

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

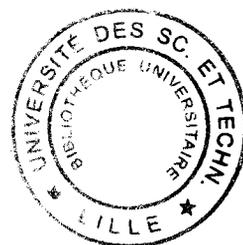
THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I
en Biologie et Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Cyril Guyard

le 13 Décembre 2001



Le phénomène killer chez la levure *Williopsis saturnus* var. *mrakii* : de la caractérisation de la protéine à la recherche du gène

Directeurs de thèse : Dr. Jean-Charles Cailliez et Dr. Franco D. Menozzi

Jury

Pr. Jean-Claude Michalski	Président
Pr. Anne-Marie Corbisier-Colson	Rapporteur
Pr. Tilman Achstetter	Rapporteur
Dr. Domingo Gargallo-Viola	Examinateur
Dr. Daniel Poulain	Examinateur

à Nathalie et Andreas

à Francine, Simone, André et Lucien

Remerciements

J'exprime mes plus vifs remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de lire et de juger ce travail :

*** Professeur Jean-Claude MICHALSKI**

Université des Sciences et Technologies de Lille
UMR CNRS n°8576, Laboratoire de Chimie Biologique
France

*** Professeur Tilman ACHSTETTER**

Hochschule Bremen
University of Applied Sciences
Meerestechnik und Angewandte Naturwissenschaften
Germany

*** Professeur Anne-Marie CORBISIER-COLSON**

Faculté des Sciences Agronomiques
Département de Chimie Appliquée et de Bio-industries
Unité de Microbiologie MBLA
Belgique

*** Docteur Jean-Charles CAILLIEZ**

Laboratoire Environnement & Santé
Faculté Libre de Médecine et Faculté Libre des Sciences
Université Catholique de Lille
France

*** Docteur Daniel POULAIN**

Laboratoire de Mycologie Fondamentale et Appliquée
INSERM EPI 9915, Faculté de Médecine,
Université du Droit et de la Santé de Lille
France

*** Docteur Domingo GARGALLO-VIOLA**

Laboratorios GlaxoSmithKline SA
España

*** Docteur Franco D. MENOZZI**

Institut de Biologie de Lille; Institut Pasteur de Lille
Unité INSERM 447,
France

Je tiens également à remercier L'Institut Pasteur de Lille, la Région Nord-Pas-de-Calais et la Fondation pour la Recherche Médicale pour le soutien financier de cette thèse.

J'exprime également mes remerciements et toute ma gratitude aux personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail,

Au **Docteur Eduardo DEI-CAS** qui m'a accueilli au sein du laboratoire d'Ecologie du Parasitisme et m'a permis de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions matérielles.

Au **Docteur Jean-Charles CAILLIEZ** qui a accepté de co-diriger cette thèse, de me transmettre ses connaissances sur les toxines killer et de m'accorder toute l'autonomie nécessaire.

Au **Docteur Franco D. MENOZZI** qui a accepté de co-diriger cette thèse. Il m'a soutenu, suivi et encouragé tout au long de ce travail. Il a su me faire partager son expérience et s'est toujours montré disponible. Son jugement critique et ses qualités professionnelles ont souvent été à l'origine des orientations de ce travail de thèse. Je souhaite vivement que nous soyons à nouveau amenés à travailler ensemble.

Au **Docteur Nathalie SEGUY** qui par son amitié, ses conseils scientifiques et son soutien technique a permis l'avancé de ce travail.

Au **Docteur Annick MERCENIER** qui m'a accordé sa confiance lors de mon arrivé à l'Institut Pasteur de Lille. Elle a su me comprendre, me conseiller et participer activement à ce travail. Je lui serai toujours reconnaissant pour son aide.

Aux **Professeurs Jean-Marc JELTSCH** et **Yves LEMOINE** qui m'ont donné l'envie de faire cette thèse.

Au **Docteur Marc LANGE** qui m'a encouragé, m'a conseillé et m'a fait profiter de son équipement scientifique.

Au **Docteur Nathalie REVENEAU** sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce travail.

A **Anne-Sophie, Marie-Christine** et **Odile** pour leur aide précieuse lors de la rédaction de ce mémoire.

A **Christopher** et **Hélène** que j'ai fait souffrir pendant leur stages respectifs.

A **Karine, Céline, Isabelle R., Isabelle C., Anne, Jean-Pierre, El Moukhtar, Josette, Marie-Claude, Patrice, Hervé, Edith, Aurélien** et tous les **NC**.

Abréviations et nomenclature

Ab	« Antibodies », anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BCA	« Bicinchoninic acid »
CFU	« Colony Forming Unit »
CO ₂	Dioxyde de carbone
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1.3,7] decan}-4-yl)phenyl phosphate
Da	Dalton
DAPI	4, 6-diamino-2-phenylindole hydrochloride
DIG	Digoxigénine
DNA	« Deoxyribonucleic acid »
DNPG	<i>p</i> -nitrophenyl-β-D-glucopyranoside
EDTA	« Ethylene Diamine Tetra Acetate »
FACS	« Fluorescent Assay Cell Sorting »
GTPase	Guanosine Tri-Phosphatase
H6 Sc Fv	Anticorps simple chaîne H6
HCl	Acide chlorydrique
HPLC	« High Pressure Liquid Chromatography »
Ig	Immunoglobuline
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
KT	« Killer toxin »
KT-IdAbs	« Anti-idiotypic antibodies mimicking killer toxin activity »
mAb	« Monoclonal Antibody »
NaCl	Chlorure de sodium
N-terminal	Amino terminal
OD	« Optical Density »
ORF	« Open Reading Frame »
PABA	acide para-aminobenzoïque
PaKT	« <i>P. anomala</i> ATCC 96603 Killer Toxin »
pb	paire de bases
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PI	« Propidium Iodide »
RACE-PCR	« Rapid Amplification of cDNA ends »
RNA	« Ribonucleic Acid »

rRNA	« ribosomal RNA »
RT PCR	« Reverse Transcriptase PCR »
SCID	« Severe Combined Immuno-Deficiency »
SD	« Standard deviation »
SDS	« Sodium Dodecyl Sulfate »
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
spp.	« Subspecies », sous-espèce
UDP	Uridine Di-Phosphate
UMP	Uridine Mono-Phosphate
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WmKT	« <i>W. saturnus</i> var. <i>mrakii</i> MUCL 41968 killer toxin »
<i>WMSU1</i>	« <i>W. saturnus</i> var. <i>mrakii</i> MUCL 41968 SUN gene 1 »
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Résumé

RESUME

La toxine killer de *Williopsis saturnus* var *mrakii* (WmKT) ou les anticorps anti-idiotypiques mimant son activité ont des propriétés anti-microbiennes vis-à-vis de pathogènes eucaryotes et procaryotes comme *Candida* spp., *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*. Ces observations réalisées *in vitro* et *in vivo* permettent d'envisager une nouvelle stratégie thérapeutique à cibles multiples basée sur l'utilisation de l'activité killer de la WmKT. Peu de choses sont néanmoins connues sur le mode d'action de la WmKT.

Nous nous sommes donc intéressés à la purification et à la caractérisation biochimique de cette toxine. La WmKT est une glycoprotéine de 85 kDa qui agit sur les cellules cibles en perturbant leur perméabilité. Le séquençage partiel de la WmKT suggère que la toxine ne possède pas d'homologie avec les autres toxines killer de levure mais qu'elle est apparentée aux protéines SUN. Plusieurs approches expérimentales ont montré que les β -glucanes constituent les récepteurs de la WmKT à la surface des cellules cibles et que l'interaction de la toxine avec ces polysaccharides est indispensable à son activité anti-microbienne. Après avoir mis en évidence que la castanospermine (un inhibiteur spécifique de β -glucosidase) inhibe l'effet biologique de la WmKT, nous avons montré que la toxine possède une activité β -glucosidase. Cette activité enzymatique lui permet certainement d'hydrolyser la paroi fongique comme le suggèrent nos observations par microscopie électronique à balayage de cellules traitées avec la WmKT. Nous avons ensuite abordé le clonage du gène codant WmKT, ce qui nous a conduit à isoler le gène *WMSU1*. Ce gène code Wmsu1p, une protéine apparentée à WmKT. L'analyse de la séquence de Wmsu1p suggère qu'il s'agit d'une glycoprotéine sécrétée appartenant à la famille SUN. L'expression hétérologue de *WMSU1* est toxique pour son hôte et elle induit des altérations de la paroi, comparables à celles observées lors du traitement de levures avec la WmKT.

Ces résultats essentiels nous encouragent à approfondir la caractérisation de Wmsu1p et à cloner les autres gènes de la famille SUN de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCI 41968, car il est probable que le gène codant la WmKT soit présent parmi eux. Pareille démarche pourra certainement conduire au développement de molécules antimicrobiennes efficaces contre un large spectre de micro-organismes pathogènes.

Sommaire

Remerciements	2
Abréviations et nomenclature	5
Résumé	8
<hr/>	
Problématique et Définition du sujet	17
État de l'art Bibliographique	22
I : Agents antifongiques	23
1. Composés ciblant les stérols fongiques.....	23
1.1. Agents antifongiques de type azolé	23
1.2. Agents antifongiques de type polyène	24
1.3. Agents antifongiques de type allylamine	24
2. Composés inhibant la synthèse nucléique	24
3. Composés actifs contre la paroi cellulaire	25
3.1. Inhibiteurs de la β 1,3-glucane synthase	26
3.2. Inhibiteurs des chitines synthases	27
II : Les toxines killer de levure	28
1. Toxines codées par des gènes nucléaires (Tableau I)	29
1.1. Toxines de <i>Williopsis</i> spp.	29
1.1.1. Toxine HM-1 (HMK)	29
1.1.2. Toxine K-500	30
1.1.3. Toxine HSK((HYI)	31
1.1.4. Toxine WmKT	31
1.2. Toxines de <i>Pichia</i> spp.	31
1.2.1. Toxine de 19 kDa de <i>P. kluyveri</i>	31
1.2.2. Toxine SMK ou KK1 de <i>P. farinosa</i>	31
1.2.3. Toxine WC65 de <i>P. anomala</i>	32

1.2.4.	Toxine PaKT de <i>P. anomala</i> ATCC 96603.....	32
1.3	Toxines de <i>S. cerevisiae</i>	33
1.3.1.	Toxine KHR de <i>S. cerevisiae</i>	33
1.3.2.	Toxine KHS de <i>S. cerevisiae</i>	33
2.	Mécanismes d'action de ces toxines killer	34
2.1.	Toxines de <i>Williopsis</i> spp.	34
2.1.1.	Toxine HM-1 (HMK) de <i>W. mrakii</i>	34
2.1.2.	Toxine K-500 de <i>W. mrakii</i>	35
2.2.	Toxines de <i>Pichia</i> spp.	36
2.2.1.	Toxine SMK de <i>P. farinosa</i>	36
2.2.2.	Toxine WC65 de <i>P. anomala</i>	36
3.	Toxines codées par des gènes extra-chromosomiques	37
3.1.	Toxines codées par des plasmides linéaires à ADN	38
3.1.1.	Toxine de <i>Kluyveromyces lactis</i>	38
3.1.2.	Toxines de <i>Pichia</i> spp.	38
3.2.	Toxines codées par des plasmides à ARN encapsidés	39
3.2.1.	Toxines de <i>S. cerevisiae</i>	39
3.2.2.	Toxines de <i>Ustilago maydis</i>	41
4.	Modes d'action de ces toxines killer	44
4.1.	Modes d'action de la toxine de <i>K. lactis</i>	44
4.2.	Modes d'action des toxines de <i>Pichia</i> spp.	45
4.3.	Modes d'action des toxines de <i>S. cerevisiae</i>	46
4.3.1.	Toxine K1	46
4.3.2.	Toxine K2	46
4.3.3.	Toxine K28	46
4.4.	Modes d'action des toxines de <i>U. maydis</i>	47
4.4.1.	Toxine P6 (KP6)	47
4.4.2.	Toxine P1 (KP1)	48
4.4.3.	Toxine P4 (KP4)	48
5.	Autres toxines de levures	49

III : Les récepteurs des toxines killer de levure	51
1. Modification de la perméabilité ionique membranaire	51
1.1 Récepteurs de nature β -glucanes	51
1.2 Récepteurs de nature β 1,6-glucanes	51
1.3 Récepteurs de nature inconnue	53
2. Inhibition de la synthèse d'ADN	54
3. Activité chitinase et arrêt du cycle cellulaire	55
4. Inhibition de la synthèse des β 1,3-glucanes	56
5. Activité killer encore inconnue	57
5.1. Récepteurs de nature β -glucanes	57
5.2. Récepteurs de nature β 1,6-glucanes	58
5.3. Récepteurs de nature inconnue	58
6. « Auto-immunité » des souches killer	61
IV : Les toxines killer de <i>P.anomala</i> ATCC 96603 et <i>W. saturnus</i> Var. <i>mrakii</i> MUCL 41968	63
1. Etude de l'effet toxique de surnageants de cultures de <i>Pichia anomala</i> ATCC 96603 sur divers microorganismes	63
2. Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine killer de <i>P. anomala</i> ATCC 96603	64
3. Etude du spectre d'activité de la toxine killer de <i>P. anomala</i> ATCC 96603	64
4. Etude du spectre d'activité de la toxine killer de <i>W. saturnus</i> var. <i>mrakii</i> MUCL 41968	66
5. Etudes cytologiques et ultrastructurales de la WmKT et de la PaKT.....	69
V : Production d'anticorps anti-idiotypiques mimant l'activité killer	71
1. Concept des anti-idiotypes	71
2. Vaccination anti-idiotypique	72
3. Mimétisme enzymatique d'anticorps anti-idiotypiques	73

4. Production d'anticorps anti-idiotypiques killer et immunodétection des récepteurs pariétaux de la WmKT	74
5. Production d'anticorps anti-idiotypiques monoclonaux mimant l'activité killer	75
6. Vaccination idiotypique expérimentale (modèle murin)	76
7. Isolement d'anticorps anti-idiotypiques humains naturels	76
8. Production d'anticorps anti-idiotypiques simple chaîne mimant l'activité de la toxine killer	77

Résultats	83
-----------------	----

Chapitre I : Immuno-réactivité croisée d'un anticorps monoclonal anti-toxine killer de <i>Pichia anomala</i> avec une toxine de <i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i>	84
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Introduction	85
--------------------	----

Immuno-crossreactivity of an anti- <i>Pichia anomala</i> killer toxin monoclonal antibody with a <i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i> killer toxin.....	87
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Chapitre II : Etude de la nature du déterminant génétique, détermination des condition de pH optimales pour son activité et purification préparative de la WmKT	102
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

1. Etude de la nature du déterminant génétique de WmKT.....	103
1.1. Introduction	103
1.2. Matériels et méthodes	103
1.2.1. Extraction d'ADN plasmidique	103
1.2.2. Extraction d'ARN plasmidique	104
1.2.3. Curage de plasmides	104
1.3. Résultats	104

2.	Détermination des conditions de pH optimales pour l'activité de WmKT	105
2.1	Introduction	105
2.2.	Matériels et méthodes	105
2.3.	Résultats	106
3.	Purification préparative de la WmKT	107
	Introduction	108
	First steps in the purification and characterization of a <i>Pichia anomala</i> killer toxin.....	109
 Chapitre III : Purification quantitative et caractérisation de WmKT.....		111
	Introduction	112
	Characterisation of a <i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i> high-molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity	113
 Chapitre IV : Identification des récepteurs de WmKT et étude du mécanisme d'action de la toxine		141
	Introduction	142
	Involvement of β -glucan in the wide spectrum antimicrobial activity of <i>Williopsis</i> <i>saturnus</i> var. <i>mrakii</i> MUCL 41968 killer toxin	143
 Chapitre V : Clonage et caractérisation de WMSU1		168
	Introduction	169
	Cloning and characterization of <i>WMSU1</i> , a <i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i> gene encoding a new yeast SUN protein involved in the cell wall structure	170

Discussion et perspectives193

Références bibliographiques203

Annexes.....226

Problématique et définition du sujet

PROBLEMATIQUE ET DEFINITION DU SUJET

Parmi les infections opportunistes, les mycoses profondes ou systémiques sont des causes majeures de morbidité et de mortalité (Groll *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1996; Minamoto & Rosenberg, 1997). Les situations favorisant ces infections sont principalement les neutropénies prolongées, occasionnées par les traitements chimiothérapeutiques du cancer, les immunodépresseurs sévères induites lors de transplantations d'organes et la pratique de techniques invasives (transfusion, dialyse, cathéterismes,...). A ces situations s'ajoutent les cas d'immunodépresseurs liés soit à une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), soit à d'autres causes (déficits immunitaires congénitaux par exemple). Depuis une dizaine d'années, l'accroissement du nombre de patients se trouvant dans ces situations à risque, a provoqué une augmentation sans précédent des mycoses (Marr & Bowden, 1999). Pourtant, le nombre de molécules antifongiques disponibles à ce jour reste faible comparé aux nombreux agents antibactériens. Durant près de 30 ans, malgré ses propriétés néphrotoxiques, l'amphotéricine B a été la seule drogue disponible pour traiter les infections fongiques sévères. Au cours des années 1980, la mise sur le marché d'agents antifongiques azolés (fluconazole) a permis une avancée significative pour le traitement local et systémique des infections fongiques. Le caractère beaucoup moins toxique du fluconazole en a encouragé l'utilisation excessive, ce qui a entraîné une augmentation des cas de résistance (Perea *et al.*, 2001; Vazquez *et al.*, 2001). Bien que très rares, il y a encore 10 ans, les résistances au fluconazole sont maintenant répandues. Ainsi 33% des patients en phase terminale du SIDA sont infectés par des souches de *Candida albicans* résistantes au fluconazole (Law *et al.*, 1994). Cette situation alarmante impose de développement rapide de nouvelles stratégies pour lutter contre les infections fongiques.

Parmi les nouvelles molécules antifongiques en cours d'investigation, les toxines killer fongiques sont des candidates prometteuses dans la mesure où certaines d'entre elles présentent un large spectre antimicrobien (Magliani *et al.*, 1997b; Conti *et al.*, 1998b). A l'origine, le phénomène killer a été découvert chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, où il a été défini comme un effet létal exercé par certaines souches de levures sur d'autres souches de la même espèce (Bevan & Makower, 1963). Depuis la publication de ce travail, de nombreuses études ont été consacrées à ce phénomène. Elles ont notamment mis en évidence que le phénomène killer ne se limitait pas à l'espèce *S. cerevisiae*. Il a été démontré que beaucoup d'autres levures produisent aussi des toxines killer. Parmi celles-ci, la toxine

produite par la souche *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 (WmKT), remarquable en raison de son large spectre d'activité, a été choisie dans le cadre de notre travail.

L'activité de la WmKT a été observée contre des pathogènes fongiques majeurs tels que *Pneumocystis carinii* ou *C. albicans* (Cailliez *et al.*, 1993; Seguy *et al.*, 1998). Son mode d'action a alors été proposé comme la base d'une nouvelle stratégie anti-infectieuse (Polonelli *et al.*, 1986). Les arguments en faveur de cette stratégie ont été renforcés par des travaux montrant que la toxine réduit considérablement l'infectivité de *P.carinii* dans des modèles de pneumocystose expérimentale chez la souris SCID (« Severe Combined Immuno-Deficiency ») et le rat nude (Seguy *et al.*, 1996a). Des anticorps monoclonaux anti-idiotypiques mimant l'activité de la WmKT (KT-IdAbs) ont été produits par immunisation de rats avec un anticorps monoclonal neutralisant l'effet de la WmKT (mAbKT4). Les KT-IdAbs se sont révélés efficaces contre *M. tuberculosis* et ont montré un effet thérapeutique dans des modèles d'infections fongiques expérimentales : pneumocystose ou candidose (Polonelli *et al.*, 1997; Seguy *et al.*, 1997a; Seguy *et al.*, 1997b; Conti *et al.*, 1998a). Récemment, il a été démontré que ces KT-IdAbs possèdent également une activité bactéricide à l'encontre de souches de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et *Streptococcus pneumoniae* multi-résistantes (Conti *et al.*, 2000).

Les résultats évoqués, obtenus *in vitro* et *in vivo*, illustrent le spectre d'activité de la WmKT et des KT-IdAbs, en témoignant de leurs potentialités thérapeutiques. Néanmoins, peu de choses sont connues concernant la nature, la structure biochimique et le mode d'action de la WmKT. Ces données pourraient contribuer à une meilleure compréhension des propriétés antimicrobiennes à large spectre de la WmKT et des KT-IdAbs. Elles pourraient également aider au développement d'autres molécules thérapeutiques dont les caractères antimicrobiens seraient optimisés. Enfin, d'un point de vue fondamental, l'étude de la WmKT et des ses cibles moléculaires pourrait contribuer à des avancées concernant l'architecture des parois fongiques et bactériennes, comme cela a été le cas lors de l'étude d'autres toxines killer telles que la toxine K1 de *S. cerevisiae*.

Pour ces raisons, l'objectif de notre travail a consisté à caractériser la toxine killer de *W. saturnus* var. *mrakii* et à définir ses cibles moléculaires afin de déterminer son mécanisme d'action.

Dans la mesure où la taxonomie des levures a subi ces dernières années d'importantes modifications (Barnett *et al.*, 1990), nous avons dans un premier temps décidé de revisiter la taxonomie de la souche de levure productrice de la WmKT. Ce travail a révélé que la WmKT est produite par une souche de *W. saturnus* var. *mrakii* alors que la bibliographie indiquait qu'il s'agissait d'une souche de *Pichia anomala*. Nous avons ensuite élaboré un procédé de purification de la WmKT à partir de surnageants de culture. Ce procédé nous a permis d'isoler la protéine responsable de l'activité killer et nous avons identifié certains de ses caractères biochimiques. Dès lors, nous avons souhaité approfondir la caractérisation de la molécule en identifiant partiellement sa séquence peptidique et en produisant contre elle des anticorps polyclonaux spécifiques. Pour cela, il nous fallait disposer de la WmKT en quantité suffisante. Nous avons alors modifié notre protocole de purification pour en augmenter le rendement. Le séquençage partiel de la WmKT n'a pas révélé d'homologies avec les toxines killer de levures décrites dans la littérature, mais il a mis en évidence que la WmKT est apparentée à une famille de protéines fongiques récemment décrite. Leurs propriétés nous ont permis de proposer un mécanisme d'action pour la WmKT. Les anticorps polyclonaux anti-WmKT nous ont ensuite permis de réaliser différentes expériences d'immunolocalisation de la WmKT chez les cellules cibles ; nous avons alors défini les conditions biochimiques nécessaires à la fixation de la WmKT.

L'identification des récepteurs pariétaux de la WmKT au niveau de la paroi des levures cibles a constitué le second objectif de ce travail. Par différentes approches expérimentales utilisant des souches mutantes de *S. cerevisiae* déficientes en composants pariétaux, des traitements enzymatiques spécifiques et des tests d'inhibition d'activité, nous avons montré que l'interaction de la WmKT avec les β -glucanes de la paroi cellulaire fongique est un événement nécessaire à la réalisation de l'activité antimicrobienne. D'autre part, en se basant sur les données bibliographiques concernant des protéines qui lui sont apparentées, nous avons proposé un modèle pour le mécanisme d'action de la WmKT. Pour tester ce modèle sur le plan expérimental, nous avons d'une part réalisé une étude de l'activité enzymatique de la WmKT et d'autre part, évalué ses effets morphologiques sur des levures sensibles.

La dernière partie de ce travail a consisté à aborder l'étude du gène codant la WmKT à partir des séquences peptidiques partielles dérivant de la protéine purifiée. Ce travail a débouché sur la construction d'une banque d'ADN génomique partielle de *W. saturnus* var. *mrakii* dont

nous avons isolé le gène *WMSUI* codant une protéine possédant des homologies de séquences avec la WmKT. L'analyse de la séquence protéique déduite de ce gène suggère qu'il s'agit d'une protéine sécrétée ou pariétale tout comme la WmKT. Cependant, il n'existe pas une identité parfaite entre la séquence protéique déduite de ce gène et les séquences peptidiques obtenues à partir de la WmKT. Nous avons alors construit des souches recombinantes d'*Escherichia coli* et de *S. cerevisiae* exprimant Wmsulp. L'impact de l'expression de Wmsulp chez ces micro-organismes recombinants a pu être évalué et comparé à l'activité de la WmKT sur ses cellules cibles.

Etude bibliographique

I. AGENTS ANTIFONGIQUES

1. Composés ciblant les stérols fongiques

Les trois classes d'agents antifongiques, les plus utilisées cliniquement à ce jour, ont toutes une activité basée sur l'inhibition de la synthèse ou une interaction avec l'ergostérol. L'ergostérol est un constituant majeur de la membrane cellulaire des champignons, il constitue donc une cible de première importance.

1.1. Agents antifongiques de type azolé

Les dérivés de type azolé ont été découverts au cours des années 60. Ils sont totalement synthétiques et composent le groupe le plus important parmi les agents antifongiques (Fromtling, 1988). Les antifongiques azolés ont un effet fongistatique et possèdent un large spectre d'activité qui inclut la plupart des levures et des champignons filamenteux. Ils agissent sur la biosynthèse de l'ergostérol au cours de l'étape de déméthylation de l'atome de carbone 14 du lanostérol. Cette étape est catalysée par l'enzyme 14α -stérol déméthylase du cytochrome p-450 (P-450_{DM}). L'ergostérol est un biorégulateur de la symétrie et de la fluidité membranaire qui joue un rôle majeur dans l'intégrité de la membrane (Ghannoum & Rice, 1999). Les composés de type azolé induisent un déficit en ergostérol et une accumulation de précurseurs stérols méthylés en position 14, ce qui entraîne une altération de la structure membranaire (Barrett-Bee *et al.*, 1991). Bien que les azolés antifongiques les plus récents soient généralement des inhibiteurs de la P-450_{DM}, il existe une grande hétérogénéité de modes d'action parmi ces composés. Les dérivés de l'imidazole, par exemple, agissent selon un mécanisme complexe inhibant l'activité enzymatique de plusieurs protéines ainsi que la synthèse des lipides membranaires (Sheehan *et al.*, 1999). Des résistances aux azolés sont rencontrées, tout particulièrement lors de l'utilisation du fluconazole contre *C. albicans*, levure pathogène la plus communément impliquée lors de candidoses mucosales chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Georgopapadakou & Walsh, 1996; Vazquez *et al.*, 2001).

1.2. Agents antifongiques de type polyène

Les antibiotiques de type polyène sont produits par des espèces de *Streptomyces*. Ils présentent le spectre d'activité antifongique le plus étendu de tous les agents antifongiques utilisés cliniquement à ce jour pour le traitement des infections fongiques systémiques. Ils agissent en se fixant à l'ergostérol membranaire par une liaison hydrophobique, ce qui a pour effet d'augmenter la perméabilité membranaire, la perte des composants cytoplasmiques et la mort de la cellule (Bolard, 1986). Certaines observations suggèrent que les polyènes, comme l'amphotéricine B, causent ainsi des dommages oxydatifs qui peuvent contribuer à l'effet létal (Brajtburg *et al.*, 1990). Les résistances aux composés de type polyène comme l'amphotéricine B ou la nystatine, sont rares, néanmoins ces agents antifongiques présentent une toxicité importante en raison de leur affinité pour le cholestérol des cellules de mammifères, limitant de ce fait leur utilisation clinique (Warnock, 1991).

1.3. Agents antifongiques de type allylamine

Les allylamines, comme la terbinafine et la naftidine, sont des antifongiques de synthèse qui ont pour cible la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Ryder, 1992). Leur mode d'action et leur structure chimique sont distincts de ceux décrits pour les composés azolés et les polyènes. A titre d'exemple, la terbinafine est active contre de nombreux champignons, particulièrement contre les dermatophytes. Elle possède une activité fongicide résultant d'un mécanisme spécifique d'inhibition de la squalène epoxydase (Ryder & Frank, 1992). Les champignons traités deviennent alors déficients en ergostérol, ce qui entraîne comme dans le cas des composés azolés, une altération de la structure membranaire. L'effet fongicide est induit par une accumulation de squalène ce qui engendre des dysfonctionnements membranaires et une altération de la synthèse de la paroi. Dans le cas du traitement clinique de pathogènes fongiques, aucun cas de résistance aux allylamines n'a été reporté à ce jour. Il a été néanmoins décrit qu'une souche de *Candida glabrata* isolée d'un patient possédait un phénotype de résistance à la terbinafine (vanden Bossche *et al.*, 1992).

2. Composés inhibant la synthèse nucléique

La **5-fluorocytosine** (5-FC) est une pyrimidine fluorée qui exerce une activité antifongique sur les champignons susceptibles de l'absorber et de la désaminer (Diasio *et al.*, 1978). Elle

est active contre de nombreuses levures incluant *Candida* spp. et *Cryptococcus neoformans*. La 5-FC entre dans les cellules cibles en utilisant une perméase. Une fois internalisée, elle est convertie en 5-fluorouracyl (5-FU) par la cytosine déaminase puis en acide 5-fluorouridylique (FUMP) par l'UMP pyrophosphorylase. Le FUMP est ensuite incorporé à l'ARN, ce qui conduit à un arrêt de la synthèse protéique (Polak & Scholer, 1975). Le 5-FU est également converti en 5-fluorodéoxyuridine monophosphate qui est un inhibiteur de la thymidylate synthase, une enzyme impliquée dans la synthèse d'ADN et dans la division nucléaire (Diasio *et al.*, 1978). L'émergence de mutants résistants au cours d'infections par des levures est un risque important (Whelan, 1987), ce qui limite les possibilités d'utilisation de cette molécule. Ces résistances peuvent résulter d'une perte d'activité de la perméase qui permet l'entrée de la 5-FC dans la cellule. Néanmoins, la cause majeure d'apparition de résistance au 5-FC est la perte des activités enzymatiques responsables de la conversion du 5-FC en FUMP. Du fait de la fréquence d'apparition de résistance au 5-FC, l'utilisation de cette molécule en monothérapie est proscrite. Elle est donc généralement administrée en complément d'un autre agent antifongique, notamment l'amphotéricine B.

3. Composés actifs contre la paroi cellulaire

La paroi cellulaire des champignons est une structure unique dans la nature (figure 1). Cette particularité en fait une cible idéale pour le développement d'agents antifongiques sélectifs. La paroi des champignons est composée de glucanes (59%), de protéines pariétales (40%) et de chitine (1%) (figure 1). La chitine participe à l'architecture de la paroi cellulaire, elle est attachée aux β -glucanes par des liaisons glycosidiques (Cabib *et al.*, 2001). Les β 1,3-glucanes, qui représentent la majorité des glucanes, sont impliqués dans un réseau fibreux qui confère à la paroi sa rigidité (Smits *et al.*, 2001). Les β 1,6-glucanes, présents en plus faible proportion, relient tous les autres composants (Shahinian & Bussey, 2000). Les protéines pariétales ont quant à elles des fonctions encore mal connues ; certaines d'entre elles pourraient contribuer à la rigidité cellulaire et intervenir dans la synthèse de la paroi (De Nobel *et al.*, 2000).

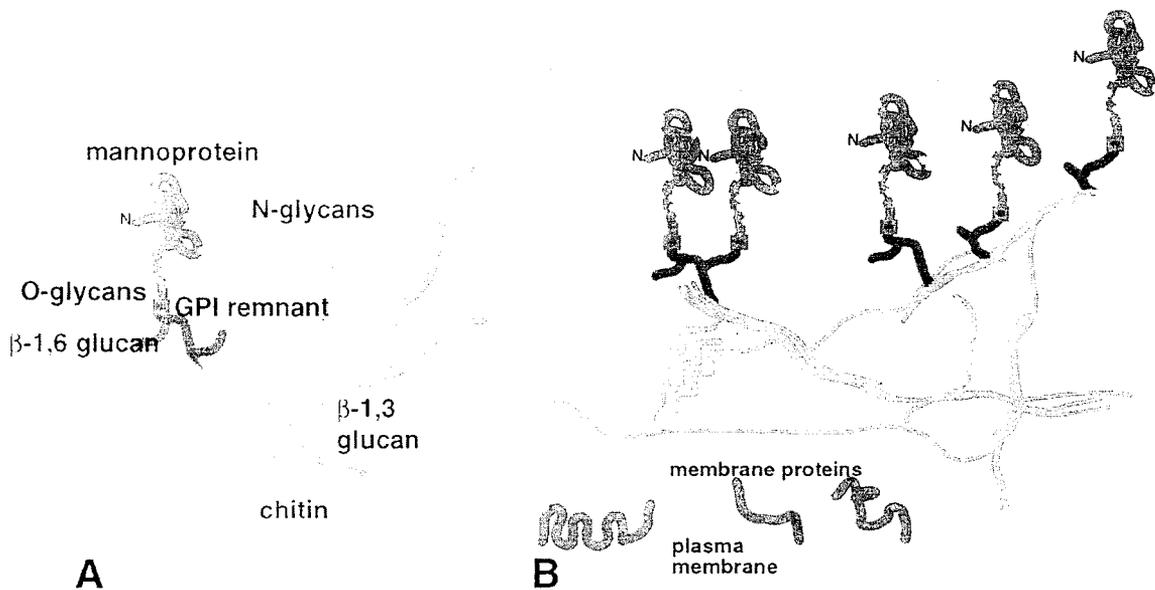


Figure 1 : Relations entre les composants de la paroi cellulaire de *S. cerevisiae*. (A). Mannoprotéines (■), β1,6-glucanes (■), β1,3-glucanes (●), chitine (○), glycosylation des protéines (□). Seulement une partie de la ramification des glucanes est illustrée. La chitine peut également se lier aux β1,6-glucanes. (B) Association des différents composants de la paroi cellulaire.

3.1. Inhibiteurs de la β1,3-glucane synthase

L'enzyme qui catalyse la polymérisation des β-glucanes est la β1,3-glucane synthase. Cette enzyme possède au moins 2 composants fonctionnels : un composant catalytique Fks1p qui agit sur l'UDP-glucose, et un composant régulateur Rho1p qui lie le GTP (Kang & Cabib, 1986; Mol *et al.*, 1994). Ce dernier est activé par une GTPase qui régule la synthèse des glucanes en fonction du stade de développement cellulaire, via un mécanisme relais faisant intervenir des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation. Parmi les composés inhibiteurs de la β1,3-glucane synthase (aculéacines, échinocandines et papulocandines), seules les échinocandines sont évaluées dans le cadre d'essais cliniques, en raison de leur caractère non toxique et de leur efficacité dans le cas de candidoses. Les échinocandines sont des lipopeptides inhibiteurs non compétitifs de la β1,3-glucane synthase. Elles ont un effet antifongique *in vivo* et *in vitro* contre des espèces de *Pneumocystis*, *Candida* et *Aspergillus* (Cassone *et al.*, 1981; Walsh *et al.*, 1991; Beaulieu *et al.*, 1993). Les échinocandines ne sont utilisées cliniquement que depuis peu. Par conséquent, des mutants sélectionnés par ce traitement thérapeutique n'ont pas encore été reportés. Des résultats obtenus en laboratoire

montrent néanmoins que *S. cerevisiae* développe des résistances aux échinocandines via des mutations affectant Fks1p (Kurtz & Douglas, 1997).

3.2. Inhibiteurs des chitines synthases

La chitine est un polymère constitué de N-acétylglucosamine (GlcNac) liés en β -(1,4). Elle est synthétisée dans le cytoplasme au niveau de la membrane plasmique. La polymérisation des GlcNac est catalysée par les chitines synthases qui sont des enzymes liées à la membrane cellulaire (Bulawa, 1993). Il existe trois chitines synthases chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Chez *S. cerevisiae*, la chitine synthase majeure (Chs1p) n'est pas essentielle, elle intervient au cours du mécanisme de maintenance de la paroi (Bulawa & Osmond, 1990). Les deux autres sont impliquées dans la septation (Chs2p), la maturation de la paroi cellulaire et le bourgeonnement (Chs3p) (Choi *et al.*, 1994). Contrairement aux agents antifongiques précédents, aucune molécule capable d'inhiber ces enzymes n'est aujourd'hui utilisée cliniquement. Néanmoins, les nikkomycines sont en cours de développement. Ces molécules sont naturellement produites par *Streptomyces tendae*. Elles entrent dans la cellule cible par l'intermédiaire de perméases et inhibent aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la biosynthèse de chitine chez *C. albicans* (Chapman *et al.*, 1992; Tariq & Devlin, 1996).

II. LES TOXINES KILLER DE LEVURE

Le phénomène killer désigne l'interaction spécifique entre une toxine sécrétée par une cellule « tueuse » (souche killer) et une cellule cible sensible à cette toxine. Chez les levures, les souches killer sécrètent des toxines protéiques ou glycoprotéiques qui ont une activité létale, ou seulement inhibitrice sur la croissance et le développement d'autres souches de micro-organismes. Ces toxines sont des protéines codées par des gènes plasmidiques (à ADN ou ARN) ou chromosomiques (Magliani *et al.*, 1997b).

Découvert en 1963 par Makower et Bevan (Makower & Bevan, 1963), ce phénomène fut d'abord décrit chez *Saccharomyces cerevisiae* comme une interaction stricte entre levures d'une même espèce, avant d'être élargi en 1968 par Woods et Bevan (Woods & Bevan, 1968). Depuis, de nombreuses souches killer ont été décrites et caractérisées chez différentes espèces de levure telles que *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Zygosaccharomyces* spp., *Ustilago maydis*, *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. maltosa*, *C. pseudotropicalis*, *C. apis*, *C. bombicola*, *C. fructus*, *C. krusei*, *C. sorbosa*, *Cryptococcus laurentii*, *C. albidus*, *Debaryomyces* spp., *Torulopsis* spp., *Rodotorula* spp., *Trichosporon* spp., *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia occidentalis*, *Kloeckera apis*, *Sporobolomyces roseus*, *S. salmonicolor*, *Zygowilliopsis* spp., *Williopsis mrakii*, *W. californica*, *W. canadensis*, *W. dimennae*, *W. subpelliculosa*, *W. nonfermentans*, *W. bimundalis*, *W. fabianii*, *W. petersonii*, *W. holstii*, *Pichia anomala*, *P. kluyveri*, *P. farinosa*, *P. spartinae*, *P. membranaefaciens*, *P. guilliermondii*, *P. carsonii* ou *P. ohmeri* (Polonelli *et al.*, 1990; Abranches *et al.*, 1997; Magliani *et al.*, 1997b).

Le phénomène killer chez les levures a été observé dans les écosystèmes naturels comme dans les milieux industriels. En effet, de nombreuses souches killer ont été isolées de plantes, de fruits, de champignons, de sols (Stumm *et al.*, 1977; Starmer *et al.*, 1987), tandis que d'autres ont été retrouvées dans les produits de fermentation du vin ou de la bière (Young & Yagiu, 1978; Sossin *et al.*, 1989). Les applications dérivant de l'étude de ce phénomène biologique sont multiples et variées. Dans le domaine de la recherche, elles peuvent concerner la mise au point de modèles d'études fondamentaux comme ceux de la sécrétion et de la glycosylation de protéines, de la régulation de leur synthèse et de leur fixation à des récepteurs spécifiques à la surface de cellules cibles. Elles peuvent intéresser le domaine du génie génétique en

permettant la construction de vecteurs portant les gènes des toxines killer et la production de peptides recombinants reproduisant les propriétés antibiotiques de ces molécules fongiques. Dans l'industrie agro-alimentaire, le phénomène killer présente un intérêt évident dans la lutte contre les micro-organismes indésirables contaminant les milieux de fermentation (Young & Yagiu, 1978; Sossin *et al.*, 1989), mais aussi dans la production de souches killer utilisables elles-mêmes pour la production de bière, de vin ou de pain (Hara *et al.*, 1980; Young, 1981; Bortol *et al.*, 1986; Boone *et al.*, 1990a). Enfin, dans le domaine médical, les toxines killer peuvent être utilisées pour le biotypage de souches de micro-organismes pathogènes (Polonelli *et al.*, 1983; Morace *et al.*, 1989), comme pour la production de nouveaux agents antifongiques, sous la forme de peptides recombinants killer ou d'anticorps anti-idiotypiques reproduisant leurs propriétés antimicrobiennes (Polonelli *et al.*, 1986; Polonelli & Morace, 1988; Polonelli *et al.*, 1991b; Cailliez *et al.*, 1994b; Polonelli *et al.*, 1994; Cassone *et al.*, 1997; Magliani *et al.*, 1997a; Polonelli *et al.*, 1997).

1. Toxines codées par des gènes nucléaires (Tableau I)

1.1. Toxines de *Williopsis* spp.

Depuis quelques années, les espèces du genre *Hansenula* sont classées dans les genres *Williopsis* et *Pichia* (Barnett *et al.*, 1990). Les souches killer du genre *Williopsis* sécrètent des toxines killer, capables de tuer des espèces de levures sensibles appartenant à des genres tels *Saccharomyces* ou *Candida* (Nomoto *et al.*, 1984). Parmi les espèces du genre *Williopsis* qui forment des ascospores, des souches de *W. mrakii*, *W. saturnus*, *W. saturnus* var. *subsufficiens* et *W. beijerinckii* produisent des toxines killer. Des comparaisons entre les structures moléculaires de toxines sécrétées par différentes souches de *Williopsis* spp. ont été réalisées par analyse génotypique et/ou phénotypique. Des toxines provenant de certaines souches killer de *W. mrakii* et *W. saturnus* présentent des similarités structurales, alors que d'autres ont des structures complètement différentes, ceci malgré des spectres d'activité semblables. C'est le cas des toxines de *W. beijerinckii* et de *W. californica* (Kimura *et al.*, 1995). Il est maintenant évident que toutes les souches killer d'une même espèce ne synthétisent pas les mêmes toxines, certaines produisant vraisemblablement plusieurs toxines différentes.

1.1.1. La toxine HM-1 (HMK) de *Williopsis mrakii* est une protéine monomérique sécrétée par la souche IFO 0895 (ou souche LKB 169). Codée par un gène de 0,85 kbp, elle est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur de 125 acides aminés. La maturation de cette protoxine résulte en une toxine non glycosylée de 10 721 Da constituée de 88 acides aminés dont 10 cystéines (Yamamoto *et al.*, 1986b). L'activité biologique de la toxine est inactivée par réduction des ponts disulfures au 2-mercaptoéthanol ou au dithiothréitol. Contrairement à la majorité des autres toxines de levures, HM-1 est une protéine alcaline thermostable. Elle a un pI de 9.1 et reste stable dans une gamme de pH de 2 à 11. Enfin, elle se distingue de la toxine K-500 de *W. mrakii* par le fait qu'elle est encore active après 10 minutes à 100 °C, à condition d'être maintenue à pH 4.0 (Ashida *et al.*, 1983).

Des anticorps monoclonaux ont été produits contre la toxine HM-1. Ils possèdent des activités neutralisantes qui ont permis de purifier la toxine par chromatographie d'affinité (Yamamoto *et al.*, 1986a). La toxine HM-1 a également été purifiée par deux autres méthodes chromatographiques. Dans la première méthode, les surnageants de culture des levures killer ont été concentrés par ultrafiltration avant d'être séparés par chromatographie de gel-filtration (Séphadex G-50). Les fractions ayant une activité killer ont ensuite été purifiées par HPLC sur une colonne SP-2SW après élution en gradient linéaire de NaCl de 0 à 0,5 M (Yamamoto *et al.*, 1986a; Kasahara *et al.*, 1994b). Dans la seconde méthode, les surnageants de culture ont été passés dans une colonne de chromatographie d'échange d'ions (SP-Séphadex C25) équilibrée à pH 3.0. La toxine HM-1 a ainsi été éluée par un gradient de pH avant d'être purifiée par HPLC sur une colonne SP-2SW (Takasuka *et al.*, 1995).

1.1.2. La toxine K-500 de *Williopsis mrakii* est sécrétée par la souche NCYC 500. C'est une toxine polypeptidique acide de masse moléculaire comprise entre 1,8 et 5,0 kDa (Ashida *et al.*, 1983). Elle a une activité killer contre des souches de *C. albicans*, *C. glabrata* et *S. cerevisiae* (Hodgson *et al.*, 1995). Elle est active pour des valeurs de pH et de température proches de 4.0 et de 30 °C respectivement. En dehors de ces valeurs, son activité décroît. A faible concentration, la toxine garde son effet fongicide, mais ce n'est qu'à plus fortes concentrations qu'elle entraîne des dommages visibles de la membrane plasmique de la cellule cible. Pour purifier cette toxine, les surnageants de culture de la souche NCYC 500 ont été traités par chromatographie de gel-filtration sur une colonne Séphadex G-25 (Hodgson *et al.*, 1995). L'activité killer a été retrouvée dans les fractions correspondant à des masses

moléculaires inférieures ou égales à 5-10 kDa. Ces fractions actives ont ensuite été purifiées sur une colonne Biogel P2. L'élution de deux pics actifs dans le volume mort a permis de conclure que la toxine K-500 avait une masse moléculaire minimale de 1,8 kDa.

1.1.3. La toxine HSK (HYI) de *Williopsis saturnus var. saturnus* est une protéine sécrétée par la souche killer IFO 0117 (Ohta, 1984; Kimura *et al.*, 1993). Elle est codée par *HSK*, un gène homologue à *HMK*, le gène de la toxine HM-1. La toxine HSK est d'abord synthétisée sous la forme d'une protoxine de 124 acides aminés qui subit une maturation aboutissant à une protéine d'environ 8,5 kDa, composée de 87 acides aminés. Le pI de cette toxine est proche de 5.8 et son activité antibiotique résiste à une incubation d'une heure à 60°C (Ohta, 1984). Afin de la purifier, des surnageants de culture ont été concentrés sous vide, puis déposés sur une colonne DEAE-cellulose (DE-52, Whatman) équilibrée en Tris-HCl, pH 6.7. La toxine a ensuite été éluée par un gradient de NaCl (de 0 à 1 M) et les fractions killer ont été concentrées par ultrafiltration puis analysées par gel filtration sur une colonne Ultrogel AcA 54 équilibrée en PBS 100 mM, pH 7.3. Après ultrafiltration, la toxine HYI a été cristallisée entre 3 et 5 °C (Ohta, 1984).

1.1.4. La toxine WmKT de *Williopsis saturnus var. mrakii* MUCL 41 968 possède un large spectre d'activité et elle est à l'origine de la réalisation de ce travail de thèse. Ses caractéristiques sont décrites dans le chapitre IV de cette étude bibliographique

1.2. Toxines de *Pichia* spp.

1.2.1. La toxine de 19 kDa de *P. kluyveri* est une glycoprotéine monomérique acide qui provoque la formation de pores perméables aux ions. Son action est comparable à celle de la toxine K1 de *S. cerevisiae*. Cette toxine entraîne ainsi chez la cellule cible une fuite extracytoplasmique d'ions potassium et d'ATP, une baisse du pH cellulaire et l'inhibition des mécanismes d'incorporation d'acides aminés. Elle a été purifiée par précipitation fractionnée à l'éthanol et chromatographie sur colonne de butyl-sépharose. Cette toxine résiste à une température maximale de 40 °C et son activité biologique reste stable dans une gamme de pH entre 2.5 et 5.0 (Middelbeek *et al.*, 1979).

1.2.2. La toxine SMK (« salt-mediated killer toxin ») ou KK1 de *P. farinosa* est sécrétée par la souche KK1 de la levure halotolérante *P. farinosa*. C'est un hétérodimère de 14,214 kDa codé par un gène de 0,6 kbp. La toxine SMK est composée d'une sous-unité α de 6,6 kDa (63 acides aminés) et d'une sous-unité β de 7,9 kDa (77 acides aminés). Ces sous-unités sont fortement liées en conditions acides (pH inférieur à 5.0) sans qu'il y ait formation de ponts disulfures. L'activité de la toxine mature est maximale dans ces conditions et en présence de NaCl 2M. En conditions neutres, les deux sous-unités se dissocient et l'agrégation du monomère α qui en résulte, rend la toxine inactive (Suzuki *et al.*, 1997). La structure secondaire de la toxine SMK change radicalement pour des valeurs de pH allant de 5.1 et 5.5. Au-delà, la dissociation des sous-unités empêche le monomère β de reprendre sa conformation secondaire correcte. Des études récentes en cristallographie ont permis de montrer que la conformation de la toxine SMK avait la forme d'un simple domaine protéique ellipsoïdal formé par les 2 monomères α et β (Kashiwagi *et al.*, 1997). Enfin, ces études ont confirmé que le maintien de la conformation active de la toxine nécessite une forte concentration saline.

Bien qu'il y ait peu de similarités de séquence entre la toxine SMK et les autres, la structure de la protoxine de 222 acides aminés à l'origine de cette toxine, ressemble à celle de la protoxine de K1 de *S. cerevisiae*. Chez cette protoxine, les futures sous-unités α et β correspondent respectivement aux positions d'acides aminés 19-81 et 146-222. La maturation de la protoxine en toxine active semble être due à l'action d'endopeptidases pseudo-Kex2p et de carboxypeptidases pseudo-Kex1p, comme dans le cas de la toxine K1 de *S. cerevisiae* (Suzuki & Nikkuni, 1994).

1.2.3. La toxine WC65 de *P. anomala* est une glycoprotéine acide monomérique de 83,3 kDa. Son activité killer s'exerce vis-à-vis de souches variées de levure comme *C. albicans* ou *P. bimundalis*. Elle est stable pour des valeurs de pH entre 2.0 et 5.0 (Sawant *et al.*, 1989). L'intensité de l'activité de cette toxine sature à partir d'une certaine concentration, ce qui suggère un mécanisme moléculaire dépendant de l'existence de récepteurs spécifiques à la surface de la cellule cible (Sawant *et al.*, 1988). De plus, la sensibilité à la toxine WC65 de certaines souches de *C. albicans* décroît avec l'âge des cellules cibles.

1.2.4 La toxine PaKT de *P. anomala* ATCC 96603 (UP 25F) possède un large spectre d'activité et elle est en partie à l'origine de la réalisation de ce travail de thèse. Ses caractéristiques sont décrites dans le chapitre IV de cette étude bibliographique

1.3. Toxines de *Saccharomyces cerevisiae*

Bien que les toxines killer de *S. cerevisiae* soient généralement codées par des gènes plasmidiques, certaines d'entre elles peuvent être codées par des gènes nucléaires. C'est le cas de la toxine KHR (« killer heat resistant ») et de la toxine KHS (« killer heat susceptible »).

1.3.1. La toxine KHR de *S. cerevisiae* est une protéine monomérique de 20 kDa dont le gène *KHR* de 888 bp se trouve sur le bras gauche du chromosome IX (Goto *et al.*, 1990b). Ce gène code une protoxine de 33 kDa qui possède une séquence signal hydrophobe dans sa région N-terminale, 4 sites de glycosylation, et 5 sites potentiels de clivage par la protéase *kex2p*. La toxine KHR mature n'a pas de région hydrophobe.

1.3.2. La toxine KHS de *S. cerevisiae* est une protéine monomérique de 75 kDa dont le gène *KHS* de 2.124 bp se trouve sur le bras droit du chromosome V (Goto *et al.*, 1991). Ce gène code une protoxine de 79 kDa qui porte une séquence N-terminale hydrophobe. La conformation de cette séquence N-terminale est probablement réorganisée dans l'espace pour donner la toxine mature. La toxine KHS possède 3 motifs conservés hydrophobes ayant une fonction ionophore similaire à celles des toxines de *S. cerevisiae* codées par des gènes plasmidiques.

Tableau I : Structure des toxines Killer codées par des gènes nucléaires

Levure killer	Toxine	SU (kDa)	Masse moléculaire	GP ?	ProT	pH ou pI / T°
<i>Hansenula mrakii</i>	HM-1 (HMK)	mono	10,7kDa (88 aa)	non	125 aa	2,0 à 12,0
<i>Hansenula mrakii</i>	K-500	mono ?	1,8 et 5,0 kDa			± 4,0 / ± 30°C
<i>Hansenula saturnus</i>	HSK (HYI)	mono	± 8,5 kDa (87 aa)		124 aa	pI = 5,8
<i>Pichia kluyveri</i>	19 kDa	mono	19 kDa	oui		
<i>Pichia farinosa</i>	SMK	α (6,6) β (7,9)	14,2 kDa		222 aa	< 5,0 +NaCl (2M)
<i>Pichia anomala</i>	WC65	mono	83,3 kDa	oui		2,0 à 5,0
<i>Pichia anomala</i>	UP25F	?				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHR	mono	20 kDa	oui	33 kDa	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHS	mono	75 kDa		79 kDa	

[aa = acides aminés ; GP = nature glycoprotéique ; mono = toxine monomérique ; SU = sous-unités]

2. Mécanismes d'action de ces toxines killer (tableau II)

Chez les levures, le rôle des glycoprotéines et polysaccharides de surface dans la formation de récepteurs pariétaux, a été mis en évidence. Avant d'atteindre la membrane plasmique des levures cibles, les toxines killer entrent en contact avec les molécules qui composent la paroi de celles-ci. Parmi ces molécules de surface, certaines sont particulièrement impliquées dans ces mécanismes de reconnaissance plus ou moins spécifiques et ainsi considérées comme les récepteurs des toxines killer.

2.1. Toxines de *Williopsis* spp.

2.1.1. La toxine HM-1 (HMK) de *W. mrakii* inhibe la croissance de souches sensibles de *S. cerevisiae* en agissant sur la synthèse de leurs β1,3-glucanes. La production d'autres composants pariétaux comme la chitine, les mannanes et les glucanes alcali-solubles n'est pas affectée (Yamamoto *et al.*, 1986a). Des expériences plus récentes ont confirmé que la toxine HM-1 inhibait l'activité de la β1,3-glucane synthase (Takasuka *et al.*, 1995). La toxine HM-1 n'est pas active contre les sphéroplastes de levures sensibles. Des levures cibles dont le gène *KRE6* est non fonctionnel, présentant un taux particulièrement réduit de β1,6-glucanes pariétaux (par réduction de l'activité de la β-glucane synthase), résistent à de fortes

concentrations de toxine. L'activité de la toxine HM-1 est d'ailleurs inhibée par des incubations prolongées avec des β 1,3- ou des β 1,6-glucanes, plus faiblement avec des mannanes. Ce phénomène n'est pas observé lorsque l'on utilise des α 1,4-glucanes ou de la chitine (Kasahara *et al.*, 1994a). Ces expériences indiquent ainsi qu'une quantité minimale de β -glucanes pariétaux est vraisemblablement nécessaire pour que la cellule cible soit sensible à l'activité de la toxine HM-1.

Chez des souches de *S. cerevisiae* sensibles à HM-1, deux gènes jouant un rôle dans la sensibilité à la toxine ont été clonés. L'un d'eux, *KNR4* est impliqué dans la synthèse des β 1,3-glucanes. Une mutation de *KNR4* permet à *S. cerevisiae* de résister à la toxine HM-1. Cette mutation rend également *S. cerevisiae* sensible à la cercosporamide, un agent antifongique isolé de *Cercosporidium henningsii* qui inhibe la synthèse des β 1,3-glucanes (Hong *et al.*, 1994). Cette souche résistante à la toxine HM-1 présente en fait une activité réduite de la β 1,3-glucane synthase. Le second gène est *HKR1*. Sa mutation par insertion conduit à un phénotype de résistance de *S. cerevisiae* à la toxine HM-1 (Kimura *et al.*, 1997). Le gène *HKR1* complémente ce phénotype. Il code une protéine membranaire de haut poids moléculaire (Hkr1p) riche en sérine et en thréonine. Hkr1p ne participe pas directement à la synthèse des β 1,3-glucanes, mais semble réguler la synthèse des β -glucanes et les mécanismes de bourgeonnement de la levure (Yabe *et al.*, 1996). *HKR1* est donc impliqué dans la synthèse du récepteur de la toxine HM-1. L'étude de la séquence de Hkr1p permet de penser que cette protéine a une activité mannosyl-transférase calcium-dépendante qui interviendrait dans la glycosylation des mannoprotéines reconnues par la toxine HM-1 (Yabe *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997).

2.1.2. Toxine K-500 de *W. mrakii*. Cette toxine a une forte activité anti-*Candida* mais ses mécanismes d'action restent encore inconnus. La susceptibilité des cellules cibles de K-500 répond à un effet dose-dépendant, ce qui sous-entend l'existence de récepteurs pariétaux. Certaines évidences laissent penser que K-500 agit comme la toxine de *P. kluyveri* et comme la toxine K1 de *S. cerevisiae* en induisant la formation de canaux ioniques chez la cellule cible (figure 2).

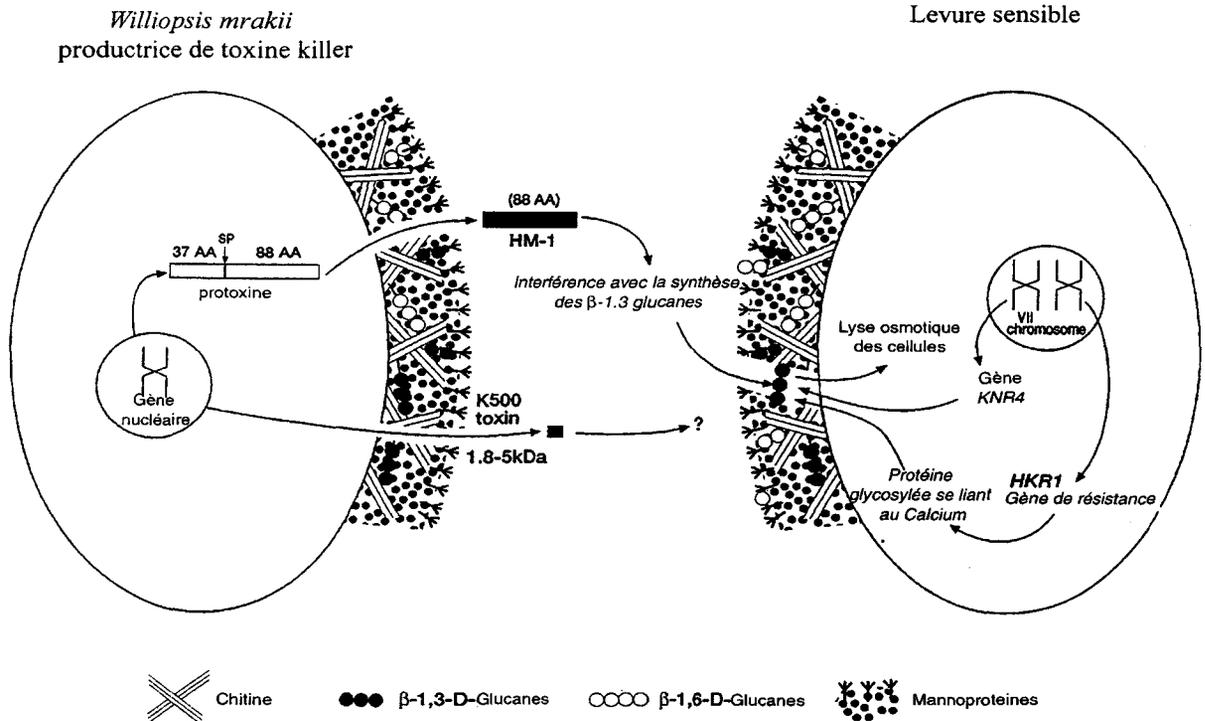


Figure 2 : Mode d'action des toxines HM-1 et K500 (d'après Magliani *et al.*, 1997).

