevisiae</i> Lys14p regulates genes of the lysine biosynthetic pathway.	SGD
orf19.5729	<i>FGR17</i>	654	11-48	+		Regulator of filamentous growth.	[89]
orf19.5849	<i>CWT1</i>	578	49-87		Rds2p	Disruption of <i>CWT1</i> confers sensitivity to calcofluor white and alters the composition of the cell wall.	[127,130]
orf19.5924	<i>ZCF31</i>	1130	31-87				
orf19.5940	<i>ZCF32</i>	716	12-50				
orf19.5992	<i>WOR2</i> (alias <i>ZCF33</i> )	446	303-342			Transcriptional regulator of white-opaque switching; required for maintenance of opaque state.	[61]

Orf19 number <sup>b</sup>	Gene name <sup>c</sup>	Length (a. a.)	Z <sub>2</sub> C <sub>6</sub> position <sup>d</sup>	FTD <sup>e</sup>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>f</sup> homolog	Function/comments	Refs <sup>g</sup>
orf19.6038	<i>UGA32</i>	583	49-87			Homologous to <i>UGA3</i> .	
orf19.6182	<i>ZCF34</i>	710	9-46	+			
orf19.6203	<i>PUT3</i>	978	66-103	+	Put3p	<i>S. cerevisiae</i> Put3p positively regulates <i>PUT</i> (proline utilization) genes.	SGD
orf19.6680	<i>FGR27</i>	787	29-66	+		Regulator of filamentous growth	[89]
orf19.6817	<i>FCR1</i>	517	24-61			Negative regulator of drug resistance; partially suppresses the fluconazole sensitivity of an <i>S. cerevisiae</i> $\Delta pdr1 \Delta pdr3$ double mutant.	[118]
orf19.6985	<i>TEA1</i>	900	40-76	+	Tea1p	<i>S. cerevisiae</i> Tea1p is a Ty enhancer activator.	[137]
orf19.7317	<i>UGA33</i>	482	15-54			Homologous to <i>UGA3</i> .	
orf19.7319	<i>SUC1</i>	501	11-48	+	Mal13p	Involved in sucrose utilization.	[68]
orf19.7371	<i>ZCF35</i>	1102	21-59	+		Homologous to <i>CTA4</i> .	
orf19.7372	<i>MRR1</i> (alias <i>ZCF36</i> )	1108	29-68	+		Regulator of <i>MDR1</i> expression. Gain-of-function mutations in Mrr1p confer azole resistance in clinical isolates. Homologous to <i>CTA4</i> .	[55]
orf19.7374	<i>CTA4</i>	1016	14-54			Regulator of nitrosative stress response.	[124]
orf19.7381	<i>ZCF37</i>	624	17-57				
orf19.7518	<i>ZCF38</i>	582	12-52	+			

Orf19 number <sup>b</sup>	Gene name <sup>c</sup>	Length (a. a.)	Z <sub>2</sub> C <sub>6</sub> position <sup>d</sup>	FTD <sup>e</sup>	<i>S. cerevisiae</i> <sup>f</sup> homolog	Function/comments	Refs <sup>g</sup>
orf19.7570	<i>UGA3</i>	803	72-111		Uga3p	<i>S. cerevisiae</i> Uga3p regulates genes for catabolism of gamma-aminobutyrate (GABA).	SGD
orf19.7583	<i>ZCF39</i>	681	23-65				
orf19.1604	<i>ZCF40</i>	989	15-53				
orf19.4998	<i>ZCF41</i>	991	15-52	+	Tea1p	Homologous to <i>TEA1</i> .	
orf19.6781	<i>ZCF42</i>	472	12-50				
orf19.6888	<i>ZCF43</i>	442	11-49				

<sup>a</sup> Eighty-one genes encoding (or predicted to encode) zinc cluster proteins, in addition to orf19.4342 (82<sup>nd</sup>), are listed. Orf19.4342 encodes an atypical putative zinc cluster protein homologous to *S. cerevisiae* Sut1p and Sut2p (Figure 2). An initial number of ORFs (77 genes, excluding orf19.4342) were identified by analysis of the *C. albicans* genome (Assembly 19) during the annotation project [21], using a combination of sequence analyses tools as described previously [21]. Additional 4 ORFs were identified by analyses of the *C. albicans* proteome (Assembly 21) using the PatMatch tool at the *Candida* genome database (CGD, <http://www.candidagenome.org/cgi-bin/PATMATCH/nph-patmatch>). The PatMatch pattern entered for search was CX{2}CX{6}C, which allowed to identify 114 hits. Among them only 81 were identified as having a zinc cluster motif by the Protein Families Database (PFAM) using an e-value cutoff of  $\leq 0.002$  (<http://pfam.sanger.ac.uk/search?tab=searchSequenceBlock>). The PatMatch analysis was performed using the default settings in October 2009.

<sup>b</sup> ORF numbers are from Assemblies 19 [20,21] and 21 (CGD, [www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)). Some updates in gene names and functions/comments are taken from CGD.

<sup>c</sup> Published or suggested name. A ZCFx (Zinc Cluster Factor) name has been assigned to ORFs without a clear homologue and/or function.

<sup>d</sup> Positions of the putative zinc binuclear cluster motif in the protein, according to PFAM.

<sup>e</sup> FTD, for fungal\_trans domain in PFAM, also known as MHR for middle homology region [6]. The symbol “+” indicates the presence of a putative FTD according to PFAM (e-value cutoff  $\leq 0.006$ ).

<sup>f</sup> The *S. cerevisiae* zinc cluster protein most homologous to the *C. albicans* protein was identified by BLAST reciprocal analyses (top BLASTP e-value of 1.E-20) as previously described [21].

<sup>g</sup> SGD: *Saccharomyces* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>).