2.2. Toxines de *Pichia* spp.

2.2.1. Toxine SMK de *P. farinosa*. La structure de la toxine SMK (en particulier les domaines responsables de sa polarité) et de son gène présentent des similarités avec celle des toxines K1 et K2 de *S. cerevisiae* (Kashiwagi *et al.*, 1997). Ces observations laissent penser que la toxine SMK agit sur la membrane plasmique des cellules cibles même si des expériences avec des souches mutantes *kre* de levure ont suggéré que des molécules de surface différentes des β 1,6-D-glucanes pouvaient aussi jouer le rôle de récepteurs.

2.2.2. Toxine WC65 de *P. anomala*. L'étude de l'influence de quantités croissantes de toxine WC65 sur la vitesse de croissance de souches sensibles de *C. albicans* a suggéré l'existence de deux sites de fixation pour la toxine. Le premier de ces récepteurs pariétaux fixe la toxine WC65 de manière non compétitive en faisant vraisemblablement intervenir des β 1,6-D-glucanes. Le second site fixe la toxine de manière compétitive. Des souches mutantes de *Candida* ayant un déficit en glucanes pariétaux, ont une sensibilité plus faible à la toxine. La localisation des sites de fixation de la toxine dans la paroi de la cellule cible a été réalisée en

immunofluorescence indirecte (Sawant & Ahearn, 1990). Des souches mutantes de *S. cerevisiae*, ayant une synthèse déficiente en β 1,6-glucanes, présentent aussi une résistance à la toxine, ce qui suggère que ces glucanes sont impliqués dans la constitution ou la conformation des récepteurs de la toxine WC65. Ces récepteurs pourraient ne pas être uniquement pariétaux puisque des sphéropastes de souches résistantes de *S. cerevisiae* restent sensibles à la toxine WC65. Des expériences en immunofluorescence ont montré que la toxine était toujours localisée à la surface de la membrane plasmique de sphéropastes de *C. albicans* (Sawant & Ahearn, 1990).

Tableau II : Modes d'action des toxines killer codées par des gènes nucléaires

Levure killer	Toxine	Cibles	Récepteurs	Activité
<i>Williopsis mrakii</i>	HM-1 (HMK)	<i>S. cerevisiae</i>	β 1,3-glucanes pariétaux	- inhibition de la β 1,3-glucane synthase
<i>Williopsis mrakii</i>	K-500	<i>Candida spp</i>		- similaire à K1 ? - formation de canaux ionophores ?
<i>Williopsis saturnus</i>	HSK (HYI)	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. anomala</i> <i>C. glabrata</i>		
<i>Pichia kluyveri</i>	19 kDa			- similaire à K1
<i>Pichia farinosa</i>	SMK		β 1,6-glucanes ?	- formation de canaux ionophores
<i>Pichia anomala</i>	WC65	<i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>P. bimundalis</i>	en partie : β 1,6-glucanes pariétaux et membranaires	
<i>Pichia anomala</i>	UP25F	<i>Pichia spp</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Pneumocystis</i> <i>Staphilococcus</i> <i>E. coli</i> <i>Mycobacterium</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHR	<i>C. glabrata</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHS			

3. Toxines codées par des gènes extra-chromosomiques

3.1. Toxines codées par des plasmides linéaires à ADN (Tableau III)

3.1.1. Toxine de *Kluyveromyces lactis*

La toxine de *K. lactis*, codée par les plasmides pGKL1/L2, a été découverte lors d'expérimentations cherchant à caractériser de nouveaux plasmides chez les levures (Gunge *et al.*, 1981). Les souches killer de *K. lactis* contiennent de 50 à 100 copies de chacun des plasmides linéaires désignés pGKL1 (k_1) et pGKL2 (k_2), comprenant respectivement 8.874 bp et 13.447 bp. Le plasmide k_1 possède 4 cadres ouverts de lecture (ORFs), nommés ORF1, ORF2, ORF3 et ORF4, tandis que le plasmide k_2 possède 10 ORFs (ORF1 à ORF10) (Gunge & Sakaguchi, 1981; Chen *et al.*, 1988; Wesolowski-Louvel *et al.*, 1988; Tokunaga *et al.*, 1992). La toxine de *K. lactis* est constituée de 3 sous-unités protéiques codées par k_1 : une sous-unité α de 99 kDa possédant une seule chaîne oligosaccharidique *N*-glycosylée, une sous-unité β de 30 kDa et une sous-unité γ de 27,5 kDa (Stark & Boyd, 1986). L'ORF2 de k_1 code un précurseur de 128 kDa comprenant les sous-unités α et β , le peptide signal N-terminal et des sites de clivage pour une protéase de type *kex2*. Ce précurseur est dirigé vers le réticulum endoplasmique de la levure où il commence à être glycosylé. Il est ensuite transporté vers l'appareil de Golgi où une protéase de type *kex2p* le mature en sous-unités natives. Au même moment, le peptide signal est clivé au niveau de Arg²⁹. De son côté, l'ORF4 de k_1 code le précurseur de la sous-unité γ ainsi qu'un peptide signal N-terminal.

La toxine de *K. lactis* a été purifiée par chromatographie de filtration en gel Sephadex G-75 après précipitation au sulfate d'ammonium. Les fractions présentant une activité « killer » ont ensuite été séparées par chromatographie sur une colonne échangeuse d'ions (hydroxylapatite) équilibrée à pH 6.8. L'élution a été réalisée par un gradient de tampon phosphate de potassium de 50 à 500 mM (Takita & Castilho-Valavicius, 1993). La toxine ainsi purifiée ne présente pas d'activité killer supérieure à celle du surnageant de culture de départ.

3.1.2. Toxines de *Pichia* spp.

- La toxine de *P. inositovora* codée par les plasmides pPin 1-1 (18 kbp) et pPin 1-3 (10 kbp) est une protéine multimérique de masse moléculaire supérieure à 100 kDa. Cette toxine est apparemment une glycoprotéine acide thermolabile (Hayman & Bolen, 1991). Les souches

killer curées de leurs plasmides demeurent auto-immunes vis-à-vis de leur toxine. Il est donc probable que le mécanisme d'auto-immunité soit dû à des caractères portés par des gènes nucléaires.

- **La toxine de *P. acaciae* codée par pPac 1-1 (13,6 kbp) et pPac 1-2 (6,8 kbp) est une protéine trimérique d'environ 190 kDa (monomères de 110, 39 et 38 kDa) (Bolen *et al.*, 1994). Les plasmides codant pour cette toxine ont des organisations fonctionnelles et structurales proches des plasmides de *K. lactis*. Cette toxine a un large spectre d'activité biologique pour des valeurs de pH comprises entre 7.0 et 7.5.**

3.2. Toxines codées par des plasmides à ARN encapsidés (Tableau III)

3.2.1. Toxines de *S. cerevisiae*

Parmi les toxines killer les mieux caractérisées d'un point de vue moléculaire, se trouvent celles sécrétées par l'espèce *S. cerevisiae*. Ces toxines ont été classées en 3 groupes (K1, K2 et K28) en fonction de leurs caractéristiques moléculaires, leur spectre d'activité killer, l'existence ou non d'immunité croisée et la nature de leurs déterminants géniques. Les toxines K1, K2 et K28 sont codées par des ARN bicaténaires (dsRNA ou « double-strand RNA ») ou satellites nommés respectivement M1 (1,8 kb), M2 (1,5 kb) et M28(1,9 kb). Chaque dsRNA porte les gènes responsables de la toxicité et de l'auto-immunité de la levure killer vis-à-vis de sa propre toxine. Ces dsRNA sont encapsidés dans des particules pseudo-virales (VLPs ou « virus-like particles ») et sont dépendants de virus « helper » (L-A) pour leur réplication et encapsidation (Bostian *et al.*, 1980; El-Sherbeini *et al.*, 1984). Certains aspects de la synthèse, de la maturation et de la sécrétion des toxines K1, K2 et K28, ainsi que les organisations moléculaires de leurs dsRNA sont comparables. Il n'existe néanmoins pas d'homologies de séquences significatives entre ces toxines (Schmitt & Tipper, 1990; Schmitt & Tipper, 1992; Wickner, 1992; Schmitt & Tipper, 1995; Wickner, 1996). Bien qu'elles se ressemblent, les toxines K1, K2 et K28 sont des protéines ayant des compositions différentes en acides aminés. Chaque toxine est codée par un seul ORF sous la forme d'une pré-prototoxine comprenant un large domaine amino-terminal hydrophobe, des sites potentiels de clivage par les endopeptidases *kex2p/kex1p* et des sites de *N*-glycosylation. Ces pré-prototoxines vont subir des étapes de maturation dans le réticulum endoplasmique granulaire, l'appareil de Golgi et les vésicules de sécrétion, ce qui donnera une toxine active prête à être sécrétée par la levure.

• **La toxine K1 de *S. cerevisiae*** est une protéine dimérique de 19 kDa, thermolabile et active dans une gamme de pH allant de 4.2 et 4.6. Elle est sécrétée sous la forme de 2 sous-unités α et β non glycosylées, reliées par un pont disulfure. La sous-unité α est composée de 172 acides aminés et a une masse moléculaire de 9,5 kDa, tandis que la sous-unité β est composée de 140 acides aminés et a une masse moléculaire de 9,0 kDa. Elles dérivent toutes les deux d'une protoxine glycosylée de 42 kDa, elle-même issue d'une pré-protoxine polypeptidique M1p de 35 kDa, formée de 316 acides aminés. La structure de M1p comprend une séquence leader N-terminale δ de 44 acides aminés (position : 1 à 44) (dans laquelle se trouve un peptide signal de 26 acides aminés), un domaine de 103 acides aminés (position : 45 à 147) et un domaine β de 83 acides aminés (position : 234 à 316). Les domaines α et β sont reliés par un peptide central γ (position : 148 à 233) portant 3 sites de *N*-glycosylation (Bostian *et al.*, 1984; Sturley *et al.*, 1986; Zhu *et al.*, 1987). La pré-protoxine de 35 kDa entre ensuite dans le réticulum endoplasmique et subit une maturation en protoxine après clivage de son peptide signal et glycosylation du domaine γ (Lolle & Bussey, 1986). La maturation de la protoxine se poursuit dans l'appareil de Golgi. Une activité endopeptidase codée par le gène *KEX2* permet de générer les formes définitives des domaines α et β (Lolle & Bussey, 1986; Mizuno *et al.*, 1987). L'extrémité C-terminale de la sous-unité α est ensuite maturée par une sérine-carboxypeptidase codée par le gène *KEX1* (Dmochowska *et al.*, 1987). La toxine mature est alors sécrétée par la levure sous la forme d'un dipeptide où les sous-unités α et β sont reliées par un pont disulfure.

• **La toxine K2 de *S. cerevisiae*** présente une organisation structurale similaire à celle de la toxine K1, surtout en ce qui concerne la synthèse de ses précurseurs. La toxine K2 est une glycoprotéine hétérodimérique de 21,5 kDa formée d'une sous-unité α de 180 acides aminés, *N*-glycosylée en position 177 et 214, et d'une sous-unité β de 140 acides aminés. La toxine K2 mature est dérivée d'une pré-protoxine M2p de 38,7 kDa et contenant 362 acides aminés. M2p est constituée d'un peptide signal de 43 acides aminés (position : 1 à 43), d'un domaine α de 179 acides aminés (position : 43 à 222) et d'un domaine β de 140 acides aminés (position : 222 à 362). Contrairement à la toxine K1, il n'y a pas de domaine de liaison γ entre les domaines α et β . De plus, M2p contient 3 sites potentiels de *N*-glycosylation sur des asparagines en position 177, 214 et 261. M2p possède aussi un signal potentiel de sécrétion en position N-terminale et des sites de clivage pour *kex1p* et *kex2p* (Dignard *et al.*, 1991;

Meskauskas & Citavicius, 1992). Pendant les processus de maturation, une peptidase clive le peptide signal après une alanine (Ala⁴³) et la molécule restante est clivée après une arginine (Arg²²²) par *kex2p*, ce qui permet d'obtenir la toxine mature formée de ses 2 sous-unités α et β .

- **La toxine K28 de *S. cerevisiae*** est une glycoprotéine hétérodimérique de 21,5 kDa formée d'une sous-unité α de 10,5 kDa et d'une sous-unité β de 11 kDa (Schmitt & Tipper, 1995). Elle dérive d'une pré-protoxine M28p de 37,6 kDa composée de 345 acides aminés et dont l'organisation structurale est très proche de M1p. La pré-protoxine M28p est constituée d'un peptide signal de 30 acides aminés (position : 1 à 30), d'un domaine δ de 18 acides aminés (position : 31 à 48), de la sous-unité α de 100 acides aminés (position : 49 à 148), d'une sous-unité de liaison γ de 96 acides aminés (position : 149 à 244) ayant 3 sites de *N*-glycosylation et de la sous-unité β de 100 acides aminés (position 245 à 345). La maturation de la pré-protoxine est assurée par l'endoprotéase *kex2p* qui clive M28p entre γ et β en position 245. Une autre enzyme coupe entre les sous-unités α et γ , en position 149, pour permettre à la toxine K28 mature de prendre sa forme définitive.

3.2.2. Toxines de *Ustilago maydis*

Des virus à ARN double-brin (dsRNA) sont responsables de la production de toxines killer chez l'espèce *Ustilago maydis* (Koltin & Day, 1975; Koltin & Day, 1976). Les différentes souches killer de cette espèce peuvent sécréter 3 catégories de toxines (KP1, KP2 ou KP6). Les toxines KP semblent être synthétisées sous la forme de protoxines qui subissent des processus de maturation dans le cytoplasme de la levure killer. Elles ont des spécificités killer différentes. Ainsi, une cellule résistante à une toxine KP particulière peut être sensible à d'autres toxines KP. Les toxines KP exercent des activités antibiotiques contre des espèces relativement proches d'un point de vue taxonomique (Koltin & Kandel, 1978). Chaque levure killer peut contenir de 3 à 7 segments de dsRNA de 0,36 à 6,2 kb, répartis en 3 groupes désignés H (*heavy*), M (*medium*) et L (*light*) (Koltin & Day, 1976; Bozarth *et al.*, 1981). Ces dsRNA sont encapsidés dans des particules virales de 43 nm formées d'une protéine majeure de 73 à 75 kDa. Les souches killer de l'espèce *U. maydis* sont résistantes à leurs propres toxines, cependant contrairement à ce qui est observé chez *S. cerevisiae*, elles ne doivent pas cette auto-immunité aux déterminants génétiques responsables de l'activité killer. Chez les

souches killer de type KP1, l'auto-immunité est associée aux segments L, tandis que chez les souches de type KP4 et KP6, elle est due à des mutations chromosomiques (Koltin *et al.*, 1980; Peery *et al.*, 1982; Finkler *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1994).

- **La toxine P1 (KP1)** d'*U. maydis* est une toxine dimérique de 19,0 kDa formée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β , liées de manière non covalente. La sous-unité β , apparemment glycosylée, possède des domaines hydrophobes similaires à ceux de la toxine K2 de *S. cerevisiae*. La toxine KP1 provient d'un virus à 6 segments de dsRNA (H1, H2, M1, M2, M3 et L).
- **La toxine P4 (KP4)** d'*U. maydis* est une toxine monomérique non glycosylée de 11,1 kDa qui est formée de 105 acides aminés (Ganesa *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1994). Elle a un point isoélectrique de 8,1 et contient 10 cystéines probablement impliquées dans la formation de ponts disulfures (Ganesa *et al.*, 1991). La toxine KP4 provient d'un virus à 7 segments de dsRNA (H1, H2, H3, H4, M2, M3 et L). Son ADNc a été cloné, séquencé et exprimé chez *S. cerevisiae* (Park *et al.*, 1994). Elle est synthétisée sous la forme d'une préprotoxine de 13,6 kDa, composée de 127 acides aminés, ne contenant aucun site de *N*-glycosylation.
- **La toxine P6 (KP6)** d'*U. maydis* est une toxine dimérique non glycosylée de 17,7 kDa. Elle est composée d'une sous-unité α de 8,6 kDa, formée de 78 acides aminés, et d'une sous-unité β de 9,1 kDa, formée de 81 acides aminés. Ces 2 sous-unités sont liées de manière non covalente. La toxine KP6 provient d'un virus à 5 segments de dsRNA (H1, H2, M2, M3 et L). C'est la toxine d'*U. maydis* la mieux caractérisée. Son ADNc a été cloné, séquencé et exprimé dans différents systèmes d'expression hétérologue (Peery *et al.*, 1987; Tao *et al.*, 1990; Finkler *et al.*, 1992; Tao *et al.*, 1993). Le segment M2 code une protoxine de 24,1 kDa, composée de 219 acides aminés, qui sera clivée par différentes protéases dont une ayant une activité de type *kex2p*. Cette protoxine comprend un peptide signal, la sous-unité α glycosylée, un domaine de liaison et la sous-unité β (Tao *et al.*, 1990).

Tableau III : Structure des toxines killer codées par des gènes extra-chromosomiques

Levure killer	Toxine	SU (kDa)	Masse moléculaire	GP ?	ProT	pH ou pI / T°
<i>Kluyveromyces lactis</i>	codée par pGKL1 (k ₁) et pGKL2 (k ₂)	α (99) β (30) γ (27,5)	156,5 kDa	oui	128 kDa	
<i>Pichia inositovora</i>	codée par pPin 1-1 et pPin 1-3		> 100 kDa	oui		de 3,4 à 4,2
<i>Pichia acaciae</i>	codée par pPac 1-1 et pPac 1-2	α (110) β (39) γ (38)	± 190 kDa			de 7,0 à 7,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K1	α (9,5) β (9,0)	172 aa + 140 aa 19 kDa	non	35 kDa, puis 42 kDa	de 4,2 à 4,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K2	α β	180 aa + 140 aa 21,5 kDa	oui	38,7 kDa	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K28	α (10,5) β (11)	21,5 kDa	oui	37,6 kDa	
<i>Ustilago maydis</i>	P1 (KP1)	α β	19,0 kDa	oui		
<i>Ustilago maydis</i>	P4 (KP4)	mono	11,1 kDa (105 aa)	non	13,6 kDa (127 aa)	
<i>Ustilago maydis</i>	P6 (KP6)	α (8,6) β (9,1)	17,7 kDa	non	24,1 kDa (219 aa)	
<i>Phaffia rhodozyma</i>						
<i>Hanseniaspora uvarum</i>			± 18 kDa	non		
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	KT412		± 10 kDa	non		
<i>Tilletiopsis albescens</i>			± 10 kDa			de 3,5 à 8,0

[aa = acides aminés ; GP = nature glycoprotéique ; mono = toxine monomérique ; SU = sous-unités]

4. Modes d'action de ces toxines killer (tableau IV)

4.1. Modes d'action de la toxine de *K. lactis* (Figure 3)

La toxine de *K. lactis* exerce une activité killer à l'encontre de souches sensibles appartenant à différentes espèces comme *Candida* spp., *Kluyveromyces* spp., *Saccharomyces* spp., *Torulopsis* spp. ou *Zygosaccharomyces* spp. (Gunge *et al.*, 1981). La toxine mature provoque un arrêt définitif du cycle cellulaire de la cellule cible en phase G₁ conduisant à une perte rapide de la viabilité (Gunge & Sakaguchi, 1981; White *et al.*, 1989). Cet arrêt du cycle cellulaire en G₁ est attribué à la sous-unité γ (Butler *et al.*, 1991b). La sous-unité α , de son côté, possède une activité chitinase qui est essentielle pour permettre à la toxine d'agir sur les cellules cibles (Butler *et al.*, 1991a; Watanabe *et al.*, 1992). Des études ultérieures ont montré que des souches mutantes de *S. cerevisiae*, incapables de synthétiser de la chitine, sont résistantes à la toxine de *K. lactis* (Bulawa, 1993). Chez cette levure, la chitine semble être impliquée dans la formation des récepteurs pariétaux de la toxine de *K. lactis* (Takita & Castilho-Valavicius, 1993). Dès que la toxine s'est fixée à la surface de la cellule cible, une partie de celle-ci, probablement la sous-unité β en raison de ses domaines hydrophobes, est transloquée à travers la membrane plasmique vers le cytoplasme. La sous-unité β agit aussi probablement de manière simultanée avec la sous-unité α . Les cellules cibles exposées au contact de la toxine killer maintiennent leur potentiel de membrane à une valeur constante, ce qui indique que la toxine de *K. lactis* n'agit pas comme un ionophore. Il a été montré que des mutants de *S. cerevisiae* déficients en Totp (une protéine intervenant lors du processus d'élongation de l'ARN) sont résistants à la toxine de *K. lactis* (Frohloff *et al.*, 2001), la toxine pourrait donc agir sur ces protéines pour entraîner l'arrêt du cycle cellulaire.

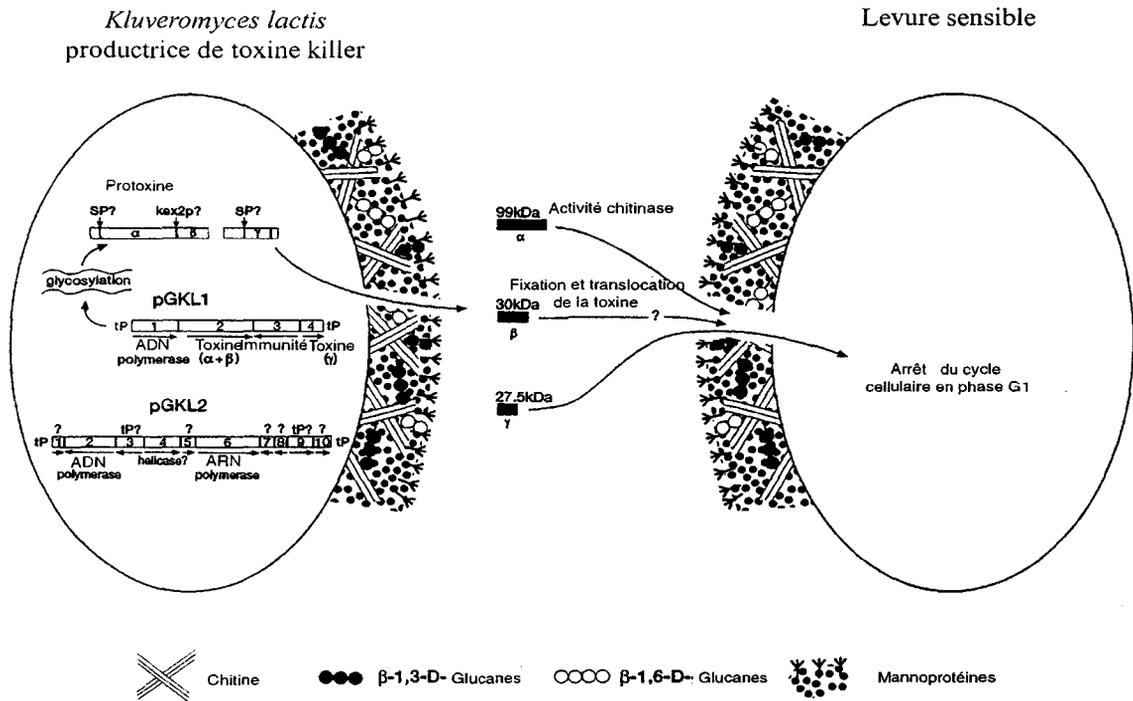


Figure 3 : Mode d'action de la toxine killer de *Kluyveromyces lactis* (d'après Magliani *et al*,1997).

4.2. Modes d'action des toxines de *Pichia* spp.

La toxine de *P. acaciae* codée par pPac 1-1 et pPac 1-2 est inhibée par l'allosamidine, un inhibiteur de chitinase. Une fixation de la toxine sur la chitine de la cellule cible est essentielle pour obtenir une activité toxique. Cette activité arrête le cycle cellulaire de la cellule cible en G₁. Les mécanismes d'action de cette toxine semblent proches de ceux de la toxine de *K. lactis*. Cependant, alors que des souches mutantes *k₁* de *K. lactis*, qui ont perdu le plasmide *k₁*, deviennent sensibles à la toxine de *P. acaciae* comme à leur propre toxine, les souches mutantes de *P. acaciae* ne deviennent sensibles qu'à leur propre toxine (Bolen *et al.*, 1994). Ces observations suggèrent que les mécanismes d'immunité de ces deux toxines sont sans doute différents.

4.3. Modes d'action des toxines de *S. cerevisiae* (figure 4)

4.3.1 La toxine K1 se fixe, dans un premier temps, sur les β 1,6-D-glucanes de la paroi de la cellule cible grâce à sa sous-unité β (Al-Aidroos & Bussey, 1978; Boone *et al.*, 1990b). Les conditions de fixation de la toxine sur ces récepteurs pariétaux sont fortement liées aux conditions de pH. La valeur optimale du pH permettant la fixation de la sous-unité β est de 4,6 (Bussey *et al.*, 1979). Dans un second temps, la sous-unité α de la toxine interagit avec la membrane plasmique de la cellule cible par un mécanisme énergie-dépendant responsable de l'effet toxique entraînant la mort de la cellule. Ces conclusions ont été obtenues en observant que les sphéropastes des cellules cibles étaient sensibles à la toxine (Zhu & Bussey, 1989). Il s'avère aussi que de jeunes cellules en bourgeonnement soient plus sensibles à l'activité de la toxine K1 que les levures en phase stationnaire de croissance, ce qui suggère que seulement quelques récepteurs membranaires pourraient être impliqués dans la fixation de la toxine (Bussey *et al.*, 1979). La toxine ainsi fixée agit sur la cellule cible en inhibant la synthèse de macromolécules et en causant des dommages à la membrane plasmique de celle-ci, ce qui conduit à une fuite d'ions potassium et de molécules d'ATP cytoplasmiques (De la Pena *et al.*, 1981; Martinac *et al.*, 1990). Au cours d'une étude récente, le canal à potassium Tok1p de *S. cerevisiae* a été identifié comme la cible membranaire de la toxine K1 (Ahmed *et al.*, 1999). La toxine agit en activant ces canaux ioniques, ce qui provoque un flux d'ions potassium et la mort cellulaire. La souche productrice de toxine K1 possède également ces canaux ioniques, elle est néanmoins immune à l'activité killer. Dans ce cas, la toxine K1 agit sans doute directement sur les canaux Tok1p au niveau du cytoplasme de la cellule killer, ce qui supprime les effets extra-membranaires de la toxine (Sesti *et al.*, 2001).

4.3.2 La toxine K2 semble avoir le même mode d'action que celui de K1.

4.3.3 La toxine K28 se fixe sur la paroi de la cellule cible par un autre mécanisme. Elle reconnaît un récepteur pariétal de 185 kDa composé de résidus α 1,3-mannanes (Schmitt & Radler, 1987). La fixation de la toxine K28 à son récepteur mannoprotéique induit apparemment un arrêt du cycle cellulaire. On observe dans le cas de cellules cibles en cours de division que la toxine K28 neutralise la division cellulaire, confinant l'ADN nucléaire dans la cellule mère (Schmitt & Tipper, 1990).

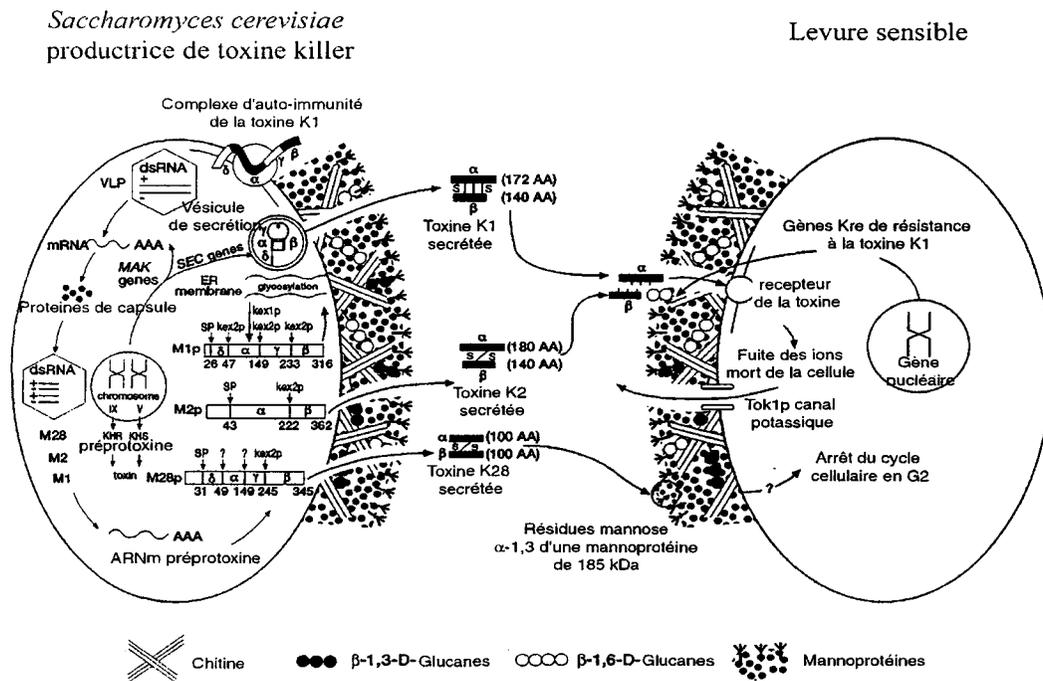


Figure 4 : Mode d'action des toxines K1, K2 et K28 (d'après Magliani *et al.*, 1997).

Des souches sensibles aux activités killer des toxines K1, K2 ou K28 peuvent devenir résistantes à ces mêmes toxines par mutation des gènes *KEX*. Certains de ces gènes sont impliqués dans la synthèse des récepteurs pariétaux. Les sphéropastes de ces mutants *kex* restent cependant sensibles à l'activité killer des toxines en question, ce qui suggère l'existence d'un récepteur secondaire membranaire (Meaden *et al.*, 1990). (Figure 4).

4.4. Modes d'action des toxines de *Ustilago maydis* (figure 5)

4.4.1 La toxine P6 (KP6) est la toxine d'*U. maydis* dont l'activité a été la mieux caractérisée. Elle est composée de 2 sous-unités α et β qui agissent de manière séquentielle. La sous-unité β est responsable de l'activité antibiotique, mais n'agit qu'après interaction de la sous-unité α avec la paroi de la cellule cible. Les récepteurs à KP6 des cellules sensibles n'ont

pas été identifiés. On pense qu'ils sont présents dans la paroi des cellules cibles, car les protoplastes de celles-ci sont insensibles à KP6 (Steinlauf *et al.*, 1988). La sous-unité α présente des similarités avec des neurotoxines de scorpions et des cytotoxines. Elle contient des domaines hydrophobes et 8 cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfures. Ces ponts disulfures sont indispensables à l'activité antibiotique de la toxine. L'étude cristallographique de KP6 a montré que les sous-unité α s'assemblent pour former un hexamère présentant un pore central. Ce port est sans doute à l'origine de l'activité killer de KP6 (Li *et al.*, 1999).

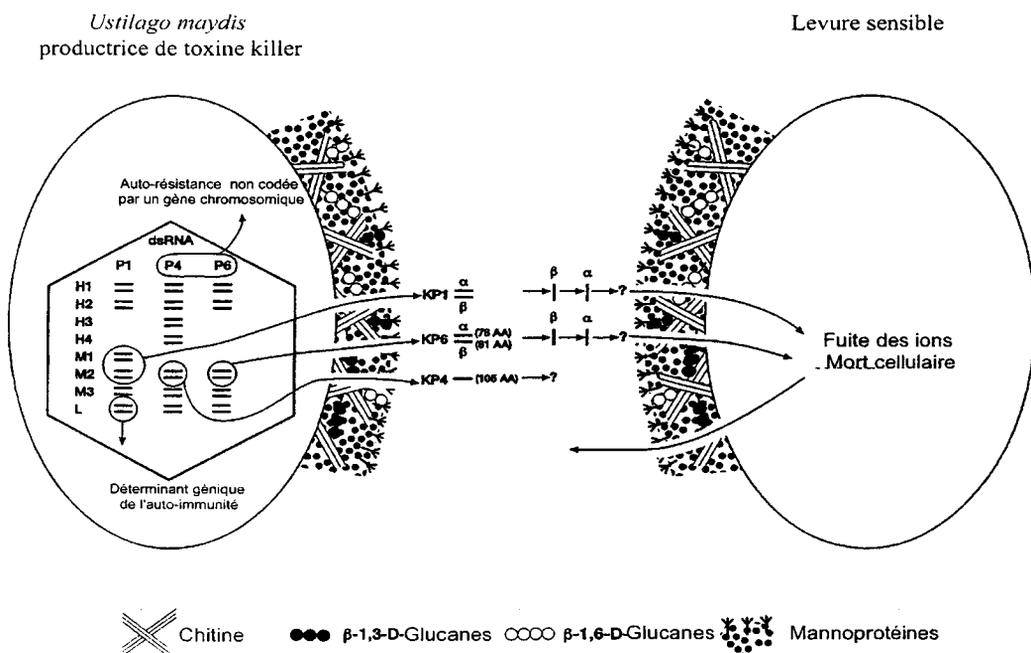


Figure 5 : Mode d'action des toxines KP1, KP4 et KP6 (d'après Magliani *et al.*, 1997).

4.4.2 La toxine P1 (KP1) a un mode d'action plus ou moins proche de celui de KP6 dans la mesure où les 2 sous-unités α et β agissent indépendamment sur la cellule cible.

4.4.3 La toxine P4 (KP4) ne présente pas de similarités de séquence avec les autres toxines de levure, mais tout comme KP6 elle possède des homologies structurales avec les toxines de scorpions (Park *et al.*, 1994). L'activité de la toxine est abolie en présence de calcium et est capable de bloquer les canaux calciques de cellules neuronales de rat (Gu *et al.*, 1995). Récemment, ce mode d'action faisant intervenir des canaux ioniques a été confirmé en

montrant que la toxine KP4 agit en fait comme un chélateur des ions calcium. Ceci suggère que KP4 agit en inhibant la division cellulaire plutôt qu'en tuant la cellule cible (Gage *et al.*, 2001)(Figure 5).

5. Autres toxines de levures

D'autres souches killer ont été caractérisées chez d'autres espèces de levure comme *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* ou *Phaffia rhodozyma*. Il s'agit en général de toxines codées par des gènes plasmidiques localisés sur des ARN bicaténaires (dsRNA) satellites (Schmitt *et al.*, 1997). La toxine killer KT412 de *Z. bailii* est une protéine d'environ 10 kDa (Radler *et al.*, 1993). Elle est probablement non glycosylée et se fixe sur les mannanes pariétaux de souches sensibles de *S. cerevisiae* ou *C. glabrata*. La toxine killer de *H. uvarum* est une protéine d'environ 18 kDa (Radler *et al.*, 1990). Elle se fixe à la surface de cellules cibles, vraisemblablement sur les β 1,6-glucanes. Chez l'espèce *Phaffia rhodozyma*, une toxine killer codée par un ou plusieurs dsRNA associés à des particules pseudo-virales a été isolée (Castillo & Cifuentes, 1994). Cette toxine est active contre des souches killer de *P. rhodozyma* sécrétant d'autres types de toxines. Des souches de *Tilletiopsis albescens* sécrètent une toxine killer d'environ 10 kDa qui est active pour des valeurs de pH entre 3.5 et 8.0 (Golubev, 1998). Cette toxine (ou mycocine) a une activité fongicide contre des souches de *Rhodotorula* spp., *Exobasidium* spp., *Farysia* spp., *Protomyces* spp., *Pseudozyma* spp., *Sporisorium* spp., *Tapphrina* spp. et *Ustilago* spp.. Par contre, elle n'agit pas contre les Ascomycètes. Elle est thermolabile et sensible à la protéinase K. Les mêmes auteurs ont montré que des souches de *Cryptococcus humicola* sécrètent de petites toxines killer thermostables (nommées microcines), actives en conditions acides et solubles en méthanol (Golubev & Shabalin, 1994). Des études ultérieures en microscopie et fluorimétrie ont montré que cette toxine est active contre des souches sensibles de *Cryptococcus terreus* (Puchkov *et al.*, 1998). D'autres toxines killer ont été caractérisées chez des souches de *Candida* spp. ou *Torulopsis* spp. (Kandel & Stern, 1979). Chez *Candida* spp., une toxine dimérique formée de sous-unités glycoprotéiques I et II d'environ 36 kDa chacune, a été caractérisée (Yokomori *et al.*, 1988). La sous-unité I est la plus active, notamment contre des souches de *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, *Klyuveromyces lactis*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula rubra* et *Saccharomyces cerevisiae*, alors qu'elle n'agit pas contre d'autres souches de levure, ni même contre des Bactéries.

Tableau IV : Mode d'action des toxines killer codées par des gènes extra-chromosomiques

Levure killer	Toxine	Cibles	Récepteurs	Activité
<i>Kluyveromyces lactis</i>	codée par pGKL1 (k ₁) et pGKL2 (k ₂)	<i>Candida spp</i> <i>Kluyveromyces spp</i> <i>Torulopsis spp</i> <i>Zygosaccharomyces S. cerevisiae</i>	Chitine	- arrêt du cycle en G ₁ - chitinase
<i>Pichia inositovora</i>	codée par pPin 1-1 et pPin 1-3	<i>S. cerevisiae</i> <i>Cephaloascus Citeromyces</i>		
<i>Pichia acaciae</i>	codée par pPac 1-1 et pPac 1-2		Chitine	- arrêt du cycle en G ₁ - chitinase
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K1			- formation de canaux ionophores - fuite d'ATP - inhibition de synthèse de macromolécules
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K2			- formation de canaux ionophores
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K28			- inhibition de la synthèse d'ADN
<i>Ustilago maydis</i>	P1 (KP1)			- formation de canaux ionophores
<i>Ustilago maydis</i>	P4 (KP4)			- formation de canaux ionophores
<i>Ustilago maydis</i>	P6 (KP6)		pariétaux	- formation de canaux ionophores
<i>Phaffia rhodozyma</i>				
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		<i>S. cerevisiae</i>	β1,6-glucanes	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	KT412	<i>S. cerevisiae</i> <i>Candida glabrata</i>	mannanes	

III. LES RECEPTEURS DES TOXINES KILLER DE LEVURE (TABLEAU V)

Ce que l'on nomme le phénomène *killer* commence par une étape de fixation plus ou moins spécifique, de la toxine à la surface de la cellule cible. Ce sont généralement des structures polysaccharidiques pariétales, liées ou non à des protéines, qui représentent les premiers récepteurs de la toxine, avant qu'une ou plusieurs sous-unités de celle-ci ne traverse la membrane plasmique vers le cytoplasme de la cellule cible. D'autres récepteurs plus spécifiques, membranaires, cytoplasmiques et/ou nucléaires, peuvent ensuite être mobilisés pour que l'effet anti-fongique se propage dans la cellule cible. Dans les systèmes killer où la nature moléculaire des récepteurs n'a pas encore été déterminée, des réactions d'immunodétection ont tout de même permis de les localiser dans la paroi des cellules cibles. Les toxines peuvent induire des dommages structuraux et fonctionnels de la membrane plasmique des cellules cibles en provoquant, par exemple, des fuites d'ions par activation de canaux trans-membranaires, une inhibition du transport actif de métabolites comme les acides aminés ou une acidification du pH intra-cellulaire.

1. Modification de la perméabilité ionique membranaire

1.1. Récepteurs de nature β -glucanes

- **Toxines codées par des gènes nucléaires** : le mécanisme d'action de la toxine K-500 de *Williopsis mrakii* reste relativement peu connu. On constate une activité anti-*C. albicans* très développée, plutôt à l'encontre des cellules en phase stationnaire, ce qui est assez différent des observations faites avec les toxines de *P. anomala* ATCC 96603 et *W. mrakii* MUCL 41968. On pense que la toxine K-500 agit de la même manière que celle de *P. kluyveri* ou de la toxine K1 de *S. cerevisiae*, c'est-à-dire en induisant la formation de canaux membranaires favorisant ainsi la fuite d'ions et conduisant à la lyse de la cellule cible (Hodgson *et al.*, 1995). Les effets dose-réponse observés lors des études cinétiques suggèrent l'existence de récepteurs spécifiques à la surface des levures sensibles. Ces récepteurs pourraient être de nature β -glucanes.

1.2. Récepteurs de nature β 1,6-glucanes

- **Toxines codées par des gènes extra-chromosomiques** : les toxines K1 et K2 de *S. cerevisiae* ont des activités killer semblables, notamment dans la reconnaissance de récepteurs

pariétaux β 1,6-glucanes. La toxine K1 de *S. cerevisiae* est sans doute celle dont la nature biochimique des récepteurs a été la mieux caractérisée. Son activité antifongique s'exerce en deux temps. La toxine mature, dimérique, se fixe d'abord sur des récepteurs β 1,6glucanes présents dans la paroi des levures cibles. Cette étape d'adsorption faisant intervenir la sous-unité α de 10,5 kDa, mais surtout dans un premier temps la sous-unité β de 11 kDa, est fortement dépendante du pH (fixation optimale à pH 4.6) et ne prend que quelques minutes (Kurzweilova & Sigler, 1994). La synthèse des récepteurs reconnus par la toxine fait intervenir les gènes *KRE* (*killer resistance*) dont la majorité code des enzymes responsables de la biosynthèse et l'assemblage des β -glucanes pariétaux (Boone *et al.*, 1990b). Comme dans le cas d'autres systèmes killer, la toxine K1 est aussi capable de se fixer à la surface des cellules qui lui seront résistantes. La présence de récepteurs polysaccharidiques spécifiques d'une toxine fongique n'est donc pas toujours suffisante pour entraîner l'effet killer. La seconde phase de l'activité killer de la toxine K1 consiste à déréguler le flux ionique à travers la membrane plasmique, ce qui conduit à la mort cellulaire (Bussey *et al.*, 1973; De la Pena *et al.*, 1981).

Le fait que des mutants *kre* puissent exprimer une résistance efficace à la toxine K1 alors que leurs sphéroplastes restent sensibles, est un argument en faveur de la localisation pariétale des récepteurs polysaccharidiques de la toxine K1 (Bussey *et al.*, 1990). L'altération des sites de fixation de la toxine par oxydation au périodate, contrairement à ce que l'on observe après traitement à la pronase, confirme la nature polysaccharidique des récepteurs. Des sphéroplastes de souches mutantes *kre3* et *kre12* de *S. cerevisiae* résistantes à la toxine K1, sont également résistants à l'activité killer (Al-Aidroos & Bussey, 1978; Schmitt & Compain, 1995). Il existe donc un second système de récepteurs membranaires, accessible à la toxine une fois que celle-ci a été reconnue par les β -glucanes de la paroi fongique. Des expériences de purifications protéiques à partir de membranes plasmiques de souches mutantes *kre12* et de souches isogéniques exprimant *KRE12*, ont permis de caractériser 3 protéines, ou sous-unités protéiques, pouvant jouer un rôle dans les mécanismes de reconnaissance de la toxine K1 par la membrane plasmique de la cellule cible (Schmitt & Compain, 1995).

La toxine K1 agit sur les cellules sensibles en perturbant l'équilibre osmotique des ions potassium de part et d'autre de leur membrane plasmique. Elle active principalement des canaux potassium membranaires et en provoque même la synthèse *de novo* (Martinac *et al.*, 1990), ce qui favorise la fuite ionique et la mort cellulaire (Bussey & Skipper, 1976; De la Pena *et al.*, 1981). D'autres ions et métabolites, comme les molécules d'ATP, peuvent aussi

fuir le cytoplasme des cellules atteintes. On a observé récemment que des cellules mutantes pour le gène *TOK1*, responsable de la conformation des canaux potassium membranaires (canaux Tok1p), acquièrent une résistance à l'activité antifongique de la toxine K1, de même que des cellules surexprimant le gène *TOK1* ont une sensibilité accrue à la toxine K1 (Ahmed *et al.*, 1999). Cela indique que les canaux TOK1 sont des cibles moléculaires privilégiées de la toxine K1. L'activation de ces canaux est nécessaire et suffisante pour modifier le flux potassium et tuer les cellules cibles de la toxine.

1.3. Récepteurs de nature inconnue

- **Toxines codées par des gènes extra-chromosomiques** : les toxines KP1 et KP6 d'*U. maydis* sont des protéines dimériques formées de sous-unités α et β liées de manière non covalente. Les deux sous-unités ainsi sécrétées par la souche killer interagissent indépendamment avec la surface de la cellule cible mais de manière séquentielle, la sous-unité α induisant l'activité de la sous-unité β . Les récepteurs pariétaux de ces monomères n'ont pas encore été identifiés, bien que l'on pense qu'ils se localisent dans la paroi de la cellule cible. En effet, des sphéroplastes de levures sensibles aux toxines KP1 ou KP6 deviennent résistants (Makower & Bewan, 1963).

- **Toxines codées par des gènes nucléaires** : les toxines KHR (*killer of heat resistant*) et KHS (*killer of heat susceptible*) de *S. cerevisiae* sont des protéines monomériques de 20 et 75 kDa. La nature de leurs récepteurs est inconnue. La toxine KHS mature possède des domaines hydrophobes qui pourraient jouer un rôle dans les interactions avec la membrane plasmique de la cellule cible et la formation de canaux ionophores. Ces canaux sont semblables à ceux créés par les toxines K1 et K2 de *S. cerevisiae* (Goto *et al.*, 1991). La toxine KHR, quant à elle, ne présente apparemment aucun domaine hydrophobe permettant de lui attribuer un mode d'action proche de celui de la toxine K1 de *S. cerevisiae* (Goto *et al.*, 1990a).

La toxine de *Pichia kluyveri* est une glycoprotéine de 19 kDa qui interagit avec la double couche phospholipidique de la membrane plasmique de la cellule cible. Elle provoque en quelques minutes la formation de pores membranaires, comme dans le cas de la toxine K1 de *S. cerevisiae*, puis une diminution du pH intra-cellulaire et l'inhibition des mécanismes d'incorporation des acides aminés (Middelbeek *et al.*, 1980a). L'effet killer sur des souches sensibles de *S. cerevisiae* est maximal en début de phase exponentielle de croissance, alors que les cellules en phase stationnaire sont totalement résistantes à la toxine (Middelbeek *et al.*, 1980b).

La toxine dimérique halo-tolérante SMK1 (SMKT ou KK1) de *Pichia farinosa* présente des similarités structurales avec la toxine K1 de *S. cerevisiae*, surtout par son caractère hydrophobe qui suppose l'existence d'un récepteur membranaire chez la cellule cible (Suzuki & Nikkuni, 1994). Les auteurs de ces travaux pensent que les récepteurs pariétaux impliqués dans ce système killer sont des β 1,6-glucanes, observations faites à la suite d'expériences avec des mutants *kre* de *S. cerevisiae*. Très récemment, ils ont décrit des mutants *spf1* de *S. cerevisiae* résistants à la toxine SMK1 (Suzuki, 1999). Le gène *SPF1* code pour une ATPase transmembranaire, dont la présence n'est pas essentielle chez *S. cerevisiae*, mais qui joue un rôle évident dans la sensibilité de la levure cible à la toxine SMK1. Comme dans le cas de la toxine de *P. kluyveri*, ce sont les cellules de *S. cerevisiae* en phase de croissance, bourgeonnantes, qui s'avèrent être plus sensibles à l'effet killer que les cellules en phase stationnaire.

2. Inhibition de la synthèse d'ADN

- **Récepteurs de nature α 1,3-mannose** : la toxine K28 de *Saccharomyces cerevisiae*, qui est codée par des gènes chromosomiques, se distingue des toxines K1 et K2 par la nature de ses récepteurs et par son mode d'action antifongique. Elle se fixe à la surface des levures cibles en reconnaissant des mannoprotéines pariétales. En effet, des anticorps anti-mannoprotéines sont capables de neutraliser les sites de fixation de la toxine à la surface de levures cibles, les rendant ainsi résistantes à son activité (Schmitt & Radler, 1990). De même, des mutants *mnn* de *S. cerevisiae*, dont la composition en mannoprotéines est très incomplète, montrent une certaine résistance à cette même toxine. On sait maintenant que la toxine K28 se fixe sur un récepteur α 1-3 mannosidique d'une glycoprotéine pariétale de 185 kDa, ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire, apparemment en phase G2 (Schmitt & Radler, 1987; Schmitt & Radler, 1990). La K28 a une activité qui s'exerce directement sur la synthèse d'ADN de la cellule cible (Schmitt *et al.*, 1996). Lorsque cette synthèse est bloquée en phase S du cycle cellulaire, la viabilité de la cellule atteinte diminue progressivement. On peut observer alors des cellules présentant des bourgeonnements de taille moyenne et un noyau simple dans la blastoconidie mère contenant de l'ADN non encore répliqué. Les microtubules cytoplasmiques apparaissent normaux, bien qu'aucun fuseau de division ne soit détectable. Les cellules cibles peuvent être rendues expérimentalement résistantes à l'activité toxique de la K28 à condition de les bloquer par le facteur α au point de départ du cycle cellulaire. Cette résistance peut être maintenue plusieurs heures et reste réversible si on libère le facteur α des cellules cibles. D'autres expériences de sensibilité à la toxine K28 ont été réalisées en

bloquant le développement des cellules entre la phase G2 et la mitose, par des poisons métaboliques comme l'hydroxyurée qui bloque la duplication de l'ADN, ou du méthylbenzimidazol-2-yl-carbamate qui empêche la séparation des chromosomes le long du fuseau de division. Les cellules ainsi traitées restent sensibles à l'activité killer de la K28. Cette activité nécessite donc apparemment une entrée de la cellule cible en phase de division cellulaire et formation de bourgeons en bloquant la synthèse d'ADN et les mécanismes cellulaires du bourgeonnement. Très récemment, il a été démontré que la toxine K28, une fois entrée dans le cytoplasme de la cellule cible par endocytose, remontait à contresens (transport rétrograde) le cycle de sécrétion de la levure afin de libérer son activité toxique (Eisfeld *et al.*, 2000). Des cellules mutantes déficientes dans leurs mécanismes de sécrétion cellulaire (ayant par exemple un recyclage déficient des protéines de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique) sont résistantes à la toxine K28 alors que les souches sauvages correspondantes restent sensibles.

3. Activité chitinase et arrêt du cycle cellulaire

- **Récepteurs de type chitine** : Les toxines killer possédant une activité chitinase et arrêt du cycle cellulaire utilisent généralement la chitine comme récepteur. La toxine de *K. lactis*, dont les sous-unités sont codées par les gènes des plasmides *pGKL1* et *pGKL2*, se fixe à la paroi des cellules cibles avant de traverser probablement la membrane plasmique de celle-ci par un mécanisme qui pourrait être assimilé à une translocation. L'effet toxique observé est un arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G1. Les levures touchées ne montrent pas de forme bourgeonnée et n'entrent plus en division mitotique (Gunge & Sakaguchi, 1981; White *et al.*, 1989). Elles continuent à synthétiser leurs protéines et leurs ARN, tandis que leur volume cellulaire augmente fortement en absence de division (Bussey, 1991). A la différence d'autres systèmes killer, le potentiel membranaire des cellules cibles ne subit ici aucune modification, ce qui élimine les mécanismes de perméabilisation membranaire décrits chez les toxines ionophores de *S. cerevisiae* ou d'*U. maydis*. Dans le cas de la toxine de *K. lactis*, il semble que seule la sous-unité γ de 27,5 kDa n'agisse dans le cytoplasme de la cellule cible pour interrompre le déroulement du cycle cellulaire en phase G1 (Butler *et al.*, 1991b). La nature du récepteur intracellulaire interagissant avec cette sous-unité toxique est encore inconnue. De son côté, la sous-unité toxique α de 99 kDa agirait comme une chitinase sur la paroi de la levure, ce qui permettrait de faciliter le passage et l'activité ultérieure de la particule γ (Butler *et al.*, 1991a). Celle-ci pénétrerait en effet plus facilement dans le cytoplasme après une dégradation partielle de la structure polysaccharidique pariétale. Le rôle de la sous-unité β de

30 kDa reste quant à lui encore inconnu, même si sa nature hydrophobe permet de penser qu'elle joue un rôle auxiliaire dans les mécanismes de translocation de la sous-unité (à travers la membrane plasmique).

La chitine pariétale joue sans doute un rôle important comme récepteur de cette toxine. On observe en effet que des mutants de *S. cerevisiae* sans activité chitine-synthase III sont résistants à l'activité killer de *K. lactis* (Bulawa, 1993). Des études sur le gène *CAL1*, responsable de l'activité chitine synthase III, ont montré que des souches mutantes récessives *cal1* de *S. cerevisiae* arrêtent leur cycle cellulaire à 37°C sous forme bourgeonnée et deviennent résistantes à la toxine (Takita & Castilho-Valavicius, 1993). La quantité faible de chitine retrouvée dans la paroi de ces levures mutantes ne les empêche pas de survivre, mais les rend résistantes à la toxine killer de *K. lactis*. D'autres gènes de *S. cerevisiae* sont soupçonnés d'intervenir dans les mécanismes de résistance et de sensibilité à la toxine de *K. lactis*. C'est le cas par exemple du gène responsable de la synthèse d'ARNt-(Glu3) dont la surexpression confère une sensibilité réduite à la toxine (Butler *et al.*, 1994).

La toxine de *Pichia acaciae* codée par les plasmides *pPac1-1* et *pPac1-2* a des propriétés structurales et fonctionnelles proches de celles de *K. lactis* (McCracken *et al.*, 1994). Elle est composée de trois sous-unités de 110, 39 et 38 kDa et possède une activité chitinase. Cette activité, qui n'a pas encore été associée précisément à l'une des sous-unités, provoque ensuite sur les souches sensibles de *S. cerevisiae*, un blocage du cycle cellulaire en phase G1. Il est intéressant de noter que les mécanismes d'action de cette toxine ne sont sans doute pas très éloignés de celle de *K. lactis*. En effet, parmi la dizaine d'allèles récessifs de *S. cerevisiae* qui induisent une résistance à la toxine de *K. lactis*, trois reproduisent les mêmes effets vis-à-vis de la toxine de *P. acaciae* (McCracken *et al.*, 1994).

4. Inhibition de la synthèse des β 1,3-glucanes

- **Récepteurs de nature β 1,3-glucanes** : Les espèces de *Williopsis*, comme celles de *Pichia*, présentent la particularité de reconnaître des récepteurs polysaccharidiques de type β 1,3- et β 1,6-glucanes. Les β 1,3-glucanes qui constituent le composant majeur de la paroi cellulaire, sont impliqués dans le maintien de la morphologie cellulaire et l'intégrité de la pression osmotique. Chez *W. mrakii*, la toxine HM-1 (ou HMK) interfère avec la synthèse des β 1,3-glucanes, ce qui fragilise les levures sensibles du point de vue de la pression osmotique et

conduit à la lyse de la cellule cible (Yamamoto *et al.*, 1986a). La toxine HM1 n'est pas active à l'encontre des protoplastes de levure appartenant à des souches sensibles, ni contre des cellules délétées de l'allèle KRE6 qui présentent des quantités très réduites de β 1,6-glucanes. Il est fortement suspecté que ces deux types de β -glucanes pariétaux jouent un rôle important en tant que récepteur de la toxine (Kasahara *et al.*, 1994a). Récemment, la mise en évidence de mutants *rhk* de *S. cerevisiae*, présentant un phénotype résistant à l'activité de la toxine HM-1, a permis de souligner le rôle de la *N*-glycosylation dans la sensibilité des levures à l'effet killer de *W. mrakii* (Kimura *et al.*, 1999). La suppression des gènes impliqués dans la synthèse de mannosyl-transférases (*RHK1/ALG3*) ou d'oligosaccharyl-transferases (*RHK2* ou *STT3*), intervenant dans les mécanismes de glycosylation des protéines fongiques, confère aux levures une sensibilité importante à la toxine HM-1. Des mannoprotéines pariétales, liées à la membrane plasmique de la levure cible, se retrouvent ainsi impliquées dans la reconnaissance de la toxine et le déroulement des effets cytotoxiques qui s'ensuivent.

Le rôle des β 1,3-glucanes dans les premières phases de fixation de la toxine de *W. saturnus* var. *saturnus* sur la paroi d'une levure cible, a aussi été suggéré. Des cellules de *S. bayanus* traitées par la toxine HYI, présentent en microscopie électronique un éclatement de la paroi cellulaire dans la région des jeunes bourgeons, ce qui conduit à une fuite de matériel cytoplasmique et à la mort de la cellule (Komiyama *et al.*, 1998). L'effet killer de la toxine HYI est plus intense sur des cellules en phase exponentielle de croissance. La cible potentielle de la toxine HYI serait la voie de biosynthèse des β 1,3-glucanes et les mécanismes enzymatiques concentrés dans les régions bourgeonnantes des levures, ce qui rend les cellules plus sensibles à l'effet killer.

5. Activité killer encore inconnue

5.1. Récepteurs de nature β -glucanes

- **Toxines codées par des gènes nucléaires** : la toxine WC65 de *Pichia anomala* exerce une activité antifongique à l'encontre de souches de *C. albicans* ou de *P. bimundalis*, avec un mode d'action qui suggère l'existence de récepteurs spécifiques. En effet, les cinétiques d'activité antibiotique de la toxine sur les cellules cibles font apparaître une phase de saturation en présence de concentrations élevées de toxine WC65 (Sawant *et al.*, 1988). La présence de ces récepteurs dans la paroi de souches de *C. albicans* sensibles, comme sur la

membrane de sphéroplastes traités par la toxine, est confirmée par des méthodes d'immunodétection en microscopie de fluorescence (Sawant & Ahearn, 1990). Leur nature β 1,6-glucanes est, quant à elle, suspectée par l'observation de souches mutantes résistantes de *S. cerevisiae* qui sont déficients dans les mécanismes de synthèse de ces composants polysaccharidiques pariétaux (Sawant & Ahearn, 1990). Dans ces expériences, il est intéressant de noter que des sphéroplastes de souches résistantes de *S. cerevisiae* peuvent devenir sensibles à l'activité killer de la toxine, ce qui suggère l'existence de mécanismes de reconnaissance plus complexes entre la molécule anti-fongique et ses récepteurs.

5.2 Récepteurs de nature β 1,6-glucanes

La toxine CYC 1106 de *Pichia membranifaciens*, dont on ignore encore si elle est codée par des gènes nucléaires ou extra-chromosomiques, a une activité anti-fongique favorisée par une concentration importante en NaCl, caractéristique qu'elle partage avec la toxine SMK1 de *P. farinosa* (Llorente *et al.*, 1997; Marquina *et al.*, 1997). La toxine CYC 1106 se fixe en quelques minutes sur les β 1,6-glucanes pariétaux de cellules sensibles de *C. boidinii*, une levure contaminant fréquemment les saumures d'olives et perturbant sérieusement leur fermentation (Santos *et al.*, 2000). La résistance de la souche de *C. boidinii* à la toxine K1 de *S. cerevisiae*, qui reconnaît elle-même les β 1,6-glucanes pariétaux, indique que les mécanismes qui suivent la fixation de la toxine sur la paroi de la cellule cible sont différents entre ces deux systèmes killer.

La toxine killer de *Hanseniaspora uvarum* est une protéine de 18 kDa qui a une activité létale sur des souches sensibles de *S. cerevisiae*. Bien que la protéine sécrétée ne présente aucune chaîne polysaccharidique, des expériences d'inhibition utilisant la tunicamycine ont montré que la *N*-glycosylation des protéines chez la souche killer était nécessaire à la production d'une toxine protéique active (Radler *et al.*, 1990). Les auteurs suggèrent que la fixation de cette protéine à la surface des cellules cibles se fait par l'intermédiaire des β 1,6-glucanes pariétaux.

5.3. Récepteurs de nature inconnue

- **Toxines codées par des gènes extra-chromosomiques** : les mécanismes d'action et la nature biochimique des récepteurs de la toxine de *Pichia inositovora* codée par les gènes

plasmidiques *pPin1-1* et *pPin1-3* restent inconnus. Le spectre d'activité de cette toxine de plus de 100 kDa est assez large et comprend des souches de levures sensibles variées comme *S. cerevisiae*, *Cephaloascus albidus* ou *Citeromyces matritensis* (Hayman & Bolen, 1991).

- **Toxines codées par des gènes nucléaires** : bien que les toxines de *Pichia anomala* ATCC 96603 et *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 soient produites par des souches appartenant à des genres maintenant différenciés, elles ont des structures moléculaires et des spectres d'activités antimicrobiennes très proches (Guyard *et al.*, 2001). Les données concernant les récepteurs de ces toxines sont exposées dans le chapitre IV et V de cet exposé bibliographique.

Tableau V : Nature des récepteurs des toxines killer

Récepteurs	Toxines killer	Gén.	Principales cibles	Effets killer et résistances
Modification de la perméabilité ionique membranaire				
β-glucanes	<i>W. mrakii</i> K-500	Ncl	<i>Candida spp</i> Cellules en phase stationnaires	Canaux transmembranaires Fuite d'ions
β1,6-glucanes Protéines membranaires	<i>S. cerevisiae</i> K1, K2	Plm	<i>S. cerevisiae</i> Sphéroplastes et levures	Fuite d'ions, d'ATP et de métabolites Canaux K ⁺ Mutants <i>kre3</i> , <i>kre12</i> résistants Mutants <i>tok1</i> résistants
β1,6-glucanes ?	<i>P. farinosa</i> SMK1 (SMKT, KK1)	Ncl	Cellules en phase de croissance	Mutants <i>kre</i> résistants Mutants <i>sf1</i> résistants (ATPase membranaire)
Inconnu	<i>U. maydis</i> KP1, KP6 <i>S. cerevisiae</i> KHR, KHS <i>P. kluyveri</i>	Plm Ncl Ncl	Sphéroplastes et levures <i>S. glabrata</i> <i>S. cerevisiae</i> Cellules en phase exponentielle de croissance	Formation de canaux ionophores ? Pores membranaires Diminution du pH cytoplasmique Inhibition de l'incorporation des acides aminés Fuite K ⁺ et ATP Cellules en phase stationnaire = résistantes
Inhibition de la synthèse d'ADN				
α-1,3-mannose sur une GP185	<i>S. cerevisiae</i> K28	Plm	<i>S. cerevisiae</i>	Activité toxique cytoplasmique Arrêt du cycle cellulaire (phase S ?) Anticorps anti-mannane pariétaux neutralisant l'effet killer Facteur α bloquant l'effet killer Mutants <i>mnn</i> résistants Mutants sécrétoires résistants
Activité chitinase et arrêt du cycle cellulaire				
Chitine pariétale	<i>K. lactis</i> (PGKL1, pGKL2)	Plm	<i>Candida spp</i> <i>Kluyveromyces spp</i> <i>Torulopsis spp</i> <i>Zygosaccharomyces spp</i> <i>S. cerevisiae</i>	Activité cytoplasmique Arrêt du cycle cellulaire en G1 Mutants <i>cal1</i> (sans activité de chitine-synthase III) résistants Mutants défectifs en ARNt-Glu3 résistants
Chitine pariétale	<i>P. acaciae</i> (pPac1-1, pPac1-2)	Plm		Arrêt du cycle cellulaire en G1 Mutants récessifs résistants
Inhibition de la synthèse des β-glucanes				
β1,6-glucanes β1,3-glucanes		Ncl	<i>S. cerevisiae</i> Cellules entières	Fragilité de la paroi et lyse cellulaire Protoplastes résistants Mutants <i>kre6</i> résistants Mutants <i>rhk1/alg3</i> résistants (synthèse de mannosyl-tranfèrase) Mutants <i>rhk2/stt3</i> résistants (synthèse d'oligosaccharyl- transfèrase)
β1,3 -glucanes	<i>W. saturnus</i> HY1 (HSK)		<i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i> <i>P. anomala</i> <i>C. glabrata</i> Cellules bourgeonnantes	Eclatement de la paroi cellulaire Fuite de matériel cytoplasmique
Activité inconnue				
β1,6-glucanes	<i>P. anomala</i> WC65	Ncl	<i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>P. bimundalis</i>	Mutants résistants (synthèse de β-1,6-glucanes) Sensibilité de sphéroplastes de souches résistantes
β1,6-glucanes β1,6-glucanes ? Inconnu		? ? Plm	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Cephaloascus spp</i> <i>Citeromyces spp</i>	
	<i>P. anomala</i> ATCC96603 et <i>W. mrakii</i> MUCL41968	Ncl	<i>Pichia spp</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>Pneumocystis carinii</i> <i>Staphilococcus spp</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Fixation préférentielle sur les tubes germinatifs, bourgeons et cellules en phase de croissance

6. «Auto-immunité» des souches killer

- **Toxines codées par des gènes extra-chromosomiques** : Les souches de *S. cerevisiae* produisant les toxines K1 ou K28 développent des mécanismes de résistance assez semblables (« auto-immunité ») à leurs propres toxines. Cette auto-protection est liée aux déterminants génétiques codant l'activité killer, plus particulièrement aux ARN double-brin *M1* ou *M28* (Lolle *et al.*, 1984; Hanes *et al.*, 1986; Tipper & Schmitt, 1991; Meskauskas & Citavicius, 1992). Par des expériences de mutagenèse dirigée, il a ainsi été démontré que les domaines α et γ des précurseurs protéiques M1p ou M28p étaient impliqués dans l'établissement de l'auto-immunité chez la souche killer. La protoxine en cours de maturation pourraient interagir avec les récepteurs membranaires et les rendre ainsi inaccessibles à la toxine mature avant la production en masse de celle-ci. Le fait que les sphéroplastes, comme les formes levures, des souches killer puissent fixer de grandes quantités de toxine, sans en subir l'effet toxique, suppose que les récepteurs membranaires de K1 ou K28 doivent être masqués ou modifiés. Cette hypothèse a néanmoins été remise en cause récemment avec la découverte du mécanisme d'action de la toxine K1. La toxine K1 induit une fuite des ions potassium par activation du canal ionique codé par le gène *TOK1*. Les souches killer possèdent également ces canaux ioniques, mais elles sont immunes à l'activité de la toxine car l'activation des canaux Tok1p est bloquée au niveau cytoplasmique par K1 (Sesti *et al.*, 2001).

A l'inverse, les mécanismes d'auto-immunité des souches de *S. cerevisiae* produisant la toxine K2 sont indépendants de ceux responsables de l'activité killer. C'est le cas de étapes de maturation contrôlées par l'endopeptidase *Kex2p* et la carboxypeptidase *Kex1p* (Dignard *et al.*, 1991). Une modification des acides aminés dans la partie amino-terminale de la séquence primaire de la toxine K2 entraîne une réduction de l'auto-immunité sans altérer l'activité killer. Dans ces travaux, des expériences de mutagenèse dirigée suggèrent que l'un des deux sites de clivage *Kex2p* de la protoxine pourrait être impliqué dans l'établissement de l'auto-immunité de la souche killer.

Chez *U. maydis*, les souches killer ne sont pas sensibles à leurs propres toxines KP1, KP4 ou KP6. Cette auto-immunité ne semble pas liée aux précurseurs ou à la forme mature de ces toxines. Chez la souche productrice de la toxine KP1, l'auto-immunité est liée à un segment L du génome viral qui rend la levure killer, mais dont on ignore encore la nature. Chez d'autres

systèmes killer de *U. maydis*, comme les souches sécrétant les toxines KP4 et KP6, l'auto-immunité est due à des mutations chromosomiques récessives (Peery *et al.*, 1982; Park *et al.*, 1994). Chez *U. maydis*, les mécanismes moléculaires responsables de l'auto-immunité sont très différents de ce que l'on observe dans les systèmes killer K1 et K2 de *S. cerevisiae*, notamment avec les mutations *kre*. En effet, chez *U. maydis*, aucune mutation simple connue n'a encore rendu les souches killer résistantes à plus d'une toxine (Koltin & Day, 1976).

Chez *K. lactis*, on pense que le produit d'expression de l'ORF3 est impliqué dans les mécanismes d'auto-immunité, bien que l'on ignore son mode d'action exact. Celui-ci est encadré par les ORF responsables de la synthèse des précurseurs des sous-unités α , β et γ de la toxine killer (Stark & Boyd, 1986).

Chez *P. inositovora*, il a été démontré que des souches killer débarrassées (curées) de leurs plasmides à ADN double-brin *pPin1-1* et *pPin1-3*, bien que perdant leurs propriétés killer, ne deviennent pas forcément sensibles à leur toxine (Hayman & Bolen, 1991). Ces observations suggèrent que les mécanismes d'immunité des souches killer de *P. inositovora* ne sont pas liés à des gènes plasmidiques, mais peut-être à des gènes nucléaires.

Des observations différentes ont été faites avec des souches killer de *P. acaciae* débarrassées de leurs plasmides à ADN double-brin *pPac1-1* et *pPac1-2* par irradiation aux ultra-violets. En effet, dans ce cas, les souches ainsi traitées perdent leur activité killer et deviennent sensibles à la toxine produite par les souches mères sauvages (Worsham & Bolen, 1990). Dans le cas de *P. acaciae*, les mécanismes d'immunité à la toxine killer ne sont apparemment pas liés au génome nucléaire.

IV. LES TOXINES KILLER DE *P. ANOMALA* ATCC 96603 ET *W. SATURNUS* VAR. *MRAKII* MUCL 41968.

Dans cette partie de notre exposé bibliographique, nous dressons un bilan des connaissances concernant les toxines de *P. anomala* ATCC 966603 et de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. Les toxines produites par ces deux souches semblent apparentées puisqu'elles sont toutes les deux neutralisées par le même anticorps monoclonal anti-toxine, le mAbKT4 (Polonelli & Morace, 1987; Cailliez *et al.*, 1994).

Dans la plupart des publications traitant de la toxine killer à laquelle nous nous sommes intéressé au cours de ce travail de thèse, il est indiqué que la levure productrice est une souche de *P. anomala* (référéncée K36). Au cours du chapitre I, consacré aux résultats, nous indiquerons que les caractères taxonomiques de cette souche ont été ré-identifiés durant notre étude et qu'il s'agit en fait d'une souche de *W. saturnus* var. *mrakii* (maintenant référencée MUCL 41968). Par soucis de clarté dans cet exposé bibliographique, nous avons tenu compte de cette modification.

1. Etude de l'effet toxique de surnageants de cultures de *P. anomala* ATCC 96603 sur divers micro-organismes.

Des auteurs ont décrit des systèmes de classification de micro-organismes basés sur leur sensibilité vis-à-vis des toxines fongiques (Polonelli *et al.*, 1985; Polonelli & Morace, 1986). Les toxines killer de levures ont ainsi été utilisées pour la différenciation des micro-organismes. Leur utilisation a ensuite été étendue à l'étude et au biotypage de bactéries pathogènes pour l'homme (Morace *et al.*, 1989). C'est en utilisant des surnageants de cultures bruts, que le large spectre d'activité de la toxine killer de la souche ATCC 96603 de *P. anomala* (PaKT) a été mis en évidence. Ce spectre est d'autant plus remarquable qu'il s'étend à des micro-organismes eucaryotes et procaryotes pathogènes aussi variés que *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Polonelli & Morace, 1986; Morace *et al.*, 1989).

Ces travaux préliminaires ont conduit à l'évaluation des potentialités thérapeutiques de la PaKT. A l'aide de modèles d'infections cutanées par *Malassezia furfur* et *M. pachydermatis*, des animaux ont été traités par application externe de surnageants de cultures concentrés de *P.*

anomala ATCC 96603 (Polonelli *et al.*, 1986). Ces expériences ont montré que l'activité antimicrobienne de la PaKT induit une éradication totale des pathogènes fongiques.

2. Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine killer de *P. anomala* ATCC 96603

Dans la mesure où il n'était pas exclu que *P. anomala* ATCC 96603 puisse produire plusieurs toxines, il était indispensable de valider spécifiquement le spectre d'activité de la PaKT. Des anticorps monoclonaux ont alors été produits chez la souris par injection de surnageants de culture concentrés de la souche *P. anomala* ATCC 96603 (Polonelli & Morace, 1987). Parmi ces anticorps monoclonaux, le mAb KT4 a été sélectionné pour ses propriétés neutralisantes vis-à-vis de l'activité de PaKT. Il a ensuite été montré que le mAbKT4 reconnaît 2 bandes protéiques de 92 et 115 kDa. Un autre anticorps monoclonal (mAbKT1) reconnaissant les mêmes bandes protéiques a également été sélectionné, il ne possède néanmoins pas les caractéristiques neutralisantes du mAbKT4.

La spécificité du mAbKT4 a été testée au cours d'études sérologiques sur des souches de levures productrices de toxines killer (Polonelli *et al.*, 1989). Les tests d'immunodiffusion et de détection par immunofluorescence indirecte ont montré la spécificité du mAbKT4 pour les espèces productrices de toxines killer appartenant au genre *Pichia*. Aucune réactivité du mAbKT4 n'a été observée avec les toxines killer produites par les espèces appartenant aux genres *Candida*, *Kluyveromyces* et *Saccharomyces*. Par ailleurs, une étude réalisée sur 25 espèces du genre *Pichia* a révélé une corrélation entre la réactivité sérologique du mAbKT4 et la production de toxine killer (Polonelli *et al.*, 1991a). Toutefois, certaines espèces (4 sur 25), chez lesquelles aucune production de toxine n'a été démontrée, sont réactives avec le mAbKT4. Inversement, certaines souches de *Pichia* identifiées comme productrices de toxine killer n'ont montré aucune réactivité avec le mAbKT4, différentes toxines peuvent donc être produites par des souches appartenant au même genre.

3. Etude du spectre d'activité de la toxine killer de *P. anomala* ATCC 96603

Après l'obtention de l'anticorps neutralisant mAbKT4, les expériences permettant d'établir le spectre d'activité de la toxine de *P. anomala* ATCC 96603 ont été spécifiquement contrôlées en réalisant des tests d'inhibition de l'activité killer. C'est sur cette base qu'il a été démontré,

lors de tests de croissance réalisés *in vitro*, que la PaKT est active contre *C. albicans* (Polonelli *et al.*, 1997), levure pathogène prédominante lors d'infections fongiques (Navarro-Garcia *et al.*, 2001). L'activité antimicrobienne de la PaKT a ensuite été étendue à des micro-organismes pathogènes procaryotes tel que *Mycobacterium tuberculosis* (Conti *et al.*, 1998a). Au cours de ces expériences, un surnageant de culture de *P. anomala* ATCC 96603 a été pré-incubé 24 à 72 heures avec une suspension d'une souche de *M. tuberculosis* présentant des résistances à l'acide *p*-aminosalicylique, à la streptomycine et à l'isoniazide. Après ce traitement, la souche de *M. tuberculosis* a été remise en culture et sa croissance a été suivie durant 12 jours. Dans ces conditions, les auteurs ont montré une diminution significative de la croissance bactérienne. Après 6 jours de culture, l'essai réalisé en présence de la PaKT montrait un index de croissance nul alors que l'expérience contrôle réalisée en présence de la toxine inactivée (10 min, 100°C), montrait une croissance bactérienne significative. Cette activité anti-*Mycobacterium* a été attribuée à la PaKT dans la mesure où l'effet antimicrobien était neutralisé par une pré-incubation des surnageants de culture avec le mAbKT4 (Tableau VI).

Tableau VI : récapitulatif du spectre d'activité de la toxine killer de *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41 968 (WmKT), de celle de *Pichia anomala* ATCC 96603 (PaKT), des anticorps monoclonaux mimant l'activité de toxines killer (mAbK10), des sérums humains produisant des anticorps anti-idiotypiques killer et des anticorps simple chaîne recombinants (H6 ScFv).

Souches cibles	WmKT	PaKT	mAbK10	Sérums humains	SCFV6
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+
<i>Pneumocystis carinii</i>	+	nd	+	+	nd
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	nd	+	+		+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	nd	nd	nd
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+	nd	nd	nd	nd
<i>Pichia. anomala</i>	+	+			
Bactéries Gram-positives	nd	nd	+	nd	+

[+ : sensibilité ; - : résistance ; nd : non déterminé.]

4. Etude du spectre d'activité de la toxine killer de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968

La souche *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 est surproductrice de toxine killer (WmKT) (Polonelli, communication personnelle). Comme dans le cas de la souche *P. anomala* ATTC 96603, le spectre d'activité de cette toxine a d'abord été établi sur la base des propriétés antimicrobiennes de son surnageant de culture (Polonelli & Morace, 1986). C'est ainsi qu'il a été démontré que le surnageant de culture de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 possède une activité antimicrobienne vis-à-vis de souches fongiques appartenant aux espèces *P. anomala* (figure 6), *Aspergillus fumigatus* ou *Aspergillus nidulans*. Comme dans le cas de la PaKT, le surnageant de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 est capable d'exercer un effet antimicrobien contre des souches de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Le surnageant de culture de la souche *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 possède donc un spectre d'activité antimicrobien proche de celui de *P. anomala* ATTC 96603, ce qui laisse supposer que les deux souches de levure produisent des toxines au mode d'action similaire. Des tests de neutralisation de l'activité antimicrobienne du surnageant de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 ont montré que le mAbKT4 est capable d'inhiber spécifiquement l'activité de la WmKT, ce qui renforce l'hypothèse de similarités existant entre les deux toxines (Aliouat *et al.*, 1993a).

Les études du spectre d'activité de la WmKT ont révélé une activité antimicrobienne spécifique contre *C. albicans* (Cailliez *et al.*, 1992). Cette activité antimicrobienne a aussi été décrite contre *Pneumocystis carinii*, un champignon parasite unicellulaire responsable de pneumonies sévères chez les patients immunodéprimés (Figure 7). Au cours de ces études, l'effet inhibiteur *in vitro* de la WmKT sur l'attachement de *P. carinii* à des cellules fibroblastiques de singe (cellules Vero) a été mis en évidence (Aliouat *et al.*, 1993a). La pré-incubation des trophozoïtes avec un surnageant de culture de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 induit une inhibition marquée (34 à 45%) de l'attachement du parasite sur ces cellules. Cet effet est spécifique de la WmKT puisque les expériences de contrôle réalisées avec la toxine pré-incubée avec le mAbKT4 n'ont montré aucune inhibition de l'attachement du parasite. Des expériences similaires ont été réalisées en testant l'effet de la WmKT sur l'attachement de *P. carinii* sur des cellules épithéliales alvéolaires d'origine humaine (WI38VA13) et murine (L2). Ces deux types cellulaires sont proches des pneumocytes de type I sur lesquels *P. carinii* s'attache spécifiquement lors de la pneumocystose. De plus, ils

produisent une matrice riche en fibronectine, ce qui permet une bonne adhésion du parasite (Aliouat *et al.*, 1993b). Aussi bien dans le cas des cellules L2 et que celui des cellules WI38VA13, la WmKT induit une diminution spécifique de l'attachement du parasite (Seguy *et al.*, 1994; Seguy, 1996). De ce point de vue, la WmKT présente un intérêt certain dans la mesure où l'attachement de *Pneumocystis* aux cellules pulmonaires est une phase cruciale dans la pathogénie de la pneumocystose et qu'aucune drogue actuelle n'agit lors de cette étape.

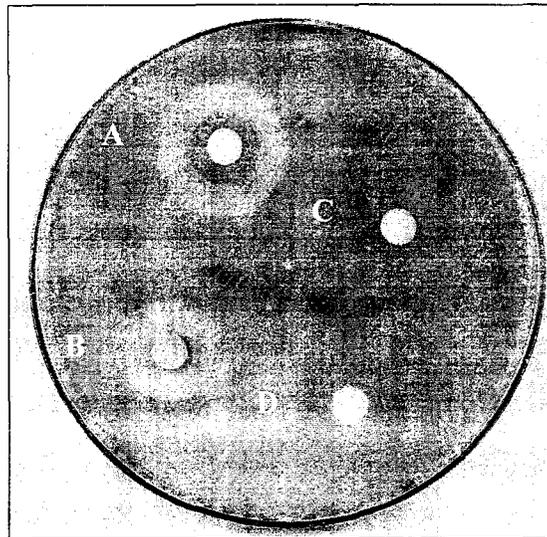


Figure 6 : Test d'activité d'un surnageant de culture de la souche *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 sur *P. anomala* MUCL 41968 par la technique de diffusion en boîte de Pétri. (A) et (B) Zones d'inhibition de croissance causées par un surnageant de culture, (C) Contrôle utilisant un surnageant dénaturé à la chaleur, (D) Contrôle réalisé avec du milieu de culture sans WmKT.

Pour déterminer si l'inhibition de l'attachement était due à la mort du parasite ou à un mécanisme spécifique d'inhibition de l'adhésion de *P. carinii*, Jackson *et al* ont réalisé des mesures d'incorporation d'acide para-aminobenzoïque radiomarqué [pABA-³H] chez *P. carinii* après contact avec la toxine. Ils ont ainsi mis en évidence que la WmKT induit une diminution d'environ 15 % de l'incorporation du [pABA-³H], ce qui indique que la WmKT agit directement sur la viabilité de *P. carinii* (Jackson *et al.*, 1996).

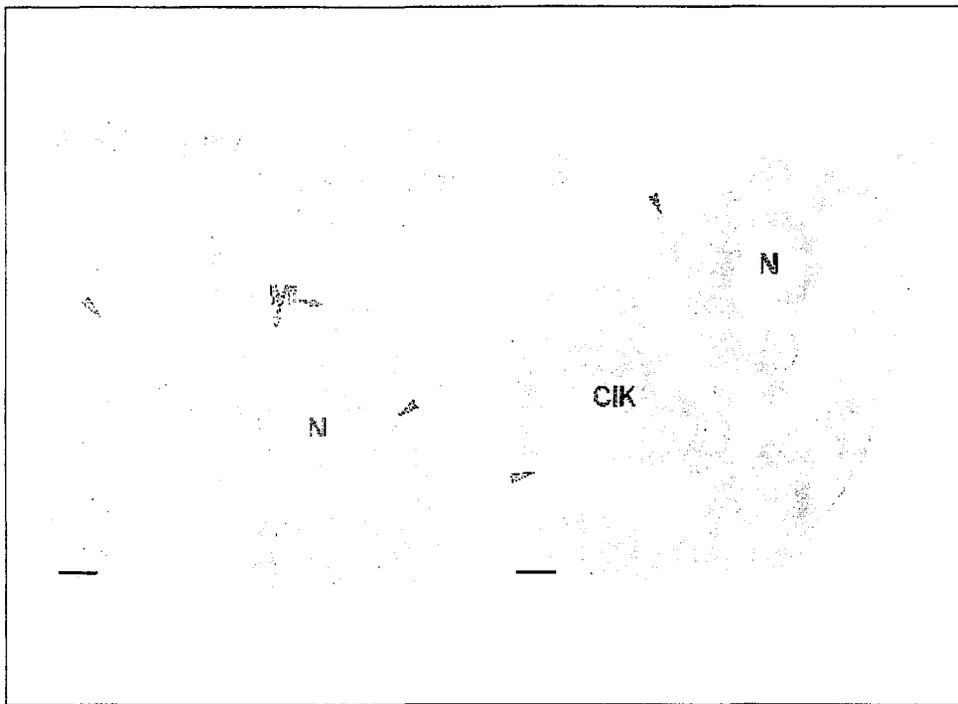


Figure 7 : Etude ultrastructurale de l'activité d'un surnageant de culture contenant la WmKT sur *P. carinii*. (A) : prékyste contrôle sans la WmKT ; (B) kyste incubé avec la WmKT : une altération importante de la membrane plasmique et des structures nucléaires sont visibles. CIK : corps intrakystique, Mi : mitochondrie, N : noyau. Trait : 0,3 μm .

L'ensemble des résultats obtenus dans ces tests *in vitro* indique que la WmKT est active contre *P. carinii*. Les potentialités thérapeutiques de la WmKT ont également été testées dans des modèles expérimentaux de pneumocystose chez le rat « nude » sous corticoïdes et chez la souris SCID. Au cours de ces expériences, les inoculum parasites ont été pré-incubés avec la WmKT puis instillés par voie nasale à la souris SCID ou par voie trachéale au rat « nude ». Des études ultrastructurales et des évaluations quantitatives du nombre parasites infectants ont été effectuées à l'issue de la période nécessaire au développement normal d'une pneumocystose. Pour les animaux contrôles, en contact avec un inoculum parasite pré-incubé avec la WmKT neutralisée avec le mAbKT4, une parasitémie comparable à celle obtenue en absence de toxine a été observée. Au contraire, dans le cas des animaux instillés avec un inoculum pré-incubé avec la WmKT, la charge parasitaire était faible et accusait une diminution moyenne de l'ordre de 76 à 99%, la toxine réduit donc significativement l'infectivité de *P. carinii* chez la souris SCID et le rat nude (Seguy *et al.*, 1996a).

5. Etudes cytologiques et ultrastructurales de la WmKT et de la PaKT

Des études en microscopie optique et électronique ont été réalisées pour mieux comprendre le mécanisme de sécrétion de la toxine chez *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 (Cailliez *et al.*, 1992). En les combinant avec des expériences d'immuno-fluorescence indirecte utilisant le mAbKT4, Cailliez *et al.* ont montré que la WmKT est présente de façon homogène dans la paroi de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. Des études d'immunolocalisation ont également été réalisées sur des coupes ultrafines de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 incluse dans une résine hydrophobe par des expériences d'immuno-marquage indirect à l'or colloïdal utilisant le mAbKT4 (Cailliez *et al.*, 1992). Dans ces conditions, la WmKT a été localisée principalement au niveau cytoplasmique. Aucune réactivité du mAbKT4 n'a été détectée au niveau du noyau, des mitochondries, des vacuoles et de la paroi. Des résultats comparables ont été obtenus sur des cellules incluses dans une résine de type Lowicryl k4m et sur des coupes à congélation. L'observation de ces cellules par microscopie électronique à transmission a également mis en évidence la sécrétion de la WmKT à travers la paroi cellulaire de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 (figure 8) (Cailliez *et al.*, 1994a).

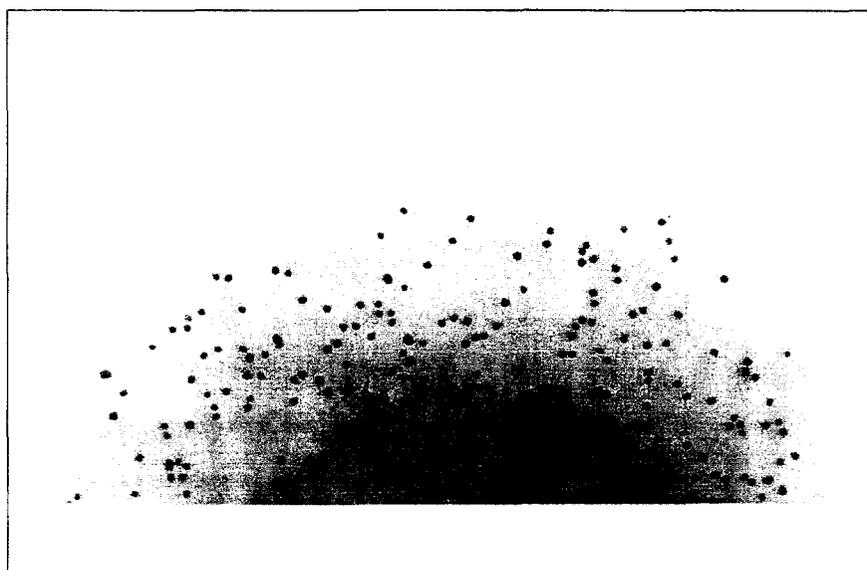


Figure 8 : Expériences d'immuno-marquage indirect à l'or colloïdal utilisant le mAbKT4 sur des cellules incluses dans une résine de type Lowicryl. L'observation de ces cellules par microscopie électronique à transmission a mis en évidence la sécrétion de la WmKT à travers la paroi cellulaire de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968.

Afin de déterminer le rôle éventuel de la *N*-glycosylation dans la sécrétion de la WmKT, des cultures de la souche *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 ont été réalisées en présence de tunicamycine, un antibiotique qui inhibe la *N*-glycosylation des protéines. Les expériences

d'immunofluorescence réalisées sur les cellules cultivées en présence de l'antibiotique n'ont pas montré de variation d'affinité du mAbKT4 pour la WmKT à la surface de *P. anomala* K36 (Cailliez *et al.*, 1993). De plus, il a été montré que le surnageant de culture de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 produit en présence de tunicamycine possédait toujours un effet antimicrobien. Les auteurs ont ainsi conclu que non seulement la *N*-glycosylation n'est pas indispensable à la sécrétion, mais également que l'absence de ces sucres n'altère pas significativement l'activité antimicrobienne de la toxine (Cailliez *et al.*, 1993). Par immunofluorescence indirecte en utilisant le mAbKT4 sur *P. carinii* pré-incubé avec la WmKT, il a été observé que la toxine agit en se fixant à la surface des trophozoites (Aliouat *et al.*, 1993a). Au contraire, aucune fixation de la toxine n'a pu être démontrée sur les stades pré-kystiques et kystiques du parasite.

L'effet de la PaKT sur *C. albicans* a été étudié par mesure de l'incorporation d'uridine-[³H] et de méthionine-[³⁵S] (Mathews *et al.*, 1998). Après un contact de trois heures avec un surnageant de culture de *P. anomala* ATCC 96603, l'incorporation des 2 radioéléments par *C. albicans* est significativement inhibée. La forme levure ou blastoconidie, de *C. albicans* s'est avérée plus sensible à la PaKT que la forme filamenteuse. De plus, en utilisant une méthode de coloration au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), les auteurs ont observé un effet de la PaKT sur l'intégrité du noyau des filaments et des levures de *C. albicans*. Après 3 heures de contact avec la toxine, suivis de 6 heures d'incubation avec le DAPI, les filaments de *C. albicans* ne comportaient plus de noyau, ce qui laisse supposer que non seulement la PaKT inhibe la croissance de *C. albicans* mais qu'elle affecte directement l'ADN de la levure (Mathews *et al.*, 1998).

Enfin une caractéristique commune à de ces deux toxines est la labilité, puisque leur activité antimicrobienne n'est constatée qu'à un pH proche de 4.6 et lorsque les incubations ou les pré-incubations sont effectuées entre 26 et 28°C (Seguy *et al.*, 1994; Conti *et al.*, 1998a).

V. PRODUCTION D'ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES MIMANT L'ACTIVITE KILLER

Les toxines PaKT et WmKT ne sont pas actives en conditions physiologiques (37°C, pH 7.5), des recherches visant à obtenir des molécules plus stables et possédant l'activité des toxines ont donc été menées dans notre laboratoire en collaboration avec l'équipe du Professeur L. Polonelli. Le résultat majeur de ce travail a été de produire des anticorps anti-idiotypiques dirigés contre le mAbKT4 (anticorps monoclonal neutralisant la toxine) et mimant l'activité killer des toxines.

1. Concept des anti-idiotypes

En 1963, les équipes de Kunkel et de Oudin ont décrit simultanément la notion d'idiotype. Les travaux de Kunkel *et al.* portaient sur la production d'anticorps humains spécifiques de déterminants antigéniques d'hématies ; ceux de Oudin *et al.* traitaient de la production d'anticorps de lapins immunisés contre *Salmonella typhii* (Kunkel *et al.*, 1963; Oudin & Michel, 1963). Au cours de leurs travaux, ces derniers ont injecté à un lapin des antigènes de *S. typhii* afin de produire des anticorps (Ab1). Ces anticorps Ab1 ont ensuite été injectés à un autre lapin qui a produit des anticorps Ab2 (Anti-Ab1). Ils ont alors montré que les anticorps Ab2 reconnaissaient spécifiquement les Ab1. Oudin *et al.* ont alors donné le nom d'idiotype (du grec « individuel » et « forme ») aux déterminants antigéniques spécifiques de Ab1 et celui d'anti-idiotype à l'ensemble des anticorps Ab2 produits spécifiquement en réponse aux anticorps Ab1.

En 1974, Jerne a proposé le concept d'un réseau immunitaire au sein de l'organisme, formé d'éléments associés entre eux par des interactions entre idiotypes et anti-idiotypes (Jerne, 1974). Selon cette théorie, lorsque l'antigène induit la production d'un anticorps, celui-ci va susciter, à son tour, une réponse anti-idiotypique contre lui-même. Les idiotypes sont présentés à la surface des lymphocytes B. Lorsque les lymphocytes B prolifèrent en réponse à un antigène, la quantité d'anticorps augmente et la concentration en idiotypes croît. Cette augmentation de la concentration en idiotypes stimule la prolifération d'autres lymphocytes portant des récepteurs anti-idiotypiques. Ces derniers secrètent alors des anticorps anti-idiotypiques qui régulent en retour la réponse immunitaire initiale. Néanmoins, la réponse immunitaire persiste car après la première génération d'anticorps anti-idiotypiques produits,

ces anticorps qui portent également des idiotypes, stimulent une troisième population de lymphocytes (Figure 9).

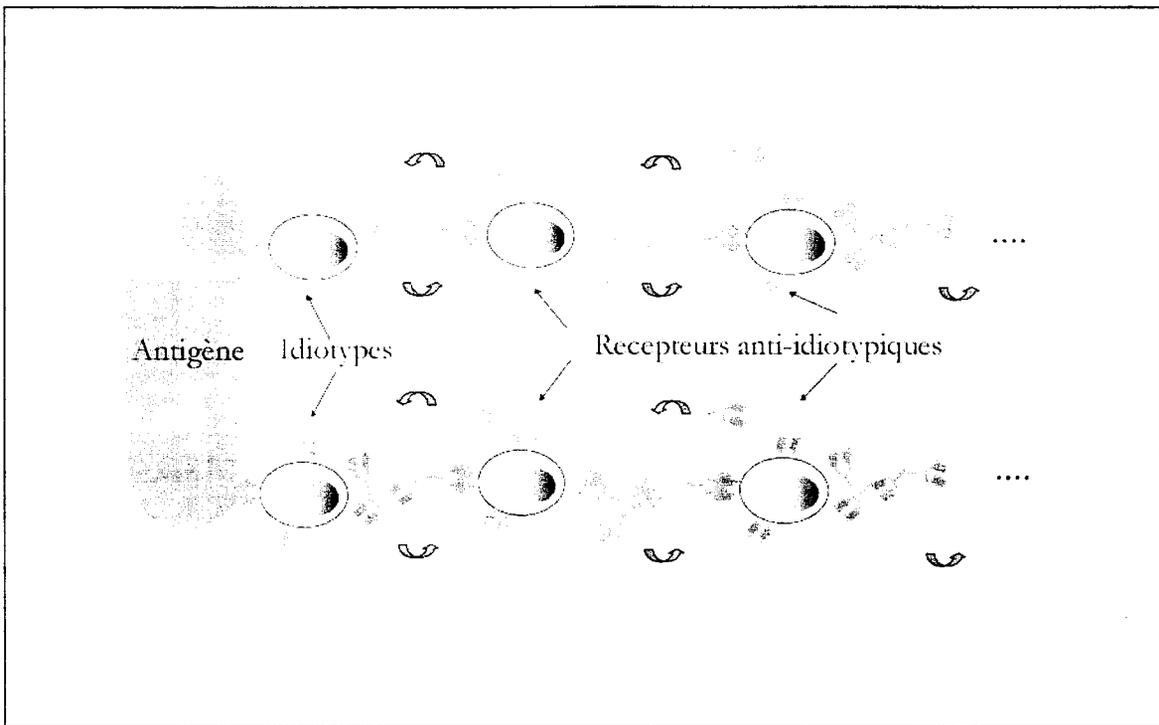


Figure 9 : Schéma illustrant la cascade idiotypique

Le concept de ce réseau repose donc sur l'hypothèse qu'à chaque antigène ou épitope, correspond un idiotype que l'on considère comme son image interne. Un antigène externe et certains anticorps anti-idiotypiques peuvent donc entrer en compétition pour se fixer sur un anticorps spécifique, ce qui suggère que ces anticorps anti-idiotypiques ressemblent à l'antigène externe et donc miment sa structure (Fields *et al.*, 1995).

2. La vaccination anti-idiotypique

Le principe du mimétisme idiotypique a permis d'imaginer une nouvelle approche concernant l'immunoprotection, puisqu'en simulant un antigène microbien, un anti-idiotype pouvait potentiellement se substituer à un vaccin (Nisonoff & Lamoyi, 1981). Ce concept est intéressant car la vaccination anti-idiotypique a potentiellement l'avantage sur les méthodes conventionnelles d'éviter des contaminations par des agents infectieux. Elle permet une réponse immune contre un épitope unique qui peut ne pas être immunodominant lors de l'utilisation de l'immunogène initial (ce qui active des clones silencieux). Elle permet

également de remplacer des déterminants antigéniques polysaccharidiques, et elle induit une forte réponse lymphocytaire T (Magliani *et al.*, 1997b). Pour valider ce concept, plusieurs systèmes vaccinaux ont été testés. Ils utilisent des anticorps monoclonaux anti-idiotypiques pour induire une immunoprotection vis-à-vis de la toxicité de molécules biologiques non protéiques de faible poids moléculaire. A titre d'exemple, un anticorps monoclonal dirigé contre la mycotoxine T-2 a permis la production d'un anticorps anti-idiotypique mimant un épitope de cette toxine. L'administration de cet anticorps anti-idiotypique à des souris a permis la production d'une réponse en anticorps protectrice vis-à-vis de la toxicité de la toxine T-2 (Chanh *et al.*, 1990). Ce système permet d'envisager l'induction *in vivo* d'une réponse protectrice vis-à-vis de molécules dont la cytotoxicité empêche leur utilisation en tant qu'immunogène.

3. Mimétisme enzymatique d'anticorps anti-idiotypiques

Le concept d'anti-idiotypie a conduit à une seconde hypothèse selon laquelle les propriétés de mimétisme des anticorps anti-idiotypiques peuvent être utilisées pour la production d'anticorps possédant les caractères spécifiques du site actif d'une enzyme (Kolesnikov *et al.*, 2000). Cette hypothèse a été confortée lors de l'obtention d'anticorps anti-idiotypiques catalytiques mimant l'activité de l'acétylcholinestérase humaine (AcChoE) (Izadyar *et al.*, 1993) et celle de la β -lactamase (Avalle *et al.*, 1998). Dans le cas de l'AcChoE, des souris ont été immunisées avec un anticorps monoclonal de classe IgG (AE-2) qui possédait une forte affinité pour le site actif de l'enzyme et qui était capable d'inhiber spécifiquement son activité. Les auteurs ont obtenu des anticorps anti-idiotypiques de classe IgM possédant une activité enzymatique similaire à celle de l'AcChoE (Izadyar *et al.*, 1993).

4. Production d'anticorps anti-idiotypiques killer et immunodétection des récepteurs pariétaux de la WmKT

Selon le concept de mimétisme anti-idiotypique, l'interaction spécifique entre les récepteurs pariétaux d'une souche de levure sensible et une toxine killer peut donc être comparée à celle existant entre l'idiotype d'un anticorps monoclonal anti-toxine killer et son anticorps anti-idiotypique complémentaire (Magliani *et al.*, 1997a). Il était donc envisageable que des anticorps neutralisants dirigés contre l'épitope fonctionnel d'une toxine killer puissent posséder une conformation stérique homologue au récepteur de cette toxine. Cette perspective

ouvre la possibilité d'utiliser des anticorps anti-idiotypiques anti-mAbKT4 pour étudier les interactions entre un récepteur pariétal à la surface d'une cellule cible et la toxine killer.

Des anticorps anti-idiotypiques dirigés contre le mAbKT4 ont donc été produits chez le lapin (Polonelli & Morace, 1988). Les anticorps des lapins immunisés, possédaient une forte spécificité pour le mAbKT4. De plus, il existait une compétition entre la PaKT et ces anticorps anti-idiotypiques vis-à-vis du mAbKT4, suggérant ainsi une complémentarité entre les anticorps anti-idiotypiques et le récepteur de la PaKT. Polonelli *et al.* ont utilisé ces anticorps anti-idiotypiques pour localiser les récepteurs pariétaux de la toxine à la surface de souches sensibles de *C. albicans* par immunofluorescence indirecte (Polonelli *et al.*, 1990). Cet immunomarquage, inhibé par le mAbKT4, est principalement observé sur les tubes germinatifs et les bourgeons, avec une intensité variable en fonction du stade de développement de la levure cible (figure10)

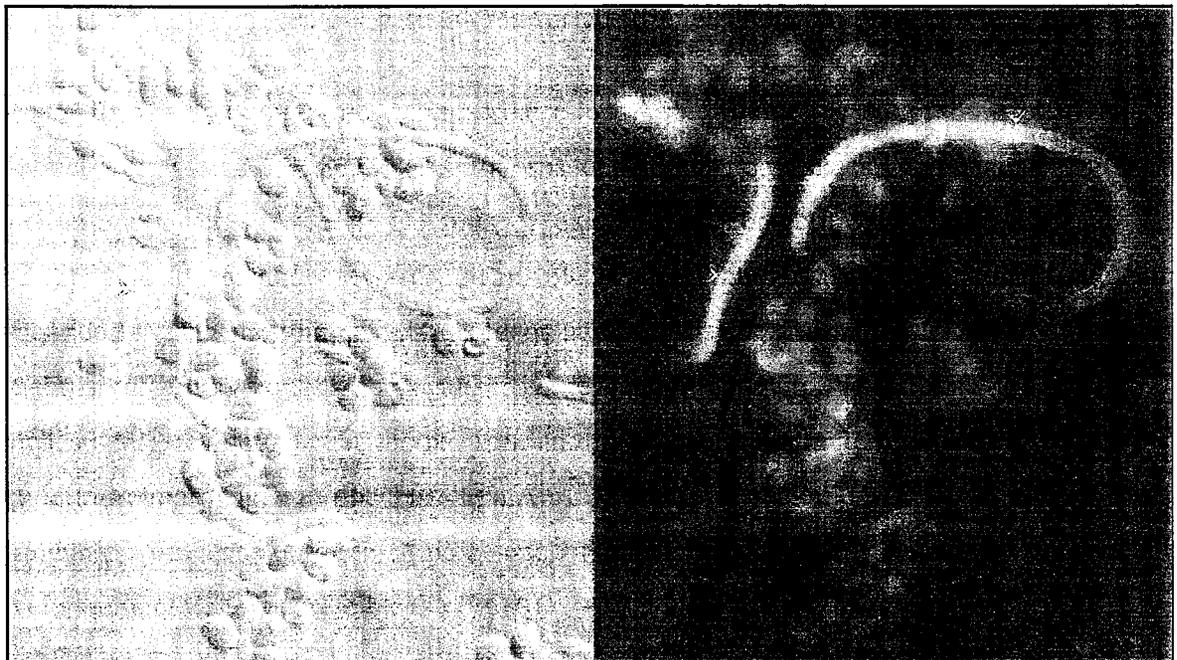


Figure 10 : Détection des récepteurs à la WmKT par immunofluorescence indirecte utilisant des anticorps anti-idiotypiques. (A) Observation en microscopie à contraste interférentiel d'une souche de *C. albicans* produisant des tubes germinatifs, (B) les anticorps anti-idiotypiques mimant l'activité de la WmKT se fixent sur les tubes germinatifs de *C. albicans*. Grossissement x 600, les flèches indiquent les tubes germinatifs.

5. Production d'anticorps anti-idiotypiques monoclonaux mimant l'activité killer

Une des implications de la théorie du réseau anti-idiotypique est qu'un anticorps anti-idiotypique peut non seulement mimer la conformation stérique d'un antigène mais également son activité biologique comme dans le cas de la β -lactamase (Avalle *et al.*, 1998).

Dans le but de produire de tels anticorps anti-idiotypiques, des rats ont été immunisés avec le mAbKT4. Les hybridomes obtenus à partir des cellules de rates d'animaux soumis au protocole d'immunisation, ont ensuite été sélectionnés pour la production d'anticorps présentant une activité antifongique vis-à-vis de la souche *P. anomala* K3 (souche sensible à la PaKT et la WmKT) (Seguy, 1996). C'est à l'issue de cette sélection qu'un anticorps anti-idiotypique monoclonal de l'isotype IgM (mAbK10) a été isolé. Il a ensuite été établi que le mAbK10 possède également une forte activité anti-*candida*. En effet, une mortalité de l'ordre de 90 % des cellules de la souche 10S de *C. albicans* a été observée après contact avec le mAbK10 (Polonelli *et al.*, 1997). Comme dans le cas de la PaKT et de la WmKT, cet effet antifongique est inhibé spécifiquement par le mAbKT4.

Le mAbK10 a également montré un effet *in vitro* contre *P. carinii*. Des tests d'attachement de *P. carinii* réalisés avec la lignée WI38VA13 en présence de l'anticorps monoclonal, ont révélé une inhibition spécifique de l'attachement du parasite aux cellules cibles. Cette inhibition, de l'ordre de 53%, est spécifique du mAbK10 puisque la pré-incubation de l'anticorps anti-idiotypique avec le mAbKT4 permet d'obtenir un taux de parasites attachés comparable à celui obtenu lors d'une co-culture parasite/cellules WI38VA13 contrôle sans anticorps (Seguy, 1996; Seguy *et al.*, 1997a).

L'activité antibiotique du mAbK10 a ensuite été montrée contre une souche de *M. tuberculosis* résistante à l'acide *p*-aminosalicylique, à la streptomycine et à l'isoniazide (Conti *et al.*, 2000). Après 16 jours de culture, les mycobactéries traitées avec le mAbK10 n'ont montré qu'une faible croissance alors que l'expérience de contrôle, en présence d'un anticorps non relevant de même isotype, présentait un développement important des bactéries. Cette activité anti-mycobactérie est inhibée par le mAbKT4, ce qui confirme que l'effet bactéricide observé est spécifiquement reliée à l'activité du mAbK10. Par ailleurs, des expériences d'immunofluorescence utilisant le mAbK10 ont montré un marquage à la surface de *M. tuberculosis*, et une compétition de fixation a été démontrée entre l'anticorps et la PaKT. Ces résultats suggèrent que les deux molécules interagissent avec le même « récepteur ». Ces

observations cruciales permettent de valider les potentialités thérapeutiques à large spectre de l'activité killer, puisqu'elles mettent en évidence l'existence d'une activité antibiotique vis-à-vis de micro-organismes procaryotes.

6. Vaccination idiotypique expérimentale (modèle murin)

Une étude similaire à celle réalisée chez le rat, a consisté à utiliser le mAbKT4 comme antigène dans un protocole d'immunisation chez la souris (Polonelli *et al.*, 1993). Au cours de ce travail, les auteurs ont administré le mAbKT4 à des souris BALB/C par différentes voies d'immunisation. Les animaux ont ensuite été infectés avec des quantités variables de *C. albicans* sensibles à la WmKT. Il a alors été montré que les animaux immunisés avec le mAbKT4 étaient protégés contre la candidose systémique car leur taux de survie était significativement supérieur à celui des animaux contrôles immunisés avec un anticorps non relevant du même isotype. Des résultats comparables ont été obtenus dans des expériences de vaccination mucoale dans un modèle de candidose vaginale chez le rat (Polonelli *et al.*, 1994). A chaque fois, la protection observée a clairement été associée à la présence d'anticorps anti-idiotypiques dont l'activité fongicide était inhibée par le mAbKT4.

7. Isolement d'anticorps anti-idiotypiques humains naturels

Ces travaux utilisant le pouvoir vaccinal du mAbKT4, suggèrent que les anticorps anti-idiotypiques produits lors de ces immunisations pourraient posséder des similarités fonctionnelles et structurales avec la WmKT. Ceci a permis de supposer qu'il y a également des homologies structurales entre l'idiotype du mAbKT4 et le récepteur pariétal de la WmKT chez *C. albicans* (Magliani *et al.*, 1997b). Il était donc raisonnable d'envisager que des animaux ou des hommes, en contact avec des cellules de *C. albicans* exprimant le récepteur à la WmKT, puissent produire des anticorps anti-idiotypiques mimant l'activité de la toxine. En effet, des personnes atteintes de candidoses à *C. albicans* produisent des anticorps dirigés contre les antigènes de surface de cette espèce. Si ces souches sont sensibles à la WmKT, il est probable que certains des anticorps humains anti-*Candida* soient des anticorps anti-récepteur de la WmKT, possédant une activité killer (Seguy, 1996). Cette hypothèse a pu être vérifiée en immunopurifiant avec le mAbKT4 des anticorps anti-idiotypiques provenant de patientes ayant développé une candidose vaginale (Polonelli *et al.*, 1996). En mesurant *in vitro* la viabilité de *C. albicans*, Polonelli *et al.* ont mis en évidence que ces anticorps anti-

idiotypiques humains possèdent une activité fongicide neutralisée spécifiquement par le mAbKT4 (Figure 11).

L'homologie probable entre les récepteurs pariétaux de *P. carinii* et de *C. albicans* pouvait laisser supposer que ces anticorps ont également un effet inhibiteur sur le développement de *P. carinii*. Pour le vérifier, Seguy *et al.* ont mesuré leur effet sur l'attachement *in vitro* de *P. carinii* à des cellules épithéliales alvéolaires (Seguy *et al.*, 1997a). Les auteurs ont ainsi mis en évidence que ces anticorps anti-idiotypiques humains induisent une inhibition significative (55.5%) de l'attachement du parasite aux cellules WI38 VA13, inhibition comparable à celle induite par la toxine (Aliouat *et al.*, 1993a; Seguy *et al.*, 1994). Comme dans le cas de la WmKT, l'effet inhibiteur est spécifiquement neutralisé par le mAbKT4. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*, en montrant que les anticorps anti-idiotypiques humains inhibent l'infectivité de *P. carinii* chez le rat nude et que leur effet inhibiteur n'est plus observé lorsque les anticorps anti-idiotypiques humains sont pré-incubés avec le mAbKT4 (Seguy *et al.*, 1997a).

8. Production d'anticorps anti-idiotypiques simple chaîne mimant l'activité de la toxine killer

D'autres stratégies ont été mises au point pour s'affranchir des problèmes liés à la production d'anticorps monoclonaux par la technologie de l'hybridome. Parmi elles, celle permettant l'expression d'un fragment d'anticorps fusionné avec une protéine de surface d'un bactériophage filamenteux a largement fait ses preuves (« phage display ») (McCafferty *et al.*, 1990; Clackson *et al.*, 1991). Cette technique a ouvert la possibilité de produire des anticorps anti-idiotypiques simple chaîne (ScFv) mimant l'activité de la toxine killer.

Pour y parvenir, Magliani *et al.* ont isolé des cellules spléniques provenant de souris immunisées avec le mAbKT4 et en ont extrait l'ARN messager (ARNm). L'ADN complémentaire (ADNc) issu de cet ARNm a ensuite été cloné en fusion avec le gène codant pour la protéine III de l'enveloppe d'un phagémide. Les anticorps ScFv exprimés à la surface des bactériophages ont ensuite été sélectionnés pour leur effet fongicide vis-à-vis de *C. albicans*, puis pour leur immunoréactivité avec le mAbKT4 (Magliani *et al.*, 1997a). Lors de cette sélection, l'un d'entre eux, H6 ScFv, s'est révélé particulièrement intéressant, puisqu'au même titre que les anticorps anti-idiotypiques mimant l'activité de la toxine, il montrait une

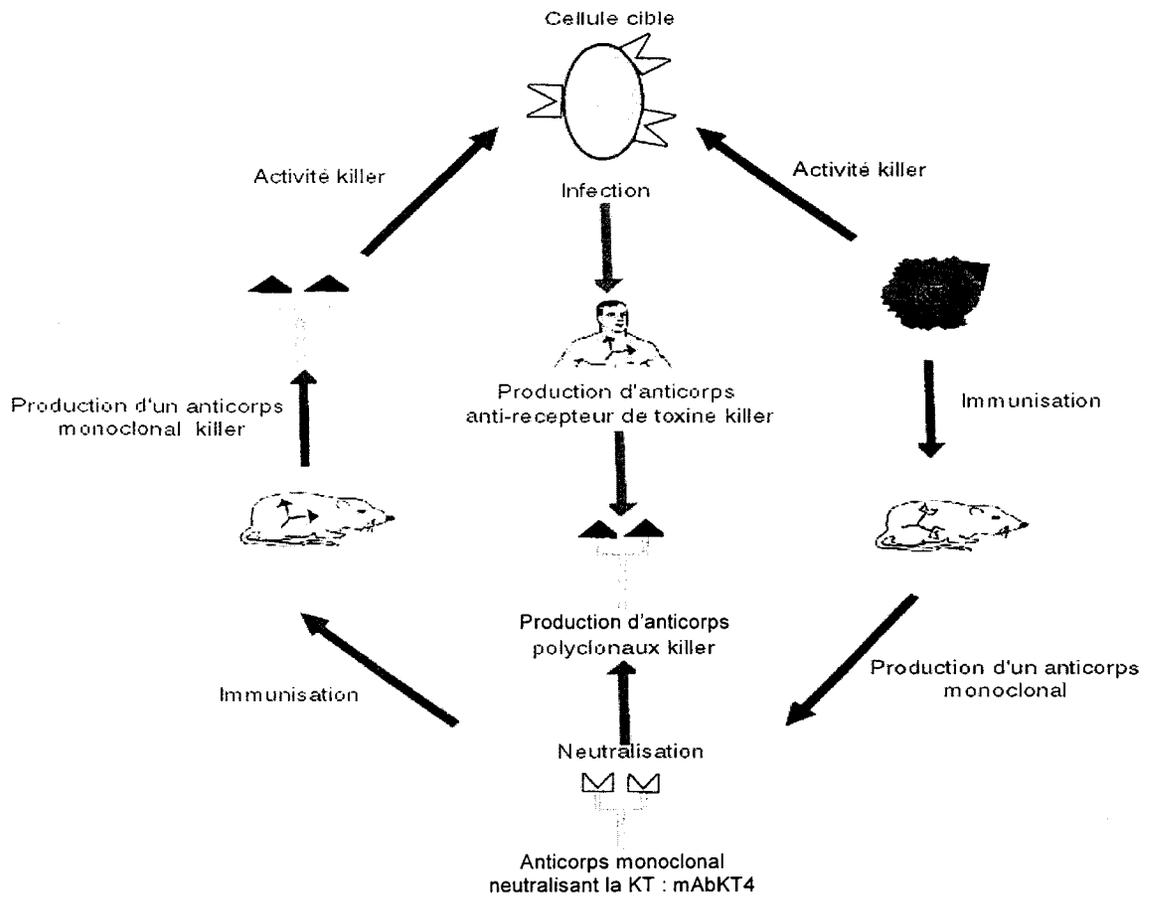


Figure 11 : Représentation schématique illustrant l'origine des anticorps anti-toxine killer (mAbKT4) et des anticorps mimant l'activité de la toxine killer.

forte réactivité pour les tubes germinatifs et les cellules de *C. albicans*. De plus, son immunoréactivité est inhibée par le mAbKT4, ce qui laisse penser que cette molécule recombinante reconnaît les « récepteurs » du mAbK10 (Magliani *et al.*, 1997a). Les tests de viabilité *in vitro* de *C. albicans* en présence de H6 ScFv ont révélé une mortalité des levures pathogènes de l'ordre de 90% et cet effet fongicide est inhibé par le mAbKT4 (figure 12).

Ces résultats obtenus *in vitro* ont encouragé les auteurs à tester les potentialités de H6 ScFv dans le traitement de candidoses vaginales expérimentales chez le rat. Une seule administration intra-vaginale de 10 µg de H6 ScFv a permis une diminution de l'ordre de 2 logarithmes du nombre de *C. albicans* présents dans la cavité vaginale. Ces résultats montrent que H6 ScFv confère aux animaux une protection vis-à-vis de l'infection lors de leur co-administration avec une souche virulente de *C. albicans*. Dans une autre expérience, l'administration de la même quantité de H6 ScFv, 1, 3 et 5 jours après une infection expérimentale avec *C. albicans*, a permis une rémission rapide et significative des animaux traités (Magliani *et al.*, 1997a), résultats qui ont renforcé l'évidence des potentialités thérapeutiques du H6 ScFv.

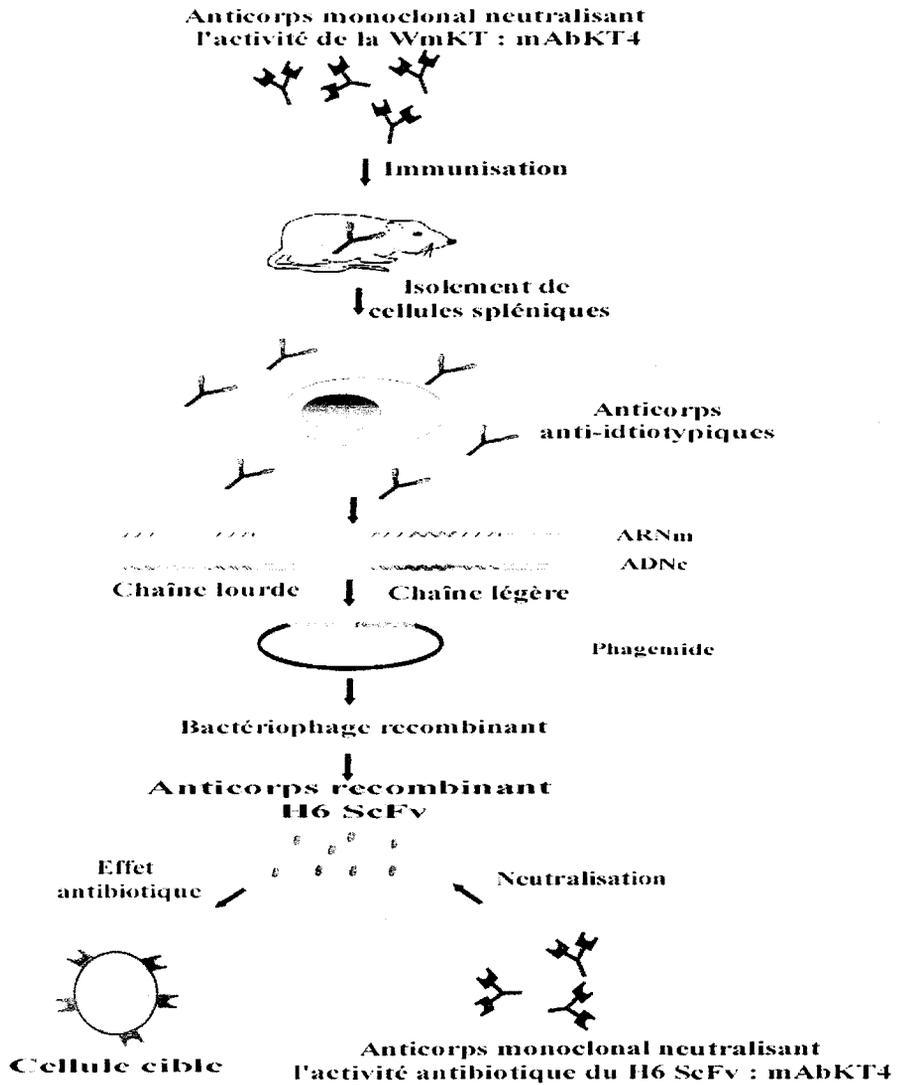


Figure 12 : Représentation schématique de la stratégie employée pour la production des anticorps simple chaîne mimant l'activité de la WmKT (H6 ScFv)

Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* contre une souche multi-résistante de *M. tuberculosis* (Conti *et al.*, 1998a). Au cours de ces expériences, des cellules de *M. tuberculosis* ont été incubées avec 10 µg de H6 ScFv durant 72 heures, puis la croissance bactérienne a été suivie durant 19 jours. Dans ces conditions, les anticorps recombinants ont montré un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. De plus, comme dans le cas du mAbK10, les auteurs ont mis en évidence par immunofluorescence que H6 ScFv se fixe sur la paroi des bactéries pathogènes et que cette fixation est inhibée par le mAbKT4. Par ailleurs, Conti *et al.* ont montré qu'il existait une compétition de fixation entre la PaKT et H6 ScFv lors d'expériences d'immunofluorescence, ce qui laisse supposer que les deux molécules possèdent un « récepteur » commun.

Tableau VII : Effet antibiotique du mAbK10 et du H6-ScFv contre des bactéries Gram-positives présentant une résistance aux antibiotiques conventionnels (d'après Conti *et al.*, 2000)

Micro-organisme	% d'inhibition par le mAbK10	% d'inhibition par le H6-ScFv
<i>Enterococcus faecium</i> LS10	89	83
<i>E. faecalis</i> 2724	94	95
<i>Staphylococcus aureus</i> a38	89	62
<i>S. aureus</i> a3	86	nd
<i>S. aureus</i> a53	89	nd
<i>S. aureus</i> CVC4	82	nd
<i>S. aureus</i> LS1-R	89	nd
<i>S. haemolyticus</i> SH8	78	nd
<i>S. haemolyticus</i> 221-4	49	nd
<i>S. haemolyticus</i> 615	75	nd
<i>S. haemolyticus</i> 7086	80	nd
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 143	85	nd
<i>S. pneumoniae</i> 153	94	nd
<i>S. pneumoniae</i> 5353	89	89

[nd : non déterminé]

H6 ScFv et le mAbK10 sont également actifs contre des souches de bactéries Gram positives multi-résistantes aux antibiotiques conventionnels (Conti *et al.*, 2000). 100 µg de mAbK10 ou 10 µg de H6 ScFv sont suffisants pour tuer entre 50 et 95% des 2.10^3 bactéries engagées dans le test de viabilité (Tableau VII). Cette activité antibiotique est inhibée par le mAbKT4, ce qui suggère que le récepteur bactérien de ces molécules est commun à celui de la PaKT et de la WmKT.

En utilisant un vecteur plasmidique, H6 ScFv a été exprimé chez *Streptococcus gordonii* sous la forme d'une protéine de fusion avec la protéine de surface M6 de *Streptococcus pyogenes*. Les tests réalisés *in vitro* avec les souches de *S. gordonii* exprimant H6 ScFv en surface, ou au niveau cytoplasmique, ont montré un effet antibiotique très marqué contre *C. albicans* (Beninati *et al.*, 2000). *S. gordonii* est une bactérie commensale de la bouche qui est colonisatrice du vagin. L'expression de H6 ScFv n'altère pas son taux de persistance. *In vivo*, ces bactéries recombinantes constituent donc théoriquement un système d'administration continu de molécules thérapeutiques. Pour le vérifier, la souche de *S. gordonii* exprimant H6 ScFv a été administrée à des rats infectés expérimentalement par *C. albicans*. Dans le cas des animaux traités avec les souches recombinantes, une rémission rapide des candidoses vaginales a pu être observée. L'expression en surface de H6 ScFv s'est révélée particulièrement efficace puisque, dans ces conditions, l'anticorps recombinant a montré un effet thérapeutique aussi rapide que celui du fluconazole. L'activité antifongique de *S. gordonii* exprimant H6 ScFv est inhibée par le mAbKT4, ce qui suggère à nouveau que l'activité antibiotique détectée dans le cas de ces expérimentations est comparable à celles de la PaKT et de la WmKT.

Résultats

Chapitre I

Immuno-réactivité croisée

d'un anticorps monoclonal anti-toxine killer de *Pichia anomala* avec une toxine de *Williopsis saturnus* var. *mrakii*

Introduction

Les toxines killer sont des molécules antifongiques sécrétées par une large variété de levures (Young & Yagiu, 1978; Magliani *et al.*, 1997). Le genre *Hansenula* comporte le plus grand nombre de souches killer décrites à ce jour, ces souches appartiennent généralement aux espèces *mrakii* ou *anomala* (Kasahara *et al.*, 1994a; Suzuki & Nikkuni, 1994; Lowes *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2000). Récemment, les espèces de *Hansenula* ont été classées en deux genres différents *Williopsis* et *Pichia* (Kurtzman & Fell, 1998). Ces deux genres, très proches l'un de l'autre, sont différenciés par la forme de leurs ascospores et leur capacité à assimiler ou non le nitrate comme seule source d'azote.

Parmi ces espèces, une souche de *P. anomala* ATCC 96603 a été sélectionnée en raison du large spectre d'activité de sa toxine (PaKT) contre des micro-organismes fongiques et bactériens. L'activité de cette toxine est spécifiquement neutralisée par le mAbKT4, un anticorps monoclonal de souris anti-PaKT (Polonelli & Morace, 1987). Cet anticorps est également capable d'inhiber l'activité d'une autre toxine (WmKT) produite par une souche de levure initialement identifiée comme *P. anomala* K36 (Cailliez *et al.*, 1992; Cailliez *et al.*, 1994a). Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la toxine produite par cette souche. En effet, cette seconde souche de levure présente l'intérêt d'être surproductrice d'une toxine, la WmKT, (L. Polonelli, communication personnelle) dont le spectre d'activité est comparable à celui de PaKT (Aliouat *et al.*, 1993; Seguy, 1996; Polonelli *et al.*, 1997).

Une modification de la classification taxonomique des souches appartenant au genre *Hansenula* ayant été récemment proposée, nous avons réalisé un travail d'identification de la souche *P. anomala* K36. Nous avons ainsi montré que la souche *P. anomala* K36 est en fait une souche de *Williopsis saturnus* var. *mrakii*. Cette souche est maintenant conservée à la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve, Belgique, sous la référence MUCL 41968. Au cours du même travail, une analyse comparée de *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 et de *P. anomala* ATCC 96603 par immunomarquage, a permis de montrer que les toxines PaKT et la WmKT sont toutes les deux reconnues par le mAbKT4. Pour chacune des souches, une toxine killer est sécrétée à travers la paroi fongique avant de se

retrouver dans les surnageants de culture. L'analyse par Western blot de ces surnageants concentrés a révélé que les toxines la PaKT et la WmKT diffèrent par leur masse moléculaire.

Ces résultats sont présentés dans l'article intitulé « **Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* killer toxin** » C. Guyard, P. Evrard, AM. Corbisier-Colson, H. Louvart, E. Dei-Cas, F. D. Menozzi, L. Polonelli & JC. Cailliez. **Medical Mycology** 2001, 39, 395-400.

Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* killer toxin.

C. GUYARD^{*}, P. EVRARD[†], AM. CORBISIER-COLSON[†], H. LOUVART^{*},
E. DEI-CAS^{*‡}, F. D. MENOZZI[¥], L. POLONELLI[¶] & JC. CAILLIEZ^{*.§}

** Département de Microbiologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, France; † Mycothèque (BCCM/MUCL), Unité de Microbiologie, Faculté des Sciences Agronomiques, UCL, Belgium; ‡ Université de Lille-2, Centre Hospitalier et Faculté de Médecine, Lille, France; ¥ INSERM U447, Institut Pasteur de Lille, France; ¶ Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Parma, Italy; § Laboratoire Environnement et Santé, Faculté Libre des Sciences et Faculté Libre de Médecine, Université Catholique de Lille, France*

Correspondence: Dr. Jean-Charles Cailliez, Département de Microbiologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France.

Tel: +33.3.20.87.71.57 - Fax : +33.3.20.87.79.08 - E-mail: jean-charles.cailliez@pasteur-lille.fr

Summary

A monoclonal antibody (mAbKT4), produced against the *Pichia anomala* ATCC 96603 killer toxin (*PaKT*) was used to detect the toxin (*WmKT*) produced by *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 which inhibits the growth of a *PaKT*-sensitive *P. anomala* strain MUCL 41969. Immunofluorescence studies revealed that mAbKT4 specifically labels the surface of *P. anomala* and *W. saturnus* var. *mrakii*, suggesting that both taxa secrete a killer toxin bearing a common epitope. Immunoblot analyses of concentrated supernatants from *P. anomala* and *W. saturnus* var. *mrakii* cultures showed that in both taxa mAbKT4 reacts with high molecular weight secreted proteins ranging from 85 kDa to 200 kDa. However, immunoblot experiments showed that the molecular weights of *PaKT* and *WmKT* are quite different, indicating that the two toxins are related but not identical molecules.

Keywords: killer toxin, *Williopsis saturnus* var. *mrakii*, *Pichia anomala*, antifungal agent

Introduction

Yeast killer toxins are antifungal molecules secreted by a large variety of yeast killer strains [1, 2]. The most frequently encountered killer strains belong to the genera *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* and *Hansenula*. *Hansenula* species are now classified in the genera *Williopsis* or *Pichia* [3]. *Hansenula* and *Pichia* were first distinguished on the basis of difference in their ability to assimilate nitrate as a sole source of nitrogen. The genus *Williopsis* was mainly characterized by its saturn-shaped ascospores [4]. Further studies demonstrated that *Williopsis* and *Pichia* are polyphyletic.

Based on comparative analysis of 18S rRNA gene, it is apparent that the genus *Williopsis* should be restricted to the type species *W. saturnus* including the varieties *saturnus*, *mrakii*, *sargentensis*, *suaveolens* and *subsufficiens* [5]. These five varieties have identical 18S rRNA gene sequences and form a taxonomic group distinct from *Pichia* species. Among varieties of *W. saturnus*, structural similarities have been shown between the killer toxins already characterized, especially in *W. saturnus* var. *mrakii* and *W. saturnus* var. *saturnus* [6]. However, no relationships were found between these killer toxins and those secreted by killer strains of *Williopsis beijerinckii* and *W. californica*. In *W. saturnus* var. *mrakii*, killer toxins have been described that show different molecular weights and physiological features. The *W. saturnus* var. *mrakii* killer strain 500 (NCYC, National Collection of Yeast Culture, Norwich, UK) has been found to produce a killer toxin (K-500) of 1.8 – 5.0 kDa. K-500 displays an extensive anti-*Candida* activity above 30°C and at pH 4.0 [7]. Another *W. saturnus* var. *mrakii* strain named Institute For Fermentation (IFO, Osaka, Japan) 0895 formerly named LKB 169, secretes a proteinaceous toxin called HM-1 of 10.7 kDa which is active between pH 2.0 and pH 11.0 [8]. Finally, a *W. saturnus* var. *saturnus* killer strain (IFO 0117) produces a toxin (called HSK, formerly HYI) of 8.5 kDa, which is active at pH 5.8 [6].

In the genus *Pichia*, which consists of nearly 100 species [9], genomic studies on killer yeasts have been made using restriction fragment length polymorphism and Southern blot hybridization [10]. As described in *Williopsis* species, *Pichia anomala* variants produce strain-specific killer toxins. An halotolerant strain (called KK1) of *Pichia farinosa* produces a salt-mediated killer toxin (SMK) of 14.2 kDa showing a maximum of killer activity in the presence of 2M NaCl [11]. *Pichia kluyveri* produces a 19 kDa killer toxin with a potent antimicrobial activity between pH 2.5 and pH 5.0 [12]. A killer toxin (*PaKT*) has been studied in the *P. anomala* American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va, USA) 96603 killer strain (formerly named UP25F) by using a *PaKT*-neutralizing monoclonal

antibody [13]. PaKT was proven to be active against a wide spectrum of yeast isolates belonging to *Candida albicans*, *P. anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*, and was also effective against *Pneumocystis carinii*, an atypical fungal microorganism [14].

Recently, a yeast killer strain (Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (MUCL, Louvain, Belgium) 41968) formerly designated K36 [15-17], first considered to be a *P. anomala* strain, has been shown to be a *W. saturnus* var. *mrakii* strain as demonstrated by its formation of saturn-shaped rather than hat-shaped ascospores in a sporulation medium. Since the toxin produced by this killer strain is also active against *C. albicans*, *P. anomala*, *S. cerevisiae* and *P. carinii*, we investigated the killer activity of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 toxin (WmKT) using the PaKT-neutralizing monoclonal antibody (mAbKT4). The results presented in this study indicate that the killer toxins produced by *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL and *P. anomala* ATCC 96603 are related but not identical.

Materials and methods

Yeast identification and characterization

Strains were characterized according to the Belgium Coordinated Collection of Microorganisms (BCCM/MUCL, Louvain; Belgium) automated identification system employing both physiological criteria and morphological features [18]. For morphological characterization, the strain were grown on YPDA (Yeast 2 %, Peptone 1 %, Dextrose 0.5 %, Agar 3 %) plate. Germ tube formation was obtained with Dalmau's technique [19] by seeding the strains on PDA (Potato 20 % Dextrose 2 % Agar 2 %) medium. To induce sporulation, strains were seeded on McClary's acetate agar medium [20]. Results were computed using the ALLEV identification software [18].

Killer toxin production

As a preculture, *P. anomala* ATCC 96603 and *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968, were cultured at 26°C for 48 h at 70 rpm in 100 ml of Sabouraud broth (Tryptone 5 %, Meat Peptone 5 %, Dextrose 20 %) and buffered at pH 4.6 with 0.1 M citric acid and 0.2 M sodium phosphate. For production of killer toxin, a 250 ml flask containing 90 ml of Sabouraud broth was seeded with 10 ml of this preculture and incubated at 26°C for 72 h at 70 rpm.

Killer toxin activity assay

The *P. anomala* ATCC 96603 or *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer cells were harvested by centrifugation at 4500 x g for 10 min. The supernatants containing the secreted *PaKT* or *WmKT* were filtered through a 0.45 µm filter (Millipore S.A, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and concentrated 50-fold by using an ultrafiltration cell under N₂ pressure with a 10 kDa cut-off YM-10 membrane (Millipore S.A.). Aliquots (50µl) of each concentrated supernatant were mixed into 200 µl liquid Sabouraud broth containing 5·10⁴ cells of a killer toxin sensitive *P. anomala* strain, MUCL 41969, seeded into wells of 96-well microtiter plates (Costar, Brumath, France). The plates were incubated at 26°C for 18-20h. Following incubation, the optical density at 630 nm was measured using an automatic plate recorder (Bio-tek Instruments, Inc, Winooski, USA). Killer toxin activities were measured by observation of a reduction in growth of the sensitive strain compared to a toxin-free microculture control.

Immunofluorescence assay

A monoclonal *P. anomala* killer toxin-neutralizing antibody (mAbKT4) was used in immunofluorescence assays (IFA) to localize the secretion sites of PaKT and WmKT on the surface of the yeast killer producing cells [13]. The *P. anomala* ATCC 96603 and *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 yeast cell suspensions were centrifuged (10000 g for 4 min) and pellets were resuspended in sterile distilled water. The resulting suspensions were adjusted to a final concentration of approximately $5 \cdot 10^3$ cells/ μ l. Twenty microliters of each standardized yeast cells suspension were put into the wells of an IFA slide and left to dry and fix for 45 min at 50°C. Twenty five microliters of mAbKT4 diluted 1/200 in phosphate buffer saline (PBS) were added to each well for 35 min at 37°C in a humid chamber. The slides were then washed three times with PBS (10 min each) and 25 μ l of fluorescein isothiocyanate (FITC)-goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) diluted 1:50 were allowed to react 1.5 h at 37°C in a humid chamber. The slides were then washed three times in PBS (10 min each) and mounted with a coverslide with mounting (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The slides were then observed using epifluorescence microscopy (Axiophot 2, Zeiss S.A., Le Pecq, France). As negative controls, the IFA were carried out using PBS in place of mAbKT4 and cells were stained using Evans Blue 1 % (Argene Biosoft, Varilhes, France) diluted 1/10000 in PBS.

SDS-PAGE and immunoblotting

The 50-fold concentrated supernatants prepared as described above were subjected to sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a 4-15 % linear acrylamide gel [21]. After SDS-PAGE proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad S.A., Ivry-sur-Seine, France) as described by Towbin *et al* [22]. Killer toxin proteins were then detected with the mAbKT4. Immune complexes were revealed with alkaline phosphatase-linked goat anti-mouse IgG (Roche Diagnostics S.A., Meylan, France).

Results

Yeasts identification and characterization

At the morphological level, both *P. anomala* 96603 and *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 appeared on YPD plates as cream colored colonies with a mat surface, soft texture, convex shape, furrowed surface and entire margin. The vegetative cells were spherical to ovoid for the two strains but occasionally ellipsoid cells could be observed for *P. anomala* 96603 strain. Both strains developed a pseudomycelium on Dalmau plate. Nevertheless, *P. anomala* 96603 and *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 grown on McClary's acetate agar were distinguished by their ascospores, which were hat-shaped and saturniform, respectively. In the two strains, the ascospores measuring 2-3 x 1.5-2 µm were formed 2-4 per ascus and had smooth, thin walls. They were liberated soon after formation. Despite similarities in vitamin requirements, the isolates showed some different carbon fermentation and assimilation features (Table 1).

The morphological and physiological features of the two isolates were compared to the BCCM database. The computer-assisted system developed for the identification of yeast at MUCL showed that *P. anomala* ATCC 96603 displayed a 100 % similarity with reference strain *P. anomala* MUCL 28639. For the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 a 97.8 % similarity was observed with reference strain *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 31950.

Killer toxin assay

When *P. anomala* MUCL 41969 were incubated with either of the killer toxins, a cytocidal effect was observed, suggesting that PaKT and WmKT strongly inhibited the growth of susceptible strain by reducing the number of viable cells present. These observations confirmed our previous results which showed that these killer toxins were active against *P. anomala* MUCL 41969 yeast cells and could be completely neutralized by using the mAbKT4 [13-15]. The killer activity of both toxins was more effective when culture were in the exponential phase of growth, suggesting an effect on cellular reproduction.

Killer toxin immunodetection

As shown in Figure 1, the binding of mAbKT4 at the surface of the yeast killer cells suggested an accumulation of the toxin in the cell wall during the secretion process. This trend was clear even though the labeling density varied from cell to cell. In our study, IFA didn't show any differences in mAbKT4 fixation at the surface of the *P. anomala* or *W. saturnus* var. *mrakii* killer strains, suggesting the presence of a common epitope shared by *WmKT* and *PaKT* as well as a comparable expression.

Immunoblotting experiments performed on concentrated culture supernatants of *P. anomala* and *W. saturnus* var. *mrakii* killer strains showed that mAbKT4 reacts with high-molecular weight proteins present in both samples (Fig.2). In accordance with a previous study [13], the mAbKT4 reacted with a *P. anomala* secreted protein displaying an apparent molecular weight of 115 kDa. However in the *W. saturnus* var. *mrakii* supernatant, mAbKT4 reacted with two proteins exhibiting apparent molecular weights of 85 kDa and 200 kDa.

Discussion

The monoclonal antibody MabKT4 has been shown to specifically neutralize the activity of a killer toxin produced by *Pichia anomala* ATCC 96603 [13]. In this study, the previously described killer strain *P. anomala* K36 [15-17] here reidentified as *W. saturnus* var. *mrakii* and accessioned as MUCL 41968, was shown to produce a similar toxin recognized in immunofluorescence studies by the mAbKT4. Immunoblotting experiments showed that the antigenic determinants produced by *Pichia anomala* ATCC 96603 and *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 had higher molecular weights than killer toxins secreted other *Pichia* or *Williopsis* isolates. Nevertheless, the toxins produced by the two yeast isolates exhibited different molecular weights. Although these results show that PaKT is not produced by *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968, its toxin was also recognized and neutralized by mAbKT4 as PaKT is. Furthermore, its antibiotic properties were also close to those of PaKT since it is also active against *C. albicans*, *P. anomala*, *S. cerevisiae* and *P. carinii* [23].

Further molecular characterization of PaKT and WmKT should confirm if they are structurally related, as it has been reported for killer toxins produced by various strains of the *Williopsis saturnus* complex. For instance, peptidic homology of 87 % was reported between killer toxins HM-1 and HYI produced by *W. saturnus* var. *mrakii* and *W. saturnus* var. *saturnus* [24]. Also, Southern blot analyses using gene fragments of *HMK* and *HSK* showed cross-hybridization with genomic DNA fragments of *W. saturnus* var. *mrakii*, *W. saturnus* var. *saturnus* and *W. saturnus* var. *subsufficiens*. These results suggested that these killer strains have sequences homologous to *HMK* and *HSK*, even if their toxins are not identical to each other [6].

The results of this study show that PaKT and WmKT share an epitope that may be involved in their antifungal properties as demonstrated by the killer activity of anti-idiotypic monoclonal antibodies directed against mAbKT4 [25, 26]. Actually, KT-anti-idiotypic

antibodies were produced by immunization against the variable domain (idiotype) of mAbKT4, and surprisingly, they were also isolated from vaginal fluid of patients with recurrent vaginal candidosis [27]. Moreover, these different anti-idiotypic molecules mimic the mAbKT4-sensitive anti-microbial activity of PaKT. The fact that WmKT is also recognized and neutralized by this antibody, suggested that the common epitope is involved in the toxic activity. Further analyses of WmKT and PaKT molecules should reveal the relationships between their structures and lead us to understand their evolutionary and functional relations.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. O. Legeay from the Lille Pasteur Institute for fruitful discussion and criticism. CG is supported by a Ph.D. grant from the Région Nord Pas-de-Calais (France) and the Institut Pasteur de Lille (France). BCCM/MUCL (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Mycothèque de L'UCL) is supported by the contract C2/10/007 of the prime Minister's services, Scientific, Technical and Cultural Affairs (SSTC).

References

1. Guyard C, Magliani W, Polonelli L, Cailliez JC. Les toxines killer de levure. *J Mycol Méd* 2000; **9**: 9-20.
2. Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10**: 369-400.
3. Barnett J, Payne R, Yarrow D (eds). *Yeasts, Characteristics and Identification*, 2nd Edition, Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
4. Kurtzman C, Fell J. Descriptions of teleomorphic ascomycetous genera and species . in: Kurtzman C, Fell J(eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th Edition. Amsterdam: Elsevier Science, 1998: 350-352.
5. James S, Roberts I, Collins M. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Williopsis* as revealed by 18S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1998; **48**: 591-596.
6. Kimura T, Kitamoto N, Ohta Y, Kito Y, Iimura Y. Structural relationships among killer toxins secreted from the killer strains of the genus *Williopsis*. *J Ferment Bioengin* 1995; **80**: 85-87.
7. Hodgson V, Button D, Walker G. Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology* 1995; **141**: 2003-2012.
8. Ashida S, Kitano K, Hara S. New killer toxin of *Hansenula mraki*. *Agric Biol Chem* 1983; **47**: 2953-29955.
9. Kurtzman CP. Four new yeasts in the *Pichia anomala* clade. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; **50**: 395-404.
10. Morace G, Cattani P, Manzara S, *et al.* Genomic studies on killer yeasts belonging to the genus *Pichia*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1992; **62**: 215-223.
11. Suzuki C, Nikkuni S. The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *J Biol Chem* 1994; **269**: 3041-3046.
12. Middelbeek EJ, Hermans JM, Stumm C. Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek* 1979; **45**: 437-450.
13. Polonelli L, Morace G. Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1987; **25**: 460-462.
14. Cailliez J, Seguy N, Aliouat E, *et al.* The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Med Hypotheses* 1994; **43**: 167-171.

15. Cailliez J, Cantelli C, Seguy N, *et al.* Killer toxin secretion through the cell wall of the yeast *Pichia anomala*. *Mycopathologia* 1994; **126**: 173-177.
16. Cailliez J, Cantelli C, Conti S, *et al.* *Pichia anomala* killer toxin secretion in presence of tunicamycin. *J Med Vet Mycol* 1993; **31**: 337-342.
17. Cailliez J, Gerloni M, Morace G, *et al.* Ultrastructural immunodetection of a *Pichia anomala* killer toxin: a preliminary study. *Biol Cell* 1992; **75**: 19-23.
18. Robert V, Evrard P, Hennebert GL. BCCM-TM/Allev 2.00 an automated system for the identification of yeasts. *Mycotaxon* 1997; **64**: 455-464.
19. Kreger-van R (ed). *The Yeast, a Taxonomic study*, 3rd edn. Amsterdam: Elsevier Science, 1984.
20. McClary DO, Nulty WL, Miller GR. Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.* 1959; **78**: 362-368.
21. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
22. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci US A* 1979; **76**: 4350-4354.
23. Polonelli L, Morace G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol* 1986; **24**: 866-869.
24. Komiyama T, Ohta T, Furuichi Y, Ohta Y, Tsukada Y. Structure and activity of HYI killer toxin from *Hansenula saturnus*. *Biol Pharm Bull* 1995; **18**: 1057-1059.
25. Magliani W, Conti S, de Bernardis F, *et al.* Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nat Biotechnol* 1997; **15**: 155-158.
26. Seguy N, Polonelli L, Dei-Cas E, Cailliez JC. Monoclonal killer toxin-like antiidiotypic antibodies to control rat-pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol* 1997; **44**: 37S.
27. Seguy N, Polonelli L, Dei-Cas E, Cailliez JC. Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; **22**: 145-149.

TABLE

Table. 1: *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 and *P. anomala* ATCC 96603 growth factor and assimilation/fermentation tests as seen in microplates.

	<i>W. mrakii</i> MUCL41968	<i>P. anomala</i> MUCL41969		<i>W. mrakii</i> MUCL41968	<i>P. anomala</i> MUCL41969		<i>W. mrakii</i> MUCL41968	<i>P. anomala</i> MUCL41969
Fermentation			Fermentation			Fermentation		
D-glucose	+	+	α,α -threulose	-	-	Raffinose	-	+
D-galactose	-	+	Melibiose	-	-	Inulin	-	-
Maltose	-	+	Lactose	-	-	Soluble starch	-	-
Methyl α -D-glucosidase	-	-	Cellobiose	-	+	D-Xylose	-	-
sucrose	-	+	Melezitose	-	-			
Carbon assimilation			Carbon assimilation			Carbon assimilation		
D-glucose	+	+	Arbutin	+	+	Myo-inositol	-	-
D-galactose	-	+	Melibiose	-	-	D-glucono-1,5-lactone	+	+
L-sorbose	-	-	Lactose	-	-	2-keto-gluconate	-	-
D-glucosamine	-	-	Raffinose	-	-	5-keto-gluconate	-	-
D-ribose	-	-	Melezitose	-	+	D-gluconate	+	+
D-xylose	+	-	Inulin	-	-	D-glucuronate	-	-
L-arabinose	-	-	Soluble starch	?	?	D-galacturonate	-	w
D-arabinose	-	-	Glycerol	+	+	DL-lactate	+	+
L-rhamnose	w	-	Erythritol	-	+	Succinate	+	+
Sucrose	w	+	Ribitol	-	w	Citrate	w	+
Maltose	-	+	Xylitol	-	-	Methanol	w	-
α,α -threulose	-	w	L-arabinitol	-	-	Ethanol	+	+
Methyl α -D-glucoside	-	+	D-glucitol	-	+	Propane 1,2 diol	+	+
Cellobiose	+	-	D-mannitol	-	+	Butane 2,3 diol	w	+
Salicin	+	+	Galactitol	-	-			
Nitrogen assimilation			Nitrogen assimilation			Nitrogen assimilation		
Nitrate	+	+	L-lysine	+	+	Creatinine	-	-
Nitrite	+	+	Cadaverine	+	+	Glucosamine	-	-
Ethylamine	+	+	Creatine	-	-	Imidazole	-	-
Vitamins assimilation			Vitamins assimilation			Vitamins assimilation		
W/o Vitamins	+	w	w/o Thiamin	+	+	w/o Niacin	+	+
w/o Myo-inositol	+	+	w/o Biotin and thiamin	+	+	w/o P-aminobenzoic acid	+	+
w/o Ca panthotenate	+	+	w/o Pyridoxin	+	+			
w/o Biotin	+	+	w/o Pyridoxin and thiamin	+	+			

Meaning of codes: negative: -, positive: +, unknown:?, weak: w, without: w/o



FIGURES

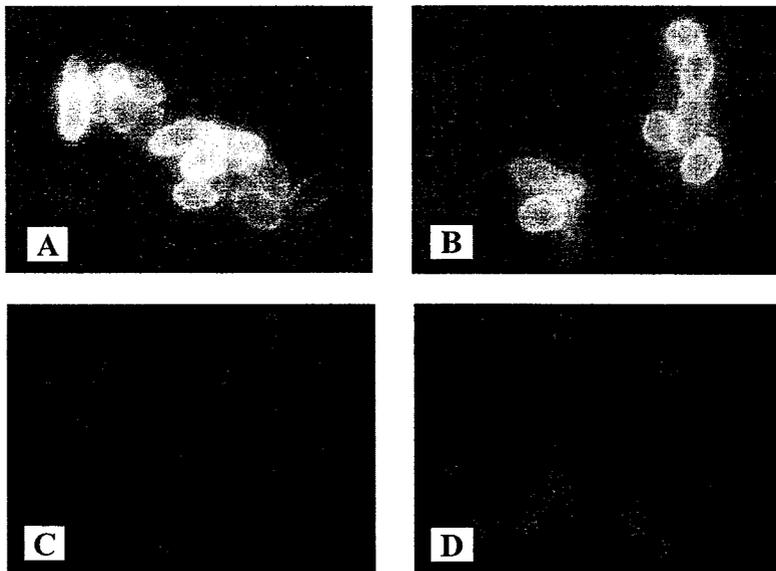


Fig. 1: Immunofluorescence assays (IFA): *P. anomala* (ATCC 96603) (A) and *W. saturnus* var. *mrakii* (MUCL 41968) (B) labeled with the anti-*P. anomala* killer toxin-neutralizing monoclonal antibody mAbKT4. Killer cells were characterized by a punctuate labeling pattern with concentrated label in defined areas. Similar patterns were observed on the outer surfaces of killer *P. anomala* and *W. saturnus* var. *mrakii* cells. As negative controls, the IFA were carried out on *P. anomala* (ATCC 96603) (C) and *W. saturnus* var. *mrakii* (MUCL 41968) (D) using phosphate-buffered saline (PBS) in place of mAbKT4. Cells were stained with Evans Blue 1 % diluted 1/10000 in PBS (x 1500).

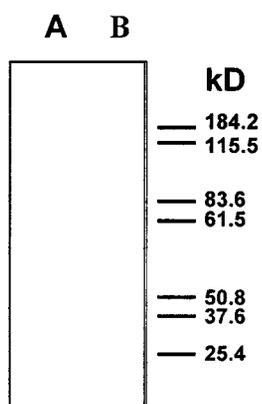


Fig. 2: Western blot analysis using mAbKT4 to probe 50X-concentrated culture supernatant of *P. anomala* ATCC 96603 (A) and *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 (B). Molecular weights expressed in kDa are shown in the right margin.

Chapitre II

**Etude de la nature du déterminant génétique,
détermination des conditions de pH optimales pour son
activité et purification préparative de la WmKT.**

1. Etude de la nature du déterminant génétique de la WmKT

1.1. Introduction

A ce jour, les toxines killer décrites dans la littérature et produites par le genre *Williopsis* sont toutes codées par un gène nucléaire (Kimura *et al.*, 1993). Des travaux préliminaires, réalisés en collaboration avec le Dr. Gunge (Kumamoto Institute of Technology, Japan) ont suggéré que la WmKT est également codée par un gène nucléaire (L. Polonelli, communication personnelle). Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons adopté deux stratégies complémentaires. Pour contrôler la présence éventuelle de plasmides, nous avons analysé l'ADN et l'ARN de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 par détection au bromure d'éthidium après électrophorèse en gel d'agarose. Des expériences de curage de plasmides ont été réalisées par irradiation aux rayons ultra-violet (UV). Les colonies survivant à ce traitement ont ensuite été testées pour leur caractère killer vis-à-vis de la souche sensible *P. anomala* MUCL 41969.

1.2. Matériels et méthodes

1.2.1. Extraction d'ADN plasmidique. Les extractions d'ADN plasmidique de levure ont été réalisées selon une méthode adaptée de Hoffman et Winston (Hoffman & Winston, 1987). Brièvement, 10ml d'une culture de la nuit à 26°C de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 ou de la souche *P. anomala* MUCL 41969 sont centrifugés durant 5min à 3000 X g à température ambiante. Les cellules sont ensuite reprises dans 200µl d'un tampon Tris-HCl 10mM (pH 8), Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Na₂ EDTA 1mM. Un volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et 0,3g de billes de verre (Sigma-aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) sont ajoutés à la suspension cellulaire qui est alors vortexée durant 5min puis centrifugée à 10000 X g durant 10min. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est alors précipité à l'éthanol 100% et lavé une fois avec de l'éthanol 70%. Le culot est repris dans 400µl d'un tampon Tris 10mM, EDTA 1mM (pH 7,4) puis traité à la RNase A (75µg/ml) (Roche, Mannheim, Germany) durant 5min à 37°C. Après une précipitation à l'éthanol et un lavage supplémentaire, l'ADN est analysé par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

1.2.2. Extraction d'ARN plasmidique. Les ARN ont été sélectivement purifiés en utilisant la méthode du phénol acide (Ausubel *et al.*, 1994). Brièvement, 10ml d'une culture en milieu de phase exponentielle de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 ou de *P. anomala* MUCL 41969 sont centrifugés durant 5min à 3000 X g à température ambiante. Après un lavage dans 1 ml d'eau stérile à 4°C, les cellules sont resuspendues dans 400 µl d'un tampon Tris 10 mM, Na₂ EDTA, 0.2% SDS (pH 7.4) et 400 µl de phénol acide. La suspension cellulaire est incubée durant 60 min à 65°C puis centrifugée à 10000 X g. La phase aqueuse est alors précipitée à l'éthanol et reprise dans 50 µl de Tris 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7.4). Dix microlitres de cette solution d'ARN sont alors analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

1.2.3. Curage de plasmides. La souche killer *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 est ensemencée sur un milieu Sabouraud gélosé (Tryptone 5 %, Meat Peptone 5 %, Dextrose 20 %) à une densité de 10⁵ cellules/boîte de Petri. Ces cellules sont ensuite exposées à une irradiation UV (254 nm) à la dose de 20000 µJ/cm² durant 9s en utilisant un Stratalinker UV Crosslinker 1800 (Stratagene, La Jolla, USA). Les cultures irradiées sont incubées durant 4 jours à 26°C dans l'obscurité pour éviter la photoréactivation du système de réparation de l'ADN. Les colonies survivantes sont repiquées sur un milieu Sabouraud et testées pour leur caractère killer en utilisant un test d'activité en milieu liquide (Material and methods, J. Euk Micro., Guyard *et al.*, 1999).

1.3. Résultats

Afin de détecter la présence d'éventuels plasmides à ADN, nous avons réalisé une analyse électrophorétique comparée de l'ADN de la souche killer *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 et d'une souche sensible à la WmKT *P. anomala* MUCL 41969. L'ADN provenant de chacune des levures a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose à 1%. Après marquage au bromure d'éthidium et exposition aux UV (254 nm), aucun plasmide à ADN n'a été détecté chez ces deux souches.

Certaines toxines killer de levure étant codées par des plasmides à ARN double brin, nous avons recherché la présence de tels plasmides chez *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. Les éventuels plasmides à ARN de la souche killer et ceux de la souche *P. anomala* MUCL 41969 ont été extraits par la méthode au phénol acide. Les produits d'extraction ont ensuite

été analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1%. Dans ces conditions expérimentales, nous n'avons détecté aucun plasmide à ARN susceptible de coder pour la WmKT.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences de curage de plasmides par irradiation aux UV. Le taux de survie des cellules traitées avec 20000 μ J/cm² a été d'environ 0.2%. Les 23 colonies survivantes à ce traitement ont été isolées sur milieu Sabouraud et testées pour leur caractère killer. Dans l'ensemble des cas, les cellules ont toutes conservé leur capacité à produire la WmKT, ce qui suggère que la production de toxine de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 n'est pas associée à un déterminant génique plasmidique.

2. Détermination des conditions de pH optimales pour l'activité de la WmKT

2.1. Introduction

Les toxines killer de levure sont actives dans des gammes de pH très variables. La toxine K1 de *S. cerevisiae* est totalement active dans une gamme de pH étroite allant de 4.5 à 4.6 (Kurzweilova & Sigler, 1993), alors que celle de *P. acaciae* est active dans une gamme de pH plus proche des conditions physiologiques allant de 7.0 à 7.5 (McCracken *et al.*, 1994). Cette diversité des conditions de pH nécessaires à l'activité des toxines killer se retrouve également au sein d'une même espèce puisque la toxine HM-1 de *W. mrakii* est active entre pH 2.0 et 12.0 (Komiya *et al.*, 1996) alors que celle de *W. mrakii* (K-500) n'est active qu'à pH inférieur à 4.0 (Hodgson *et al.*, 1995).

Des études préliminaires ont indiqué que l'activité optimale de la WmKT est obtenue dans une gamme de pH allant de 4.2 et 4.6 (Jackson, 1996). Pour confirmer ce résultat, nous avons soumis des surnageants de culture à des variations de pH. Ces surnageants de cultures ont ensuite été testés pour leur activité killer vis-à-vis de la souche *P. anomala* MUCL 41969.

2.2. Matériels et Méthodes

Modification des conditions de pH de la WmKT. Une culture à saturation de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 est diluée au 1/10 dans 50ml de milieu Sabouraud liquide tamponné à pH 4.6. Les cellules sont incubées à 26°C sous une agitation de 70 rpm. Après 18-20h de culture, le surnageant est récolté par centrifugation et passé sur filtre 0.45 μ m (Millipore S.A.,

Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Des aliquots de ce surnageant sont alors dilués au 1/10 dans un tampon citrate-phosphate équilibré à des valeurs de pH comprises entre 2.0 et 7.5. Afin de tenir compte de la modification du pH liée à l'ajout du surnageant, le pH est vérifié et ajusté le cas échéant. Les aliquots de surnageant de culture sont maintenus dans ces conditions de pH durant 1 heure à température ambiante, puis soumis à un test d'activité toxique en milieu liquide par microdilution selon le protocole décrit précédemment (Material and methods, J Eukaryot Microbiol., Guyard *et al*, 1999).

2.3 Résultats

Les valeurs d'activité antibiotique moyennes de la WmKT contre *P. anomala* MUCL 41969, après un maintien d'1h à différents pH sont indiquées dans la figure 1. Les expériences ont été réalisées trois fois pour chaque valeur de pH testée. Dans nos conditions expérimentales, la WmKT est active dans une gamme de pH de 2.0 à 4.0. Une diminution d'environ 10% de cette activité est observée à partir de pH 4.5. L'activité antibiotique de la WmKT décroît ensuite rapidement à partir de pH 4.75 pour disparaître au delà de pH 5.6. Ces résultats confirment nos données préliminaires suggérant que la WmKT est active en conditions acides et que son activité n'est plus observée dans des conditions de pH proches des conditions physiologiques. Néanmoins, ils démontrent que l'activité de la WmKT est optimale dans une gamme de pH allant de 2.0 à 4.5.

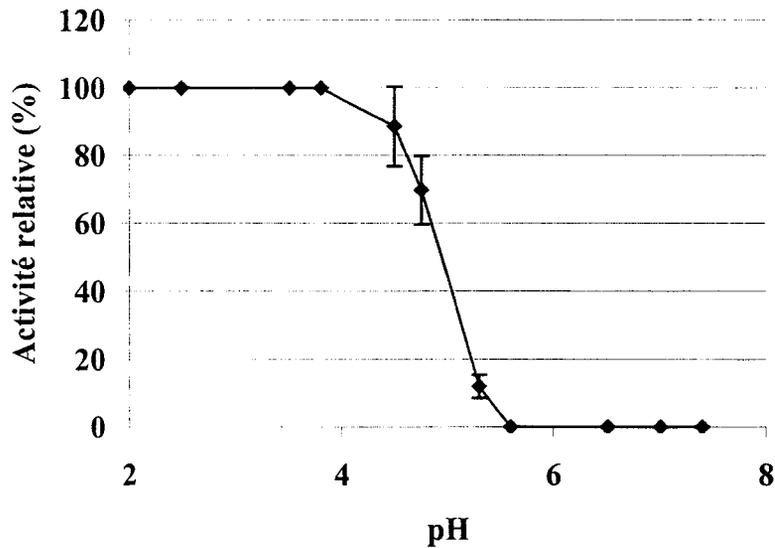


Figure 1 **Impact des variations de pH sur l'activité killer de la WmKT.** Le pH des surnageants de culture a été modifié dans une gamme allant de 2.0 à 7.5. Après un maintien dans ces différentes conditions de pH durant 1 heure, les activités toxiques de la WmKT vis-à-vis de *P. anomala* MUCL 41969 ont été mesurées. Les activités relatives indiquées dans cette figure sont des moyennes établies à partir de 3 expériences indépendantes pour chaque valeur de pH.

3. Purification préparative de la WmKT

Introduction

A ce stade de l'étude, nous souhaitons réaliser une analyse plus approfondie des caractéristiques biochimiques de la WmKT ; nous devons donc disposer de la toxine purifiée. Nous avons alors élaboré un protocole de purification à partir d'un surnageant de culture concentré de la souche de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. Ce protocole de purification est basé sur l'utilisation successive de deux techniques de chromatographie : une chromatographie de gel-filtration suivie d'une chromatographie d'échange d'ions.

Ce travail est présenté dans l'article « **First Steps in the Purification and Characterization of a *Pichia anomala* Killer Toxin** » J Eukaryot Microbiol. 1999 Sep-Oct ; 46(5):144 (dans ce manuscrit antérieur à la publication de notre étude taxonomique (Guyard *et al*, 2001), la WmKT est encore décrite sous le nom de la PaKT (*Pichia anomala* K36 killer toxin)). En complément de cette publication, les courbes d'absorbance (280 nm) des fractions recueillies après chromatographie de gel-filtration et d'échange d'ion sont respectivement présentées dans les figures 2A et 2B.

First Steps in the Purification and Characterization of a *Pichia anomala* Killer ToxinCYRIL GUYARD,^{1*} NATHALIE SÉGUY,¹ MARC LANGE,¹ ISABELLE RICARD,¹ LUCIANO POLONELLI,² JEAN-CHARLES CAILLIEZ^{1,3}¹Dept. Microbiol. Ecosystèmes, Inst. Pasteur de Lille, 1 rue Pr. Calmette, BP245, 59019 Lille, France, ²Inst. Microbiol., Univ. Parma, Italy, ³Fac. Libre Sciences, Univ. Catho. Lille, France.

A new therapeutic strategy directed against unrelated pathogenic microorganisms, such as *Pneumocystis carinii* and *Mycobacterium tuberculosis*, using recombinant stable variants of a *Pichia anomala* killer toxin, is being developed in our laboratory. This strategy is based on the yeast killer phenomenon. This phenomenon, first described in *Saccharomyces cerevisiae*, was defined as a lethal effect on susceptible yeast cells belonging to the same species [1]. Later on, complementary studies demonstrated that

at some killer toxins are active against eucaryotic and procaryotic microorganisms. Killer toxins differ from each other by properties such as the mechanism of toxicity, protein structure, genetic determinant or killer activity spectra. However, a common feature of killer strains is that they are resistant to the activity of their own toxin. This phenotype has been defined as *auto-immunity*. The activity spectrum of *Pichia anomala* K36 killer toxin (PKT) has been extensively investigated. These studies have demonstrated that the secreted PKT is active against a broad range of microorganisms including taxonomically unrelated pathogenic microorganisms, such as *P. carinii*, *C. albicans* and *M. tuberculosis* [3, 5]. This suggests that its antimicrobial activity could be exploited in a therapeutic strategy. However, little is known about the mode of action and the biochemical properties of the PKT. The optimal conditions for the activity of the PKT are a pH of 4.6 and a temperature of 26°C. The PKT is encoded by a nuclear gene but the structure of this gene still remains unknown. In this report, we describe the first steps in the purification of the PKT. The final aim of our study is to clone the PKT encoding gene in order to perform an extensive biochemical characterization of the protein.

MATERIALS AND METHODS

Culture. As a preculture, a colony of the killer yeast *Pichia anomala* K36 was cultured during 48 h at 26°C, 70 rpm into 100 ml of Yeast Minimal Medium (YMM), buffered at pH 4.6 with 0.1 M citric acid and 0.2 M sodium phosphate. Two flasks (2-liters volume) with 450 ml of YMM were seeded each with 50 ml of this preculture and incubated at 26°C for 15 h at 70 rpm.

Purification. The yeast cells were eliminated by centrifugation and the supernatant containing the PKT was filtered through a 0.45 µm filter. The supernatant was concentrated 500-fold by using successively a ultrafilter system with a 10 kDa cut-off membrane (Minitan, Millipore, USA) and an ultrafiltration cell under N₂ pressure with a 10 kDa cut-off YM-10 membrane (Millipore, USA). The concentrated supernatant was treated with a protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim, Germany) and supplemented with 50 mM sulfobetaine NDSB 201 (Calbiochem, USA). The concentrated sample was then applied to an acrylamide-agarose (ACA 44 Biosepra, USA) column (120 cm x 2.5 cm) pre-equilibrated in 25 mM sodium acetate (pH 4.6) containing 50 mM sulfobetaine NDSB 201 and 200 mM NaCl. Eluted fractions were screened for their killer activity by measuring the growth of sensitive yeast cells in liquid medium. The active fractions including the PKT were then pooled and concentrated by pressure ultrafiltration with a 10 kDa cut-off YM-10 membrane (Millipore, USA). After dialysis against 25 mM sodium acetate (pH 3.0), the sample was applied to a Macro-Prep High S (Bio-Rad, USA) ion exchange chromatography column (10 cm x 1 cm) pre-equilibrated with the same buffer. After extensive washing with 25 mM sodium acetate (pH 3.0), the adsorbed proteins were eluted with 25 mM sodium acetate (pH 7.5). Fractions were screened for the killer activity by using the same killer toxin assay as described above.

Specific activity measurement. The activity of the PKT was quantified by measuring the optical density (630 nm) of a sensitive yeast cell suspension in contact with serial dilutions of the PKT. The activity corresponded to the dilution factor of the PKT allowing 50 % growth of the sensitive population at 26°C, pH 4.6 in Sabouraud Medium. The specific activity represented the activity of the sample per µg of protein (U/µg).

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis. The active fractions were subjected to SDS-PAGE using a 10% acrylamide gel followed by silver staining or by a standard Western blotting procedure using a specific monoclonal antibody (mAb KT1) [4] directed against the PKT.

Enzymatic deglycosylation. Enzymatic deglycosylations were performed by treating sample with NANase II, O-Glycosidase DS and PNGase F cocktail

(Bio-Rad, USA) during 24 h at 37°C, without prior denaturation of the protein. After deglycosylation, the sample was analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining or Western blot analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Purification of the PKT. Specific activity was measured at each stage of the purification protocol. The specific activity of the initial concentrated supernatant was 242.1 U/µg. After the gel exclusion step, the pooled active fractions had a specific activity of 677.9 U/µg. Following the complete purification protocol, the purified sample had a specific activity of 2 238.4 U/µg. As a result of the purification procedure, only one band was observed after SDS-PAGE followed by silver staining of the purified sample (Fig. 1A2). The estimated molecular weight of the purified protein was 85 kDa. These results confirmed that the PKT has a high molecular weight in comparison with other *Pichia* killer toxins [6]. Immunoblotting using the mAb KT1 (Fig. 1B2) confirmed that the 85 kDa purified protein is the PKT. In contrast with a previous study showing that the mAb KT1 reacted with two bands of high molecular weights [4], a unique active protein was isolated under our working conditions.

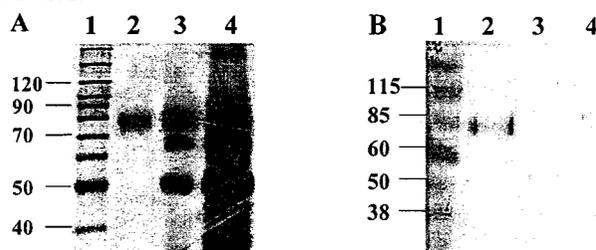


Fig. 1A Silver stained SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of *P. anomala* K36 killer toxin at various stages of purification. Lanes: 1, Molecular weight marker; 2, purified sample; 3, sample obtained after gel filtration; 4, 500-fold concentrated supernatant. 1B Western blot analysis using mAb KT1, a specific monoclonal antibody directed against PKT. Lanes: 1, Molecular weight marker; 2, purified sample; 3, purified deglycosylated sample; 4, 500-fold concentrated supernatant.

Characterization of the PKT. Previous experiments have shown that active PKT is still secreted in the presence of tunicamycin, suggesting that N-glycosylation is not involved in either PKT secretion or in its killer activity [2]. Nevertheless, on Western blots, a diffuse protein band was observed with a concentrated or purified sample, suggesting that the protein is glycosylated (Fig. 1B2 and 4). We have thus examined the effect of enzymatic deglycosylation on PKT. Following a combined treatment with NANase II, O-Glycosidase DS and PNGase F, the protein appeared to have a molecular weight of 50 kDa following immunoblotting with the mAb KT1 (Fig. 1B3). This result demonstrates that PKT is a glycoprotein. Our hypothesis is that the proteic moiety of PKT is responsible of the antimicrobial activity. This hypothesis will be tested by performing a killer toxin assay using deglycosylated PKT. These results are the first steps in the biochemical description of PKT and are essential tools for the generation of PKT stable variants with therapeutic properties.

ACKNOWLEDGMENTS

CG is supported by a PhD. grant from the Région Nord-Pas de Calais and the Institut Pasteur de Lille. NS is supported by a SIDACTION grant (n° ID 000420-02).

LITERATURE CITED

1. Bevan, E. M. & Makower, M. 1963. *Genetics today* 1: 202.
2. Cailliez, J.C., Cantelli, C., Conti, S., Gerloni, M., Magliani, W., Morace, G. & Polonelli, L. 1993. *J. Med. Vet. Mycol.* 31 : 337-342.
3. Conti, S., Fanti, F., Magliani, W., Gerloni, M., Bertolotti, D., Salati, A., Cassone, A. & Polonelli, L. 1998. *J. Infect. Dis.* 177 : 807-811.
4. Polonelli, L. & Morace, G. 1987. *J. Clin. Microbiol.* 25 : 460.
5. Séguy, N., Cailliez, J. C., Delcourt, P., Conti, S., Camus, D., Dei-Cas, E. & Polonelli, L. 1997. *Mol. Med.* 3 : 544-552.
6. Yamamoto, T., Imai, M., Tachibana, K & Mayuna, M. 1986. *FEBS* 195 : 253.

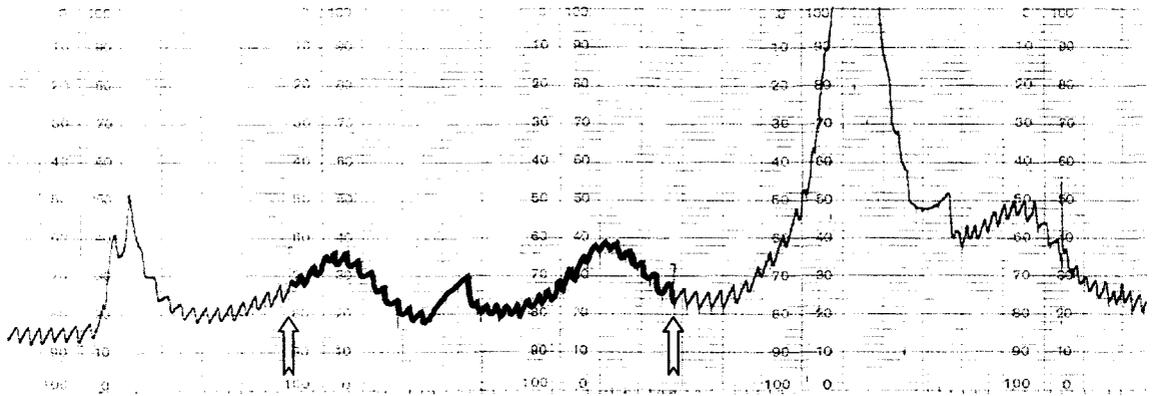


Figure 2A : Courbes représentant l'absorbance à 280nm des fractions collectées par chromatographie de gel-filtration. Les flèches indiquent la première et la dernière des fractions contenant la WmKT.

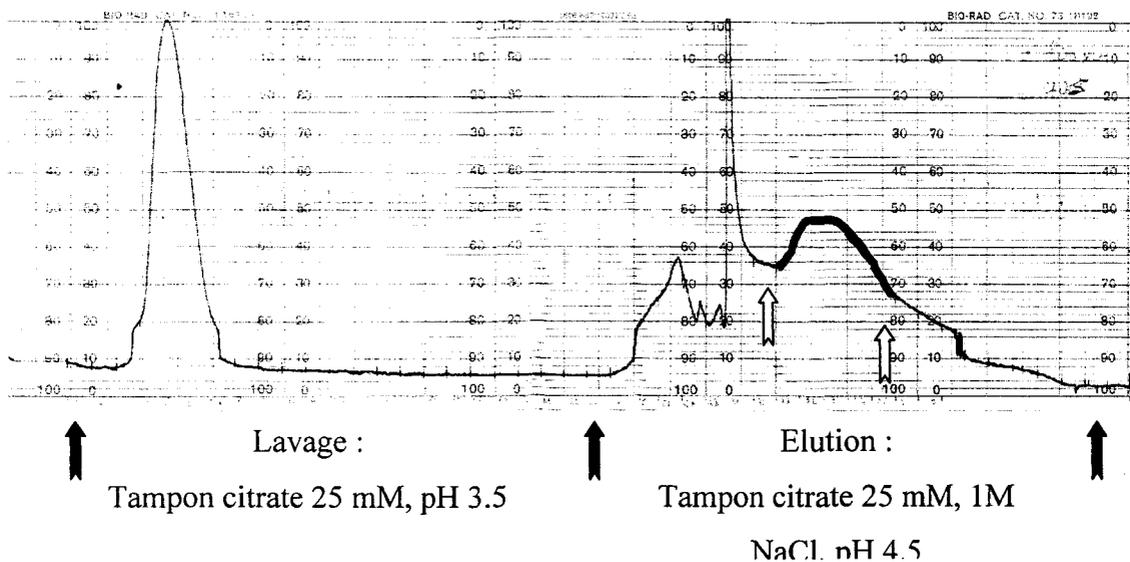


Figure 2B : Courbes représentant l'absorbance à 280 nm des fractions collectées par chromatographie d'échange d'ions. Les flèches noires indiquent les différentes phases de la chromatographie. Les flèches blanches indiquent la première et la dernière des fractions contenant la WmKT.

Chapitre III

Purification quantitative et caractérisation de la WmKT

Introduction

Le protocole de purification présenté dans l'article précédant nous a permis de démontrer que la WmKT possède une masse moléculaire de 85 kDa. Cette protéine semble capable d'assurer à elle seule l'activité antibiotique de la WmKT, puisqu'un échantillon purifié ne comportant que cette protéine de 85 kDa possède un effet antifongique. Ce travail suggère aussi que la toxine est une glycoprotéine. En effet, après déglycosylation, une protéine de 50kDa est reconnue par le mAbKT1. Malgré de nombreuses tentatives, nos expériences de microséquençage de protéine à partir de la WmKT purifiée selon ce protocole sont restées sans succès. Cet échec étant vraisemblablement attribué au faible rendement de notre technique de purification, nous avons alors entrepris de purifier la WmKT selon une procédure permettant d'obtenir des rendements supérieurs.

Cette seconde méthode ainsi que les résultats de caractérisation de la WmKT qui ont suivi sont décrits dans le manuscrit : **"Characterisation of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high-molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity"**
Cyril Guyard, Nathalie Séguy, Jean-Charles Cailliez, Hervé Drobecq, Luciano Polonelli, Eduardo Dei-Cas, Annick Mercenier, and Franco D. Menozzi. soumis à publication.

Characterisation of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high-molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity

CYRIL GUYARD,^{a,b,*} NATHALIE SÉGUY,^c JEAN-CHARLES CAILLIEZ,^{a,b,d} HERVÉ DROBECQ,^e LUCIANO POLONELLI,^f EDUARDO DEI-CAS,^{a, b, g} ANNICK MERCENIER,^{a, b} and FRANCO D. MENOZZI,^{b, h}

^aDépartement de Microbiologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP 245, 59019 Lille, France, ^bIFR17, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP 245, 59019 Lille, France, ^cLaboratoire de Mycologie, Université de Bourgogne, Faculté de Pharmacie et de Médecine, 7 bd Jeanne d'Arc, BP87900, 21079 Dijon Cedex, France, ^dFaculté Libre des Sciences, Université Catholique, Lille, France, ^eUMR 8525, Université de Lille II, Institut de Biologie de Lille, 1 Rue Calmette, 59019 Lille, France, ^fDipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy, ^gCentre Hospitalier et Faculté de Médecine, Lille, France, ^hINSERM U447, Mécanismes Moléculaires de la Pathogénie Microbienne, Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

*Corresponding author. Mailing address. Tel: +33.320.87.71.57; Fax: +33.320.87.79.08 ; E-mail: Cyril.Guyard@pasteur-lille.fr

ABSTRACT

Williopsis saturnus var. *mrakii* MUCL 41968 secretes a killer toxin (WmKT) that is active against a wide range of pathogens. From the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 culture supernatant a protein of 85 kDa with killer activity was purified to homogeneity. The purified protein was demonstrated to be a killer toxin since it displays the toxin activity and cross-reacts with mAbKT4, a monoclonal antibody that blocks WmKT activity. Its partial amino acid sequencing revealed that WmKT might be related to yeast SUN proteins, but not to already described killer toxins. Immunofluorescence studies using polyclonal antibodies raised against purified WmKT revealed that it acts by binding to the cell surface of sensitive strains. We showed that WmKT is inactive against mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in the synthesis of β -glucans, suggesting that these polysaccharides constitute the target of the toxin. The WmKT was demonstrated to induce rapid lethal cell permeation, since a strong propidium iodide labelling was shown for sensitive strains treated with the killer toxin. These findings suggest that WmKT is a novel killer toxin whose molecular characterisation may lead to the development of new wide-spectrum anti-microbial compounds.

INTRODUCTION

The emergence and the rapid dissemination of infectious agents resistant to antibiotic treatments have emphasised the need for alternative chemotherapies.¹ Among the new antimicrobial molecules under investigation, specific yeast killer toxins (KTs) represent promising candidates since they display wide spectra of activity.^{2,3} The yeast killer phenomenon was first described in *Saccharomyces cerevisiae* strains producing toxins that inhibit the growth or exert lethal effects against closely related yeast strains.⁴ It has later been demonstrated that this phenomenon is wide-spread among yeast species.^{2,5} Due to a mechanism called self-immunity, yeast killer strains are resistant to the activity of their own KT. In the past decade, numerous KT have been described and shown to differ in their mode of action, molecular structure or maturation process.² Although KT secreted by *Williopsis* spp. generally exhibit small molecular weights (5–19 kDa),⁶⁻⁸ a KT with an apparent molecular weight of 85 kDa was recently described in *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 (WmKT).⁹ WmKT is characterised by a particularly wide spectrum of activity since it is active against *Candida albicans*, *Pichia anomala*, *Pneumocystis carinii* and *S. cerevisiae*.^{10,11} The high sensitivity of mouse- and rat-derived *P. carinii* strains to WmKT has been demonstrated both *in vitro* and in animal models.¹¹ WmKT is encoded by a nuclear gene and its microbicidal activity is neutralised by mAbKT4, an anti-WmKT monoclonal antibody.¹² Preliminary characterisation studies have also shown that WmKT is active in acidic conditions (around pH 4.6), and at temperatures between 25 and 28°C.¹¹

Anti-idiotypic antibodies (KTIdAbs) obtained after immunisation of mice with mAbKT4¹³ were shown to exert a lethal effect against WmKT-sensitive yeast strains, as well as multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and antibiotic-resistant Gram-positive cocci.^{14,15} Since the antimicrobial activity of KTIdAbs is neutralised by mAbKT4, it has been proposed that KTIdAbs mimic the activity of WmKT. Moreover, single chain fragment anti-idiotypic antibodies (ScFv KTIdAbs) produced from splenic lymphocytes of mice immunised with mAbKT4 were shown to display a wide antimicrobial activity.¹⁶ Recently, recombinant strains of *Streptococcus gordonii* expressing ScFv KTIdAbs were used to treat rats suffering from experimental vaginitis caused by *C. albicans*.¹⁷ In this experiment, *S. gordonii* secreting ScFv KTIdAbs displayed therapeutic effects equivalent to fluconazole.

Taken together, these results suggest that WmKT or derivatives thereof could be used as a novel therapeutic agent against microbial infections. However, previous studies about WmKT activity spectrum were performed with KTIdAbs or crude the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 culture supernatant and there was virtually no information on the protein itself and the corresponding gene. Therefore, as presented in this paper, we purified the WmKT and demonstrated for the first time that this killer toxin is a cell surface 85-kDa glycoprotein which exhibits some relatedness to the yeast SUN proteins and causes cell permeation after contact with target cells.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains

The killer yeast strains used were *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968⁵ and *P. anomala* ATCC 96603.¹⁸ *P. anomala* strain MUCL 41969 and *S. cerevisiae* W303 were used as killer toxin-sensitive strains. *S. cerevisiae* ZH 401-1-d *knr4* disruption mutant¹⁹ and its parental JY 102 strain were used to study the interaction of WmKT with cell surface β 1,3-glucan. *S. cerevisiae* SEY6210 and its derivative carrying a disruption of *KRE 1* gene²⁰ were used to study the interaction of WmKT with cell surface β 1,6-glucan.

Monoclonal antibody

mAbKT4 is a neutralising monoclonal antibody raised against killer toxin of *P. anomala* ATCC 96603¹⁸ which cross-reacts with WmKT and blocks its activity.^{21,22}

Killer toxin purification

A colony of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 was used to inoculate a 200 ml preculture in Yeast Minimal Medium (YMM), buffered at pH 3.5 with 25 mM citric acid. After 48 h of growth at 26°C and 70 rpm, four flasks (2-liter volume) containing 450 ml of YMM were seeded each with 50 ml of this preculture. After 15 h of growth at 26°C and 70 rpm, yeast cells were harvested by centrifugation (5,000 x g for 10 min), and the clarified supernatant was collected. After addition of 10 tablets of EDTA-free protease inhibitor cocktail (CompleteTM Roche, Mannheim, Germany), the 2 liters of spent growth medium were applied onto a Macro-Prep High S (Bio-Rad, Hercules, USA) ion exchange chromatography column (10 cm x 2.5 cm) equilibrated with 25 mM sodium acetate (pH 3.0). After extensive washing with 25 mM sodium acetate buffer (pH 3.5), elution was achieved by passing 25 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) containing 1 M NaCl. Eluted fractions (5 ml) were screened for killer activity as described hereafter. The active fractions were pooled, lyophilised and resuspended in 25 mM sodium acetate (pH 3.0). After dialysis against 25 mM sodium acetate (pH 3.0), the sample was analysed by SDS-PAGE and immunoblotting.²³

Killer toxin activity assay

50 μ l of spent growth medium or chromatographic fractions were mixed with 200 μ l liquid Sabouraud broth (AES laboratory, Combourg, France) containing 5×10^4 cells of the killer toxin sensitive *P. anomala* strain MUCL 41969 seeded into microtiter wells of 96-well plates (Costar, Brumath, France). The plates were incubated at 26°C for 18-20 h and growth of the indicator strain was followed by measuring the optical density at 630 nm (OD₆₃₀) using an automatic plate recorder (Bio-tek Instruments, Inc, Winooski, USA). Killer toxin activity was detected by growth inhibition of the sensitive strain, using a toxin-free microculture as control.⁹ Assays were performed in triplicate and the results expressed as the mean of OD₆₃₀ +/- SD.

SDS-PAGE and immunoblotting

Sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using a 4-15% linear acrylamide gel.²⁴ After SDS-PAGE, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad S.A., Ivry-sur-Seine, France) as described by Towbin et al.²³ Killer toxins were detected with the mAbKT4 or WmKTAbs (see below) at a concentration of 50 or 10 μ g/ml, respectively. Immune complexes were revealed with alkaline phosphatase-linked goat anti-mouse IgG (Roche Diagnostics S.A., Meylan, France) or alkaline phosphatase-linked goat anti-rabbit IgG (Promega, Madison, WI, USA).

Amino acid sequencing

To determine their N-terminal sequence, the protein bands recognised by WmKTAbs were excised from PDVF membrane (Millipore S.A., Saint Quentin en Yvelines, France), and directly submitted to Edman degradation using an automated microsequencer (Procise 492 Applied Biosystems, Palo Alto, USA). Internal amino acid sequences were obtained using a procedure previously described.²⁵ Briefly, purified WmKT was submitted to SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. The band corresponding to the killer toxin was excised and treated with acetonitrile and ammonium carbonate to remove impurities. After dehydration, the protein was digested with endoproteinase Lys-C (Roche, Mannheim, Germany) for 18 h at 37 °C. Resulting peptides were then purified by C18 reverse-phase HPLC (Applied Biosystems, Microgradient System 140C) and submitted to amino-terminal microsequencing.

Polyclonal antibodies production and purification

The polyacrylamide band containing the 85-kDa protein recognised by mAbKT4 and corresponding to WmKT, was excised from SDS polyacrylamide gel, minced and resuspended in 4 ml of phosphate buffered saline (PBS) to obtain a final WmKT concentration of 400 µg/ml, before being used to immunise rabbits by the subcutaneous route. The first injection was performed using 0.5 ml of WmKT suspension (200 µg of WmKT) and 0.5 ml of complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Three boosts were carried out at two week-intervals with 0.5 ml of WmKT suspension mixed with 0.5 ml of incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Two weeks after the last boost, the rabbits were bled and sera were collected. Anti-WmKT polyclonal antibodies (WmKTAbs) were then purified using Protein A Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The concentration of purified polyclonal antibodies was determined using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, USA). Neutralisation of killer toxin activity was assayed by adding 10 µl of WmKTAbs at the concentration of 10 mg/ml to serially diluted culture supernatant of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. After overnight incubation at 4°C, the WmKT activity was measured as described above. Protein A-purified rabbit antibodies from pre-immune serum were used as negative control at a concentration of 10 mg/ml. Assays were performed in triplicate and results expressed as the mean of OD₆₃₀ +/- SD.

Glycosylation studies

Concanavalin A conjugated to digoxigenin was purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France). The specific affinity of digoxigenin-labelled concanavalin A for the carbohydrate moiety of WmKT was determined according to the DIG glycan differentiation kit protocol (Roche Diagnostics, Meylan, France). Enzymatic deglycosylation of WmKT was performed by treating the toxin with NANase II, O-Glycosidase DS and PNGase F cocktail (Bio-Rad, USA) during 24 h at 37°C, without prior denaturation of the protein. After deglycosylation, WmKT was analysed by SDS-PAGE followed by western blotting.

Immunofluorescence assays

Yeast cells from an overnight culture were centrifuged for 4 min at 10000 x g and resuspended in PBS to a final concentration of approximately 5 x 10⁶ cells/ml.

For immunofluorescence microscopy, 20 μ l of yeast suspension were pipeted into the wells of an immunofluorescence assay (IFA) slide and let to dry before fixing for 45 min at 50°C. 25 μ l of WmKT Abs at 100 μ g/ml in PBS were then added to each well and incubated for 35 min at 37°C in a humid chamber. Following 3 washes with PBS, 25 μ l of fluorescein isothiocyanate (FITC)-swine anti-rabbit IgG (1.6 μ g/ml) (Dako, Mississauga, Canada) were pipeted into the wells. After a 90 min incubation at 37°C followed by 3 washes with PBS, the slides were mounted using coverslide and mounting medium containing glycerol/mowiol/Dabco (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Epifluorescence was observed using an Axiophot 2 microscope (Zeiss S.A., Le Pecq, France).

For flow cytometry analysis, 10^6 yeast cells were incubated for 90 min at 37°C in 100 μ l PBS containing WmKT Abs or control rabbit antibodies at the concentration of 10 μ g/ml. The cells were then washed thrice with 25 μ l PBS before incubation for 30 min at 37°C with 100 μ l of FITC-swine anti-rabbit IgG at 1.6 μ g/ml in PBS. After 3 final washes with PBS, the cells were resuspended in 1 ml PBS and analysed by flow cytometry. Cells exhibiting a FITC signal greater than control cells were considered as positive. Assays were performed in triplicate and results expressed as the mean of labelled fluorescent cells +/- SD.

For the analysis of the binding of WmKT to sensitive yeast cells, 10^6 yeast cells were incubated for 1 h at 26°C in 1 ml of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 spent growth medium. The IFA was further performed as described above except that all incubation and washing steps were done in 25 mM sodium acetate buffer (pH 4.6).

Flow cytometry assays

Flow cytometry analyses were performed using a Coulter Epics XL flow cytometer (Coultronics, Margency, France). FITC signal was collected through a 525-nm dichroic band-pass filter after being reflected by a 550-nm dichroic long pass filter. Propidium iodide (PI) fluorescence was collected through a 645-nm dichroic band-pass filter after being reflected by a 620-nm dichroic long pass filter. Before each analysis, 3 and 6 μ m green latex beads (Coultronics S.A., Margency, France) were used to calibrate the light scatter and fluorescence parameters. Killer toxin sensitivity was measured by flow cytometry analysis of 10,000 cells. Overnight grown yeast cells were enumerated using a Thoma cell count chamber, and 10^7 cells were mixed with spent growth medium or purified WmKT at the final concentration of 500 μ g/ml. After 3 hours of incubation at

26°C, the cells were harvested by centrifugation (10,000 x g, 10 min at 4°C), washed twice with PBS, then resuspended in 1 ml of PBS containing 10 µg/ml of PI (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and PI fluorescence was determined.

Zymolyase resistance assay

Yeast cells were grown to mid-log phase in 50 ml Sabouraud broth buffered at pH 4.6 with 0.1 M citric acid and 0.2 M sodium phosphate. After harvesting by low-speed centrifugation, the cells were diluted to an OD₆₀₀ of 0.25 using 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 20 µg/ml of zymolyase (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), and incubated at 37°C. Zymolyase sensitivity was monitored by measuring the OD₆₀₀ of the cell suspensions each 20 min for a 160 min period.

RESULTS

W. saturnus var. mrakii MUCL 41968 killer toxin purification

Spent growth medium (see Materials and Methods) from a *W. saturnus var. mrakii* MUCL 41968 culture performed in yeast minimal medium buffered at pH 3.5 was filter-sterilised and directly applied onto a Macro-Prep High S ion exchange chromatography column. Elution of adsorbed proteins was performed with a stepwise NaCl gradient ranging from 50 mM to 1 M. Eluted fractions were screened for the presence of killer toxin activity and the highest activity was recovered in fractions eluted at 1 M NaCl. Killer toxin assay performed with these fractions showed that specific activity of the purified sample was increased by a factor 20. SDS-PAGE analysis of killer fractions showed 3 major proteins of 85, 73 and 60 kDa (Figure 1A). In immunoblots, only the 85-kDa protein was recognised by mAbKT4 which neutralises the *W. saturnus var. mrakii* MUCL 41968 killer toxin activity, suggesting that this protein displays killer activity (Figure 1B). This was further supported by demonstrating that the 85 kDa protein purified to homogeneity by gel filtration chromatography retains the killer toxin activity (data not shown). Nevertheless, due to the low yield of purified 85 kDa protein obtained after gel filtration, the fractions resulting from the ion exchange chromatography purification were retained for further analysis. This result suggesting an high molecular for WmKT is in agreement with previous results showing that killer activity might be associated with a protein of 85 kDa present in the crude culture supernatant of *W. saturnus var. mrakii* MUCL 41968.²¹

Amino acid sequencing

The N-terminal amino acid sequence analysis of the 85-kDa protein gave the following sequence: Gly-Val-Val-Val-Val-Leu-Glu-X-Gln-Val-Ala-Tyr. A search in the protein databases failed to detect significant homologies with known proteins. To establish whether the 73- and 60-kDa proteins were related to the 85-kDa one, their N-terminal amino acid sequences were also determined. The three proteins turned out to possess identical N-terminal amino acid sequences, suggesting that they may represent 3 isoforms of the same protein. Alternatively, the 73- and 60-kDa proteins may represent degradation products of the 85-kDa protein.

To further characterise the 85-kDa protein, its partial internal amino acid sequence was determined using six peptides derived from endoproteinase Lys-C treatment of the protein

followed by reverse phase HPLC separation. The sequences obtained and respectively labelled peptides sequences 1 to 6 were: Lys-Gly-Tyr-Leu-Tyr-Arg-Ser-Asn-Thr-Ala-Lys, lys-X-Pro-Met-Ser-Val-Val-Asp-Asn-Ser-Asp-Asp-Tyr-Tyr-Asn, Lys-Gly-Ile-Thr-Tyr-Ser-Pro-Tyr-Thr-Ser-Ser-Gly-Tyr, Lys-Thr-Thr-Pro-Asn-Tyr-Asn-Ile-Lys, Lys-Ala-Thr-Ala-Asn-Phe-Val-Phe-Tyr and Lys-Gln-Gln-Thr-Ala-Asn-Ile-Lys. For the peptide sequences 1 to 5, a search in databases revealed similarities with proteins belonging to the SUN family (Figure 2). The peptide sequence 1 showed a strong similarity since 8 of 11 invariant amino acids were identical to SUN proteins. For the peptides 2-5, more limited similarities were observed, however identities ranging from 27 to 78 % were determined with each protein of SUN family. The SUN protein family has been defined on the basis of a common 258 amino acid C-terminal domain²⁶⁻²⁹ and is composed of seven proteins which are involved in different yeast cellular functions such as regulation of mitochondria biogenesis or cell septation. The similarities observed between the internal sequences of the 85-kDa protein and the SUN proteins are all located within the SUN common C-terminal domain suggesting that the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 85-kDa protein could share molecular properties with the yeast SUN protein family. For the peptide sequence 6, no significant similarity with known proteins was found.

Immunological characterization

To characterise functionally the killer activity associated with the 85-kDa protein, rabbit polyclonal antibodies (WmKTAbs) were raised against the purified protein. Immunoblotting analysis of spent growth medium of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 showed that WmKTAbs and mAbKT4 cross-react strongly with a 85-kDa protein (Figure 1C). Interestingly, WmKTAbs also react with the 73- and 60-kDa proteins associated with the 85-kDa protein, which corroborates the hypothesis that these three polypeptides are related.

Immunofluorescence studies were then performed using WmKTAbs in order to localize the killer toxin on the surface of yeast cells. As shown in Figure 3A, a strong and homogeneous binding of WmKTAbs was observed at the surface of the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer strain, suggesting that the toxin accumulates in the cell wall during its secretion process. To check the specificity of WmKTAbs, two killer strains and two killer toxin sensitive strains were studied by IFA, and labelling signals were monitored by flow cytometry. As shown in Figure 3B, the labelling by WmKTAbs was of 85.3% and 54.9% for the two killer strains *W. saturnus* var.

mrakii MUCL 41968 and *P. anomala* ATCC 96603, respectively. In the same conditions, *S. cerevisiae* W303 and *P. anomala* MUCL 41969, both sensitive to the killer toxin, exhibited a labelling of 0.1% and 27.0%, respectively. Control experiments using pre-immune rabbit serum or secondary antibody alone failed to induce significant yeast labelling, demonstrating that the binding of WmKT Abs is much higher for killer yeast strains than for sensitive ones.

To further investigate the specificity of WmKT Abs, neutralisation assays of WmKT activity were performed by mixing the polyclonal antibodies with serial dilutions of spent growth medium of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. Figure 4 shows that a 1/8 dilution of the WmKT containing growth medium was totally inhibited (no drop in the OD₆₃₀ of the WmKT sensitive culture) by WmKT Abs at the concentration of 1.6 mg/ml, a concentration which still significantly reduced the KT activity contained in 1/4 dilution. Pre-incubation with control antibodies had no impact on WmKT activity. WmKT was thus specifically neutralised by WmKT Abs as described for mAbKT4.²²

Evidence for glycosylation of WmKT

Preliminary observations suggested that WmKT may bear a polysaccharide moiety. This hypothesis was first investigated in a western blot probed with concanavalin A, a lectin that interacts with terminal α -D-mannosyl and α -D-glucosyl residues. As shown in Figure 1 (lane E), concanavalin A conjugated to digoxigenin bound to a ca. 85-kDa protein which is also recognised by mAbKT4 and WmKT Abs, supporting the hypothesis that WmKT is a glycoprotein. In addition, and based on their strong reactivity with concanavalin A, the cross-reactive 73- and 60-kDa proteins also appeared glycosylated.

To prove glycosylation, WmKT was submitted to enzymatic deglycosylation. Following treatment of purified WmKT with combined NANase II, O-Glycosidase DS and PNGase F, mAbKT4 was shown to react in immunoblotting with a protein band of approximately 55 kDa (Figure 1, lane F). Confirming that WmKT carries a polysaccharide moiety that accounts for approximately 35 % of the protein by weight.

Effect of WmKT on propidium iodide staining of sensitive yeasts

According to Green et al,³⁰ antifungal effect can be monitored by flow cytometry analysis since treatment with antifungal agents leads to increased PI staining of sensitive yeasts. The PI staining pattern of the WmKT-sensitive *P. anomala* MUCL 41969 strain after incubation with WmKT

was therefore analyzed. Untreated *P. anomala* MUCL 41969 stained with PI exhibited only a low auto-fluorescence (Figure 5A). The same analysis performed on *P. anomala* MUCL 41969 cells killed by heating at 100°C for 10 min led to an intense PI staining of the entire cell population (Figure 5B). A similar PI staining pattern was observed when *P. anomala* MUCL 41969 cells were incubated for 3 hours at 26°C with *W. saturnus* var *mrakii* MUCL 41968 spent growth medium (Figure 5C), suggesting an alteration of cell integrity as a result of the WmKT activity. To test this hypothesis, *P. anomala* MUCL 41969 cells were incubated for 3 hours at 26°C with purified WmKT at the concentration of 500 µg/ml, followed by flow cytometry analysis of PI staining. The control experiment was carried out with purified WmKT previously heated at 100°C for 10 min. While heat-treated WmKT failed to induce significant PI staining (data not shown), purified WmKT led to results similar to those obtained with *W. saturnus* var *mrakii* MUCL 41968 spent growth medium (Figure 5D). A time-course study over 80 min showed that after 10 min of incubation at 26°C with WmKT, 90.5% of the sensitive cells were stained.

Molecular targets of WmKT

To determine whether WmKT acts by direct binding to the cell surface of sensitive cells, IFAs were performed using WmKT Abs to localise WmKT after incubation with *P. anomala* MUCL 41969 sensitive cells. Under the experimental conditions, an increased fluorescence signal was detected by flow cytometry (Figure 6A) compared to the control incubated in the absence of WmKT. As shown in Figure 6B, 51.5 % of cell labelling was detected when the sensitive strain was incubated with WmKT whereas only 27 % of cell labelling was observed in the control assay. This increased fluorescence suggests that the toxin indeed acts by binding to the cell surface. In order to study the influence of pH on the WmKT cell binding properties, IFAs were repeated using PBS pH 7.5 instead of sodium acetate buffer pH 4.6. In these conditions, no increase of fluorescence was detected when *P. anomala* MUCL 41969 was treated with WmKT (data not shown). The WmKT binding properties seem thus directly affected by pH conditions.

To characterise the molecular targets of WmKT at the cell surface of sensitive strains, we studied the WmKT sensitivity of *S. cerevisiae* strains mutants defective in the production of cell wall β -glucans. The *S. cerevisiae* PM359-1d strain deficient in β 1,3-glucan synthesis due to the *knr4* mutation¹⁹ was resistant to WmKT, whereas its parental JY102 strain (KNR4) was demonstrated to be sensitive (data not shown). Similar experiments were performed with *S.*

S. cerevisiae SEY6210 strain bearing the *kre1* mutation²⁰ which is associated to a defect in cell wall β 1,6-glucan production. Again, the mutant strain displayed a resistant phenotype, whereas the parental strain (KRE1) was highly sensitive to WmKT (data not shown). Flow cytometry was used to quantify the PI staining of these mutant strains after treatment with WmKT. For yeast strain bearing the *kre1* mutation, only 1.6% +/- 0.1 were stained, whereas in the same conditions 93.1% +/- 1.3 of parental cells were stained by PI. Analysis of the staining phenotype linked to the *knr4* mutation indicated that 31.8% +/- 3.3 of the mutant cells and 95.6% +/- 0,1 of the of the parental cells were PI labelled after contact with WmKT. This result suggest that the *kre1* mutation induces total resistance to WmKT, while only partial resistance is conferred by the *knr4* mutation.

Zymolyase sensitivity and WmKT activity

Yeast killer strains are immune to their own toxin.² Since WmKT activity is decreased or abolished in *S. cerevisiae* strains with mutations in the β -glucan synthesis pathway, we hypothesised that these cell wall compounds could be involved in the self immunity mechanisms of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 to its toxin. To test this hypothesis, we compared the sensitivity of four yeast strains, i.e. two WmKT sensitive and two KT-producing ones, to the β -glucan degrading enzyme zymolyase. The sensitivities were monitored by time-course decrease in the OD₆₀₀ of a standardised yeast suspension containing zymolyase at the concentration of 20 μ g/ml. The two WmKT-sensitive strains, *S. cerevisiae* W303 and *P. anomala* MUCL 41969, turned out to be highly sensitive to zymolyase since a 40 min incubation led to a 70% decrease in the OD₆₀₀. In contrast, in the same conditions, only a 0 to 20% decrease of the OD₆₀₀ was observed for the KT-producing strains *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 and *P. anomala* ATCC 96603. These results point to a correlation between sensitivity to zymolyase and to WmKT.

DISCUSSION

W. saturnus var. *mrakii* MUCL 41968 has been found to secrete a killer toxin exhibiting a lethal effect against a broad range of pathogenic microorganisms including *P. carinii*, *C. albicans* and *M. tuberculosis*.^{11,31,32} Because of its broad spectrum of activity, the WmKT has been proposed as the basis for novel therapeutic strategies to treat insidious infectious diseases.³³ However no biochemical characterisation of WmKT had been achieved so far and its mode of action remained poorly explored.³⁴

In this study, we have fractionated by ion ion-exchange chromatography the spent growth medium of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 and isolated fractions exhibiting high killer toxin activity. SDS-PAGE analysis of these fractions revealed the presence of three proteins with apparent molecular weights of 85, 73 and 60 kDa, respectively. Immunoblot analysis showed that only the 85-kDa protein was recognised by mAbKT4 that blocks WmKT activity.¹⁸ Such a high molecular weight of WmKT^{7,8} suggested that it might belong to a new class of killer toxins. This hypothesis is supported by the N-terminal amino acid sequence determination of purified WmKT which revealed no significant similarity with sequences available in databases including those from killer toxins. Interestingly, the N-terminal amino acid sequencing of internal peptides demonstrated that this toxin exhibits homologies with proteins belonging to the yeast SUN family. Although the SUN proteins are involved in multiple cellular processes, so far no killer activity has been associated with any of them.^{27,28}

To establish that the 85-kDa protein is the WmKT, immunoblots and inhibition assays were performed using monospecific antisera directed against the purified 85-kDa protein. Since both mAbKT4 and WmKTAbs reacted specifically in Western blot experiments with the same 85-kDa protein, and abolished as-well the killer activity of culture supernatants of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968,¹² it indicates that the 85-kDa protein is the WmKT. Immunofluorescence assays performed on various yeast strains showed that WmKTAbs have higher affinity for killer strains, such as *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 and *P. anomala* ATCC 96603, than for killer toxin-sensitive strains. This correlates well with our previous results which suggested that these killer yeast strains secrete toxins bearing common epitopes.²¹

Contrary to mAbKT4, antisera raised against the 85-kDa protein also react with the 73- and 60-kDa proteins that co-elute in the ion-exchange fractionation with the WmKT, indicating the presence of common epitopes. Amino-acid sequencing of these three proteins revealed that they

share an identical 12 amino acid N-terminal sequence. These findings suggest that the 73- and 60-kDa proteins are either isoforms or degradation products of WmKT.

Preliminary observations indicated that WmKT may be glycosylated.⁹ In the present study, we have proven the glycosidic nature of WmKT by both concanavalin A binding assay and enzymatic deglycosylation of purified WmKT. Interestingly, treatment of WmKT with combined NANase II, O-Glycosidase DS and PNGase F generated a peptide of 55 kDa that is still recognised by mAbKT4, indicating that this monoclonal antibody recognises a peptidic epitope. Assuming that complete deglycosylation of WmKT is achieved by such an enzymatic treatment, a peptidic moiety of 55 kDa is in agreement with the hypothesis that it belongs to the SUN family proteins, since the average molecular weight of SUN proteins is around 50 kDa, and some of them appear to be glycosylated.²⁷

In order to elucidate the action of WmKT at the cellular level, WmKT Abs were incubated with sensitive strains exposed to WmKT, and antibody binding was monitored by flow cytometry analysis. Whereas an intense fluorescence signal was observed at pH 4.6, it disappeared at neutral pH, suggesting a pH-dependent binding of the killer toxin to the surface of target cells. This hypothesis is further supported by the lability of the WmKT activity in neutral or basic conditions.¹¹

WmKT-sensitive yeast strains exhibited a high PI fluorescence when exposed to WmKT. Since a recent study indicated that flow cytometry measurement of PI fluorescence can discriminate a fungicidal activity from a fungistatic effect,³⁰ it appears that WmKT rather exerts a microbicidal activity, leading to an increased membrane permeability. A kinetic study demonstrated that WmKT acts rapidly on target cells since increased PI staining was already observed after 10-min incubation of yeasts with WmKT. Similar results have been reported for a 1.8-5.0 kDa killer toxin (K-500) produced by *W. mrakii* NCYC 500 that induces rapid membrane permeability after contact with target cells.⁷ It has been suggested that K-500 killer toxin acts in a similar manner to that of the K1 *S. cerevisiae* killer toxin³⁵ and the *P. kluyveri* toxin.³⁶

Using microcultures and PI staining assay, we showed that a null mutant of *S. cerevisiae* for *KNR4* gene involved in β 1,3 -glucan synthesis¹⁹ becomes partially resistant to WmKT. Moreover, a *S. cerevisiae* strain with a mutation in the *KRE1* gene, phenotypically characterised by an altered cell wall β 1,6 -glucan, is totally resistant to WmKT.²⁰ Since *S. cerevisiae* strains bearing mutations in the β -glucan synthesis pathway are more resistant to WmKT, it suggests that β -

glucans may be the cell wall target of the killer toxin which could therefore act as a glucanase. This is further supported by the finding that two members of the SUN family, Sun4p from *S. cerevisiae* and BglAp proteins from *C. wickerhamii* are cell wall proteins that have been postulated to display glucanase activity.^{26,37} The hypothetical glucanase activity of WmKT is also corroborated by the observation that killer strains *W. mrakii* MUCL 41968 and *P. anomala* 96603 are resistant to zymolyase, an enzyme with β 1,3-glucanase activity. Resistance to zymolyase degradation may be explained by either an increased amount of β 1,3-glucan in the cell wall or a modified cross-linkage between β 1,3-glucan motifs and other wall components such that carbohydrate linkages become inaccessible to the enzyme.¹⁹ According to the fact that β -glucans may be potential targets for WmKT on the yeast surface, the self-immunity mechanism of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 to its own toxin could be explained by a increased β -glucan synthesis or by the inaccessibility of these β -glucans at the cell surface of the killer yeast.

The results reported here represent the first information concerning the mode of action and biochemical properties of WmKT. The potential β -glucanase activity of WmKT may explain the wide spectrum of activity reported for WmKT, since β -glucans are supposed to be present at the cell surface of most WmKT-sensitive pathogens. Actually, β -glucans are major structural components of yeast cell wall³⁸ and recent studies have revealed that also the cell surface of *P. carinii* is largely composed of β -glucans.³⁹ Moreover, *M. tuberculosis* which is also sensitive to killer toxin is surrounded by a capsule containing glucans.⁴⁰ These capsular glucans are potential virulence factors since they are involved in interaction between *M. tuberculosis* and the CR3 β -glucan receptor present at the surface of host cells.⁴¹ If the action of WmKT is based on the degradation of capsular glucans, WmKT might reduce mycobacterial virulence. Therefore WmKT could be useful to treat multidrug-resistant tuberculosis. Cloning of the WmKT-encoding gene is currently in progress in our laboratory to produce recombinant WmKT in *Escherichia coli* and yeast strains. These recombinant forms will be useful to further characterise the WmKT activity and stability, and to specify its mechanism of action, a prerequisite step to develop new anti-infectious strategies based on the WmKT.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Beth Didomenico at Schering-Plough Research Institute (Kenilworth, USA) for providing *S. cerevisiae* ZH 401-1-d strain and M. Schmitt at Universität des Saarlandes (Germany) for providing *S. cerevisiae* SEY6210 *kre1* strain. We are grateful to Christian Sergheraert for his support during this work.

C.G. is supported by a Ph.D. grant from the Région Nord Pas-de-Calais (France) and the Institut Pasteur de Lille (France). This work was granted in part by the Fondation pour la Recherche Médicale and FEDER funding.

REFERENCES

1. Cohen, M. L. (2000). Changing patterns of infectious disease. *Nature* **406**, 762-67.
2. Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. & Polonelli, L. (1997). Yeast Killer Systems. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 369-400.
3. Conti, S., Magliani, W., Gerloni, M., Salati, A., Dieci, E., Arseni, S., *et al.* (1998). A transphyletic anti-infectious control strategy based on the killer phenomenon. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **22**, 151-61.
4. Woods, D. R. & Bevan, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **51**, 115-26.
5. Guyard, C., Magliani, W., Polonelli, L. & Cailliez, J. C. (2000). The yeast killer toxins. *Journal of Medical Mycology* **9**, 9-20.
6. Yamamoto, T., Hiratani, T., Hirata, H., Imai, M. & Yamaguchi, H. (1986). Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS Letters* **197**, 50-54.
7. Hodgson, V. J., Button, D. & Walker, G. M. (1995). Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology* **141**, 2003-12.

8. Lowes, K. F., Shearman, C. A., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D. B., Merry, R. J., *et al.* (2000). Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1066-76.
9. Guyard, C., Séguy, N., Lange, M., Ricard, I., Polonelli, L. & Cailliez, J. C. (1999). First steps in the purification and characterization of a *Pichia anomala* killer toxin. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**, 144S.
10. Polonelli, L. & Morace, G. (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *Journal of Clinical Microbiology* **24**, 866-69.
11. Séguy, N., Cailliez, J. C., Polonelli, L., Dei-Cas, E. & Camus, D. (1996). Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on *Pneumocystis carinii* infectivity to the SCID mouse. *Parasitology Research* **82**, 114-16.
12. Cailliez, J. C., Cantelli, C., Conti, S., Gerloni, M., Magliani, W., Morace, G., *et al.* (1993). *Pichia anomala* killer toxin secretion in the presence of tunicamycin. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **31**, 337-42.
13. Polonelli, L., Séguy, N., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Cantelli, C., *et al.* (1997). Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **4**, 142-46.
14. Conti, S., Fanti, F., Magliani, W., Gerloni, M., Bertolotti, D., Salati, A., *et al.* (1998). Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *Journal of Infectious Disease* **177**, 807-11.
15. Conti, S., Magliani, W., Arseni, S., Dieci, E., Frazzi, R., Salati, A., *et al.* (2000). In vitro activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant Gram-positive cocci. *Molecular Medicine* **6**, 613-19.
16. Magliani, W., Conti, S., de Bernardis, F., Gerloni, M., Bertolotti, D., Mozzoni, P., *et al.* (1997). Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nature Biotechnology* **15**, 155-58.
17. Beninati, C., Oggioni, M. R., Boccanera, M., Spinosa, M. R., Maggi, T., Conti, S., *et al.* (2000). Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nature Biotechnology* **18**, 1060-64.
18. Polonelli, L. & Morace, G. (1987). Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* **25**, 460-62.

19. Hong, Z., Mann, P., Brown, N. H., Tran, L. E., Shaw, K. J., Hare, R. S., *et al.* (1994). Cloning and characterization of *KNR4*, a yeast gene involved in (1,3)-beta-glucan synthesis. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 1017-25.
20. Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A. & Bussey, H. (1990). Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *Journal of Cellular Biology* **110**, 1833-43.
21. Guyard, C., Evrard, P., Corbisier-Colson, A. M., Louvart, H., Dei-cas, E., Menozzi, F. D., *et al.* (2001). Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with a *Williopsis var. saturnus mrakii* killer toxin. *Medical Mycology* **in press**.
22. Cailliez, J. C., Cantelli, C., Séguy, N., Conti, S., Gerloni, M., Morace, G., *et al.* (1994). Killer toxin secretion through the cell wall of the yeast *Pichia anomala*. *Mycopathologia* **126**, 173-77.
23. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-54.
24. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-85.
25. Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C. & Ferrara, P. (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **203**, 173-79.
26. Mouassite, M., Camougrand, N., Schwob, E., Demaison, G., Laclau, M. & Guérin, M. (2000). The 'SUN' family: yeast *SUN4/SCW3* is involved in cell septation. *Yeast* **16**, 905-19.
27. Mouassite, M., Guérin, M. G. & Camougrand, N. M. (2000). The *SUN* family of *Saccharomyces cerevisiae*: the double knock-out of *UTH1* and *SIM1* promotes defects in nucleus migration and increased drug sensitivity. *FEMS Microbiology Letters* **182**, 137-41.
28. Camougrand, N. M., Mouassite, M., Velours, G. M. & Guérin, M. G. (2000). The "SUN" family: *UTH1*, an ageing gene, is also involved in the regulation of

- mitochondria biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **375**, 154-60.
29. Omi, K., Sonoda, H., Nagata, K. & Sugita, K. (1999). Cloning and characterization of *psu1(+)*, a new essential fission yeast gene involved in cell wall synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **262**, 368-74.
 30. Green, L., Petersen, B., Steimel, L., Haeber, P. & Current, W. (1994). Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 1088-91.
 31. Matthews, H. L., Conti, S., Witek-Janusek, L. & Polonelli, L. (1998). Effect of *Pichia anomala* killer toxin on *Candida albicans*. *Medical Mycology* **36**, 199-204.
 32. Séguy, N., Cailliez, J. C., Delcourt, P., Conti, S., Camus, D., Dei-Cas, E., *et al.* (1997). Inhibitory effect of human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies on *Pneumocystis carinii*. *Molecular Medicine* **3**, 544-52.
 33. Séguy, N., Polonelli, L., Dei-Cas, E. & Cailliez, J. C. (1998). Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **22**, 145-49.
 34. Jackson, H. C., Séguy, N., Killigin, E. M., Dei-Cas, E., Polonelli, L. & Cailliez, J. C. (1996). Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on the viability of rat-derived *Pneumocystis carinii*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **43**, 29S.
 35. Martinac, B., Zhu, H., Kubalski, A., Zhou, X. L., Culbertson, M., Bussey, H., *et al.* (1990). Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6228-32.
 36. Kagan, B. L. (1983). Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature* **302**, 709-11.
 37. Skory, C. D. & Freer, S. N. (1995). Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular beta-glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 518-25.
 38. Lipke, P. N. & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology* **180**, 3735-40.

39. Hoffman, O. A., Standing, J. E. & Limper, A. H. (1993). *Pneumocystis carinii* stimulates tumor necrosis factor-alpha release from alveolar macrophages through a beta-glucan-mediated mechanism. *Journal of Immunology* **150**, 3932-40.
40. Hetland, G., Lovik, M. & Wiker, H. G. (1998). Protective effect of beta-glucan against *Mycobacterium bovis*, BCG infection in BALB/c mice. *Scandinavian Journal of Immunology* **47**, 548-53.
41. Ehlers, M. R. & Daffé, M. (1998). Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends in Microbiology* **6**, 328-35.

FIGURES

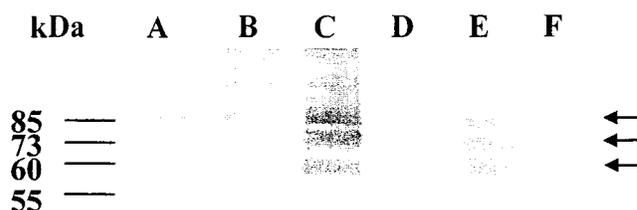


Figure 1. Ion exchange purification, immunoblotting, concanavalin A-DIG binding and enzymatic deglycosylation of WmKT. *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 conditioned growth medium was subjected to cation exchange chromatography and elution was performed using a stepwise NaCl gradient. Fraction eluted at 1-M NaCl and containing killer toxin activity was analyzed by SDS-PAGE (A) and immunoblotting using mAbKT4 after enzymatic deglycosylation (F). *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 conditioned growth medium was also analyzed by western blotting using mAbKT4 (B); anti-WmKT antiserum (C), pre-immune serum (D) and concanavalin A-DIG (E). The arrows in the right margin indicate position of the 85-, 73-, and 60-kDa proteins present in the 1 M NaCl elution peak.

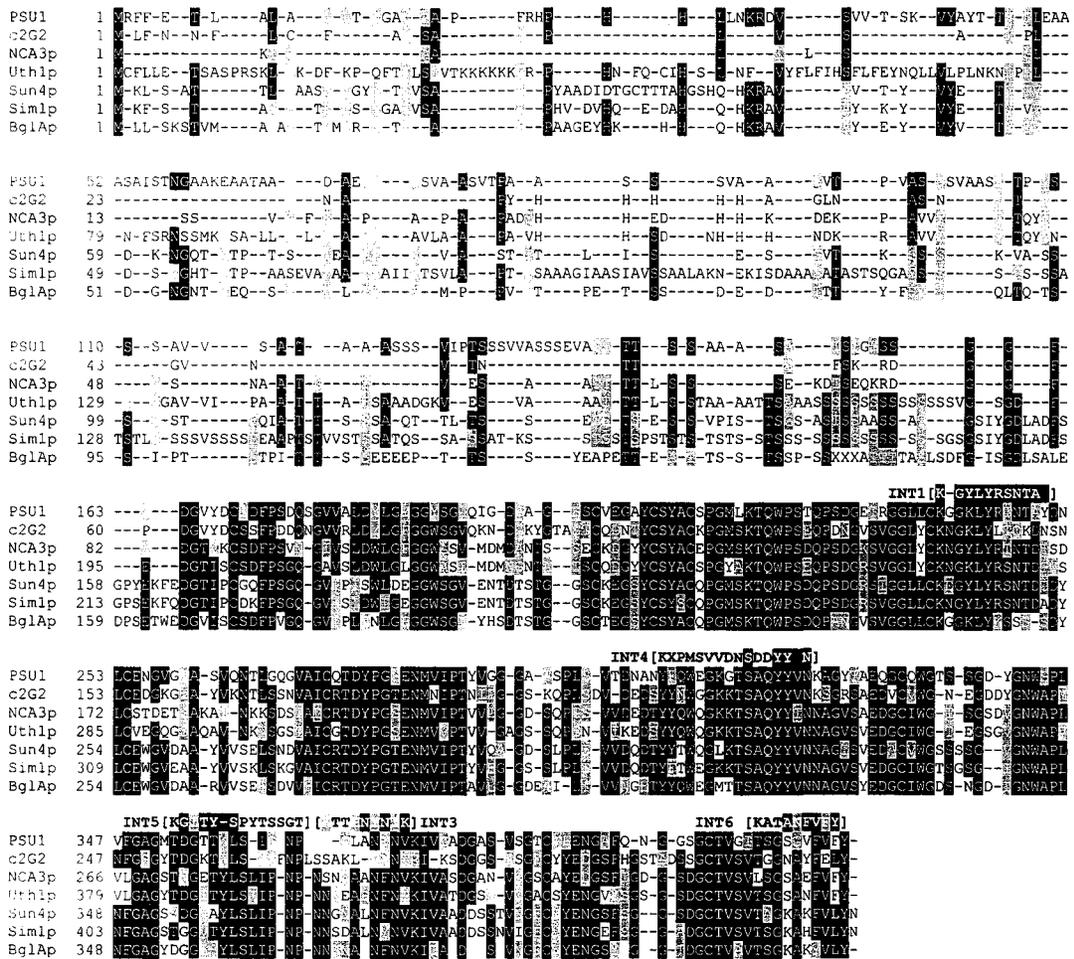


Figure 2. Sequence alignment of SUN proteins with WmKT peptides. UTH1p, SUN4p, SIMp, NCA3p are SUN proteins from *S. cerevisiae*. Bgl1A is a β -glucosidase of *C. wickerhamii* (Cw). PSU1 and c2G2 are two proteins of *S. pombe* (Sp). Alignment of SUN proteins was performed using the Clustal software. Alignment of peptides with SUN proteins was deduced from similarity search in protein sequence database with the BLAST network. GenBank Accession Nos: *PSU1*, 5822708; *NCA3p*, 1008306; *UTH1*, 486485; *SUN4*, 1301945; *SIM1*, 322376.

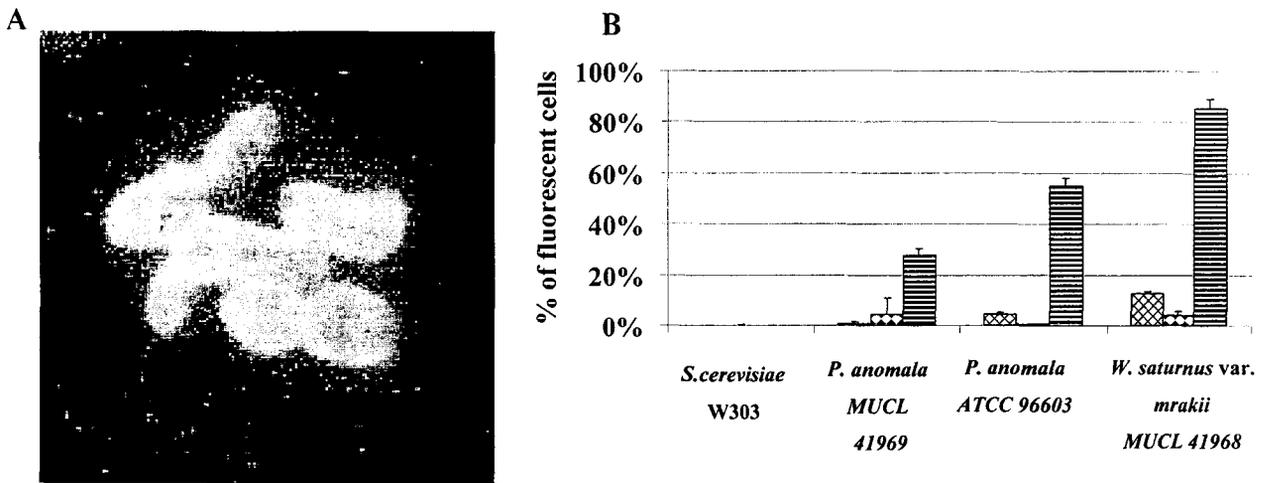


Figure 3. Immunodetection of WmKT with anti-WmKT polyclonal antibodies (WmKTAbs). (A) Fluorescence microscopy analysis of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 immunolabeled with WmKTAbs. (B) Flow cytometry analysis of yeasts immunolabeled with WmKTAbs (▨). As negative controls, the assays were carried out using pre-immune serum instead of Wm KTAb (⊗), to check unspecific immunolabeling with secondary antibody, IFA were performed using PBS instead of WmKTAb (⊙). The results are expressed as the mean of percentage of labeled cells +/- SD.

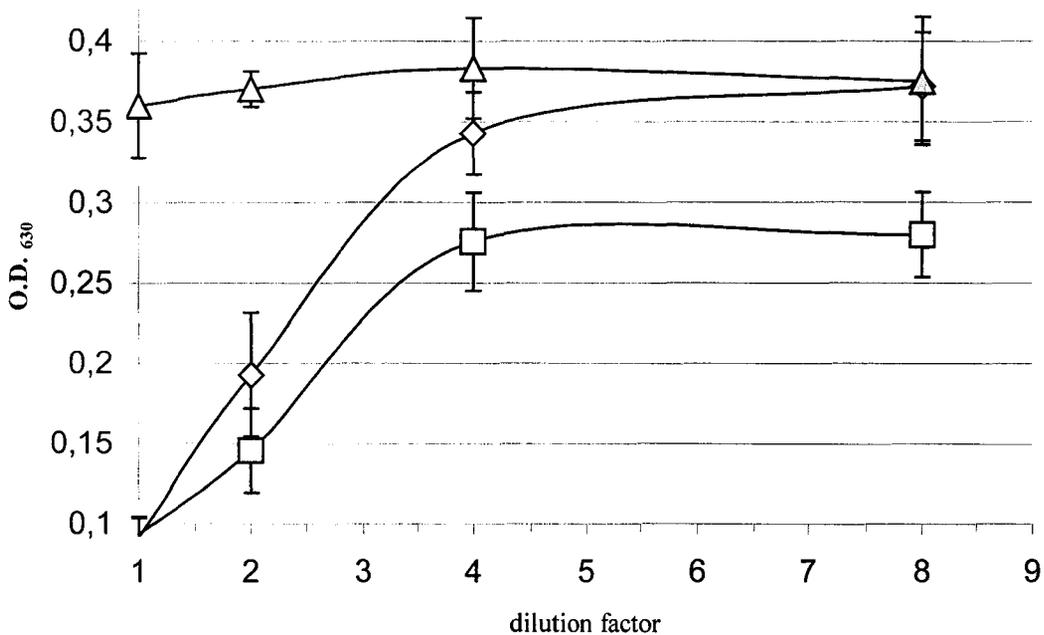


Figure 4. Neutralization of killer toxin activity using WmKTAbs. 100 µg of anti-killer toxin WmKTAbs and serial dilutions of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 conditioned growth medium were mixed. The mixtures were incubated overnight at 4°C and the killer toxin activity assays were performed as described in Material and Methods. Means and standard deviations were calculated from three independent experiments: (—△—) Toxin free control; (—◇—) WmKTAbs mixed with diluted *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 conditioned growth medium; (—□—) control antibodies mixed with dilution of conditioned supernatant.

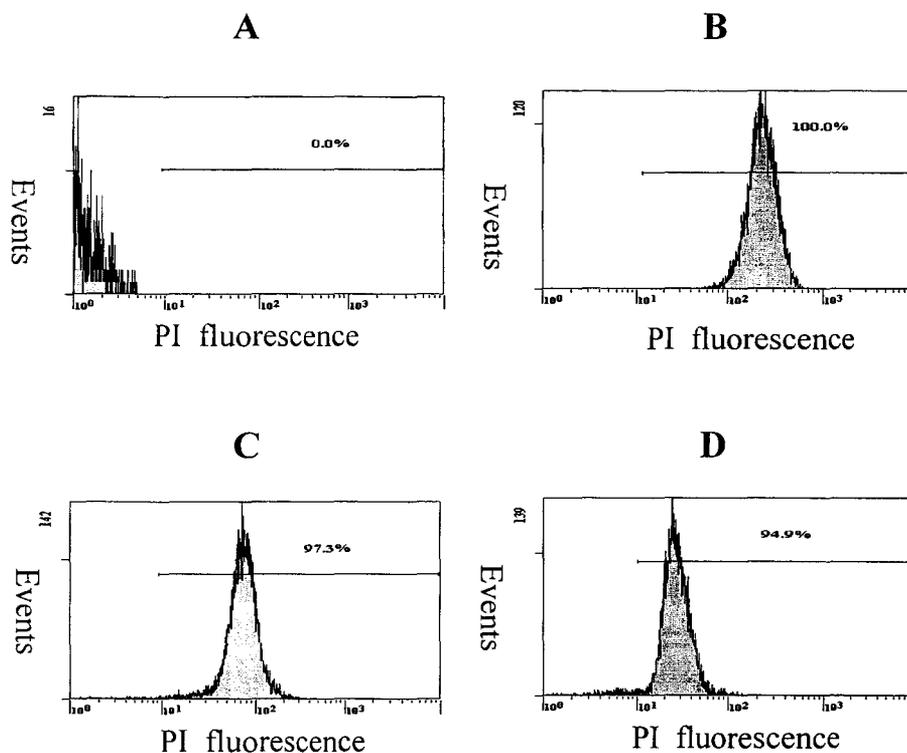


Figure 5. Flow cytometry analysis of a yeast susceptible strain treated with WmKT and stained with propidium iodide (PI). 10^6 *P. anomala* MUCL 41969 cells were mixed with conditioned growth medium of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 or purified WmKT. After 3h of incubation cells were resuspended and stained in a PBS solution containing 10 μ g/ml of PI. (A) PI fluorescence histogram of cells mixed with unconditioned growth medium. (B) Fluorescence histogram of heat killed cells stained with PI. (C) PI fluorescence histogram of cells mixed with conditioned growth medium. (D) PI fluorescence histogram of cells mixed with purified WmKT.

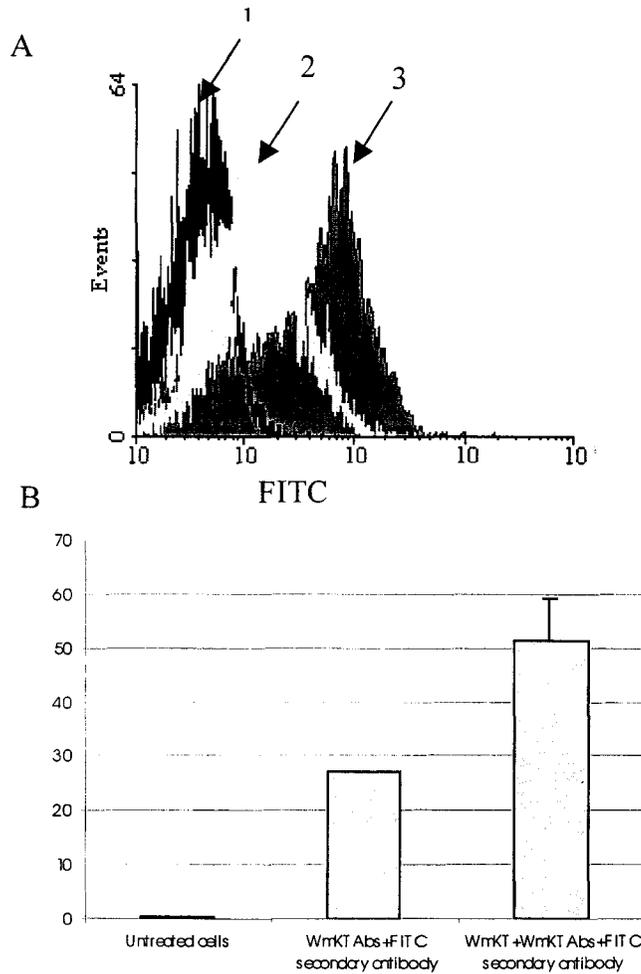


Figure 6. Flow cytometry analysis of immunolabeled killer toxin bound to sensitive yeast cells. Sensitive yeast cells were incubated with conditioned growth medium of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. After this incubation, immunofluorescence assays (IFA) were performed using WmKT Abs. (A) Fluorescein isothiocyanate fluorescence histograms. (A.1) Fluorescence histogram of untreated cells. (A.2) Fluorescence histogram obtained for IFA performed without prior incubation with WmKT. (A.3) Fluorescence histogram obtained for IFA performed after incubation with WmKT. (B) FITC fluorescence intensities greater than that noted for the untreated control cells were defined as a labeling signal and the proportion of fluorescent labeled cells was determined. All IFA experiments were performed in triplicate and results are expressed as the mean of percentage of labeled cells \pm SD.

Chapitre IV

**Identification des récepteurs de la WmKT et étude du
mécanisme d'action de la toxine**

Introduction

Les mesures d'activité antifongique de la WmKT que nous avons réalisées sur des mutants de *S. cerevisiae* déficients en production de β -glucanes ont suggéré que ces polysaccharides constituent les récepteurs, voire la cible potentielle de la toxine. Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences complémentaires pour déterminer si la fixation de la WmKT sur ces polysaccharides est une étape indispensable à son mécanisme d'action ou si la toxine est capable d'exercer son activité sur des sphéroplastes de *S. cerevisiae* comme dans le cas des expériences menées sur la toxine K1.

Par ailleurs, l'analyse de la séquence partielle de la toxine purifiée a montré que la WmKT possède des homologies avec les protéines de levures de la famille SUN. Parmi ces protéines, se trouvent Sun4p, Psu1p et Bglap qui sont toutes impliquées dans la synthèse de la paroi. Les publications décrivant ces protéines ont suggéré qu'elles possèdent une activité enzymatique de type transglycosidase ou glycosidase. Sur la base de ces travaux, nous avons voulu déterminer si la WmKT pouvait être neutralisée par des inhibiteurs enzymatiques spécifiques et si elle possédait une activité hydrolytique vis-à-vis des sucres. Enfin, pour corroborer nos conclusions, nous avons étudié les modifications ultrastructurales occasionnées par l'action de la WmKT sur les cellules cibles.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans le manuscrit intitulé « **Involvement of β -glucan in the wide spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin.** » Cyril Guyard, Eric Dehecq, Jean-Pierre Tissier, Luciano Polonelli, Eduardo Dei-Cas, Jean-Charles Cailliez and Franco D. Menozzi. **En préparation**

Involvement of β -glucan in the wide spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin.

CYRIL GUYARD ^{a,b,*}, ERIC DEHECQ ^c, JEAN-PIERRE TISSIER ^d, LUCIANO POLONELLI ^e, EDUARDO DEI-CAS ^{a, b, f}, JEAN-CHARLES CAILLIEZ ^{a,b,c} and FRANCO D. MENOZZI ^{b, g}

^aLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP 245, 59019 Lille, France

^bIFR17, Institut Pasteur de Lille, Lille, France, ^cLaboratoire Environnement et Santé, Université Catholique de Lille, Lille, France, ^dINRA centre de recherche de Lille, Villeneuve d'Ascq, France,

^eDipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy,

^fCentre Hospitalier et Faculté de Médecine, Lille, France,

^gINSERM U447. Mécanismes Moléculaires de la Pathogénie Microbienne, Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France

*Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP245, 59019 Lille Cedex, France. Phone : +33.320.87.71.57 - Fax : +33.320.87.79.08 - E-mail: Cyril.Guyard@pasteur-lille.fr

Abstract

Williopsis saturnus var. *mrakii* MUCL 41968 secretes a 85-kDa glycoprotein killer toxin which displays cytotoxic activity against a wide range of microorganisms. WmKT was proposed to bind to sensitive cell surface using β -glucans as receptor, since *S. cerevisiae* β -glucan mutants were resistant to WmKT. Here, we present data supporting this hypothesis since β -glucanase exerted an antagonistic effect on WmKT activity. Moreover, spheroplasts derived from sensitive yeast cells were shown to be resistant to WmKT, suggesting that cell wall β -glucan were required for WmKT lethal effect. Since WmKT exhibits sequence similarities with proteins suspected to have glucanase activity, we investigated the effect of castanospermine, a potent glucosidase inhibitor, on WmKT activity. Castanospermine totally abolished WmKT killer activity as well as its hydrolytic enzymatic activity against *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside. These results suggest that WmKT acts on sensitive yeast cells through a hydrolytic activity that disrupts the cell wall as demonstrated by electron microscopy studies.

Keywords: *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968; WmKT; β -glucan, β -glucosidase.

1. Introduction

In the past decade, a significant increase in the prevalence of resistance to antibacterial and antifungal agents has been reported [1, 2]. The emergence of infectious agents resistant to conventional treatments has highlighted the need for novel antimicrobial agents. Among the new potential antimicrobial molecules, specific yeast mycocins (killer toxins) represent promising candidates since they display wide spectra of activity [3, 4]. Because of its particularly wide spectrum of activity, the killer toxin (WmKT) produced by *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968, previously reported as a *Pichia anomala* K36 killer toxin [5], has been extensively described. WmKT antimicrobial activity has been demonstrated *in vitro* against *Candida albicans*, *Pichia anomala*, *Pneumocystis carinii* and *Saccharomyces cerevisiae* [6, 7]. Moreover, its potent antimicrobial effect was demonstrated using a rat model of experimental pneumocystosis [6].

Optimal WmKT activity is observed in acidic conditions (around pH 4.6) and at a temperature of 26-28°C. WmKT is specifically recognised by mAbKT4, a mouse monoclonal antibody, that neutralizes its killer activity [8]. Recently, anti-idiotypic antibodies displaying killer toxin activity (KTIdAbs) were produced by immunising mice with mAbKT4. These KTIdAbs were shown to exert a lethal effect against the WmKT sensitive microorganisms [9, 10]. Moreover, they were shown to be active against isolates of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and antibiotic-resistant Gram-positive cocci [11, 12]. These results suggest that WmKT or its active derivatives could be used for the development of new therapeutic and prophylactic strategies. Nevertheless, despite an extensive study of WmKT and KTIdAbs activities, the molecular mechanism of their antibiotic effect remained poorly understood, and the targets of these killer molecules were not identified.

In a previous study, we purified and partially characterized WmKT [13]. WmKT was shown to be a 85-kDa glycoprotein sharing structural similarities with yeast cell wall proteins suspected to exhibit glucosidase activity. We also demonstrated that soon after its binding to target cells, WmKT induces a perturbation of cell permeation leading to death.

In this report, we show that the killer activity of WmKT requires the interaction between the mycocin and cell surface β -glucans. Moreover, we present data suggesting that WmKT exhibits

β -glucanase activity that disrupts the cell wall integrity as demonstrated by scanning electron microscopy studies.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains, growth media and chemicals.

W. saturnus var. *mrakii* MUCL 41968 that produces WmKT was used as killer yeast strain while *P. anomala* MUCL 41969 was used as WmKT-sensitive strain [5]. Sabouraud broth (Tryptone 5 %, Meat Peptone 5 %, Dextrose 20 %) buffered at pH 4.6 with 0.1 M citric acid and 0.2 M sodium phosphate was used as growth medium for killer toxin assays. Yeast Minimal Medium (YMM) buffered at pH 3.5 with 25 mM citric acid was used to produce WmKT. Amphotericin B, Zymolyase were purchased from Bristol-Myers Squibb (Paris, France) and ICN Pharmaceuticals Inc. (Costa Mesa, USA), respectively. Castanospermine and gluconolactone were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.2 Spheroplast production

Approximately 10^6 yeast cells from a 16-20 hours culture performed at 30°C in liquid Sabouraud medium, were successively washed with 1 ml physiological water and 1 ml 1 M sorbitol. The pellet was then carefully resuspended in 10 ml of 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 10 mM EDTA, 1 M sorbitol, 30 mM β -mercaptoéthanol and 300 μ g/ml of zymolyase (ICN). The cell suspension was then stirred at 30 rpm for 30 min at room temperature, and finally washed in 1 ml 1 M sorbitol. The number of spheroplasts was adjusted to 10^6 cells/ml.

2.3. WmKT purification

WmKT was purified from the culture medium of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 as previously described [13]. Briefly, a colony of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 was used to inoculate a 200-ml preculture in YMM. After 48 h of growth at 26°C and 70 rpm, four flasks (2-liter volume) containing 450 ml of YMM were seeded each with 50 ml of this preculture. After 15 h of growth at 26°C and 70 rpm, yeast cells were harvested by centrifugation (5,000 x g for 10 min), and the clarified supernatant was collected. After addition of 10 tablets of EDTA-free protease inhibitor cocktail (Complete™ Roche, Mannheim, Germany), the 2 liters of spent

growth medium were applied onto a Macro-Prep High S (Bio-Rad, Hercules, USA) ion exchange chromatography column (10 cm x 2.5 cm) equilibrated with 25 mM sodium acetate (pH 3.5). After extensive washing with 25 mM sodium acetate buffer (pH 3.5), elution was achieved by passing 25 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) containing 1 M NaCl. Eluted fractions containing purified WmKT were stored at -80°C until further use.

2.4. Killer toxin activity assays

For the microassays, purified WmKT at various concentrations in 50 μl 25 mM sodium acetate buffer pH 3.5 was mixed with 200 μl liquid Sabouraud broth containing 5×10^4 *P. anomala* MUCL 41969 cells seeded into the wells of 96-well microplates (Costar, Brumath, France). The microplates were then incubated at 26°C for 18-20 h and the growth of the killer toxin-sensitive strain was monitored by measuring the optical density at 630 nm (OD_{630}) using an automatic plate recorder (Bio-tek Instruments, Inc, Winooski, USA). Killer toxin activity was detected through growth inhibition of the sensitive strain compared to a toxin-free control microculture [14]. Assays were performed in triplicate and the results are expressed in mean of % of growth inhibition +/- standard deviation compared to a WmKT-free control culture.

For the agar diffusion assays, perpendicular trenches of approximately 100 μl were made in the Sabouraud agar medium previously seeded with *P. anomala* MUCL 41 969. One hundred μl of WmKT (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$), amphotericin B (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or Zymolyase (20mg/ml) solution were added to the trenches and the Petri dishes were then incubated for 20 hours at 26°C .

To perform CFU assays, 10^3 *P. anomala* MUCL 41 969 cells were incubated with 100 μl of 25 mM sodium acetate buffer pH 4.6 containing 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of WmKT for 5 hours at 26°C . Cells were then plated on solid Sabouraud medium. After 48 hours of incubation at 26°C , CFU were enumerated. Assays were performed in triplicate and the results expressed as average % of CFU +/- standard deviation compared to a culture with heated-inactivated WmKT.

2.5. Hydrolytic activity measurement

Hydrolytic activity of WmKT was assayed using *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl *N*-acetyl-glucosaminide or *p*-nitrophenyl α -D-

galactopyranoside (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) as substrates. The assays were performed by incubating for 10 hours at 26°C 100 µl of 25 mM sodium acetate buffer pH 4.6 containing 30 µg of purified WmKT and 100 µl of 1 mM *p*-nitrophenyl-coupled substrate diluted in 50 mM sodium acetate buffer pH 4.6. Following incubation, reaction was stopped by addition of five volumes of 1 M sodium carbonate buffer was added and *p*-nitrophenol release was quantified by measuring OD₄₀₅. The results are expressed as the concentration of *p*-nitrophenol released per microgram of WmKT.

2.6. Flow cytometry analyses

Flow cytometry analyses were performed using a Coulter Epics XL flow cytometer (Coultronics, Margency, France). Propidium iodide (PI) fluorescence was collected through a 645-nm dichroic band-pass filter after being reflected by a 620-nm dichroic long pass filter. Before each analysis, 3 and 6 µm green latex beads (Coultronics S.A., Margency, France) were used to calibrate the light scatter and fluorescence parameters. To know whether WmKT activity was sensitive to β-glucosidase inhibitors, 40µg of WmKT in 100 µl of acetate buffer 25 mM (pH 4.6) were incubated for 1 hour at 26 °C in the presence 25 µM castanospermine. Then, 10⁶ overnight-grown *P. anomala* MUCL 41969 were added and incubation at 26 °C was continued for 5 hours. The cells were harvested by centrifugation (3,000 x g, 5 min at 4°C), washed twice with 1 ml PBS, resuspended in 1 ml of PBS containing 10 µg/ml of PI (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and the cell associated fluorescence was determined by flow cytometry analysis of 10,000 cells.

2.7. Scanning electron microscopy

Overnight grown *P. anomala* MUCL 41969 cells were enumerated using a Thoma cell count chamber, and 10⁶ cells were incubated at 26 °C for 5 hours in the presence of 40 µg of WmKT in 100 µl 25 mM sodium acetate buffer pH 4.6. The cells were then collected, by centrifugation and resuspended at a density of 10⁶ cells/ml in PBS, and fixed for 5 hours at room temperature in a 1.25% (v/v) glutaraldehyde solution prepared in 100 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0). After filtration through a 25-mm diameter and 0.2-µm porosity Anodisc (Whatman, Maidstone,

UK), the cells were rinsed five times for 10 min with 25 ml cacodylate buffer. Post-fixation was performed for 3 hours in a 1% OsO₄ solution prepared in cacodylate buffer, followed by five washes in ultrapure water. The samples underwent progressive dehydration by successive soaking in 50, 70, 95 and 100 % ethanol. Soaking in isopentyle acetate was performed before critical-point drying in CO₂ using a EMDSCOPE CPD 750 apparatus. The filters were then attached to large scanning electron microscopy stubs and coated with gold-palladium by cathodic spreading in a Polaron E 5100 coater. Sample observation and microphotographs were done in a JEOL JSM35CF scanning electron microscope operating at a voltage of 10 kV.

3. Results

3.1. Interaction between WmKT and cell wall β -glucan.

WmKT which is secreted by *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 has been shown to bind to the surface of sensitive yeasts cells. Since β -glucans represent the major constituent of yeast cell wall and WmKT displays amino acid sequence similarities with yeast proteins suspected to be glucanases, we hypothesized that β -glucans could be a target for WmKT. Using an agar diffusion assay, this hypothesis was first tested by investigating the effect of zymolyase (an enzyme with β 1,3-glucanase activity) and WmKT on the growth of *P. anomala* MUCL 41969. As shown in figure 1A, both molecules inhibited the yeast growth. However although 50 times more concentrated, zymolyase induced growth inhibition weaker than that induced by WmKT, confirming the potent killer activity of this mycocin. Interestingly, zymolyase reduced the WmKT toxic effect as demonstrated by the narrowed WmKT inhibition area at the vicinity of the zymolyase containing trench. This finding suggests that zymolyase and WmKT have antagonist effects.

Control experiment was performed using WmKT and amphotericin B, a fungicidal agent which is not targeted on β -glucans but acts on cell membrane ergosterol (figure 1B). Both molecules induced similar growth inhibitions and no effect was observed, indicating that WmKT and amphotericin B does not interfere with WmKT.

Next, we investigated the effect of WmKT on spheroplasts derived from killer toxin sensitive strain. *P. anomala* MUCL 41969 treated with zymolyase. The spheroplasts were then incubated for 5 hours at 26°C with 30 μ g/ml of WmKT. Controls using same incubation conditions consisted in *P. anomala* MUCL 41969 intact cell incubated with WmKT and heat-inactivated WmKT, and *P. anomala* MUCL 41969 spheroplasts incubated with heat-inactivated WmKT. As shown in figure 2, WmKT killed 79 % \pm 1.8% of the intact cells but only 20 % \pm 5.7% of the spheroplasts. These results indicate that zymolyase treatment of sensitive yeast cells induces resistance to WmKT antimicrobial effect, suggesting that interaction of the toxin with β 1,3-glucan is a requisite for the mycocin activity.

3.2 Effect of glycosidase inhibitors on WmKT killer activity.

In a previous study, we reported the partial amino acid sequence of WmKT which revealed homologies with proteins belonging to the yeast SUN family [15, 16]. Since some of the SUN proteins have been proposed to display glucosidase activity, we postulated that WmKT could act by hydrolysing cell wall carbohydrate compounds. To test this hypothesis, we performed broth liquid toxin microassays using purified WmKT mixed and various concentrations of glucosidase inhibitors. As shown in figure 3A, gluconolactone at concentrations ranging from 1 to 100 mM was without effect on WmKT activity.

In contrast, castanospermine exhibited a dose-dependent inhibitory effect which was pretty strong since at 25 μ M, it completely abolished the WmKT toxic activity (figure 3B). Because castanospermine alone did not affect the growth of *P. anomala* MUCL 41969 (data not shown), it suggested that its β -glucosidase inhibitory effect was directly responsible for the abolition of the WmKT-induced yeast killing. This effect could be explained by the fact that WmKT is a castanospermine-sensitive glucosidase and/or WmKT glucan receptors are affected in their biosynthesis during the yeast treatment with castanospermine. To discriminate between these two possibilities, 100 μ l of WmKT at 300 μ g/ml was pretreated with 25 μ M castanospermine. After 1 hour incubation at 26°C, WmKT was dialysed against 25 mM sodium acetate buffer (pH 3.5) and added to *P. anomala* MUCL 41969 cells. Following a 5-hours incubation at 26°C, the cells were stained with PI and analysed by flow cytometry for mortality [17]. When the cells were treated with buffer alone or buffer containing 25 μ M castanospermine, no significant PI labeling was observed, indicating an absence of cell mortality (figure 4C and 4D). In contrast, a PI labeling of 73.4% \pm 9.9% was observed following yeast treatment with WmKT (figure 4A). Since this labeling was reduced to 17.9% \pm 3.8% when using castanospermine-treated WmKT, it suggested that WmKT has an essential castanospermine-sensitive glucosidase activity (figure 4B).

3.3 WmKT exhibits hydrolytic activity.

The inhibition of WmKT by castanospermine suggested that this mycocin may exhibit hydrolytic activity. To address this hypothesis, purified WmKT was incubated with various

potential carbohydrate substrates covalently linked to *p*-nitrophenyl which cleavage can be monitored by spectrophotometry [18]. No significant *p*-nitrophenol release was detected using *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl *N*-acetyl-glucosaminide or *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside (data not shown). However, WmKT was shown to exert an hydrolytic activity against *p*-nitrophenol β -D-glucopyranoside (DNPG) (figure 5A). Indeed, using 1 mM of DNPG as substrate, 16.6 μ M +/- 0.16 μ M of *p*-nitrophenol was released per microgram of purified WmKT in a 10-h period. As shown in figure 5A, this enzymatic activity was specifically inhibited by 25 μ M of castanospermine. Since this castanospermine concentration also inhibited the WmKT-induced killing of *P. anomala* MUCL 41969, it further suggested that WmKT exerts its toxic effect through glucanase activity. No DNPG hydrolysis was detected using WmKT previously heated at 100°C for 10 min, confirming the reported thermolability of WmKT [19]. Since WmKT was shown to be active in acidic conditions (around pH 4.6), *P. anomala* MUCL 41969 growth inhibition and DNPG hydrolysis assays were carried out at pH 4.6 and 6.0. As shown in figure 6A and 6B, a similar pH-dependance was demonstrated for growth inhibition and DNPG hydrolysis since both activities were reduced by ca 55% when passing from pH 4.6 to pH 6.0. Interestingly, purified WmKT partially neutralized to pH 6.0 for 1 hour followed by dialysis against 25 μ M sodium acetate buffer (pH 4.6) failed to induce *P. anomala* MUCL 41969 growth inhibition or DNPG hydrolysis (figure 6C), indicating an irreversible lability of WmKT.

3.4. Ultrastructure of yeast cells treated with WmKT.

Since β -glucan were shown to be required for the toxic activity of WmKT, we wanted to know whether treatment of *P. anomala* MUCL 41969 cells caused an ultrastructural modification of the yeast cell wall. After incubation for 5 hours at 26°C with 40 μ g of WmKT in 100 μ l of acetate buffer 25 mM (pH 4.6), *P. anomala* MUCL 41969 were observed by scanning electron microscopy. Compared to yeasts incubated in the absence of the mycocin (figure 7A), the WmKT-treated *P. anomala* MUCL 41969 cells exhibited a rough surface that could be the result of partial degradation of cell wall glucans (figure 7B). To know whether such a phenotype was linked to glucan hydrolysis, *P. anomala* MUCL 41969 were treated for 5 hours at 26°C with 400 μ g/ml of zymolyase revealing a surface phenotype (figure 7C) similar to that observed with WmKT. This suggests that WmKT toxic activity is due to its ability to hydrolyze the β -glucans

present in the cell wall of sensitive yeast cells, leading to an increased cell permeability as demonstrated by the PI staining experiments.

4. Discussion

The *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin is active against a wide range of sensitive infectious agents including *C. albicans* and *P. carinii* [3-5]. Extensive studies reported that WmKT or WmKT-like anti-idiotypic antibodies could represent new therapeutic molecules for the treatment of microbial infections [11, 12, 20-22]. Despite all these studies, the molecular mechanism of WmKT induced killing still remained unknown. Recently, we purified WmKT to homogeneity and demonstrated that it is an 85-kDa glycoprotein that induces rapid cell permeation [13]. We suggested that WmKT could act by binding to β -glucan, since a *S. cerevisiae* strain bearing a mutation in *KRE1* [23], a gene involved in β 1,6-glucan synthesis, was resistant to the killer toxin and a *S. cerevisiae* null mutant for *KNR4* gene involved in β 1,3-glucan synthesis [24] was shown to be partially resistant to WmKT. In this study, we report several observations that further support this hypothesis. First we observed an antagonism between β 1,3-glucanase enzyme and WmKT activity, indicating that intact β -glucans are required for the WmKT-induced killing and may therefore be the mycocin receptor. β -glucans as killer toxin receptors have already been described for a *P. membranifaciens* killer toxin [25], *S. cerevisiae* K1 and K2 killer toxins [26] that bind to β 1,6-glucan. Moreover, β 1,6-glucan and β 1,3-glucan were demonstrated to be the cell wall receptors of *Hansenula mrakii* LKB 169 killer toxin (HM-1) [27].

Spheroplasts derived from *P. anomala* MUCL 41969 cells treated with β -glucan-degrading enzyme zymolyase exhibited a resistance to WmKT, confirming the requirement of β -glucans for the mycocin activity. Since the *S. cerevisiae* K1 killer toxin which causes cell death through activation of Tok1p potassium channel [28] only uses β -glucans as primary receptor but remains active against spheroplasts of sensitive cells [29], it suggests that β -glucans could be a major enzymatic target of WmKT and not a simple primary receptor.

Since sequence analysis of WmKT revealed homologies with yeast SUN proteins, a protein family including cell wall proteins suspected to be glucanase [15, 16], WmKT was investigated for potential hydrolytic activity which could result in hydrolysis of yeast cell wall β -glucans, and therefore explain the mycocin lethal activity. This was tested using β -glucosidase inhibitors. Such a specific inhibition strategy has been successfully used to demonstrate that the chitinase activity of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin is inhibitable by allosamidin which leads to the abolition of the toxin lethal effect [30]. When incubated with *P. anomala* MUCL 41969 in the presence of the glucosidase inhibitor castanospermine,

WmKT failed to kill yeast cells, suggesting that the killer toxin has glucosidase activity. Our study also suggests that WmKT act by hydrolysing a cell wall carbohydrate component such as β -glucan which could be the target of this enzymatic activity.

The hydrolytic activity was then investigated using various sugar substrates covalently linked to *p*-nitrophenyl. This *in vitro* enzymatic approach allowed us to show that purified WmKT is able to hydrolyse *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside but not *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl *N*-acetyl-glucosaminide and *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside. This indicates that WmKT displays β -glucosidase activity which could be totally inhibited by castanospermine. The enzymatic assays performed in this study showed that WmKT exhibited a weak but specific hydrolytic activity against DNPG. Such a weak activity against DNPG has been already reported for some yeast exoglucanases which were more efficient against glucose polymers [31]. We also showed that the WmKT β -glucosidase activity and its killing effect exhibit exactly the same pH dependence, suggesting that WmKT-induced lethality is linked to the enzymatic activity of the mycocin. According to this, WmKT would hydrolyse cell wall glucans present in sensitive cells. Similar mechanism has been already described in plant and fungi which defend themselves against invasion by producing such enzymes [32-34]. The hypothesis of a glucosidase activity correlated to WmKT lethal is consistent with a previous observation showing that *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 is resistant to zymolyase. Moreover, the cell wall-degrading activity of WmKT was confirmed by scanning electron microscopy which revealed that WmKT treatment of *P. anomala* 41 969 leads to a rough cell surface as observed following treatment with zymolyase. A similar effect on the cell wall morphology has recently been reported for the K2 killer toxin of *S. cerevisiae* that also binds to β -glucan, but its mechanism of action is still unidentified [35, 36].

The results presented in this study constitute the first steps in the elucidation of the killing mechanism of WmKT. Further characterization of the WmKT enzymatic activity as well as the cloning of its encoding gene will represent the next investigation step towards a better understanding of this therapeutically promising toxin.

Acknowledgements

C.G. is supported by a Ph.D. grant from the Région Nord Pas-de-Calais (France) and the Institut Pasteur de Lille (France). The Fondation pour la Recherche Médicale and FEDER funding granted this work.

References

- [1] Cohen, M.L. (2000) Changing patterns of infectious disease. *Nature* 406, 762-767.
- [2] Ghannoum, M.A. and L.B. Rice (1999) Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12, 501-517.
- [3] Cailliez, J.C., N. Seguy, E.M. Aliouat, L. Polonelli, D. Camus, and E. Dei-Cas (1994) The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Med Hypotheses* 43, 167-171.
- [4] Conti, S., W. Magliani, M. Gerloni, A. Salati, E. Dieci, S. Arseni, P. Fisicaro, and L. Polonelli (1998) A transphylectic anti-infectious control strategy based on the killer phenomenon. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22, 151-161.
- [5] Guyard, C., P. Evrard, A.M. Corbisier-Colson, H. Louvart, E. Dei-cas, F.D. Menozzi, L. Polonelli, and J.C. Cailliez (2001) Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with a *Williopsis var. saturnus mrakii* killer toxin. *Medical Mycology* 39, 395-400.
- [6] Seguy, N., J.C. Cailliez, L. Polonelli, E. Dei-Cas, and D. Camus (1996) Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on *Pneumocystis carinii* infectivity to the SCID mouse. *Parasitol Res* 82, 114-116.
- [7] Polonelli, L. and G. Morace (1986) Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol* 24, 866-869.
- [8] Cailliez, J., C. Cantelli, S. Conti, M. Gerloni, W. Magliani, G. Morace, and L. Polonelli (1993) *Pichia anomala* killer toxin secretion in the presence of tunicamycin. *J. Med. Vet. Myc.* 31, 337-342.

- [9] Seguy, N., L. Polonelli, E. Dei-Cas, and J.C. Cailliez (1997) Monoclonal killer toxin-like anti-idiotypic antibodies to control rat-pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol* 44, 37S.
- [10] Polonelli, L., N. Seguy, S. Conti, M. Gerloni, D. Bertolotti, C. Cantelli, W. Magliani, and J.C. Cailliez (1997) Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 4, 142-146.
- [11] Conti, S., F. Fanti, W. Magliani, M. Gerloni, D. Bertolotti, A. Salati, A. Cassone, and L. Polonelli (1998) Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *J Infect Dis* 177, 807-811.
- [12] Conti, S., W. Magliani, S. Arseni, E. Dieci, R. Frazzi, A. Salati, P.E. Varaldo, and L. Polonelli (2000) *In vitro* activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant gram-positive cocci. *Mol Med* 6, 613-619.
- [13] Guyard, C., N. Séguy, J. Cailliez, H. Drobecq, L. Polonelli, E. Dei-cas, A. Mercennier, and F. Menozzi (submitted) Characterisation of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high-molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity.
- [14] Guyard, C., N. Seguy, M. Lange, I. Ricard, L. Polonelli, and J.C. Cailliez (1999) First steps in the purification and characterization of a *Pichia anomala* killer toxin. *J Eukaryot Microbiol* 46, 144S.
- [15] Skory, C.D. and S.N. Freer (1995) Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular beta-glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*. *Appl Environ Microbiol* 61, 518-525.
- [16] Mouassite, M., N. Camougrand, E. Schwob, G. Demaison, M. Laclau, and M. Guerin (2000) The 'SUN' family: yeast *SUN4/SCW3* is involved in cell septation. *Yeast* 16, 905-919.
- [17] Green, L., B. Petersen, L. Steimel, P. Haeber, and W. Current (1994) Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1088-1091.
- [18] Lin, J., B. Pillay, and S. Singh (1999) Purification and biochemical characteristics of beta-D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. *Biotechnol Appl Biochem* 30, 81-87.
- [19] Jackson, H.C., N. Seguy, E.M. Killigin, E. Dei-Cas, L. Polonelli, and J.C. Cailliez (1996) Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on the viability of rat-derived *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 43, 29S.

- [20] Seguy, N., L. Polonelli, S. Conti, E. Dei-Cas, D. Camus, and J.C. Cailliez (1996) In vitro decrease of rat-derived *Pneumocystis carinii* attachment induced by human natural yeast killer toxin-like antiidiotypic candidacidal antibodies. *J Eukaryot Microbiol* 43, 27S.
- [21] Polonelli, L., F. De Bernadis, S. Conti, M. Boccanera, W. Magliani, M. Gerloni, C. Cantelli, and A. Cassone (1996) Human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies. *J Immunol* 156, 1880-1885.
- [22] Beninati, C., M.R. Oggioni, M. Boccanera, M.R. Spinosa, T. Maggi, S. Conti, W. Magliani, F. De Bernardis, G. Teti, A. Cassone, G. Pozzi, and L. Polonelli (2000) Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotype in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol* 18, 1060-1064.
- [23] Boone, C., S.S. Sommer, A. Hensel, and H. Bussey (1990) Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J Cell Biol* 110, 1833-1843.
- [24] Hong, Z., P. Mann, N.H. Brown, L.E. Tran, K.J. Shaw, R.S. Hare, and B. DiDomenico (1994) Cloning and characterization of *KNR4*, a yeast gene involved in (1,3)-beta-glucan synthesis. *Mol Cell Biol* 14, 1017-1025.
- [25] Santos, A., D. Marquina, J.A. Leal, and J.M. Peinado (2000) 1, 6-beta-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl Environ Microbiol* 66, 1809-1813.
- [26] Hutchins, K. and H. Bussey (1983) Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1,6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol* 154, 161-169.
- [27] Kasahara, S., S. Ben Inoue, T. Mio, T. Yamada, T. Nakajima, E. Ichishima, Y. Furuichi, and H. Yamada (1994) Involvement of cell wall beta-glucan in the action of HM-1 killer toxin. *FEBS Lett* 348, 27-32.
- [28] Ahmed, A., F. Sesti, N. Ilan, T.M. Shih, S.L. Sturley, and S.A. Goldstein (1999) A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell* 99, 283-291.
- [29] Zhu, H. and H. Bussey (1989) The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Appl Environ Microbiol* 55, 2105-2107.
- [30] Butler, A.R., R.W. O'Donnell, V.J. Martin, G.W. Gooday, and M.J. Stark (1991) *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur J Biochem* 199, 483-488.

- [31] Ridruejo, J.C., M.D. Munoz, E. Andaluz, and G. Larriba (1989) Inhibition of yeast exoglucanases by glucosidase inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 993, 179-185.
- [32] Stintzi, A., T. Heitz, V. Prasad, S. Wiedemann-Merdinoglu, S. Kauffmann, P. Geoffroy, M. Legrand, and B. Fritig (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75, 687-706.
- [33] Yi, S.Y. and B.K. Hwang (1997) Purification and antifungal activity of a basic 34 kDa beta-1,3-glucanase from soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora sojae* f. sp. *glycines*. *Mol Cells* 7, 408-413.
- [34] Rey, M., J. Delgado-Jarana, and T. Benitez (2001) Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 604-608.
- [35] Vadasz, A.S., D.B. Jagganath, I.S. Pretorius, and A.S. Gupthar (2000) Electron microscopy of the K2 killer effect of *Saccharomyces cerevisiae* T206 on a mesophilic wine yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78, 117-122.
- [36] Meskauskas, A. and D. Citavicius (1992) The K2-type killer toxin- and immunity-encoding region from *Saccharomyces cerevisiae*: structure and expression in yeast. *Gene* 111, 135-139.

FIGURES

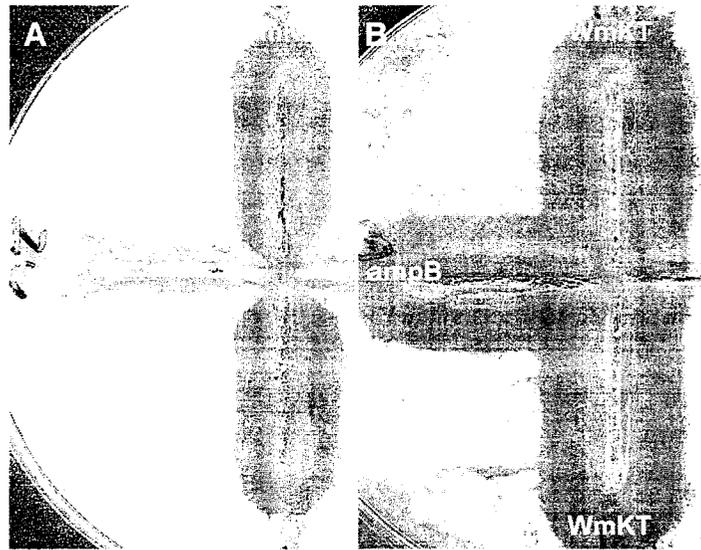


Fig. 1 Antagonistic effect of zymolyase on WmKT activity. Antifungal assays were performed using agar diffusion assays. The clear zones indicate *P. anomala* MUCL 41969 growth inhibition. (A) Growth inhibition areas induced by zymolyase (Zym) and WmKT. (B) Control experiments performed with WmKT and amphotericin B (ampB).

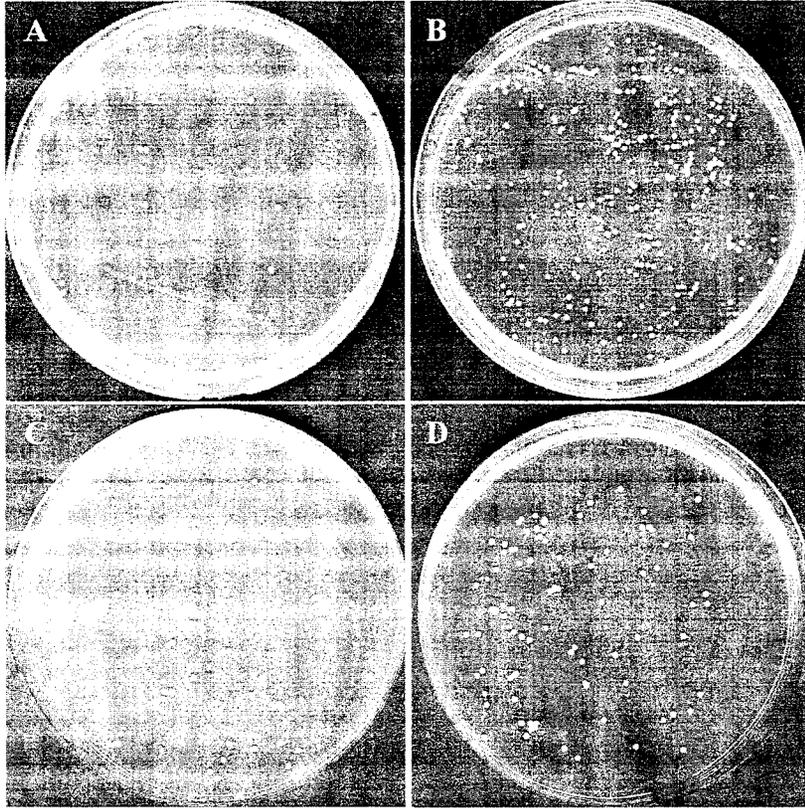


Figure 2. Effect of WmKT on spheroplasts of a toxin sensitive strain in a colony forming unit (CFU) assay. 10^3 cells of the *P. anomala* MUCL 41969 sensitive strain were incubated with WmKT (A) and with heat inactivated WmKT (B); 10^3 spheroplasts of the *P. anomala* MUCL 41969 sensitive strain were incubated with WmKT (C) and with heat inactivated WmKT (D). Aliquots were seeded on Sabouraud medium and CFU were numerated.

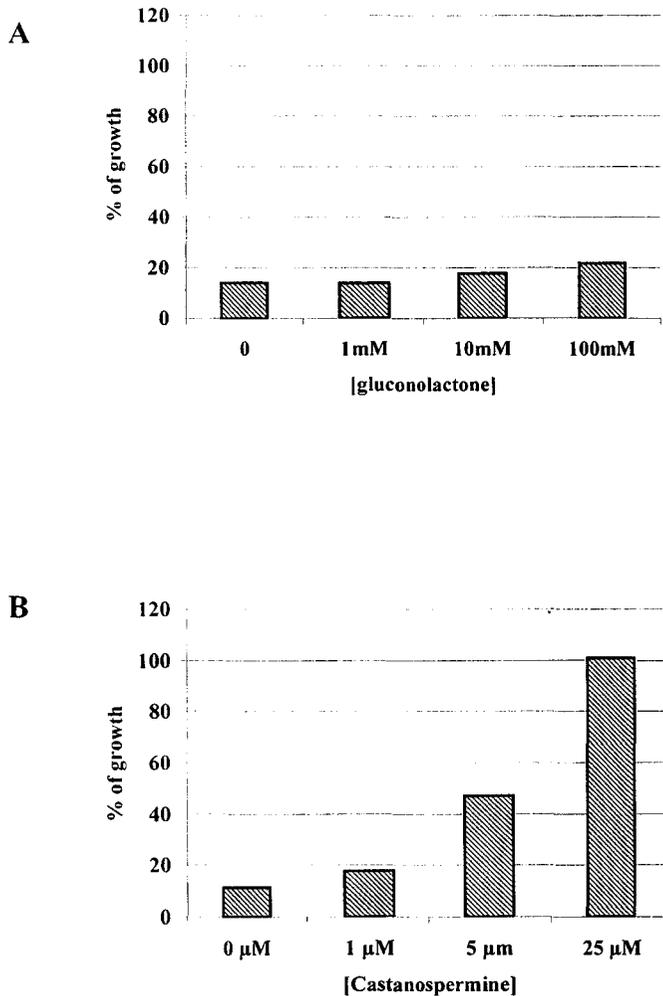


Fig. 3. Effect of the β -glucosidases inhibitor gluconolactone and castanospermine on WmKT activity. *P. anomala* MUCL 41969 cells were incubated for 18-20h at 26°C with 20 μ g/ml of WmKT mixed with various concentrations of gluconolactone (A) and castanospermine (B). The growth % of sensitive cells is indicated as the % OD₆₃₀ measured without toxin treatment.

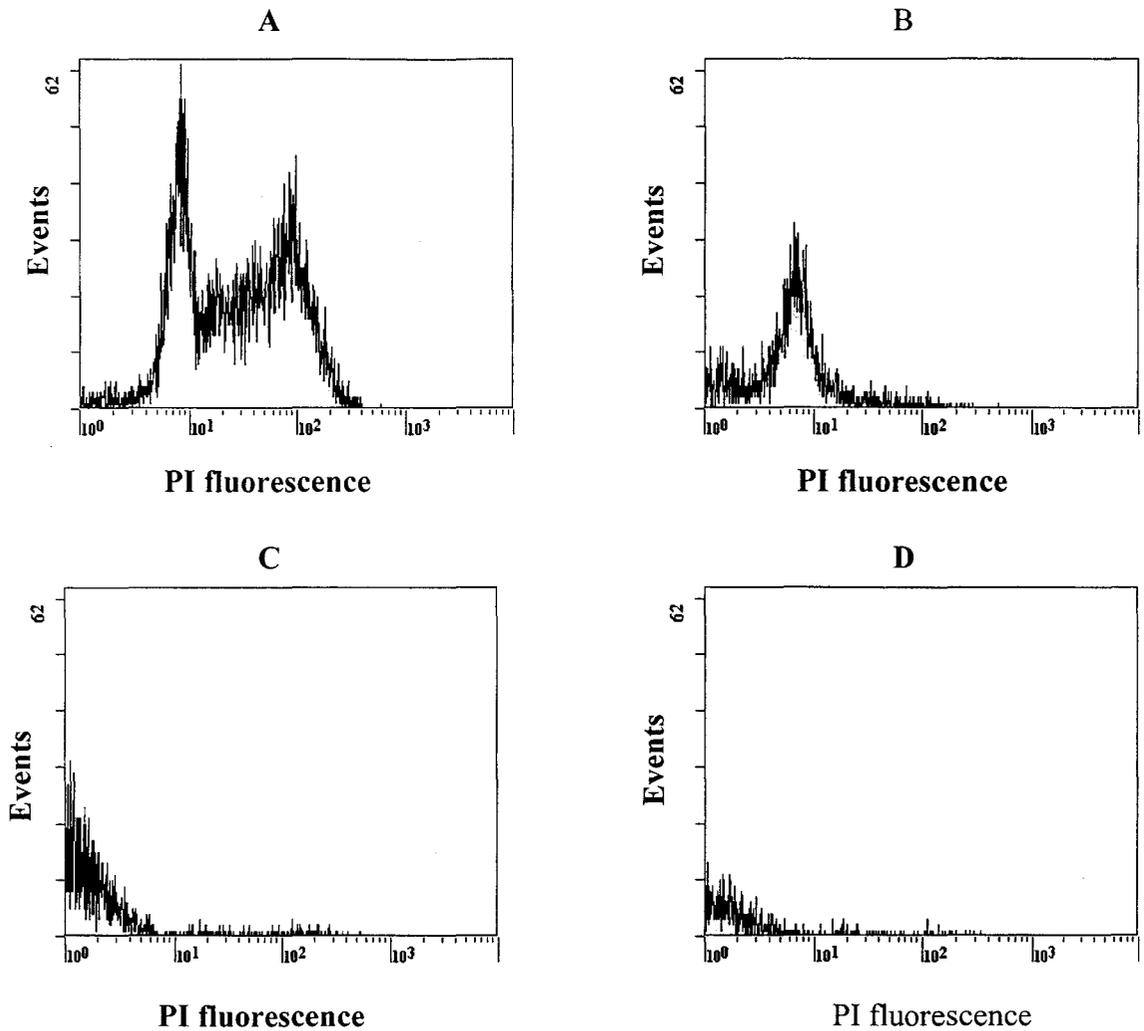


Fig. 4. Flow cytometry analysis of *P. anomala* MUCL 41969 cells stained with propidium iodide (PI). After treatment with WmKT, 10⁶ yeast cells were mixed with 300 µg/ml of purified WmKT in 25 mM sodium acetate buffer (pH 4.6) (A), 300 µg/ml of purified WmKT pretreated with 25 µM castanospermine (B), buffer alone (C) or buffer with 25 µM castanospermine (D). After staining with PI, cell associated fluorescence was determined.

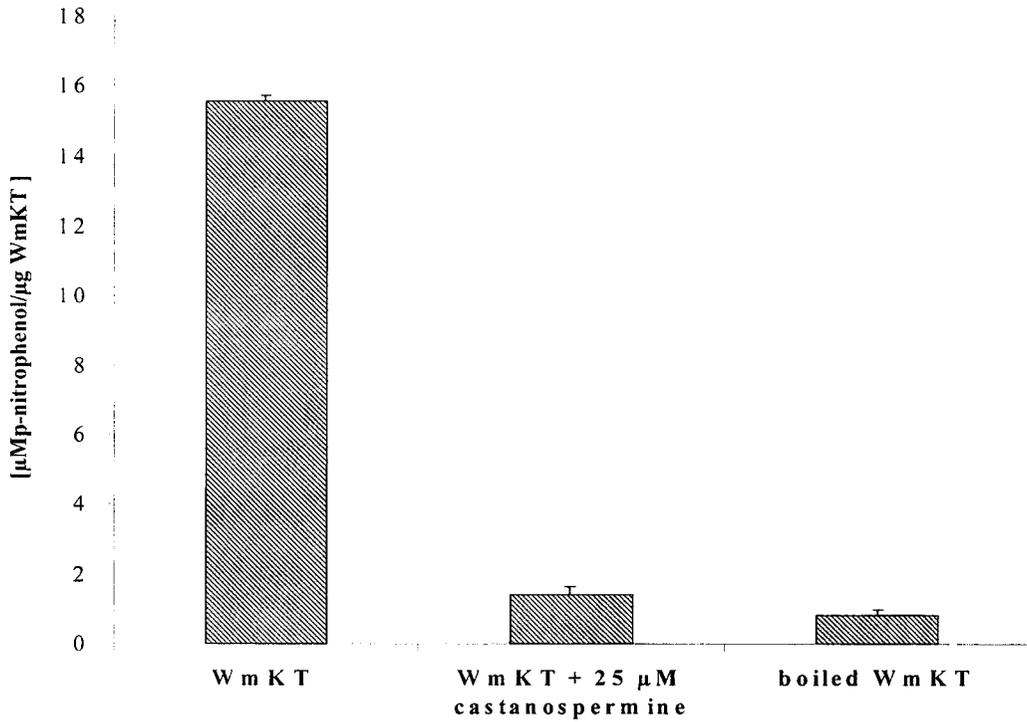


fig. 5. Glucosidase activity of *WmKT*. 1.8 μ g of purified *WmKT* was incubated for 10h at 26°C with 1 mM *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside in 50 μ l 25 mM sodium acetate (pH 4.6): (A) in the absence or (B) in the presence of 25 μ M castanospermine. (C) control experiments were performed using boiled *WmKT*.

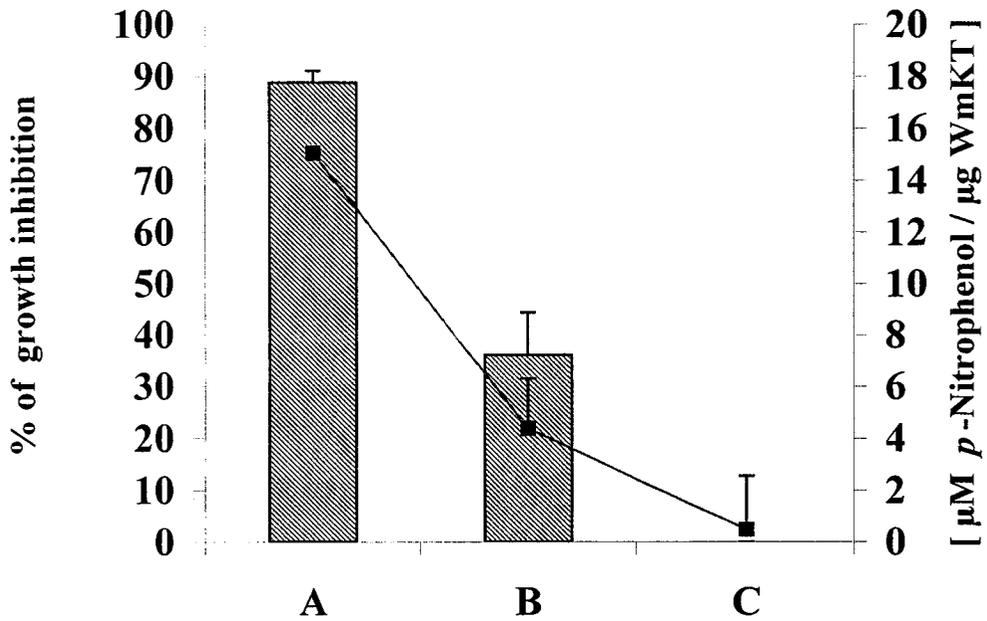


fig. 6 Comparison of glucosidase activity and growth inhibition activities of WmKT. Growth inhibition was measured as described in Material and Methods (histograms). Enzymatic activity was determined using *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside and expressed as the μM of *p*-nitrophenol released per μg of WmKT (curve). Both assays were performed at pH 4.6 (A) and pH 6.0 (B). (C) represents the results obtained using WmKT buffered at pH 4.6 followed by acidification to 4.6.

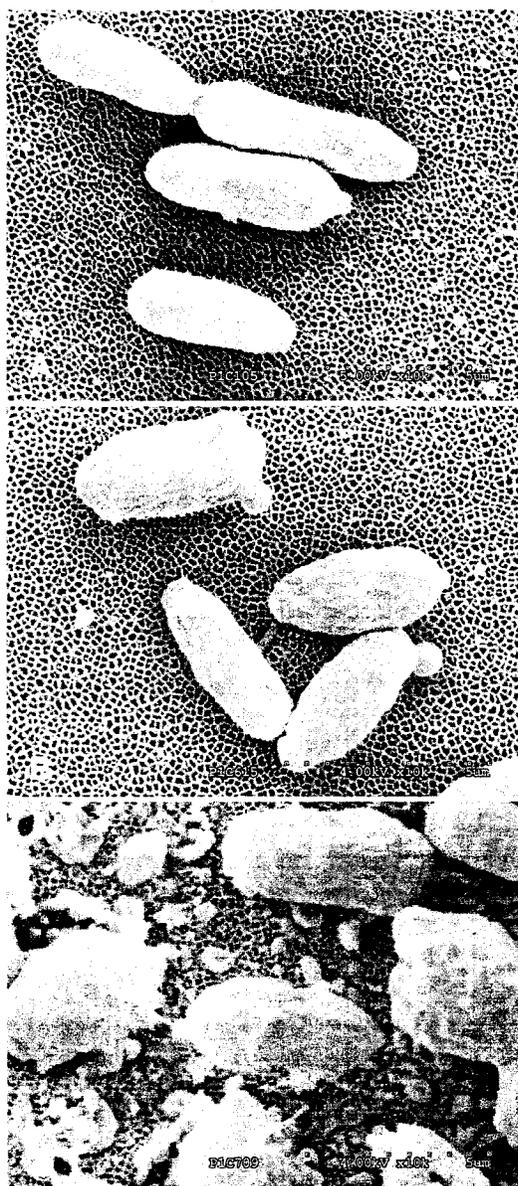


fig. 7. Scanning electron microscopy observation of *P. anomala* MUCL 41969 cells. Untreated cells (A) or cells treated for 5 hours with 300 µg/ml of purified WmKT (B) or cells treated with 400 µg/ml WmKT (C) were observed with a magnification of 10 000 X.

Chapitre V

Clonage et caractérisation de *WMSU1* :

**Un gène de *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL codant pour une
protéine apparentée à WmKT.**

Introduction

Le troisième objectif de notre travail était de cloner le gène codant pour la WmKT. Pour y parvenir nous disposions des données des séquençage partielle de la toxine. Nous avons alors déterminé des amorces oligonucléotidiques dégénérées, qui ont été utilisées dans des réactions de PCR sur le génome de *W. saturnus* var. *mrakii*. Les séquences des amplicons obtenus ont été comparées aux banques de données ainsi qu'aux données de séquences peptidiques de la WmKT. Malgré de nombreux essais, cette stratégie expérimentale est restée sans succès, sans doute à cause de l'importance de la dégénérescence des amorces oligonucléotidiques dont nous disposions.

Nous avons alors modifié notre stratégie : les données de caractérisation de la WmKT exposées dans le chapitre III suggéraient que la WmKT diffère des autres toxines killer et qu'elle est apparentée aux protéines de levure de la famille SUN. Nous avons alors entrepris d'isoler le gène d'intérêt sur la base de ces homologues de séquence en utilisant le gène *SUN4* de *S. cerevisiae* comme sonde d'hybridation. Notre choix s'est porté sur *SUN4* qui code pour Sun4p une protéine pariétale potentiellement glycosylée d'environ 90 kDa possédant donc des caractéristiques proches de celles de la WmKT.

Ces expériences nous ont conduit à isoler le gène *WMSU1*. Les résultats concernant l'isolement et la caractérisation de ce gène sont présentés dans le manuscrit intitulé « **Cloning and characterization of *WMSU1*, a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* gene encoding a new yeast SUN protein involved in the cell wall structure** ». Cyril GUYARD, Jean-Charles CAILLIEZ, Jean-Pierre TISSIER, Eduardo DEI-CAS, Annick MERCENIER, and Franco D. MENOZZI. Soumis à publication

Cloning and characterization of WMSU1, a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* gene encoding a new yeast SUN protein involved in the cell wall structure.

CYRIL GUYARD^{1,2*}, JEAN-CHARLES CAILLIEZ^{1,2,3}, JEAN-PIERRE TISSIER⁴,
EDUARDO DEI-CAS^{1, 2, 5}, ANNICK MERCENIER^{2, 6}, and FRANCO D. MENOZZI^{2, 7}

¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP 245, 59019 Lille, France, ²IFR17, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP 245, 59019 Lille, France, ³Laboratoire Environnement et Santé, Université Catholique de Lille, Lille, France, ⁵INRA centre de recherche de Lille, Villeneuve d'Ascq, France, ⁵Centre Hospitalier et Faculté de Médecine, Lille, France, ⁶Laboratoire de Bactériologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, France ⁷INSERM U447, Mécanismes Moléculaires de la Pathogénie Microbienne, Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

*Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut Pasteur de Lille, 1 rue Calmette, BP245, 59019 Lille Cedex, France. Phone : +33.320.87.71.57 - Fax : +33.320.87.79.08 - E-mail: Cyril.Guyard@pasteur-lille.fr

Abstract

SUN proteins of *S. cerevisiae* have been defined on the basis of high homologies in their C-terminal domain. Recently, two of these four proteins were shown to be involved in cell wall morphogenesis (Mouassite *et al.*, 2000a). In the present study, we have isolated *WMSU1*, a new SUN-related gene, from *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. Sequencing of the gene revealed an open reading frame coding for 402 amino acids. The predicted amino acid sequence of *WMSU1* is closely related to the *S. cerevisiae* SUN proteins and to other yeast proteins involved in cell wall metabolism. *WMSU1* is proposed to encode a cell wall protein since its predicted product contains a signal sequence, a *kex2* cleavage site and a serine/threonine rich N-terminal domain. Southern blot analysis of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 genome using the highly conserved domain of *WMSU1* as probe suggested that the isolated gene belongs to a multigenic family. Expression of *WMSU1* in *E. coli* led to a 45-kDa protein, which appeared to be toxic to this host. Scanning electron microscopy analysis of a recombinant *S. cerevisiae* producing *Wmsu1p* showed that this strain exhibited an altered cell wall, thus pointing to a probable role of this protein in the cell wall structure.

Keywords: *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968; yeast cell wall; *SUN* gene family.

Introduction

The yeast cell wall displays specific components, which constitute potential target for the development of new antimicrobial agents (Cabib *et al.*, 2001). It is mainly composed of glucan (59%), cell wall proteins (40%) and chitin (1%), which are interconnected by covalent bounds (Kapteyn *et al.*, 1999). β 1,3-glucan which represents the major form of the glucan, is involved in a fibrous network that confers rigidity to the cell wall (Smits *et al.*, 2001). β 1,6-glucan, the minor glucan form, bridges all other yeast cell wall components (Shahinian and Bussey, 2000). Chitin is attached by glycosidic linkages to non-reducing branches of the β 1,6- and β 1,3-glucans (Cabib *et al.*, 2001). The functions of the yeast cell wall proteins appear multiple since they are directly involved in the cell wall biosynthesis and contribute to cell rigidity.

Recently, the SUN gene family whose products are proteins sharing an highly conserved C-terminal domain has been described in *Saccharomyces cerevisiae* (Camougrand *et al.*, 2000). Mouassite and co-workers demonstrated that Uth1p and Sun4p encoded by distinct SUN genes might contribute to cell wall morphogenesis and septation (Mouassite *et al.*, 2000a). Inactivation of *SUN4* induced an increased resistance to β 1,3-glucanase, a yeast cell wall digesting enzyme, and the *sun4 Δ uth1 Δ* double null mutant showed a further increased resistance compared to the parental strain. Moreover, Omi and co-workers reported that *PSU1*, a *Schyzosaccharomyces pombe* gene displaying high homology with SUN genes, is essential. Indeed, these authors observed that the phenotype of a *PSU1* disruptant resembled that of cells treated with aculeacin A, a glucan synthesis inhibitor (Omi *et al.*, 1999). They also demonstrated that a *psu1 Δ* mutant of *S. pombe* was resistant to β 1,3-glucanase. These results suggested that the fission yeast gene *PSU1* is involved in the cell wall glucan synthesis. The involvement of SUN proteins in yeast glucan synthesis is also supported by the identification in *Candida wickerhamii* of *BGLA*, a SUN-related gene encoding a cell-bound extracellular protein with potential β -glucosidase activity that could be required for cell wall glucan synthesis (Skory and Freer, 1995).

In the present study, we describe the cloning, sequencing and heterologous expression of *WMSU1*, a new SUN-related gene from the yeast *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. Predicted amino acid sequence of *WMSU1* shows high homology with proteins belonging to the *S. cerevisiae* SUN family. Southern blot analysis of *W. saturnus* var. *mrakii* genomic DNA using part of *WMSU1* as probe suggested that the isolated gene belongs to a

gene family. The heterologous expression of *WMSU1* was performed in *Escherichia coli* and *S. cerevisiae* using plasmid expression vectors. In *E. coli*, a 45-kDa recombinant protein was expressed at low level, suggesting that *Wmsu1p* may be toxic for this host. Expression of *WMSU1* in *S. cerevisiae* induced a pronounced cell surface roughness, indicative of a modified cell wall structure which could result from an altered glucan synthesis. Altogether, these data strongly support the hypothesis that *Wmsu1p* plays a critical role in the *W. saturnus* var. *mrakii* cell wall structure.

Materials and methods

Strains and growth conditions.

W. saturnus var. *mrakii* MUCL 41968 was cultured at 26°C for 48 h at 70 rpm in 100 ml of Sabouraud broth (Tryptone 5 %, Meat Peptone 5 %, Dextrose 20 %) buffered at pH 4.6 with 0.1 M citric acid and 0.2 M sodium phosphate. *S. cerevisiae* W303-1B (*MATa*, *ade2*, *his3*, *trp1*, *leu2*, *ura3*, *can1*) was used as recipient cell for transformation and heterologous gene expression. It was routinely grown in YPD complex medium (Bacto-yeast extract 1%, Bacto-peptone 2%, Glucose 2%). *E. coli* XL1 blue (F'::Tn10 *proA*⁺ B⁺ *lacIq* Δ(*lacZ*) *M15/recA1 endA1 gyrA96* (Nal^r) *thi*) (Stratagene, La Jolla, USA) was used as host for propagation of plasmids. *E. coli* M15 (Nal^S Str^S Rif^S *thi lac Ara*⁺ *Gal*⁺ *mtl*⁻ *F*⁻ *recA*⁺ *uvr*⁺ *lon*⁺) containing plasmid pREP4 allowing constitutive expression of the *lac* repressor was purchased from Qiagen S.A. (Courtaboeuf, France) and used for the heterologous expression of His-tagged proteins in *E. coli*. *E. coli* strains were grown on LB medium (tryptone 10%, yeast extract 0.5 %, NaCl 1%) supplemented with 50 µg/ml ampicillin or 25 µg/ml kanamycin when appropriate. All the solid media contained 2% agar.

Cloning and expression vectors

pBluescript SK⁺ (Stratagene, La Jolla, USA) carrying an ampicillin resistance gene and the *lac* promoter was used to clone a partial DNA library of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. pCR2.1 and pYES2 vectors were purchased from Invitrogen Corp (San Diego, USA). The *E. coli* cloning vector pCR2.1 bears resistance genes for kanamycin and ampicillin as well as the *lac* promoter. The yeast expression vector pYES2 contains an ampicillin resistance gene for selection in *E. coli*, a *URA3* gene for high copy-number maintenance and selection in *ura3*Δ *S. cerevisiae*, and a *GAL1* promoter sequence. pQE30 purchased from Qiagen S.A. (Courtaboeuf, France) was used as vector for N-terminal His-tagged protein expression in *E. coli* under the control of T5 promoter.

Chromosomal DNA isolation

Chromosomal DNA from *S. cerevisiae* W303-1B or *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 was extracted by a method adapted from Hoffman and Winston (Hoffman and Winston, 1987). Briefly, yeast cells from a 10-ml overnight yeast culture were collected by centrifugation, washed with 500 µl of distilled water, and re-suspended in 200 µl of 10 mM Tris-HCl (pH 8) containing 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl and 1 mM Na₂ EDTA. After addition of 200 µl phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) and 0.3 g acid-washed glass beads (Sigma-aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), the cells were vortexed for 4 min and 200 µl of TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) was added. After centrifugation, the chromosomal DNA contained in the aqueous layer was ethanol precipitated, re-suspended in TE buffer and treated with 75 µg/ml of RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Southern blot analysis

The 1238-pb *SUN4* probe used in the southern blot analysis of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 was obtained by PCR amplification using *S. cerevisiae* chromosomal DNA and the following *SUN4* derived primers 5'-GCTTCGGTGCATCGTCATTTT-3' and 5'-TTAATCCGGCGTGGGTTT-TAGT-3'. The *WMSU1* probe was obtained by purification of the 564-pb restriction fragment resulting from *AgeI* digestion of pCR2.1-*WMSU1* (see cloning of *WMSU1* gene). After labelling with digoxigenin using the Dig labelling kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), the probes were used in Southern blot analysis (Sambrook *et al.*, 1989). Briefly, DNA fragments resulting from different endonuclease digestions of 10 µg of yeast chromosomal DNA were separated by electrophoresis on 0.7 % agarose gels and transferred to nylon membranes (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Probe hybridisation was carried out overnight at 56.5° C in 5x SSC buffer. After washing with 2 x SSC/0.1% SDS followed by 0.1 x SSC/0.1% SDS, the hybridised Dig-labelled probes were detected by alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody, followed by color development using CSPD as chemiluminescent substrate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Construction and screening of partial libraries of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968.

W. saturnus var. *mrakii* MUCL 41968 genomic DNA (20 µg) was digested for 5 hours with 100 units of *Hind*III and electrophoresed in a 0.7% agarose gel. Fragments between 600 and 900 bp were excised from the gel purified using the GeneClean kit II (Bio 101, Vista, USA) and ligated in the *Hind*III restriction site of pBluescript SK+. Recombinant plasmids were electroporated into *E. coli* X11-Blue and the white colonies obtained after plating on X-Gal/IPTG plates were screened for insert by colony hybridisation using the *SUN4* digoxigenin labeled probe.

Cloning of the *WMSU1* gene

W. saturnus var. *mrakii* MUCL 41968 was grown to mid-log phase in 50 ml Sabouraud broth. After harvesting the culture by low-speed centrifugation, total RNA was isolated as described by Adams *et al* (Adams *et al.*, 1997). The poly(A)⁺ mRNA were separated from total RNA by chromatography on oligo(dT)-cellulose (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA). First strand cDNA templates were synthesized from the poly(A)⁺ mRNA using Ready-to-go T-primed first-strand kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). To amplify part of *WMSU1*, primers 5'-TTCCGCCCAACAACA-3' and oligo(dT)₁₈ were used to perform a 5'-RACE PCR. The amplified 1116 pb fragment was cloned in pCR2.1 using a TA cloning kit (Invitrogen, Groningen, Netherlands). The whole *WMSU1* gene was then amplified from *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 genomic DNA by PCR using the primers 5'-CGCTCCTTATACTAACA-3' and 5'-TTATCATAAGGACAAAAA-3', and ligated in the *Eco*RV site of pCR2.1 to obtain pCR2.1-*WMSU1*. The nucleotide sequence reported in this study is available in the GenBank nucleotide sequence database with the accession number AF418983.

Expression of *WMSU1* in *E. coli* and *S. cerevisiae*

A 1279 bp fragment containing *WMSU1* and terminating with a stop codon was amplified by PCR from pCR2.1-*WMSU1* using the primers 5'-GATCCACGGATCCAAG-TTCTCTCCTCCTGTT-3' and 5'-CATCGTGCATGCTTATCATAAGGACAAAAA-3'. After digestion with *Bam*H1 and *Sph*I, the resulting fragment was cloned into the

corresponding sites of pQE30 generating pQE30-WMSU1 that was electroporated into *E. coli* M15 (pREP4). Following selection on LB agar medium supplemented with ampicillin (100 µg/ml) and kanamycin (25 µg/ml), recombinants clones were tested for expression of recombinant Wmsulp (rHis-Wmsulp) after induction with 1 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Purification of rHis-Wmsulp was achieved under denaturing condition using nickel-nitrilotriacetic acid resin (Ni-NTA) according to the instructions of the manufacturer (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France).

To produce Wmsulp in *S. cerevisiae*, a 1287-pb fragment containing *WMSU1* was amplified by PCR from pCR2.1-WMSU1 using the primers 5'-TCCCGCGGATCCAGGA-TGAAGTTCTCTCCTC-3' and 5'-CATCGTGCATGCTTATCATAAGGACAAAAA-3'. After digestion with *Bam*HI and *Sph*I, and the resulting fragment was ligated between the *Bam*HI and *Sph*I sites of pYES2, generating pYES2-WMSU1 that was used to transform *S. cerevisiae* W303-1B (Adams *et al.*, 1997). Transformants were selected on SC-ura agar medium (Yeast Nitrogen Base 1,7 %, glucose 2%, -ura DO supplement (Clontech, Palo Alto, USA) 0.77%, agar 2%). Repression of recombinant protein production was achieved by keeping 2% glucose in SC-ura medium, while induction was achieved by replacing glucose by 2% galactose (West *et al.*, 1984).

SDS-PAGE and immunoblotting.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli (Laemmli, 1970) by using a 4% stacking gel and a 10 % separating gel. After electrophoresis, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck, Nogent-sur-Marne, France). For immunoblotting, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad S.A., Ivry-sur-Seine, France) as described by Towbin *et al* (Towbin *et al.*, 1979). Histidine tagged proteins were detected using the QIAexpress anti-His mouse monoclonal antibody (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) at a concentration of 0.2 µg/ml. Immune complexes were revealed with alkaline phosphatase-linked goat anti-mouse IgG (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) or alkaline phosphatase-linked goat anti-rabbit IgG (Promega, Madison, WI, USA).

RT-PCR analysis of *WMSU1* transcription

WMSU1 transcription was studied by RT-PCR (Promega, Madison, USA) using purified total RNA treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) to eliminate potential DNA contaminants and the following *WMSU1*-specific primers 5'-ACAGACCTCTCC-GCCCAACAACAA-3' and 5'-AGCCATATCCACACCCCACTC-ACAT-3' that generate a 479-bp amplicon. As a positive control, *ACT1* mRNA encoding actin was amplified using primers 5'-TACGTTTCCATCCAAGCCGTT-3', 5'-AACATA-CGCGCACAAAAGCAGA-3'. For both amplification, after 45min at 48°C and 2min at 94 °C, 40 PCR cycles (94°C for 30s; 64°C for 1min; 68°C for 2min) and 1 cycle 68°C for 7min were performed. The PCR products were electrophoresed in a 2% agarose gel and visualised after ethidium bromide staining.

Scanning electron microscopy

Production of *Wmsu1p* was induced by growing *S. cerevisiae* (pYES2-*WMSU1*) for 15 hours at 30°C in SC-ura medium containing 2% galactose. The cells were then collected by low-speed centrifugation, re-suspended in PBS at the density of 10^7 cells/ml and fixed for 5 hours at room temperature in a 1.25% (v/v) glutaraldehyde solution prepared in a 100 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0). Aliquots containing approximately 10^6 cells were filtered through a 25-mm diameter and 0.2 μ m porosity Anodisc (Whatman, Maidstone, UK). The filters were rinsed five times for 10 min in 25 ml cacodylate buffer. Post-fixation was performed for 3 hours in a 1% OsO₄ solution prepared in cacodylate buffer, followed by five washes in ultrapure water. The samples underwent a progressive dehydration by successive soaking in 50, 70, 95 and 100 % ethanol. Soaking in isopentyle acetate was performed before critical-point drying in CO₂ using a EMDScope CPD 750 apparatus. The filters were then attached to large scanning electron microscopy stubs and coated with gold-palladium by cathodic spreading in a Polaron E 5100 coater. Sample observation and microphotographs were done using a JEOL JSM35CF scanning electron microscope operating at a voltage of 10 kV.

RESULTS

Wmsu1 gene isolation

In order to determine whether the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL41968 genome contains SUN-related genes, its chromosomal DNA was digested with *Hind*III and analysed by Southern blot using the *S. cerevisiae* *SUN4* gene as a probe. Using hybridisation conditions that allowed the *SUN4* probe to detect the four SUN genes of *S. cerevisiae*, a ca. 800-bp restriction fragment was detected within the *Hind*III-digested *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL41968 genome, suggesting the presence of a SUN-related gene (data not shown). To clone this 800-bp fragment, a partial genomic library was constructed using *Hind*III-digested pBluescript SK+ and the *Hind*III restriction fragments of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL41968 genome ranging from 600 to 900 bp. After ligation, the recombinant plasmids were electroporated into *E. coli* X11-Blue and the white colonies obtained after plating on X-Gal/IPTG were screened by colony blot using *SUN4* probe. An hybridising clone was isolated and its 791-bp DNA insert was sequenced. A BLAST analysis revealed homologies with the 5' terminal end of *S. cerevisiae* SUN genes, suggesting that the 3' end was missing. The 3' missing sequence was amplified by 5' RACE-PCR using the primer 5'-TTCCGCCCAACAACAA-3' and oligo(dt)₁₈. After cloning into the *Eco*RV site of pCR2.1, the 5' and 3' ends of the amplified fragment were sequenced using M13 forward and reverse primers. This allowed us to design a primer 5'-TTATCATAAGGACAAAAA-3' specific for a region downstream of the 3' end of the SUN-related *W. saturnus* var. *mrakii* gene (*WMSU1*). Using this primer and the primer 5'-CGCTCCTTATACTAACA-3' deduced from the sequence of the 791-bp *Hind*III insert and specific for the 5' flanking region of *WMSU1*, the entire gene was amplified and cloned into pCR2.1 generating pCR2.1-*WMSU1*. The sequencing of the *WMSU1* gene revealed that the cDNA and the genomic DNA were identical, establishing the absence of intron in the portion of *WMSU1* corresponding to the partial cDNA isolated (data not shown). Analysis of *WMSU1* showed that the genomic sequence presents an open reading frame of 1209-bp (Figure 1).

Wmsu1p amino acid sequence analysis

Analysis of the predicted amino sequence of *Wmsu1p* revealed that it is a 402 amino acids protein with a calculated molecular weight of 42 kDa and an isoelectric point of 4.8. To

predict Wmsu1p subcellular localisation, its sequence was submitted to TargetP network (Emanuelsson *et al.*, 2000). This analysis suggested that Wmsu1p could be destined to secretory pathway in agreement with the prediction of a potential N-terminal signal sequence (residues 1 to 21) using the signalP server (Nielsen *et al.*, 1997). Moreover, as shown in figure 1, a putative Lys-Arg cleavage site for the Kex2p endoprotease (Germain *et al.*, 1993) was found in position 39 suggesting that the protein may undergo a proteolytic maturation. Hydropathy analysis of Wmsu1p using the Kyte and Doolittle program (Kyte and Doolittle, 1982) suggested that the N-terminal end upstream the putative Kex2p endoprotease site contains a hydrophobic domain.

Since certain SUN proteins are suspected to be glycosylated (Cappellaro *et al.*, 1998), the Wmsu1p sequence was analysed *in silico* for potential sites of post-translational modifications. An Asn-Glu-Cys motif, which is a rare potential acceptor site for *N*-glycosylation, was found in position 311 (Figure. 1). Using the NetOGlyc 2.0 server for prediction of *O*-glycosylation sites (Hansen *et al.*, 1997), 42 potential *O*-glycosylation sites were found in the Wmsu1p N-terminal domain spanning residues 44 to 153, consistent with the high threonine and serine content (27.5%) of this domain (Figure 1). An homology search in the databases revealed similarities between Wmsu1p and 7 yeast proteins among which the 4 SUN proteins of *S. cerevisiae* (Figure. 2). The SUN proteins (Sim1p, Uth1p, Nca3p and Sun4p) have been defined on the basis of a common 258 amino acid C-terminal domain (Camougrand *et al.*, 2000; Mouassite *et al.*, 2000a; Mouassite *et al.*, 2000b; Omi *et al.*, 1999). The 3 others proteins were Bglap from *Candida wickerhamii*, Psu1p from *S. pombe* and a predicted sequence of 319 amino acids encoded by the open reading frame SPBCC2G2.17c from the cosmid c2G2 derived from chromosome II of *S. pombe* (Genbank accession number CAA17897). The BLAST analysis of Wmsu1p revealed that the percentages of homologies and identities between Wmsu1p and these 7 yeast proteins are high since they range from 57% to 72 % (homologies) and 44 to 59 % (identities), respectively. Since the SUN common 258-amino acid domain is present in the C-terminus of Wmsu1p, the latter might represent a new member of the yeast SUN protein family. This hypothesis is further supported by the high conservation of the cysteine residues potentially involved in disulfide bridges. Indeed, among the 12 cysteines found in Wmsu1p, 10 are strictly conserved in the SUN proteins (Figure 2).

Expression of *Wmsu1p* in *E. coli*.

To produce a recombinant N-terminal histidine tagged *Wmsu1p* (rHis-*Wmsu1p*) in *E. coli*, the open reading frame of *WMSU1* was amplified by PCR from pCR2.1-*WMSU1* and cloned into the expression vector pQE30 to obtain pQE30-*WMSU1* which was used to transform *E. coli* M15 (pREP4). Although driven by a strong promoter, the expression of rHis-*Wmsu1p* was very low as demonstrated by the SDS-PAGE analysis of the IPTG-induced recombinant *E. coli*. Only a faint band was detected at the expected molecular weight after Coomassie blue staining of the gel (data not shown) which could result from a toxic effect of *Wmsu1p* in *E. coli*. To test this hypothesis, *E. coli* M15 (pREP4) (pQE30-*WMSU1*) from an exponentially growing culture were plated on LB-ampicillin agar plates containing or not IPTG. After overnight growth at 37 °C, the sizes of the colonies were measured, demonstrating a *ca.* three-fold reduction in diameter for the clones that grew in the presence of IPTG. In the absence of IPTG, the colony diameter was identical to that obtained with *E. coli* M15 (pREP4) (pQE30) grown in the presence or in absence of IPTG. This observation indicated that *Wmsu1p* production in *E. coli* indeed interferes with bacterial growth. Using nickel-chelate affinity chromatography, rHis-*Wmsu1p* was purified to homogeneity with however a yield of approximately 1 µg per liter of culture. The purified protein was analysed by SDS-PAGE and immunoblotting using the QIAexpress anti-His mouse monoclonal antibody. As shown in figure 3, the anti-His monoclonal antibody reacted with a unique protein displaying an apparent molecular weight of 45 kDa, corresponding to the expected recombinant protein (Figure 3A; lane 1). This band, absent from cellular extracts of IPTG-induced of *E. coli* M15 (pREP4) (pQE30), thus corresponds to the *WMSU1* gene product (Figure 3A, lane 2).

Phenotypic expression of *WMSU1* in *S. cerevisiae*

To express a recombinant form of *Wmsu1p* (r*Wmsu1p*) in *S. cerevisiae*, *WMSU1* was amplified by PCR from pCR2.1-*WMSU1* and cloned into the expression plasmid pYES2, generating pYES2-*WMSU1* that was used to transform *S. cerevisiae* W303-1B. r*Wmsu1p* expression was induced by growing cells in culture medium containing 2% galactose. As a negative control, *S. cerevisiae* W303-1B transformed with pYES2 was grown in the same conditions. No r*Wmsu1p* could be detected by SDS-PAGE analysis in the induced cells, suggesting that *WMSU1* was not expressed or that its expression level was too low to allow direct gel visualisation of the recombinant protein. To verify whether *WMSU1* was

transcribed after induction, RT-PCR was performed to detect a 479-pb transcription product of *WMSU1*. As a positive RT-PCR control, *ACT1* mRNA was amplified from each RNA sample. For the negative control, no *WMSU1* transcript was detected (Figure 4). For *S. cerevisiae* (pYES-*WMSU1*) grown in presence of glucose (repression) a faint amplification product was detected suggesting a basal transcription level of *WMSU1*. In contrast, an intense amplification signal was obtained in inducing conditions, indicating that *WMSU1* was effectively transcribed (Figure 4). The relatively low production level of rWmsu1p might be linked to toxic effect of the recombinant protein for the yeast cells.

Since several SUN genes have been suspected to encode proteins involved in cell wall synthesis, *S. cerevisiae* (pYES2-*WMSU1*) cells were analysed by scanning electron microscopic to determine whether *WMSU1* expression in this host induced a modification of the cell wall structure. As shown in figure 5D, the surface of *S. cerevisiae* (pYES2-*WMSU1*) grown in induction conditions appeared rough and wrinkled, whereas in repression conditions it was smooth as observed for *S. cerevisiae* (pYES2) grown in induction or repression conditions. It thus seems that rWmsu1p production in *S. cerevisiae* leads to an altered cell wall.

WMSU1 homologue genes in *W. saturnus* var. *mrakii* genome.

Since four genes belonging to the SUN family have been identified in *S. cerevisiae*, multiple *WMSU1*-related genes could also be present in the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 genome. To test this hypothesis, a 564 pb *AgeI* restriction fragment of *WMSU1* corresponding to the conserved C-terminal extremity of the protein was used to analyse by Southern blot the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 genome digested with *AgeI*. As positive control, the genomic DNA of *S. cerevisiae* digested with *AgeI* was included in the analysis. In *S. cerevisiae*, the probe hybridised with 4 restriction fragments of 17.1, 12.6, 8.0 and 5.0 kbp corresponding to *SUN4*, *NCA3*, *SIM1* and *UTH1* genes respectively (Figure 6, lane D). The hybridisation pattern observed with *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 revealed the 564-pb *AgeI* fragment of *WMSU1* as well as at least 6 additional restriction fragments of 17.0, 15.0, 7.5, 7.0, 6.5 and 5 kbp (Figure 6, lane C), suggesting that the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 genome also contains several SUN-related genes.

Discussion

Since the yeast cell wall represents an ideal target for antifungal agents, its composition and architecture have been extensively studied (Cabib *et al.*, 2001; Lipke and Ovalle, 1998). However, the proteins involved in the mechanisms that regulate the cell wall biosynthesis and maintenance are not all identified (Klis, 1994). Mrsa and co-workers proposed that some of the cell wall proteins could directly contribute to the cell wall rigidity and regeneration (Mrsa *et al.*, 1999).

In the present study, we report the isolation of *WMSU1*, a *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 gene encoding a 402-residues protein that presents homologies with the common 258-amino acid C-terminal domain of SUN proteins, suggesting that Wmsulp is an additional member of this yeast protein family. High homologies were found with Sun4p, Psu1p and Bglap that are suspected to be involved in the glucan cell wall metabolism through glucanase or transglycosidase activities. Indeed, Bglap of *C. wickerhamii* was proposed to be a cell wall protein displaying a β -glucosidase activity and the 95-kDa Sun4p was initially described as a β -glucosidase (Cappellaro *et al.*, 1998) and then proven to be involved in the cell wall biosynthesis (Mouassite *et al.*, 2000a). Psu1p of *S. pombe* also appears to be involved in the cell wall synthesis since a Δ psu1 null mutants is resistant to digestion by β 1,3-glucanase and defective in cell wall structure (Omi *et al.*, 1999).

Analysis of the predicted amino acid sequence suggested that Wmsulp is a secreted or cell wall expressed protein since putative signal sequence of 21 residues followed by a potential Kex2p cleavage site were found in its N-terminal domain. Moreover, as observed for various yeast cell wall proteins (van der Vaart *et al.*, 1995), the N-terminal domain of Wmsulp contains serine/threonine clusters downstream of the potential Kex2p cleavage site. Wmsulp also contains one potential *N*-glycosylation site and 42 potential sites for *O*-glycosylation within its serine/threonine rich domain, suggesting that Wmsulp could be a cell surface glycoprotein as already suspected for some *S. cerevisiae* SUN proteins (Cappellaro *et al.*, 1998).

Production of His-tagged Wmsulp in *E. coli* was shown to be extremely low even when the recombinant gene expression was driven by the strong and inducible T5 promoter. This potential toxic effect was confirmed by demonstrating that the colony diameter of *E. coli* clones producing rHis-Wmsulp exhibited a *ca.* three fold reduction compared to control colonies. In *S. cerevisiae*, the expression level of WMSU1 was extremely low as well.

Scanning electron microscopy of recombinant *S. cerevisiae* cells in which *WMSU1* transcripts could be detected by RT-PCR, revealed a rough and wrinkled aspect of the cells, indicating an altered cell wall architecture. This suggests that *Wmsu1p* may be involved in the cell wall synthesis or integrity.

Southern blot analysis of the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 genome with a probe corresponding to the 3' end of *WMSU1* which encodes the SUN C-terminal conserved domain, revealed the presence of multiple related sequences, suggesting that like for *S. cerevisiae*, the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 genome carries several SUN-related genes. It thus seems that these SUN-related genes are conserved among the yeast genomes which may indicate that the corresponding protein play critical roles in the host metabolism.

Cloning and sequencing of the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 SUN-related genes are in progress in our laboratory to further elucidate the role of SUN proteins in yeast cell wall synthesis. In a previous study, we reported that a secreted mycotoxin protein produced by *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 (*WmKT*) displays a toxic activity against fungi such as *C. albicans* and *S. cerevisiae*. Partial aminoacid sequencing of *WmKT* revealed that it is related to yeast SUN proteins (Guyard *et al*, submitted). *WmKT* induces a rapid lethal cell permeation of susceptible yeast cells, suggesting that its activity could interfere with the integrity of the cell wall. It is likely that the *WmKT*-encoding gene is among the *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 SUN-related sequences detected in this study. Like *Wmsu1p*, *WmKT* alters the cell wall of susceptible yeasts. This further supports the link between SUN proteins and yeast cell wall structure, underlying the need for a better understanding of the role of each of them.

Acknowledgements

C.G. is supported by a Ph.D. grant from the Région Nord Pas-de-Calais (France) and the Institut Pasteur de Lille (France). The Fondation pour la Recherche Médicale and FEDER funding granted this work.

References

- Adams A, Gottschling D, Kaiser C, T. S. 1997. *Methods in yeast genetics*, 1997 edn. Cold Spring harbor Laboratory press.
- Cabib E, Roh DH, Schmidt M, Crotti LB, Varma A. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem* **276**: 19679-19682.
- Camougrand NM, Mouassite M, Velours GM, Guérin MG. 2000. The "SUN" family: *UTH1*, an ageing gene, is also involved in the regulation of mitochondria biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **375**: 154-160.
- Cappellaro C, Mrsa V, Tanner W. 1998. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol* **180**: 5030-5037.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N- terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**: 1005-1016.
- Germain D, Thomas DY, Boileau G. 1993. Processing of Kex2 pro-region at two interchangeable cleavage sites. *FEBS Lett* **323**: 129-131.
- Guyard C, Séguy N, Cailliez J, *et al.* Characterisation of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high-molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity. submitted.
- Hansen JE, Lund O, Rapacki K, Brunak S. 1997. O-GLYCBASE version 2.0: a revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res* **25**: 278-282.
- Hoffman CS, Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM. 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 373-383.
- Klis FM. 1994. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**: 851-869.
- Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lipke PN, Ovalle R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**: 3735-3740.
- Mouassite M, Camougrand N, Schwob E, *et al.* 2000a. The 'SUN' family: yeast *SUN4/SCW3* is involved in cell septation. *Yeast* **16**: 905-919.

- Mouassite M, Guerin MG, Camougrand NM. 2000b. The *SUN* family of *Saccharomyces cerevisiae*: the double knock-out of *UTH1* and *SIMI* promotes defects in nucleus migration and increased drug sensitivity. *FEMS Microbiol Lett* **182**: 137-141.
- Mrsa V, Ecker M, Strahl-Bolsinger S, *et al.* 1999. Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**: 3076-3086.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. 1997. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* **8**: 581-599.
- Omi K, Sonoda H, Nagata K, Sugita K. 1999. Cloning and characterization of *psu1(+)*, a new essential fission yeast gene involved in cell wall synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 368-374.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*, Second Edition edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shahinian S, Bussey H. 2000. Beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **35**: 477-489.
- Skory CD, Freer SN. 1995. Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular beta-glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 518-525.
- Smits GJ, van Den Ende H, Klis FM. 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Van der Vaart JM, Caro LH, Chapman JW, Klis FM, Verrrips CT. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 3104-3110.
- West RW, Jr., Yocum RR, Ptashne M. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Mol Cell Biol* **4**: 2467-2478.

Figures

```

ATGAAGTTCTCCTCTGTTATCGCCGCAATTGCAGGGTATCTAGTCCAACTGCTCTT
1  M K F S P L V I A A I A G Y L V Q T A L
GCTGATGAAGGGTTCACACTACACAGTTTCACGGTCATCACCACACAGCGTCCGCTC
21  A D E G C S T T Q F H G H H Q H K R A V
GCCATCGAATATGTACTCCACCATCACTGTAGATGGTCAAGGTAATACCGTTGCTCCT
41  A I E Y V Y S T I T V D G Q G N T V A P
ACTACTTCTACCAGTCTACTCAGCAGTCTAAAGCCACTTCATCTACTCAACAGACCTCT
61  T T S T T S T Q Q S K A T S S T Q Q T S
TCCGCCAACAACTACTTCTCTTCTACCCAACAACACTCCTCTGTACCAAAACAG
81  S A Q Q Q T T S S S T Q Q T T S C T K Q
CAATCTACATTTCTACTGCCGCTACCAGTACTGCCACTACTACAAGTCCCTCGTCTAGT
101 Q S T F S T A A T S T A T T T T K S S S S
TCCCTCCAGTTCGGTCCATCTATGGTATTTATCTAGTTTCTCAGGCCATATGAAAGC
121 S S S S G S I Y G D L S S F S S P Y E S
TTCACTGACGGTGTATTGACTGTTCTGACTTCAGCTCCCCCTTGGCGCAAGGTGTGATT
141 F T D G V I D C S D F S S P L R Q G V I
GCCCTCGATCACCTAGGTTCCGGTGTATTCTGGATTGTACCACCCATCAGACCTCTT
161 A L D H L G F G G Y S G L Y H P S D T S
ACCGTGGTCTTGTGAGGATGGCACCTATTGTTCTTACGCTTGTACGGCGGTATGTCT
181 T G G S C E D G T Y C S Y A C Q P G M S
AAGACGCACTGGCCATCTTCTCAACCTTCGAACGGTGTTCCTCGTTGGTGGTTGTACTGT
201 K T Q W P S S Q F S N G V S V G G L Y C
GACGGTGAAGTGTACAGATCTAACAGAACACCGATTACTTATGTGAGTGGGGTGTG
221 D G G K L Y R S N K N T D Y L C E W G V
GATATGGCTATGTGGTTCGAATTGAGTTCAGCCGTTGCCGTTTCCCGTACGGATTAT
241 D M A Y V V S E L S S A V A V C R T D Y
CCAGTACTGAAAACATGGTTATCCCAACATACGCTCACTGCTGGTTCAGTTTACCACTG
261 F G T E N M V I P D Y V T A G S L Y L
ACCGTGGTGGACCAAGATTCTTACTATACGTTGAATGGAAGAGACATCTGCTCAGTAC
281 T V V D Q D S Y V P W N G K K P S A Q Y
TATGTTAACACCGCAGGTATTACATGGGAAAATGGATATCTGGGGCACTTCGGGTTCT
301 Y V N N A G I T W E N G C I W T S G S
GGATTGGGTAATTGGGCTCCATTAACCTTTGGTGTGGTTATCTAATGTTATTCATAT
321 G L G N W A P L N F G A G V T N G I A Y
CTATCATGTATCCCGAACCAACAACACTATGATCTGCCAATTTCAACGTTAAGATTGTT
341 L S L I P N P N N D A A N E N V K I V
GCTCGGATTTAGCTCTGTCGTTACCGGTTTCATGTCTTATTCACCGCGGTTTATAAC
361 A A D S S S V V T G S C V V S N G V Y N
GGTGACGGTTCGACGGTGTACCGTTGCAGTATCCTCAGGTAAGCTAAGTTTCTCTTG
381 G D G S D G C T V A V S S G K A N F V L
TACAACCTAA
401 Y N *
    
```

Figure 1. Nucleotide sequence of WMSU1 from *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968. The deduced amino acid sequence is presented below the nucleotide sequence. The putative Lys-Arg proteolytic site for the Kex2p endoprotease is underlined. Shaded boxes indicate the serine/threonine rich domain located between residues 43 to 153. Underlined and shaded box indicates the sequence motif Asn-Glu-Cys in position 311 which is a potential acceptor site for N-glycosylation.

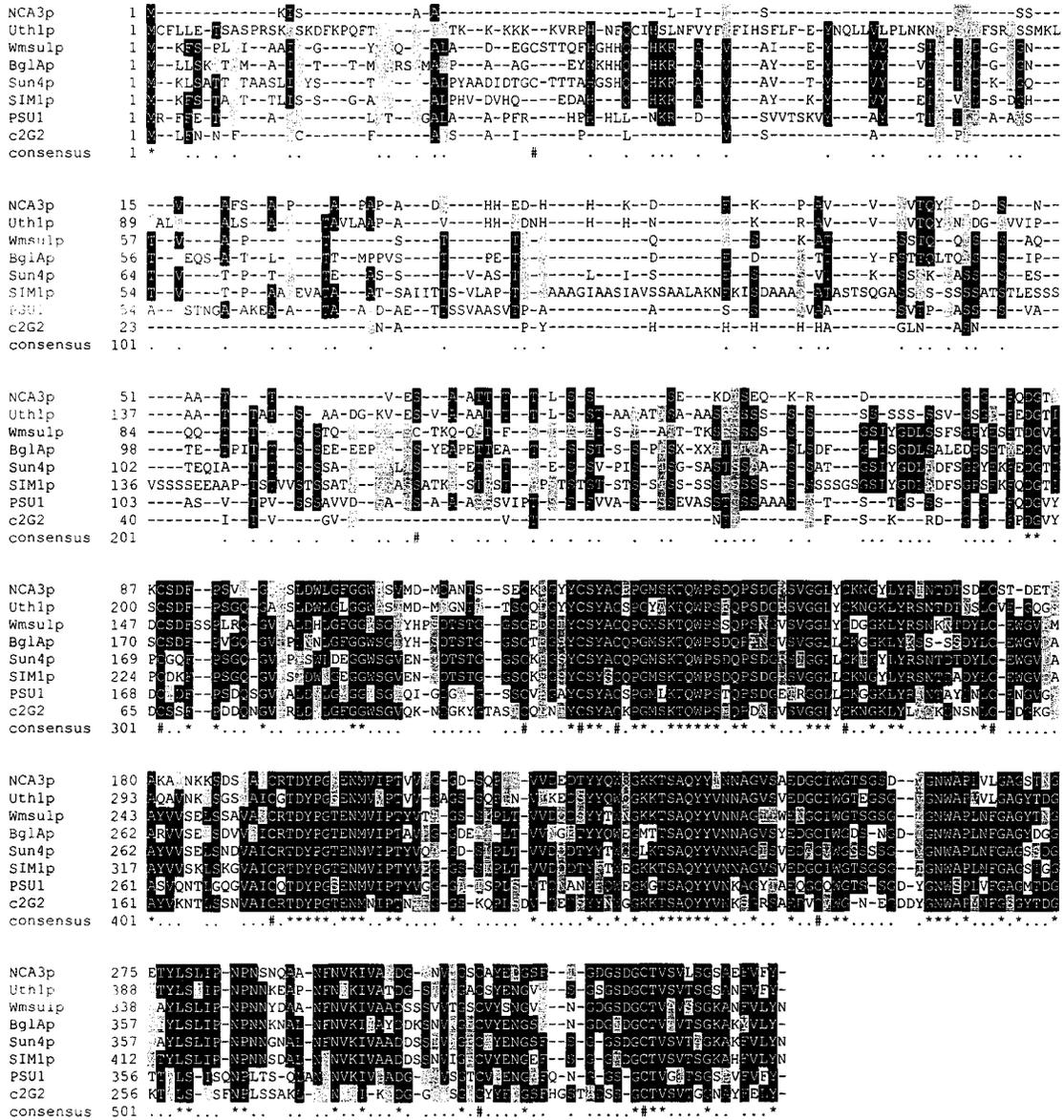


Figure 2. Sequence alignment of SUN proteins with the Wmsul1p predicted amino acid sequence. Uth1p, Sun4p, Sim1p, Nca3p are SUN proteins from *S. cerevisiae*, Bgl1p is a β -glucosidase of *C. wickerhamii* and Psu1p and c2G2 are two proteins of *S. pombe*. Alignment of SUN proteins was performed using the Clustal software. GenBank Accession Nos of corresponding genes: *PSU1*, AB009980; *NCA3*, Z49391; *UTH1*, Z28267; *SUN4*, Z71342; *SIMI*, NC001141; *BGLA*, U31091, *WMSU1*, AF418983, c2G2 gene, CAA17897. (#) indicate positions of Wmsul1p cysteine residues.

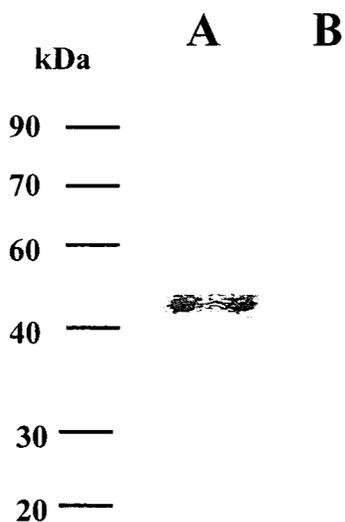


Figure 3. Immunoblot analysis of His-tagged Wmsulp produced by *E. coli* M15 (pREP4) (pQE30-WMSU1). 50 μ l of purified samples obtained from *E. coli* M15 (pREP4) transformed with pQE30-WMSU1 (lane A) and *E. coli* M15 (pREP4) transformed with pQE30 (lane B) were analysed by 10% SDS-PAGE and immunoblotting using anti-His mouse monoclonal antibody at a concentration of 0.2 μ g/ml. The sizes of the molecular weight markers are given in kDa in the left margin.

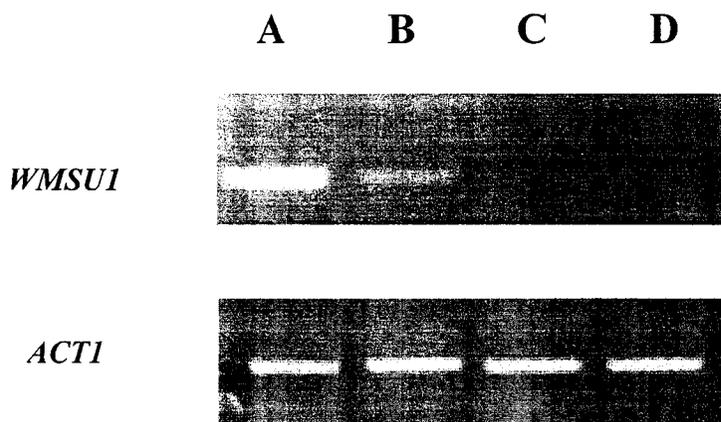


Figure 4. RT-PCR analysis of *WMSU1* transcript in *S. cerevisiae*. RT-PCR using *WMSU1*-specific primers leading to the amplification of a 479-pb fragment (lane A), was performed on purified RNA from *S. cerevisiae* (pYES2-*WMSU1*) grown in induction conditions (A) or repression conditions (B) and from *S. cerevisiae* (pYES2) grown in induction conditions (C) or repression conditions (D). As a positive control, the transcription of *ACT1* mRNA was also analysed for RNA samples.

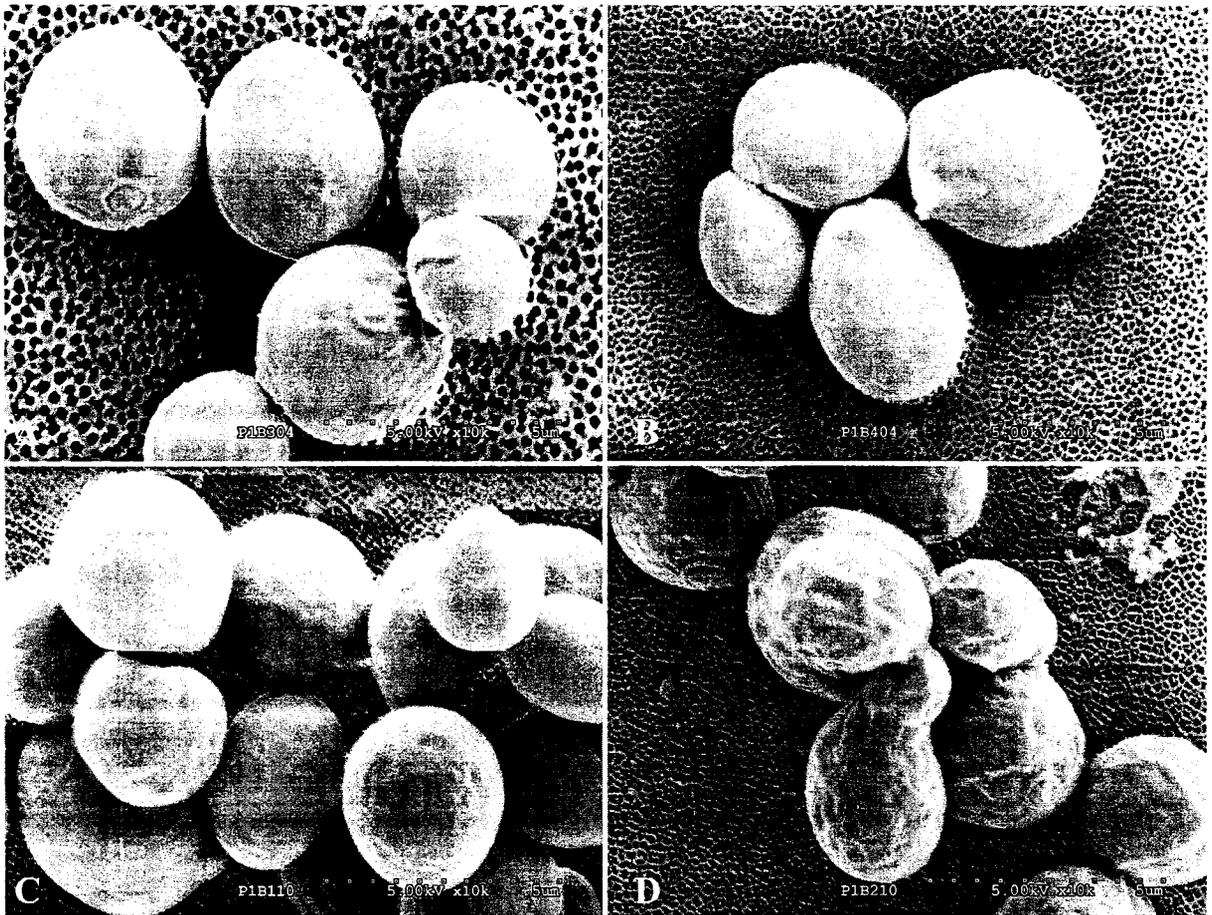


Figure. 5. Effect of *WMSU1* expression on the cell wall of *S. cerevisiae* W303-1B. *S. cerevisiae* (pYES2) cells grown in repression (A) or induction (B) conditions, and *S. cerevisiae* (pYES2-WMSU1) cells grown in repression (C) or induction (D) conditions were observed by scanning electron microscopy using an amplification of 10000 X.

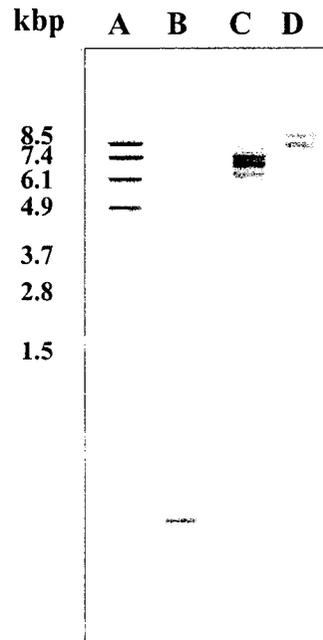


Figure. 6. Southern blot analysis of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 and *S. cerevisiae* W303-1B genomic DNA. 10 μ g of chromosomal DNA of *W. saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 (lane C) or *S. cerevisiae* W303-1B (Lane D) were digested with *AgeI* and electrophoresed in a 0.7% agarose gel, transferred to a membrane and probed with a 564 pb fragment derived from *WMSU1* encoding the SUN C-terminal extremity common domain. As positive control the unlabelled 564 pb fragment was included in the analysis (lane B). Sizes of the DNA molecular weight standards (lane A) in kbp are shown in the left margin.

Discussion et perspectives

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les potentialités thérapeutiques de la WmKT et des anticorps anti-idiotypiques mimant son activité killer ont été largement démontrées (Aliouat *et al.*, 1993; Seguy *et al.*, 1994; Magliani *et al.*, 1997a). Ces molécules sont des agents antifongiques efficaces dans des modèles murins de pneumocystose et de candidose. Elles possèdent également une activité antimicrobienne *in vitro* contre des souches de *M. tuberculosis* ou de bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus* ou encore *Streptococcus pneumoniae*. Ce large spectre d'activité, comprenant des micro-organismes souvent résistants aux traitements thérapeutiques conventionnels, suggère que les propriétés antimicrobiennes de la WmKT constituent une base solide pour le développement d'une stratégie thérapeutique alternative. Dans ce contexte notre objectif a consisté à étudier les caractéristiques biochimiques et le mécanisme d'action de la WmKT, pour ensuite aborder l'étude de son gène.

- **Caractéristiques biochimiques de la WmKT**

Nous avons débuté cette étude par une étape d'identification taxonomique de la souche productrice de la WmKT. Bien que l'ensemble des travaux menés avec cette toxine décrivaient celle-ci comme produite par une levure appartenant à l'espèce *P. anomala* (référéncée K36), nos investigations ont montré que WmKT est secrétée par une souche de *Williopsis saturnus* var. *mrakii* (référéncée MUCL 41968). Cette souche produit une toxine qui est reconnue par le mAbKT4, un anticorps monoclonal neutralisant l'activité d'une toxine killer de *P. anomala* (référéncée ATCC 96603). Ces résultats suggèrent que les deux espèces produisent des toxines apparentées, hypothèse confortée par les propriétés neutralisantes du mAbKT4 vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des deux toxines, ainsi que par les similarités de spectre d'activité observées pour chacune des deux molécules (Polonelli & Morace, 1988a; Cailliez *et al.*, 1993; Seguy *et al.*, 1994).

Nos expériences infructueuses de purification d'ARN et d'ADN plasmidiques ainsi que celles de curage de plasmides suggèrent que la WmKT est codée par un gène chromosomique, ce qui va dans le sens des résultats obtenus par l'équipe du Prof. L. Polonelli. Pour confirmer définitivement l'héritage chromosomique du caractère killer chez *W. saturnus* var. *mrakii*, il serait néanmoins nécessaire de réaliser des analyses de tétrades obtenues après croisement entre un clone killer et un clone de la même espèce ne produisant pas de toxine. Dans le

contexte de notre étude, cette stratégie était difficilement envisageable dans la mesure où les connaissances concernant la sexualité de *Williopsis saturnus* var. *mrakii* sont très limitées. Nous avons donc restreint notre champs d'investigation dans ce domaine.

Contrairement aux données bibliographiques indiquant que la WmKT possède un pH optimal d'activité compris entre 4.2 et 4.6 (Jackson *et al.*, 1996), nous avons montré que la toxine demeure pleinement active dans une gamme de pH allant de 2.0 à 4.5. Nous avons ensuite purifié la WmKT à partir de surnageants de culture en utilisant différentes approches expérimentales. Nous avons tout d'abord montré que l'activité toxique de la WmKT peut être associée à une protéine unique de 85 kDa qui est reconnue par le mAbKT4. Cette masse moléculaire élevée constitue l'une des originalités de la WmKT puisque les toxines produites par le genre *Williopsis* possèdent généralement un masse moléculaire inférieure à 10 kDa (Kasahara *et al.*, 1994b; Komiyama *et al.*, 1995). Dans un second temps, nous avons modifié notre protocole de purification, ce qui a permis d'obtenir des meilleurs rendements, nécessaires à la réalisation d'un séquençage partiel de la WmKT. En plus de la protéine de 85 kDa reconnue par l'anticorps neutralisant mAbKT4, nous avons co-purifié deux autres protéines de 73 et 60 kDa. Nous avons alors réalisé le séquençage partiel de ces protéines. L'analyse de la séquence N-terminale de la WmKT a confirmé le caractère original de cette toxine puisque aucune homologie de séquence avec les autres toxines killer de levures n'a été révélée par une analyse de type BLAST. Par ailleurs, nous avons montré que les deux autres protéines de 73 et 60 kDa qui copurifient avec la WmKT possèdent la même séquence N-terminale que la toxine, ce qui suggère que ces deux polypeptides constituent des formes de dégradations et/ou de maturations différentes de la WmKT.

Nous avons également déterminé des séquences N-terminales de peptides internes obtenus par digestion enzymatique de la WmKT par l'endoprotéinase Lys-C. L'analyse de ces séquences par BLAST a révélé que la toxine possède des homologies avec les protéines SUN de levure, protéines pour lesquelles aucune activité antimicrobienne n'a été démontrée à ce jour. Les protéines de cette famille sont caractérisées par une séquence C-terminale conservée. Parmi celles-ci figurent quatre protéines de *S. cerevisiae* : Sun4p, Uth1p, Nca3p et Sim1p. A première vue, les activités biologiques de ces protéines sont très différentes les unes des autres. Nca3p est impliquée dans l'expression mitochondriale de deux sous-unités de la Fo-F1 ATP synthase (Pelissier *et al.*, 1995). Une double mutation d'insertion des gènes *UTH1* et *SIM1* induit des défauts de migration nucléaire et accroît la sensibilité aux molécules qui

inhibent la respiration et la fermentation des levures tel que le benomyl (Mouassite *et al.*, 2000b). Uth1p joue un rôle dans la régulation de la biogenèse des mitochondries (Camougrand *et al.*, 2000). Enfin, un mutant de délétion du gène *SUN4* de *S. cerevisiae* présente une résistance accrue à la β -glucanase, phénotype qui est d'ailleurs accentué chez un double mutant $\Delta sun4/\Delta uth1$. La protéine pariétale Sun4p, également nommée Scw3p (soluble cell wall protein) a été originellement décrite comme une β -glucanase (Cappellaro *et al.*, 1998). Des résultats récents montrent que Sun4p and Uth1p contribuent à la régulation de la synthèse de la paroi cellulaire et à la septation (Mouassite *et al.*, 2000a). Les protéines SUN sont également produites par d'autres micro-organismes fongiques. Bglap, qui est une β -glucanase putative, est produite par *C. wickerhamii* (Skory & Freer, 1995). Enfin, Psu1p, une protéine essentielle de *S. pombe*, est impliquée dans la synthèse de la paroi. (Omi *et al.*, 1999).

Nous avons montré la WmKT présente une affinité pour la concanavaline A, suggérant ainsi que cette toxine est une glycoprotéine. Ce résultat a été confirmé par une seconde approche basée sur l'utilisation d'un cocktail enzymatique composé de différentes glycosidases. Après déglycosylation, la WmKT possède une masse moléculaire apparent d'environ 55 kDa, des résidus polysaccharidiques contribuent donc à hauteur de 35 % de la masse moléculaire de la toxine. La protéine déglycosylée est toujours reconnue par le mAbKT4, ce qui suggère que l'anticorps neutralisant reconnaît un épitope peptidique de la WmKT. Nous ne pouvons néanmoins pas affirmer que nos conditions expérimentales permettent une déglycosylation complète de la WmKT. Dès lors, l'affinité du mabKT4 pour cette protéine pourrait par conséquent tout de même être imputée à des sucres résiduels. D'autre part, nous n'avons pas pu déterminer si la toxine déglycosylée conserve le caractère antimicrobien de la WmKT. En effet, cette procédure de déglycosylation enzymatique impose des conditions de pH qui ne sont pas compatibles avec la stabilité de la WmKT. Des auteurs ont néanmoins suggéré que la *N*-glycosylation n'est pas indispensable à l'activité de la WmKT puisqu'une toxine active est sécrétée par des levures cultivées en présence de tunicamycine, un inhibiteur de la *N*-glycosylation (Cailliez *et al.*, 1993). Ces expériences n'ont cependant pas évalué le rôle de la *O*-glycosylation dans le maintien de l'activité killer de la WmKT. Enfin, nous n'avons pas pu distinguer la part de *N*- et de *O*-glycosylation chez la WmKT. En effet, dans nos conditions expérimentales, l'utilisation séparée d'enzymes permettant de réaliser spécifiquement l'une ou l'autre de ces déglycosylations n'a pas donné de résultats concluants. Une optimisation des

conditions de déglycosylation sélective de la WmKT serait sans doute nécessaire pour apporter une réponse à cette question. Nous avons ensuite produit des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la WmKT (WmKTAbs), anticorps dont la spécificité a été contrôlée par immunofluorescence et Western-blot. Ces WmKTAbs possèdent de plus des propriétés neutralisantes vis-à-vis de l'activité de la WmKT. Cette activité inhibitrice est néanmoins modérée, ce qui peut sembler normal compte-tenu du fait que ces anticorps polyclonaux ont été produits contre une protéine dénaturée. Nous avons aussi montré que les WmKTAbs ont une immunoréactivité croisée avec la PaKT, ce qui confirme la parenté entre les deux toxines.

- **Récepteurs de la WmKT**

Nos expériences d'immunolocalisation de la WmKT avec les WmKTAbs ont montré que la toxine agit à pH 4.6 en se fixant à la surface des levures sensibles. A pH 7.0, la toxine est inactive et l'immunomarquage sur les cellules cibles disparaît. On peut donc supposer que l'absence ou la diminution d'activité de la toxine à un pH supérieur à 4.6 résulte, entre autre, d'une diminution de l'interaction de la toxine avec son récepteur.

Nous avons montré qu'un mutant *krel* de *S. cerevisiae* (Boone *et al.*, 1990) déficient pour la biosynthèse de β 1,6-glucanes est totalement résistant à l'activité de la WmKT alors que la souche sauvage y est sensible. Le mutant *knr4* de *S. cerevisiae* (Hong *et al.*, 1994), qui possède une activité β -1,3 glucane synthase réduite, est pour sa part partiellement résistant à l'activité de la WmKT. Les β -glucanes pariétaux semblent donc constituer des récepteurs de la WmKT. Cette hypothèse est compatible avec l'antagonisme que nous avons observé entre l'activité de la WmKT et celle de la zymoliazé sur des levures cibles. De plus, elle est cohérente avec l'existence de β -glucanes pariétaux chez *P. carinii* (Kottom & Limper, 2000), microorganisme fongique sensible à la WmKT.

Selon l'hypothèse développée par l'équipe du Professeur L. Polonelli, les anticorps anti-idiotypiques killer (KT-IdAbs) miment l'activité killer de la WmKT et possèdent une affinité pour son récepteur à la surface des mêmes cellules cibles (Polonelli & Morace, 1988b). Si les β -glucanes pariétaux constituent le récepteur fongique de la WmKT, nous pouvons supposer que ces polysaccharides constituent également les récepteurs des KT-IdAbs. Cette hypothèse

pourrait être vérifiée par des tests d'activité killer ou des expériences d'immunolocalisation indirecte des KT-IdAbs sur les mutants *kre1* et *knr4* de *S. cerevisiae*.

L'activité antimicrobienne des KT-IdAbs a été démontrée contre *M. tuberculosis*. Compte tenu du fait que les β -glucanes constituent les récepteurs fongiques de la WmKT, il est probable que les KT-IdAbs se fixent sur les glucanes capsulaires qui ont été récemment décrits chez cette bactérie (Cywes *et al.*, 1997; Ehlers & Daffe, 1998). Des données récentes montrent que les KT-IdAbs sont actifs contre des bactéries pathogènes Gram-positives. Or, il est admis que la paroi de ces bactéries ne possède pas de β -glucanes. Cela suggère que la fixation pariétale des KT-IdAbs peut se faire par l'intermédiaire d'un domaine peptidique possédant à la fois une affinité pour les β -glucanes et les peptidoglycanes pariétaux des bactéries Gram-positives. Des propriétés comparables ont été décrites pour des protéines fongicides et bactéricides capable de se fixer sur les deux types polysaccharides par l'intermédiaire d'un site unique de liaison aux β -glucanes (Ma & Kanost, 2000).

• Mécanisme d'action de la WmKT

Après contact avec la WmKT, le marquage au iodure de propidium (PI) des levures cibles augmente considérablement, ce qui suggère que la toxine induit une augmentation de la perméabilité cellulaire. Ce marquage étant détectable après seulement 10 minutes de contact, la WmKT est donc capable d'exercer son effet létal dans un laps de temps très court après sa fixation sur la paroi de la cellule cible. Des sphéroplastes de levures sensibles ont un phénotype de résistance à la WmKT. Cette observation suggère que l'interaction entre la toxine et les β -glucanes pariétaux est un événement indispensable à l'effet antimicrobien de la toxine. Au contraire, la toxine K1 *S. cerevisiae*, qui utilise les β 1,6-glucanes pariétaux comme récepteur primaire, reste active contre des sphéroplastes de levures sensibles (Zhu & Bussey, 1989). Les toxines K1 et la WmKT agissent donc sans doute par le biais de mécanismes différents. L'absence d'activité de la WmKT contre des sphéroplastes laisse supposer que les β -glucanes constituent une cible moléculaire de son pouvoir antimicrobien et qu'ils ne représentent pas seulement des récepteurs transitoires permettant la pénétration de la toxine dans la levure cible. Cette hypothèse est confortée par l'existence d'un phénotype de résistance à la β -glucanase de *W. saturnus* var *mrakii* MUCL 41968 et *P. anomala* ATCC

Williopsis Saturnus var. *mrakii* MUCL 41968

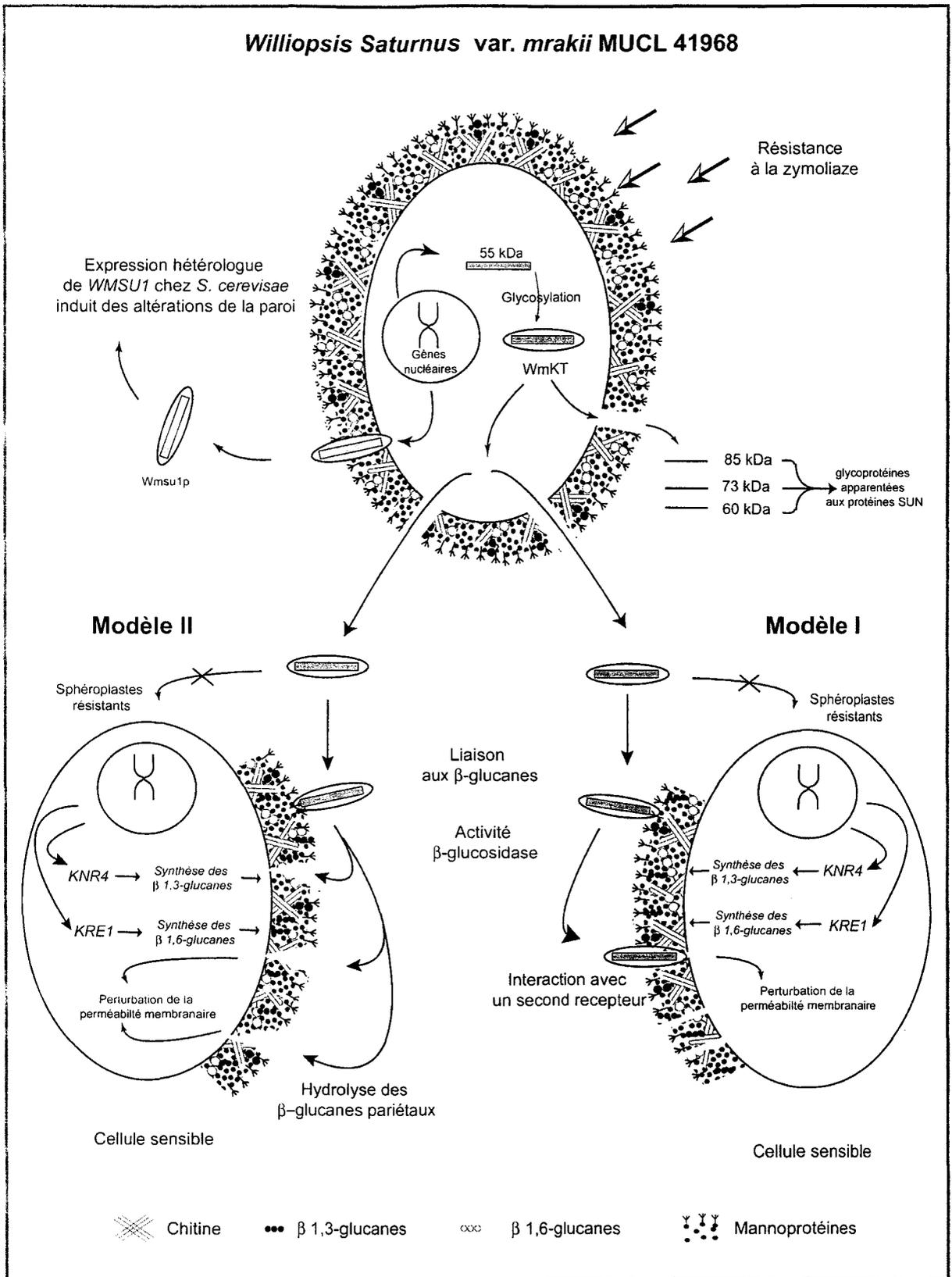


Figure 13 : Modèles de mécanisme d'action de la WmKT. Modèle I : l'activité β -glucosidase de la WmKT n'est pas directement responsable de l'activité antifongique, mais elle participe à la pénétration de la toxine à travers la paroi de la cellule cible pour atteindre un second récepteur. Modèle II : l'activité hydrolytique de la WmKT induit une importante dégradation de la paroi cellulaire des levures cibles et est responsable de la perte de l'équilibre osmotique.

96603. Dans le cas de ces deux souches killer, les β -glucanes pariétaux sont donc soit inaccessibles, soit produits en excès, ce qui protège les levures contre l'activité enzymatique de la β -glucanase. Cette architecture originale de la paroi de ces souches killer constitue peut-être l'une des clefs du mécanisme d'auto-immunité vis-à-vis de la WmKT.

La WmKT possède des homologies de séquence avec les protéines SUN de levure. Quatre des sept protéines de cette famille sont impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire et certaines pourraient posséder une activité enzymatique de type transglycosidase ou glycosidase (Skory & Freer, 1995; Omi *et al.*, 1999; Mouassite *et al.*, 2000a). Ces observations concernant ces protéines SUN homologues à la WmKT, nous ont amené à postuler que la toxine killer de *W. saturnus* var. *mrakii* possède une activité hydrolytique dirigées contre les polysaccharides pariétaux de levure. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une série d'expériences basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de glucosidases et des substrats saccharidiques couplés au *p*-nitrophenyl. Nous avons alors montré que l'activité antimicrobienne de la WmKT est inhibée par la castanospermine, un inhibiteur spécifique de β -glucosidases (Ridruejo *et al.*, 1989). Nous avons ensuite montré que la WmKT possède une activité hydrolytique vis-à-vis du *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside et que cette activité enzymatique est aussi inhibée par la castanospermine. De plus, elle montre une sensibilité aux variations de pH comparable à l'activité biologique de la toxine purifiée. Globalement, ces résultats suggèrent que l'activité hydrolytique associée à la WmKT joue un rôle majeur dans son activité antimicrobienne. Des caractéristiques enzymatiques comparables ont été décrites pour la toxine de killer de *K. lactis* dont l'activité exo-chitinase est indispensable à sa pénétration dans les cellules cibles (Butler *et al.*, 1991).

Ces résultats nous amènent à émettre deux hypothèses quant au mode d'action de la WmKT (figure. 13). Tout d'abord, nous pouvons supposer que l'activité glucosidase de la WmKT n'est pas directement responsable de l'activité antifongique, mais qu'elle participe à la pénétration de la toxine à travers la paroi de la cellule cible. La WmKT pourrait ainsi utiliser son activité glucosidase pour hydrolyser les polysaccharides pariétaux afin d'atteindre un second récepteur. Une autre hypothèse consisterait à dire que l'activité hydrolytique de la WmKT est en fait sa fonction principale et qu'elle induit une importante dégradation de la paroi cellulaire des levures cibles. Cette dégradation de la paroi serait responsable de la perte de l'équilibre osmotique, provoquant ainsi la lyse de la cellule. Cette dernière hypothèse est



en accord avec nos observations en microscopie électronique à balayage qui montrent que des cellules soumises à l'action de la WmKT présentent des altérations profondes de la paroi cellulaire. Ce phénotype de dégradation de la paroi est d'ailleurs comparable à celui que nous avons observé après traitement des levures à la zymoliase. Des fonctions similaires d'hydrolyse de la paroi cellulaire ont été reportées pour des glucosidases produites par des plantes et des champignons possédant des propriétés antifongiques et permettant la défense contre des micro-organismes pathogènes (Stintzi *et al.*, 1993; Yi & Hwang, 1997; Rey *et al.*, 2001).

- **Etude du gène codant la WmKT**

La dernière partie de ce travail s'est focalisée sur l'étude du gène codant la WmKT. En tenant compte des homologies de séquence de la WmKT avec les protéines SUN, nous avons élaboré une stratégie de clonage basée sur l'utilisation du gène *SUN4* de *S. cerevisiae* comme sonde d'hybridation hétérologue. Cette stratégie a permis l'isolement du gène *WMSU1* de *W. saturnus* var *mrakii* MUCL 41968 codant une protéine présentant une masse moléculaire calculée de 42 kDa. L'analyse de la séquence protéique déduite de *WMSU1* a révélé des homologies avec les protéines SUN fongiques et les séquences peptidiques de la WmKT. *In silico*, la Wmsulp apparaît comme une protéine sécrétée ou pariétale puisqu'elle possède une séquence signal putative. De plus, elle présente un site de maturation par la protéase kex2p et de nombreux sites potentiels de glycosylation. Ces arguments plaident en faveur d'une parenté entre la Wmsulp et la WmKT, car la toxine killer de *W. saturnus* var. *mrakii* est une glycoprotéine pariétale et sécrétée dont la portion protéique possède une masse moléculaire apparente d'environ 55 kDa. Cependant, l'identité entre la séquence de Wmsulp et les peptides dérivant de la WmKT n'est pas parfaite, ce qui suggère que *WMSU1* ne code pas la WmKT, mais que les 2 protéines sont simplement apparentées. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons exprimé *WMSU1* dans un contexte hétérologue en utilisant des vecteurs plasmidiques. Chez *E.coli*, l'expression de *WMSU1* est toxique puisque la croissance des bactéries recombinantes est altérée et que Wmsulp n'est produit qu'en très faibles quantités. Chez *S. cerevisiae*, l'expression de *WMSU1* semble également toxique puisqu'elle est corrélée à une faible synthèse de la Wmsulp et à un phénotype de perturbation de la paroi fongique des cellules recombinantes. Ce phénotype est d'ailleurs comparable à celui résultant de l'action de la WmKT sur les levures sensibles, ce qui conforte l'hypothèse de fonctions apparentées pour la WmKT et la Wmsulp. Enfin, l'analyse par Southern blot avec une sonde

codant pour la région C-terminale conservée de la Wmsulp montre que le génome de *W. saturnus* var *mrakii* MUCL 41968 comporte d'autres gènes de la famille SUN. Nous pouvons donc supposer que le gène codant pour la WmKT est parmi ces gènes *SUN*. Le clonage de ces gènes homologues à *WMSU1* constituerait sans doute une stratégie intéressante pour l'isolement du gène codant la WmKT.

- **Conclusion générale**

D'un point de vue global, le travail réalisé au cours de cette étude a permis de mettre en évidence des propriétés essentielles de la WmKT.

Si les potentialités thérapeutiques de la WmKT et des KTIdAbs vis-à-vis d'infections fongiques et bactériennes étaient clairement établies lorsque nous avons initié ce travail, aucune étude n'avait été menée pour décrire le fonctionnement de cette toxine. C'est pourquoi nous nous sommes intéressé à la caractérisation biochimique de la WmKT, à l'identification de ses récepteurs et à la description de son mécanisme d'action.

Nous avons ainsi montré que la WmKT possède des caractéristiques structurales et fonctionnelles originales par rapport autres toxines killer de levure et nous pouvons supposer que cette originalité lui confère en partie son large spectre antimicrobien. L'étude biochimique menée sur la toxine purifiée a révélé qu'il s'agit d'une glycoprotéine de haut poids moléculaire comportant des homologies avec des protéines qui sont impliquées dans la maintenance ou la synthèse de la paroi fongique. Ces homologies suggèrent que le mécanisme d'action de la WmKT est peut-être basé sur une modification de l'intégrité de la paroi cellulaire. Cette hypothèse est cohérente avec la mise en évidence d'une interaction entre la WmKT et les β -glucanes des levures cibles. Nous avons par ailleurs montré qu'après s'être liée avec ces polyssacharides pariétaux, la WmKT induit très rapidement une augmentation de perméabilité cellulaire. Comme le suggèrent nos mesures d'activité enzymatique, cette perméabilité est peut-être causée par une dégradation de la paroi fongique, ce qui conduit ensuite à la mort cellulaire. Ce mécanisme d'action est en accord avec l'observation d'un phénotype d'altération de la paroi associé à l'expression hétérologue chez *S. cerevisiae* de *WMSU1*, un gène apparenté à celui de la WmKT. Néanmoins, ce modèle suppose que l'activité glucosidase de la WmKT soit capable d'altérer l'intégrité de la paroi de champignons tels que *P. carinii* et de bactéries comme *M. tuberculosis*. Cette hypothèse est

actuellement à l'étude dans notre laboratoire et nos premiers résultats montrent qu'un traitement avec une β -glucanase induit des altérations morphologiques sévères chez *P. carinii*, comparables à celles provoquées par la WmKT (E.M. Aliouat, communication personnelle). Des expériences similaires sont également menées sur *M. tuberculosis*, elles seront sans doute très informatives pour la validation de notre modèle.

Notre objectif est maintenant de cloner les autres gènes de la famille SUN de *W. saturnus* var. *mrakii* MUC1 41968, car il est probable que le gène codant la WmKT soit présent parmi eux. Une fois ce gène cloné, il sera intéressant de produire des peptides recombinants pour tenter de mettre en évidence le ou les domaine(s) responsable(s) de l'activité toxique de la WmKT. Pareille démarche pourrait conduire au développement de molécules antimicrobiennes efficaces contre un large spectre de micro-organismes pathogènes. Ces molécules seraient particulièrement précieuses pour le traitement d'infection multiples, car les méthodes thérapeutiques actuelles imposent la prise simultanée de plusieurs médicaments, ce qui induit des effets secondaires et favorise l'augmentation des cas de résistance.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **Abranches, J., Morais P. B., Rosa C. A., et al.** (1997). The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Can J Microbiol*, **43**, 328-336.
- [2] **Adams, A., Gottschling D., Kaiser C., et al.** (1997). Methods in yeast genetics. New York, Cold Spring harbor.
- [3] **Ahmed, A., Sesti F., Ilan N., et al.** (1999). A molecular target for viral killer toxin: TOK1 potassium channels. *Cell*, **99**, 283-291
- [4] **Al-Aidroos, K. and Bussey H.** (1978). Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Can J Microbiol*, **24**, 228-237
- [5] **Aliouat, E., Cailliez J., Séguy N., et al.** (1993a). Inhibitory effect of a yeast killer toxin to the *in vitro* *Pneumocystis carinii* attachment. *Immunother Infect Dis*, **5**, 102-106
- [6] **Aliouat, E. M., Dei-Cas E., Ouaisi A., et al.** (1993b). *In vitro* attachment of *Pneumocystis carinii* from mouse and rat origin. *Biol Cell*, **77**, 209-217
- [7] **Ashida, S., Shimazaki T., Kitano K., et al.** (1983). New Killer Toxin of *Hansenula mrakii*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2953-2955
- [8] **Ausubel, F. M., Brent R., Kingston R. E., et al.** (1994). Current Protocols in Molecular Biology. New York, John Wiley and Sons, Inc.
- [9] **Avalle, B., Thomas D. and Friboulet A.** (1998). Functional mimicry: elicitation of a monoclonal anti-idiotypic antibody hydrolyzing beta-lactams. *Faseb J*, **12**, 1055-1060
- [10] **Barnett, J., Payne R. and Yarrow D.** (1990). Yeasts, Characteristics And Identification. Cambridge.
- [11] **Barrett-Bee, K., Newbould L. and Pinder P.** (1991). Biochemical changes associated with the antifungal action of the triazole ICI 153,066 on *Candida albicans* and *Trichophyton quinckeanum*. *FEMS Microbiol Lett*, **63**, 127-131.
- [12] **Beaulieu, D., Tang J., Zeckner D. J., et al.** (1993). Correlation of cilofungin *in vivo* efficacy with its activity against *Aspergillus fumigatus* (1,3)-beta-D-glucan synthase. *FEMS Microbiol Lett*, **108**, 133-137.
- [13] **Beninati, C., Oggioni M. R., Boccanera M., et al.** (2000). Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol*, **18**, 1060-1064

- [14] **Bevan, E. M. and Makower M.** (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. XIth International Congress of Genetics, Press. Oxford.
- [15] **Bolard, J.** (1986). How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta*, **864**, 257-304.
- [16] **Bolen, P. L., Eastman E. M., Cihak P. L., et al.** (1994). Isolation and sequence analysis of a gene from the linear DNA plasmid pPacl-2 of *Pichia acaciae* that shows similarity to a killer toxin gene of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **10**, 403-414
- [17] **Boone, C., Sdicu A., Wagner J., et al.** (1990a). Integration of the yeast K1 killer toxin gene into the genome of marked wine yeast and its effect on vinification. *Am J Enol Vit*, **41**, 37-42
- [18] **Boone, C., Sommer S. S., Hensel A., et al.** (1990b). Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J Cell Biol*, **110**, 1833-1843
- [19] **Bortol, A., Nudel C., Fraille E., et al.** (1986). Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Appl Microbiol Biotechnol*, **24**, 414-416
- [20] **Bostian, K. A., Sturgeon J. A. and Tipper D. J.** (1980). Encapsidation of yeast killer double-stranded ribonucleic acids: dependence of M on L. *J Bacteriol*, **143**, 463-470
- [21] **Bostian, K. A., Elliott Q., Bussey H., et al.** (1984). Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell*, **36**, 741-751
- [22] **Bozarth, R., Koltin Y., Weissman M., et al.** (1981). The molecular weight and packaging of dsRNAs in the mycovirus from *Ustilago maydis*. *Virology*, **118**, 492-502
- [23] **Brajtburg, J., Powderly W. G., Kobayashi G. S., et al.** (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother*, **34**, 183-188.
- [24] **Bulawa, C. E. and Osmond B. C.** (1990). Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7424-7428.
- [25] **Bulawa, C. E.** (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol*, **47**, 505-534
- [26] **Bussey, H., Sherman D. and Somers J. M.** (1973). Action of yeast killer factor: a resistant mutant with sensitive spheroplasts. *J Bacteriol*, **113**, 1193-1197

- [27] Bussey, H. and Skipper N. (1976). Killing of *Torulopsis glabrata* by *Saccharomyces cerevisiae* killer factor. *Antimicrob Agents Chemother*, **9**, 352-354
- [28] Bussey, H., Saville D., Hutchins K., *et al.* (1979). Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **140**, 888-892.
- [29] Bussey, H., Boone C., Zhu H., *et al.* (1990). Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. *Experientia*, **46**, 193-200
- [30] Bussey, H. (1991). K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol Microbiol*, **5**, 2339-2343
- [31] Butler, A. R., O'Donnell R. W., Martin V. J., *et al.* (1991a). *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur J Biochem*, **199**, 483-488.
- [32] Butler, A. R., Porter M. and Stark M. J. (1991b). Intracellular expression of *Kluyveromyces lactis* toxin gamma subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant. *Yeast*, **7**, 617-625
- [33] Butler, A. R., White J. H., Folawiyo Y., *et al.* (1994). Two *Saccharomyces cerevisiae* genes which control sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* toxin. *Mol Cell Biol*, **14**, 6306-6316
- [34] Cabib, E., Roh D. H., Schmidt M., *et al.* (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem*, **276**, 19679-19682.
- [35] Cailliez, J., Cantelli C., Conti S., *et al.* (1993). *Pichia anomala* killer toxin secretion in the presence of tunicamycin. *J. Med. Vet. Myc.*, **31**, 337-342
- [36] Cailliez, J. C., Gerloni M., Morace G., *et al.* (1992). Ultrastructural immunodetection of a *Pichia anomala* killer toxin: a preliminary study. *Biol Cell*, **75**, 19-23
- [37] Cailliez, J. C., Cantelli C., Seguy N., *et al.* (1994a). Killer toxin secretion through the cell wall of the yeast *Pichia anomala*. *Mycopathologia*, **126**, 173-177.
- [38] Cailliez, J. C., Seguy N., Aliouat E. M., *et al.* (1994b). The yeast killer phenomenon: a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Med Hypotheses*, **43**, 167-171.
- [39] Camougrand, N. M., Mouassite M., Velours G. M., *et al.* (2000). The "SUN" family: *UTH1*, an ageing gene, is also involved in the regulation of mitochondria biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, **375**, 154-160

- [40] Cappellaro, C., Mrsa V. and Tanner W. (1998). New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol*, **180**, 5030-5037
- [41] Cassone, A., Mason R. E. and Kerridge D. (1981). Lysis of growing yeast-form cells of *Candida albicans* by echinocandin: a cytological study. *Sabouraudia*, **19**, 97-110.
- [42] Cassone, A., Conti S., De Bernardis F., *et al.* (1997). Antibodies, killer toxins and antifungal immunoprotection: a lesson from nature? *Immunol Today*, **18**, 164-169
- [43] Castillo, A. and Cifuentes V. (1994). Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr Genet*, **26**, 364-368
- [44] Chanh, T. C., Rappocciolo G. and Hewetson J. F. (1990). Monoclonal anti-idiotypic induces protection against the cytotoxicity of the *trichothecene* mycotoxin T-2. *J Immunol*, **144**, 4721-4728.
- [45] Chapman, T., Kinsman O. and Houston J. (1992). Chitin biosynthesis in *Candida albicans* grown in vitro and *in vivo* and its inhibition by nikkomycin Z. *Antimicrob Agents Chemother*, **36**, 1909-1914.
- [46] Chen, X. J., Wesolowski-Louvel M., Tanguy-Rougeau C., *et al.* (1988). A gene-cloning system for *Kluyveromyces lactis* and isolation of a chromosomal gene required for killer toxin production. *J Basic Microbiol*, **28**, 211-220
- [47] Choi, W. J., Sburlati A. and Cabib E. (1994). Chitin synthase 3 from yeast has zymogenic properties that depend on both the CAL1 and the CAL3 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4727-4730.
- [48] Clackson, T., Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., *et al.* (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, **352**, 624-628.
- [49] Cohen, M. L. (2000). Changing patterns of infectious disease. *Nature*, **406**, 762-767.
- [50] Conti, S., Fanti F., Magliani W., *et al.* (1998a). Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *J Infect Dis*, **177**, 807-811
- [51] Conti, S., Magliani W., Gerloni M., *et al.* (1998b). A transphylectic anti-infectious control strategy based on the killer phenomenon. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **22**, 151-161.
- [52] Conti, S., Magliani W., Arseni S., *et al.* (2000). *In vitro* activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant gram-positive cocci. *Mol Med*, **6**, 613-619.

-
- [53] Cywes, C., Hoppe H. C., Daffe M., *et al.* (1997). Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun*, **65**, 4258-4266.
- [54] De la Pena, P., Barros F., Gascon S., *et al.* (1981). Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **256**, 10420-10425.
- [55] De Nobel, H., van Den Ende H. and Klis F. M. (2000). Cell wall maintenance in fungi. *Trends Microbiol*, **8**, 344-345.
- [56] Diasio, R. B., Bennett J. E. and Myers C. E. (1978). Mode of action of 5-fluorocytosine. *Biochem Pharmacol*, **27**, 703-707.
- [57] Dignard, D., Whiteway M., Germain D., *et al.* (1991). Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol Gen Genet*, **227**, 127-136
- [58] Dmochowska, A., Dignard D., Henning D., *et al.* (1987). Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell*, **50**, 573-584
- [59] Ehlers, M. R. and Daffe M. (1998). Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol*, **6**, 328-335.
- [60] Eisfeld, K., Riffer F., Mentges J., *et al.* (2000). Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol*, **37**, 926-940
- [61] El-Sherbeini, M., Tipper D. J., Mitchell D. J., *et al.* (1984). Virus-like particle capsid proteins encoded by different L double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae*: their roles in maintenance of M double-stranded killer plasmids. *Mol Cell Biol*, **4**, 2818-2827
- [62] Emanuelsson, O., Nielsen H., Brunak S., *et al.* (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N- terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, **300**, 1005-1016.
- [63] Fields, B. A., Goldbaum F. A., Ysern X., *et al.* (1995). Molecular basis of antigen mimicry by an anti-idiotope. *Nature*, **374**, 739-742.
- [64] Finkler, A., Peery T., Tao J., *et al.* (1992). Immunity and resistance to the KP6 toxin of *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **233**, 395-403
-

-
- [65] Frohloff, F., Fichtner L., Jablonowski D., *et al.* (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Embo J*, **20**, 1993-2003.
- [66] Fromtling, R. A. (1988). Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin Microbiol Rev*, **1**, 187-217.
- [67] Gage, M. J., Bruenn J., Fischer M., *et al.* (2001). KP4 fungal toxin inhibits growth in *Ustilago maydis* by blocking calcium uptake. *Mol Microbiol*, **41**, 775-785.
- [68] Ganesa, C., Chang Y. J., Flurkey W. H., *et al.* (1989). Purification and molecular properties of the toxin coded by *Ustilago maydis* virus P4. *Biochem Biophys Res Commun*, **162**, 651-657
- [69] Ganesa, C., Flurkey W. H., Randhawa Z. I., *et al.* (1991). *Ustilago maydis* virus P4 killer toxin: characterization, partial amino terminus sequence, and evidence for glycosylation. *Arch Biochem Biophys*, **286**, 195-200
- [70] Georgopapadakou, N. H. and Walsh T. J. (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 279-291.
- [71] Germain, D., Thomas D. Y. and Boileau G. (1993). Processing of Kex2 pro-region at two interchangeable cleavage sites. *FEBS Lett*, **323**, 129-131.
- [72] Ghannoum, M. A. and Rice L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 501-517.
- [73] Golubev, W. and Shabalin Y. (1994). Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiol Lett*, **119**, 105-110
- [74] Golubev, W. (1998). Killer activity of *Tilletiopsis albescens* Gokhale: taxonomic and phylogenetic implication. *Syst Appl Microbiol*, **21**, 429-432
- [75] Goto, K., Iwatuki Y., Kitano K., *et al.* (1990a). Cloning and nucleotide sequence of the KHR killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem*, **54**, 979-984.
- [76] Goto, K., Ywase Y., Kichise K., *et al.* (1990b). Isolation and properties of a chromosome-dependant KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem*, **54**, 505-509
- [77] Goto, K., Fukuda H., Kichise K., *et al.* (1991). Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem*, **55**, 1953-1958.
-

- [78] Green, L., Petersen B., Steimel L., *et al.* (1994). Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**, 1088-1091
- [79] Groll, A. H., Shah P. M., Mentzel C., *et al.* (1996). Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect*, **33**, 23-32.
- [80] Gu, F., Khimani A., Rane S. G., *et al.* (1995). Structure and function of a virally encoded fungal toxin from *Ustilago maydis*: a fungal and mammalian Ca²⁺ channel inhibitor. *Structure*, **3**, 805-814.
- [81] Gunge, N. and Sakaguchi K. (1981). Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid killer plasmids, pGK11 and pGK12, from *Kluyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. *J Bacteriol*, **147**, 155-160
- [82] Gunge, N., Tamaru A., Ozawa F., *et al.* (1981). Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J Bacteriol*, **145**, 382-390
- [83] Guyard, C., Seguy N., Lange M., *et al.* (1999). First steps in the purification and characterization of a *Pichia anomala* killer toxin. *J Eukaryot Microbiol*, **46**, 144S
- [84] Guyard, C., Magliani W., Polonelli L., *et al.* (2000). The yeast killer toxins. *J Mycol Méd*, **9**, 9-20
- [85] Guyard, C., Evrard P., Corbisier-Colson A. M., *et al.* (2001). Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with a *Williopsis var. saturnus mrakii* killer toxin. *Medical Mycology*, **39**, 395-400
- [86] Hanes, S. D., Burn V. E., Sturley S. L., *et al.* (1986). Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 1675-1679
- [87] Hansen, J. E., Lund O., Rapacki K., *et al.* (1997). O-GLYCBASE version 2.0: a revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Res*, **25**, 278-282.
- [88] Hara, S., Iimura Y. and Otsuka K. (1980). Breeding of useful killer wine yeasts. *Am J Enol Vit*, **31**, 28-33
- [89] Hayman, G. T. and Bolen P. L. (1991). Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Curr Genet*, **19**, 389-393
- [90] Hetland, G., Lovik M. and Wiker H. G. (1998). Protective effect of beta-glucan against *Mycobacterium bovis*, BCG infection in BALB/c mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, **47**, 548-553.

- [91] **Hodgson, V. J., Button D. and Walker G. M.** (1995). Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*, **141**, 2003-2012
- [92] **Hoffman, C. S. and Winston F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272
- [93] **Hoffman, O. A., Standing J. E. and Limper A. H.** (1993). *Pneumocystis carinii* stimulates tumor necrosis factor-alpha release from alveolar macrophages through a beta-glucan-mediated mechanism. *Journal of Immunology*, **150**, 3932-3940.
- [94] **Hong, Z., Mann P., Brown N. H., et al.** (1994). Cloning and characterization of KNR4, a yeast gene involved in (1,3)-beta-glucan synthesis. *Mol Cell Biol*, **14**, 1017-1025
- [95] **Hutchins, K. and Bussey H.** (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol*, **154**, 161-169.
- [96] **Izadyar, L., Friboulet A., Remy M. H., et al.** (1993). Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of a catalytic antibody with a cholinesterase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8876-8880.
- [97] **Jackson, H. C., Seguy N., Killigin E. M., et al.** (1996). Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on the viability of rat-derived *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol*, **43**, 29S.
- [98] **James, S., Roberts I. and Collins M.** (1998). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Williopsis* as revealed by 18S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*, **48 Pt 2**, 591-596
- [99] **Jerne, N. K.** (1974). Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*, **125C**, 373-389.
- [100] **Kagan, B. L.** (1983). Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature*, **302**, 709-711
- [101] **Kandel, J. S. and Stern T. A.** (1979). Killer phenomenon in pathogenic yeast. *Antimicrob Agents Chemother*, **15**, 568-571
- [102] **Kang, M. S. and Cabib E.** (1986). Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1----3)-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 5808-5812.

- [103] Kapteyn, J. C., Van Den Ende H. and Klis F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta*, **1426**, 373-383.
- [104] Kasahara, S., Ben Inoue S., Mio T., *et al.* (1994a). Involvement of cell wall beta-glucan in the action of HM-1 killer toxin. *FEBS Lett*, **348**, 27-32
- [105] Kasahara, S., Yamada H., Mio T., *et al.* (1994b). Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits beta-glucan synthesis. *J Bacteriol*, **176**, 1488-1499
- [106] Kashiwagi, T., Kunishima N., Suzuki C., *et al.* (1997). The novel acidophilic structure of the killer toxin from halotolerant yeast demonstrates remarkable folding similarity with a fungal killer toxin. *Structure*, **5**, 81-94
- [107] Kimura, T., Kitamoto N., Matsuoka K., *et al.* (1993). Isolation and nucleotide sequences of the genes encoding killer toxins from *Hansenula mrakii* and *H. saturnus*. *Gene*, **137**, 265-270
- [108] Kimura, T., Kitamoto N., Ohta Y., *et al.* (1995). Structural relationships among killer toxins secreted from the killer strains of the genus *Williopsis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**
- [109] Kimura, T., Kitamoto N., Kito Y., *et al.* (1997). A novel yeast gene, RHK1, is involved in the synthesis of the cell wall receptor for the HM-1 killer toxin that inhibits beta-1,3-glucan synthesis. *Mol Gen Genet*, **254**, 139-147
- [110] Kimura, T., Komiyama T., Furuichi Y., *et al.* (1999). N-glycosylation is involved in the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to HM-1 killer toxin secreted from *Hansenula mrakii* IFO 0895. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 176-184
- [111] Klis, F. M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast*, **10**, 851-869.
- [112] Kolesnikov, A. V., Kozyr A. V., Alexandrova E. S., *et al.* (2000). Enzyme mimicry by the antiidiotypic antibody approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13526-13531.
- [113] Koltin, Y. and Day P. R. (1975). Specificity of *Ustilago maydis* killer proteins. *Appl Microbiol*, **30**, 694-696
- [114] Koltin, Y. and Day P. R. (1976). Inheritance of killer phenotypes and double-stranded RNA in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 594-598

- [115] **Koltin, Y. and Kandel J.** (1978). Killer phenomenon in *Ustilago maydis* : the organization in the viral genome. *Genetics*, **88**, 267-276
- [116] **Koltin, Y., Levine R. and Peery T.** (1980). Assignment of functions to segments of the DsRNA genome of the *Ustilago* virus. *Mol Gen Genet*, **178**, 173-178
- [117] **Komiyama, T., Ohta T., Furuichi Y., et al.** (1995). Structure and activity of HYI killer toxin from *Hansenula saturnus*. *Biol Pharm Bull*, **18**, 1057-1059
- [118] **Komiyama, T., Ohta T., Urakami H., et al.** (1996). Pore formation on proliferating yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell buds by HM-1 killer toxin. *J Biochem (Tokyo)*, **119**, 731-736
- [119] **Komiyama, T., Shirai T., Ohta T., et al.** (1998). Action properties of HYI killer toxin from *Williopsis saturnus* var. *saturnus*, and antibiotics, aculeacin A and papulacandin B. *Biol Pharm Bull*, **21**, 1013-1019
- [120] **Kottom, T. J. and Limper A. H.** (2000). Cell wall assembly by *Pneumocystis carinii*. Evidence for a unique gsc-1 subunit mediating beta -1,3-glucan deposition. *J Biol Chem*, **275**, 40628-40634.
- [121] **Kreger-van, R.** (1984). The Yeast Taxonomy. Amsterdam.
- [122] **Kunkel, H., Mannik M. and RC. W.** (1963). Individual antigenic specificity of isolated antibodies. *Science*, **140**, 1218-1219
- [123] **Kurtz, M. B. and Douglas C. M.** (1997). Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J Med Vet Mycol*, **35**, 79-86.
- [124] **Kurtzman, C. and Fell J.** (1998). The Yeasts, a taxonomic study. Descriptions of Teleomorphic Ascomycetous Genera and Species. E. (Ed). Amsterdam: 350-352.
- [125] **Kurtzman, C. P.** (2000). Four new yeasts in the *Pichia anomala* clade. *Int J Syst Evol Microbiol*, **50 Pt 1**, 395-404
- [126] **Kurzweilova, H. and Sigler K.** (1993). Factors affecting the susceptibility of sensitive yeast cells to killer toxin K1. *Folia Microbiol*, **38**, 524-526
- [127] **Kurzweilova, H. and Sigler K.** (1994). Kinetic studies of killer toxin K1 binding to yeast cells indicate two receptor populations. *Arch Microbiol*, **162**, 211-214
- [128] **Kyte, J. and Doolittle R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*, **157**, 105-132.

- [129] **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- [130] **Law, D., Moore C. B., Wardle H. M., et al.** (1994). High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. *J Antimicrob Chemother*, **34**, 659-668.
- [131] **Li, N., Erman M., Pangborn W., et al.** (1999). Structure of *Ustilago maydis* killer toxin KP6 alpha-subunit. A multimeric assembly with a central pore. *J Biol Chem*, **274**, 20425-20431
- [132] **Lin, J., Pillay B. and Singh S.** (1999). Purification and biochemical characteristics of beta-D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. *Biotechnol Appl Biochem*, **30**, 81-87.
- [133] **Lipke, P. N. and Ovalle R.** (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol*, **180**, 3735-3740
- [134] **Llorente, P., Marquina D., Santos A., et al.** (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 1165-1167
- [135] **Lolle, S., Skipper N., Bussey H., et al.** (1984). The expression of cDNA clones of yeast M1 double-stranded RNA in yeast confers both killer and immunity phenotypes. *Embo J*, **3**, 1383-1387
- [136] **Lolle, S. J. and Bussey H.** (1986). In vivo evidence for posttranslational translocation and signal cleavage of the killer preprotoxin of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **6**, 4274-4280
- [137] **Lowes, K. F., Shearman C. A., Payne J., et al.** (2000). Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1066-1076
- [138] **Ma, C. and Kanost M. R.** (2000). A beta1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *J Biol Chem*, **275**, 7505-7514.
- [139] **Magliani, W., Conti S., de Bernardis F., et al.** (1997a). Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nat Biotechnol*, **15**, 155-158
- [140] **Magliani, W., Conti S., Gerloni M., et al.** (1997b). Yeast Killer Systems. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**, 369-400
- [141] **Makower, M. and Bewan E. A.** (1963). The physiological basis of killer character in yeast. Proceedings of the XI International Congress of Genetics, Genetics Today's.

-
- [142] **Marquina, D., Toufani S., Llorente P., et al.** (1997). Killer activity in yeast isolates from olives brines. *Adv Food Sci*, **19**, 41-46
- [143] **Marr, K. A. and Bowden R. A.** (1999). Fungal infections in patients undergoing blood and marrow transplantation. *Transpl Infect Dis*, **1**, 237-246.
- [144] **Martinac, B., Zhu H., Kubalski A., et al.** (1990). Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 6228-6232.
- [145] **Mathews, H. L., Conti S., Witek-Janusek L., et al.** (1998). Effect of *Pichia anomala* killer toxin on *Candida albicans*. *Med Mycol*, **36**, 199-204
- [146] **McCafferty, J., Griffiths A. D., Winter G., et al.** (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**, 552-554.
- [147] **McClary, D. O., Nulty W. L. and Miller G. R.** (1959). Effect of potassium versus in the sporulation of *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.*, **78**, 362-368
- [148] **McCracken, D. A., Martin V. J., Stark M. J., et al.** (1994). The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology*, **140**, 425-431.
- [149] **Meaden, P., Hill K., Wagner J., et al.** (1990). The yeast KRE5 gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1,6)-beta-D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol Cell Biol*, **10**, 3013-3019
- [150] **Meskauskas, A. and Citavicius D.** (1992). The K2-type killer toxin- and immunity-encoding region from *Saccharomyces cerevisiae*: structure and expression in yeast. *Gene*, **111**, 135-139.
- [151] **Middelbeek, E. J., Hermans J. M. and Stumm C.** (1979). Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **45**, 437-450
- [152] **Middelbeek, E. J., Stumm C. and Vogels G. D.** (1980a). Effects of *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **46**, 205-220
- [153] **Middelbeek, E. J., van de Laar H. H., Hermans J. M., et al.** (1980b). Physiological conditions affecting the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to a *Pichia kluyveri* killer toxin and energy requirement for toxin action. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **46**, 483-497
-

- [154] **Minamoto, G. Y. and Rosenberg A. S.** (1997). Fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Med Clin North Am*, **81**, 381-409.
- [155] **Mizuno, K., Nakamura T., Takada K., et al.** (1987). A membrane-bound, calcium-dependent protease in yeast alpha-cell cleaving on the carboxyl side of paired basic residues. *Biochem Biophys Res Commun*, **144**, 807-814
- [156] **Mol, P. C., Park H. M., Mullins J. T., et al.** (1994). A GTP-binding protein regulates the activity of (1,3)-beta-glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J Biol Chem*, **269**, 31267-31274.
- [157] **Morace, G., Manzara S., Dettori G., et al.** (1989). Biotyping of bacterial isolates using the yeast killer system. *Eur J Epidemiol*, **5**, 303-310.
- [158] **Morace, G., Cattani P., Manzara S., et al.** (1992). genomic studies on killer yeasts belonging to the genus *Pichia*. *Antonie van leeuwenhoek*, **62**, 215-233
- [159] **Mouassite, M., Camougrand N., Schwob E., et al.** (2000a). The 'SUN' family: yeast *SUN4/SCW3* is involved in cell septation. *Yeast*, **16**, 905-919
- [160] **Mouassite, M., Guerin M. G. and Camougrand N. M.** (2000b). The *SUN* family of *Saccharomyces cerevisiae*: the double knock-out of *UTH1* and *SIMI* promotes defects in nucleus migration and increased drug sensitivity. *FEMS Microbiol Lett*, **182**, 137-141
- [161] **Mrsa, V., Ecker M., Strahl-Bolsinger S., et al.** (1999). Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **181**, 3076-3086.
- [162] **Navarro-Garcia, F., Sanchez M., Nombela C., et al.** (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 245-268.
- [163] **Nielsen, H., Engelbrecht J., Brunak S., et al.** (1997). A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst*, **8**, 581-599.
- [164] **Nisonoff, A. and Lamoyi E.** (1981). Implications of the presence of an internal image of the antigen in anti-idiotypic antibodies: possible application to vaccine production. *Clin Immunol Immunopathol*, **21**, 397-406.

-
- [165] **Nomoto, H., Kitano K., Shimazaki K., et al.** (1984). Distribution of killer yeast in the genus *Hansenula*. *Agric Biol Chem*, **48**, 807-809
- [166] **Ohta, Y.** (1984). Production, purification and characterization of HYI, an anti-yeast substance, produced by *Hanseluna saturnus*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 903-908
- [167] **Omi, K., Sonoda H., Nagata K., et al.** (1999). Cloning and characterization of *psu1(+)*, a new essential fission yeast gene involved in cell wall synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **262**, 368-374
- [168] **Oudin, J. and Michel M.** (1963). Une nouvelle forme d'allotypie des globulines gamma du sérum de lapin apparemment liée à la fonction et à la spécificité des anticorps. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **257**, 805-808
- [169] **Park, C. M., Bruenn J. A., Ganesa C., et al.** (1994). Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Mol Microbiol*, **11**, 155-164.
- [170] **Peery, T., Koltin Y. and Tamarkin A.** (1982). Mapping the immunity function of the *ustilago maydis* P1 virus. *Plasmid*, **7**, 52-58
- [171] **Peery, T., Shabat-Brand T., Steinlauf R., et al.** (1987). Virus-encoded toxin of *Ustilago maydis*: two polypeptides are essential for activity. *Mol Cell Biol*, **7**, 470-477
- [172] **Pelissier, P., Camougrand N., Velours G., et al.** (1995). NCA3, a nuclear gene involved in the mitochondrial expression of subunits 6 and 8 of the Fo-F1 ATP synthase of *S. cerevisiae*. *Curr Genet*, **27**, 409-416
- [173] **Perea, S., Lopez-Ribot J. L., Kirkpatrick W. R., et al.** (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.
- [174] **Polak, A. and Scholer H. J.** (1975). Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. *Chemotherapy*, **21**, 113-130
- [175] **Polonelli, L., Archibusacci C., Sestito M., et al.** (1983). Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol*, **17**, 774-780.
- [176] **Polonelli, L., Castagnola M., Rossetti D. V., et al.** (1985). Use of killer toxins for computer-aided differentiation of *Candida albicans* strains. *Mycopathologia*, **91**, 175-179
-

- [177] Polonelli, L., Lorenzini R., De Bernardis F., *et al.* (1986). Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathologia*, **96**, 103-107.
- [178] Polonelli, L. and Morace G. (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol*, **24**, 866-869
- [179] Polonelli, L. and Morace G. (1987). Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*, **25**, 460-462.
- [180] Polonelli, L. and Morace G. (1988a). Yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Clin Microbiol*, **26**, 602-604.
- [181] Polonelli, L. and Morace G. (1988b). Killer systems and pathogenic fungi. *Eur J Epidemiol*, **4**, 415-418.
- [182] Polonelli, L., Manzara S., Conti S., *et al.* (1989). Serological study of yeast killer toxins by monoclonal antibodies. *Mycopathologia*, **108**, 211-215.
- [183] Polonelli, L., Fanti F., Conti S., *et al.* (1990). Detection by immunofluorescent anti-idiotypic antibodies of yeast killer toxin cell wall receptors of *Candida albicans*. *J Immunol Methods*, **132**, 205-209.
- [184] Polonelli, L., Conti S., Campani L., *et al.* (1991a). Differential toxinogenesis in the genus *Pichia* detected by an anti-yeast killer toxin monoclonal antibody. *Antonie van Leeuwenhoek*, **59**, 139-145
- [185] Polonelli, L., Conti S., Gerloni M., *et al.* (1991b). 'Antibodies': antibiotic-like anti-idiotypic antibodies. *J Med Vet Mycol*, **29**, 235-242
- [186] Polonelli, L., Lorenzini R., De Bernardis F., *et al.* (1993). Idiotypic vaccination: immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand J Immunol*, **37**, 105-110.
- [187] Polonelli, L., De Bernardis F., Conti S., *et al.* (1994). Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Immunol*, **152**, 3175-3182.
- [188] Polonelli, L., De Bernardis F., Conti S., *et al.* (1996). Human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies. *J Immunol*, **156**, 1880-1885.
- [189] Polonelli, L., Seguy N., Conti S., *et al.* (1997). Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, **4**, 142-146

- [190] Puchkov, E. O., Yurkova T. V. and Golubev W. I. (1998). Effects of *Cryptococcus humicola* killer toxin upon *Cryptococcus terreus* envelope: combined fluorometric and microscopic studies. *Biochim Biophys Acta*, **1381**, 61-67
- [191] Radler, F., Schmitt M. J. and Meyer B. (1990). Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. *Arch Microbiol*, **154**, 175-178
- [192] Radler, F., Herzberger S., Schonig I., et al. (1993). Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol*, **139** (Pt 3), 495-500
- [193] Rey, M., Delgado-Jarana J. and Benitez T. (2001). Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, **55**, 604-608.
- [194] Ridruejo, J. C., Munoz M. D., Andaluz E., et al. (1989). Inhibition of yeast exoglucanases by glucosidase inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, **993**, 179-185.
- [195] Robert, V., Evrard P. and Hennebert G. L. (1997). BCCM-TM/Allev 2.00 an automated system for the identification of yeasts. *Mycotaxon*, **64**, 455-464
- [196] Rosenfeld, J., Capdevielle J., Guillemot J. C., et al. (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **203**, 173-179
- [197] Ryder, N. S. (1992). Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br J Dermatol*, **126 Suppl 39**, 2-7.
- [198] Ryder, N. S. and Frank I. (1992). Interaction of terbinafine with human serum and serum proteins. *J Med Vet Mycol*, **30**, 451-460
- [199] Sambrook, J., Fritsh E. F. and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [200] Santos, A., Marquina D., Leal J. A., et al. (2000). 1, 6-beta-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1809-1813
- [201] Sawant, A. D., Abdelal A. T. and Ahearn D. G. (1988). Anti-*Candida albicans* activity of *Pichia anomala* as determined by a growth rate reduction assay. *Appl Environ Microbiol*, **54**, 1099-1103
- [202] Sawant, A. D., Abdelal A. T. and Ahearn D. G. (1989). Purification and characterization of the anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala* WC 65. *Antimicrob Agents Chemother*, **33**, 48-52

- [203] Sawant, A. D. and Ahearn D. G. (1990). Involvement of a cell wall receptor in the mode of action of an anti-Candida toxin of *Pichia anomala*. *Antimicrob Agents Chemother*, **34**, 1331-1335
- [204] Schmitt, M. and Radler F. (1987). Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol*, **133 (Pt 12)**, 3347-3354
- [205] Schmitt, M. J. and Radler F. (1990). Blockage of cell wall receptors for yeast killer toxin KT28 with antimannoprotein antibodies. *Antimicrob Agents Chemother*, **34**, 1615-1618
- [206] Schmitt, M. J. and Tipper D. J. (1990). K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **10**, 4807-4815
- [207] Schmitt, M. J. and Tipper D. J. (1992). Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast*, **8**, 373-384
- [208] Schmitt, M. J. (1995). Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol Gen Genet*, **246**, 236-246
- [209] Schmitt, M. J. and Compain P. (1995). Killer-toxin-resistant kre12 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and biochemical evidence for a secondary K1 membrane receptor. *Arch Microbiol*, **164**, 435-443
- [210] Schmitt, M. J. and Tipper D. J. (1995). Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology*, **213**, 341-351
- [211] Schmitt, M. J., Klavehn P., Wang J., *et al.* (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*, **142 (Pt 9)**, 2655-2662
- [212] Schmitt, M. J., Poravou O., Trenz K., *et al.* (1997). Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-Candida activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J Virol*, **71**, 8852-8855.
- [213] Seguy, N., Aliouat E. M., Dei-Cas E., *et al.* (1994). Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* killer toxin. *J Eukaryot Microbiol*, **41**, 109S.
- [214] Seguy, N. (1996). Etude de la sensibilité de *Pneumocystis carinii* vis-à-vis d'une toxine de *Pichia anomala* et des anticorps anti-idiotypes mimant son action. Lille, Publisher.
- [215] Seguy, N., Cailliez J. C., Polonelli L., *et al.* (1996a). Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on *Pneumocystis carinii* infectivity to the SCID mouse. *Parasitol Res*, **82**, 114-116

- [216] Seguy, N., Polonelli L., Conti S., *et al.* (1996b). In vitro decrease of rat-derived *Pneumocystis carinii* attachment induced by human natural yeast killer toxin-like antiidiotypic candidacidal antibodies. *J Eukaryot Microbiol*, **43**, 27S
- [217] Seguy, N., Cailliez J. C., Delcourt P., *et al.* (1997a). Inhibitory effect of human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies on *Pneumocystis carinii*. *Mol Med*, **3**, 544-552
- [218] Seguy, N., Polonelli L., Dei-Cas E., *et al.* (1997b). Monoclonal killer toxin-like antiidiotypic antibodies to control rat-pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol*, **44**, 37S
- [219] Seguy, N., Polonelli L., Dei-Cas E., *et al.* (1998). Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **22**, 145-149
- [220] Sesti, F., Shih T. M., Nikolaeva N., *et al.* (2001). Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. *Cell*, **105**, 637-644.
- [221] Shahinian, S. and Bussey H. (2000). Beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **35**, 477-489.
- [222] Sheehan, D. J., Hitchcock C. A. and Sibley C. M. (1999). Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 40-79.
- [223] Skory, C. D. and Freer S. N. (1995). Cloning and characterization of a gene encoding a cell-bound, extracellular beta-glucosidase in the yeast *Candida wickerhamii*. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 518-525
- [224] Smits, G. J., van Den Ende H. and Klis F. M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, **147**, 781-794.
- [225] Sossin, W. S., Fisher J. M. and Scheller R. H. (1989). Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. *Neuron*, **2**, 1407-1417.
- [226] Stark, M. J. and Boyd A. (1986). The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *Embo J*, **5**, 1995-2002.
- [227] Starmer, W. T., Ganter P. F., Aberdeen V., *et al.* (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol*, **33**, 783-796
- [228] Steinlauf, R., Peery T., Koltin Y., *et al.* (1988). The *Ustilago maydis* virus-encoded toxin : effect of KP6 on cells and spheroplasts. *Exp Mycol*, **12**, 264-274

- [229] Stintzi, A., Heitz T., Prasad V., *et al.* (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, **75**, 687-706
- [230] Stumm, C., Hermans J. M., Middelbeek E. J., *et al.* (1977). Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **43**, 125-128
- [231] Sturley, S. L., Elliot Q., LeVitre J., *et al.* (1986). Mapping of functional domains within the *Saccharomyces cerevisiae* type 1 killer preprotoxin. *Embo J*, **5**, 3381-3389
- [232] Suzuki, C. and Nikkuni S. (1994). The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *J Biol Chem*, **269**, 3041-3046
- [233] Suzuki, C., Kashiwagi T., Tsuchiya F., *et al.* (1997). Circular dichroism analysis of the interaction between the alpha and beta subunits in a killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Protein Engineering*, **10**, 99-101
- [234] Suzuki, C. (1999). Secretion of a protoxin post-translationally controlled by NaCl in a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Yeast*, **15**, 123-131
- [235] Suzuki, C., Kawano M., Kashiwagi T., *et al.* (2000). Lethal effect of the expression of a killer gene SMK1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Eng*, **13**, 73-76
- [236] Takasuka, T., Komiyama T., Furuichi Y., *et al.* (1995). Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res*, **41**, 575-581
- [237] Takita, M. A. and Castilho-Valavicius B. (1993). Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Yeast*, **9**, 589-598
- [238] Tao, J., Ginsberg I., Banerjee N., *et al.* (1990). *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins. *Mol Cell Biol*, **10**, 1373-1381
- [239] Tao, J., Ginsberg I., Koltin Y., *et al.* (1993). Mutants of *Ustilago maydis* defective in production of one of two polypeptides of KP6 toxin from the preprotoxin. *Mol Gen Genet*, **238**, 234-240
- [240] Tariq, V. N. and Devlin P. L. (1996). Sensitivity of fungi to nikkomycin Z. *Fungal Genet Biol*, **20**, 4-11.
- [241] Tipper, D. J. and Schmitt M. J. (1991). Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol*, **5**, 2331-2338 .

- [242] Tokunaga, M., Kawamura A., Omori A., *et al.* (1992). Structure of yeast pGKL 128-kDa killer-toxin secretion signal sequence. Processing of the 128-kDa killer-toxin-secretion-signal-alpha-amylase fusion protein. *Eur J Biochem*, **203**, 415-423
- [243] Towbin, H., Staehelin T. and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 4350-4354
- [244] Vadasz, A. S., Jagganath D. B., Pretorius I. S., *et al.* (2000). Electron microscopy of the K2 killer effect of *Saccharomyces cerevisiae* T206 on a mesophilic wine yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **78**, 117-122.
- [245] van der Vaart, J. M., Caro L. H., Chapman J. W., *et al.* (1995). Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **177**, 3104-3110
- [246] vanden Bossche, H., Marichal P., Odds F. C., *et al.* (1992). Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, **36**, 2602-2610.
- [247] Vazquez, J. A., Peng G., Sobel J. D., *et al.* (2001). Evolution of Antifungal Susceptibility among *Candida* Species Isolates Recovered from Human Immunodeficiency Virus-Infected Women Receiving Fluconazole Prophylaxis. *Clin Infect Dis*, **33**, 1069-1075.
- [248] Walsh, T. J., Lee J. W., Kelly P., *et al.* (1991). Antifungal effects of the nonlinear pharmacokinetics of cilofungin, a 1,3-beta-glucan synthetase inhibitor, during continuous and intermittent intravenous infusions in treatment of experimental disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*, **35**, 1321-1328.
- [249] Walsh, T. J., Hiemenz J. W. and Anaissie E. (1996). Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. *Infect Dis Clin North Am*, **10**, 365-400.
- [250] Warnock, D. W. (1991). Amphotericin B: an introduction. *J Antimicrob Chemother*, **28 Suppl B**, 27-38.
- [251] Watanabe, T., Oyanagi W., Suzuki K., *et al.* (1992). Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and class III plant chitinases. *J Bacteriol*, **174**, 408-414
- [252] Wesolowski-Louvel, M., Tanguy-Rougeau C. and Fukuhara H. (1988). A nuclear gene required for the expression of the linear DNA-associated killer system in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **4**, 71-81
- [253] West, R. W., Jr., Yocum R. R. and Ptashne M. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Mol Cell Biol*, **4**, 2467-2478.

- [254] Whelan, W. L. (1987). The genetic basis of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Crit Rev Microbiol*, **15**, 45-56
- [255] White, J., Butler A. and Stark M. (1989). *Kluyveromyces lactis* toxin does not inhibit adenylyl cyclase. *Nature*, **341**, 666-668
- [256] Wickner, R. B. (1992). Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol*, **46**, 347-375
- [257] Wickner, R. B. (1996). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **60**, 250-265
- [258] Woods, D. R. and Bevan E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, **51**, 115-126.
- [259] Worsham, P. L. and Bolen P. L. (1990). Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Curr Genet*, **18**, 77-80
- [260] Yabe, T., Yamada-Okabe T., Kasahara S., *et al.* (1996). HKR1 encodes a cell surface protein that regulates both cell wall beta- glucan synthesis and budding pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **178**, 477-483.
- [261] Yamamoto, T., Hiratani T., Hirata H., *et al.* (1986a). Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS Lett*, **197**, 50-54
- [262] Yamamoto, T., Imai M., Tachibana K., *et al.* (1986b). Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*. *FEBS Lett*, **195**, 253-257
- [263] Yi, S. Y. and Hwang B. K. (1997). Purification and antifungal activity of a basic 34 kDa beta-1,3- glucanase from soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora sojae* f. sp. *glycines*. *Mol Cells*, **7**, 408-413.
- [264] Yokomori, Y., Akyiama H. and Shimizu K. (1988). Isolation of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. *Agric Biol Chem*, **52**, 2791-2796
- [265] Young, T. J. I. B. (1981). The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. **87**, 292-295
- [266] Young, T. W. and Yagi M. (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **44**, 59-77

- [267] **Zhu, H., Bussey H., Thomas D. Y., et al.** (1987). Determination of the carboxyl termini of the alpha and beta subunits of yeast K1 killer toxin. Requirement of a carboxypeptidase B-like activity for maturation. *J Biol Chem*, **262**, 10728-10732
- [268] **Zhu, H. and Bussey H.** (1989). The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Appl Environ Microbiol*, **55**, 2105-2107

Annexes

LISTE DES PUBLICATIONS

Guyard C, Seguy N, Lange M, Ricard I, Polonelli L, Cailliez JC. First Steps in the Purification and Characterization of a *Pichia anomala* Killer Toxin. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999 Sep-Oct;46(5):144S.

Snyder C, Seguy N, Lafitte S, Guyard C, Polonelli L, Cailliez Jc, Grzych Jm. Production of anti-toxin antibodies by immunization with *Pichia* killer toxin-like antiidiotypic monoclonal antibodies. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999 Sep-Oct;46(5):138S.

C. Guyard, W. Magliani, L. Polonelli , JC. Cailliez. Les toxines killer de levure. *Journal de Mycologie Médicale*, 2000; 10: 9-20

Marie-claude Geoffroy, Cyril Guyard, Brigitte Quatannens, Sonia Pavan, Marc Lange, and Annick Mercenier. Use of Green Fluorescent Protein To Tag Lactic Acid Bacterium Strains under Development as Live Vaccine Vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 2000, p. 383–391

C. Guyard, E. Dehecq, W. Magliani, L. Polonelli , JC. Cailliez. Les recepteurs des toxines killer de levure. *Journal de Mycologie Médicale*, 2001; 11 : 79-86.

C. Guyard, P. Evrard, AM. Corbisier-colson, H. Louvart, E. Dei-cas, F. D. Menozzi, L. Polonelli & Jc. Cailliez. Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with a *Williopsis* var. *saturnus mrakii* killer toxin. *Medical Mycology*, 2001, 39, 395-400.

C. Guyard, N. Séguy, JC. Cailliez, H. Drobecq, L. Polonelli, E. Dei-Cas, A. Mercenier and F. D. Menozzi. Characterisation of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high-molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity, soumis a publication.

C. Guyard, JC Cailliez, L. Polonelli, E. Dei-Cas, A. Mercenier and F. D. Menozzi. Cloning and characterization of *WMSU1*, a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* gene encoding a new yeast SUN protein involved in the cell wall structure, soumis a publication.

C. Guyard, E. Dehecq, JP. Tissier, L. Polonelli, E. Dei-Cas, JC. Cailliez and F. D. Menozzi Involvement of β -glucan in the wide spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin., en préparation

COMMUNICATIONS ORALES

C. Guyard, N. Seguy , H. Drobecq , L.Polonelli , J.C. Cailliez , E. Dei-cas and F. D. Menozzi. A Killer Toxin with a Transphyletic Antimicrobial Spectrum Produced by the Yeast *Williopsis mrakii* MUCL 41968. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*, September 17-20, 2000 - Toronto, Ontario, Canada (Récompensé par un prix de la Société Américaine de Microbiologie – ASM).

C. Guyard, N. Seguy, M. Lange, I. Ricard, L. Polonelli, JC. Cailliez. First Steps in the Purification and Characterization of a *Pichia anomala* Killer Toxin. *Sixth International Workshops on Opportunistic Protists*, May 26-29,1999, Raleigh, North Carolina, USA.

C. Guyard, F. Rogerie, A. Marecat, F. Dupont, M. Lange. Contribution of Flow Cytometry for Quality Control in Food Process: detection of pathogenic micro-organisms, use in challenge test. *Fifth Meeting of French Society of Microbiology*, April 27-29, 1998, Lille, France.

Production of Anti-toxin Antibodies by Immunization with *Pichia* Killer Toxin-like Antiidiotypic Monoclonal Antibodies

CHRISTOPHER SNYDER,¹ NATHALIE SEGUY,¹ SOPHIA LAFITTE,² CYRIL GUYARD,^{1*} LUCIANO POLONELLI,¹ JEAN-CHARLES CAILLIEZ,^{1,4} and JEAN-MARIE GRZYCH²

¹Dept. Ecosystem Microbiol., Pasteur Inst., 1 rue Pr. Calmette, BP245, 59019 Lille, France, ²INSERM, U167, Pasteur Inst., Lille, France, ³Ist. Microbiol., Univ. Parma, Italia, ⁴F.L.S., Lille.

A therapeutic antimicrobial strategy for the control of pneumocystosis is being explored by harnessing the lethal effect of a yeast killer toxin secreted by *Pichia anomala* K36 (PKT). PKT is active at a pH 4.6 and 26°C, so it may not be used as a systemic antimicrobial agent. A monoclonal antibody (MabKT4) was produced by immunization with crude PKT extract [3]. The MabKT4 neutralized PKT and thus may be used to control the specific activity of PKT against sensitive microorganisms. The immunization of rats with MabKT4 permitted the production of a monoclonal antiidiotypic antibody (MabK10) [4]. In physiological conditions, MabK10 mimicked the antimicrobial activity of PKT against pathogenic microorganisms such as *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, and *Mycobacterium tuberculosis* [1,5]. These results motivated the better characterisation of the PKT protein and the study of the mechanism of activity against PKT-sensitive pathogenic microorganisms. An essential tool for this characterisation was an antibody with a strong affinity for PKT. However, MabKT4 was not sensitive enough in western blot and had an affinity too weak for the immunopurification of the PKT. According to Jerne's network theory, it is postulated that internal image antiidiotypic antibodies can assume the tertiary conformation of the nominal antigen, and thus can interact with the immune system in eliciting either a specific immune response [2]. For this reason, a new generation of anti-toxin monoclonal antibodies was envisioned by immunization with MabK10.

MATERIALS AND METHODS

Lou/m rats were immunized subcutaneously with 0.2ml of a cocktail containing MabK10 (2.8 mg) coupled with human IgG (20mg) in 0.8ml of phosphate-buffered saline (PBS)/complete Freund's adjuvant (1/1; vol/vol) on day 0. Three successive immunizations were carried out on days 21, 62, and 81 using incomplete-Freund's adjuvant in the immunization cocktail. On day 81, 1 ml of a cocktail containing MabK10 and human IgG in 4ml of PBS, was injected intraperitoneally. Three days after the last boost, the spleen was extracted to produce hybridomas. As the screening of the monoclonal antiidiotypic antibodies is in progress, all the following results were obtained by using the rat serum harvested on the day of the fusion. Various antiidiotypic polyclonal antibody concentrations were tested in triplicate by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Microtitration plates (Immulon, Dynex, USA) were coated with 0.05ml of *P. anomala* K36 supernatant, the strain used for *Pichia* killer toxin (PKT) production. The PKT supernatant was dyed at 37°C, and the wells were blocked with PBS (pH 7.2) supplemented with bovine serum albumin (BSA, 4%) and tween-20 (0.05%) for 1h at 37°C. Five washings with a PBS/tween-20 (0.05%) buffer followed each incubation. Rat-sera diluted to various concentrations in PBS/BSA (1%/tween-20 (0.05%)) were added to the microtiter wells for 1h at 37°C. After addition of horse-radish peroxidase-conjugated rabbit anti-rat IgG (1/10,000; Zymed), the ortho-phenylenediamine substrate, dissolved in phosphate-phosphate buffer (pH 5) containing hydrogen peroxide (0.03%), allowed the revelation reaction lasting 10 min at 37°C in darkness. This reaction was stopped by the addition of 0.05ml of 2N sulfuric acid. The optic density was measured at 450nm (Elx 800, Bio-Tek Instruments, Vermont, USA). Specificity of the anti-antiidiotypic polyclonal antibodies for the PKT was determined by western blot. PKT supernatant concentrated 500-fold was subjected to a SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 10% acrylamide gel. After transfer onto a nitrocellulose membrane, strips were coated by various concentrations of rat sera and a specific monoclonal antibody (MabKT4) directed against PKT. This was used as a control to confirm the specificity of the anti-antiidiotypic polyclonal antibodies neutralizing PKT activity.

RESULTS AND DISCUSSION

The control rat for these immunizations, revealed a low response level (Fig. 1A). After 4 immunizations (D81), the optic density of the control rat was similar to the optic density obtained with the rat used for the fusion immunized with MabK10 in the cocktail) at D21. The response of control rat serum was insignificant and may be overlooked in analysing the response to MabK10. The response of the rat immunized with MabK10 after the

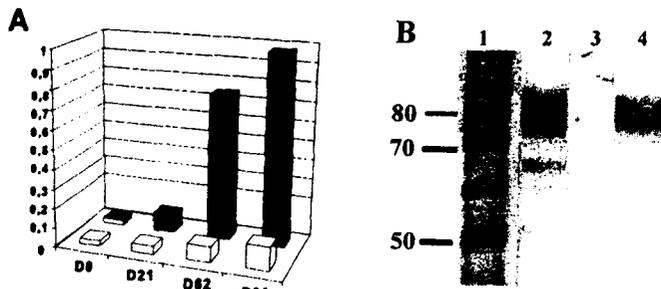


Fig. 1A. Polyclonal anti-antiidiotypic response tested against PKT (optic density, 450 nm). □ control rat, immunized with Freund's adjuvant and human IgG; ■ rat immunized with a monoclonal antiidiotypic antibody (MabK10). 1B. Analysis of polyclonal anti-antiidiotypic antibodies specificity for the PKT in western blot. Lane 1: MW marker (kDa); lane 2: serum of rat immunized with MabK10; lane 3: serum of control rat; lane 4: MabKT4.

fourth boost was increased 10-fold in comparison with the response of the control rat. ELISA confirmed the presence of polyclonal antibodies in the immunized rat serum which fix upon the PKT. The specificity of these polyclonal antibodies for the PKT was further proven by western blot. Immunoblot experimentation using control rat serum did not show a positive signal against PKT supernatant (Fig. 1B, lane3). The PKT was revealed in a diffused protein band near 85 kDa (Fig. 1B, lane4), by using MabKT4. This smeared band was assimilated to the presence of the duplicated bands near 85 and 77 kDa in lane 2 (Fig. 1B). These results can be compared to those obtained by Polonelli et al. [3] using MabKT4 in western blot. However, these polyclonal antibodies have a better affinity for the PKT than MabKT4 in western blot and ELISA. Moreover, the work of Polonelli et al. [3] revealed two bands at 115 and 92 kDa. The differences between these experiments may be explained by the production conditions of the PKT. In the present work, the two bands were due to the presence of polyclonal antibodies contained in the rat immunized sera. The polyclonal antibodies were directed against MabK10, which mimicked the killer activity of PKT, and had the ability to bind to the PKT. The antibodies produced were thus anti-antiidiotypic polyclonal antibodies. Previous results showed that PKT and MabK10 have the same killer properties [6] and both were neutralized by MabKT4 [5,6]. The anti-antiidiotypic polyclonal antibodies produced, may have the same characteristics as MabKT4. Indeed, a MabK10 sensitive yeast strain was protected when it was treated with MabK10 preincubated in anti-antiidiotypic polyclonal antibodies. Furthermore, the biological activity of the anti-antiidiotypic antibodies in the immunized rat serum were shown with an immunofluorescence assay. In this experiment, the anti-antiidiotypic polyclonal antibodies bound on the bud scar of sensitive yeasts preincubated with PKT. In this work, the results demonstrated the production of a new generation of the anti-antiidiotypic polyclonal antibodies, showing the idiotype cascade. This idiotype approach lead us to envisage new therapeutic strategies against pneumocystosis and candidosis.

ACKNOWLEDGMENTS

NS was supported by Sidaction grant (ref. n°ID000420-02) and CG was supported by "Région Nord Pas de Calais" and Pasteur Institut of Lille grant.

LITERATURE CITED

- Conti, S., Fanti, F., Magliani, W., Gerloni, M., Bertolotti, D., Salati, A., Cassone, A. & Polonelli, L. 1998. *J. Infect. Dis.*, 177: 807.
- Jerne, NK. 1974. *Ann. Immunol.*, 125:373-389
- Polonelli, L. & Morace, G. 1986. *J. Clin. Microbiol.*, 25:460-462.
- Polonelli, L., Séguy, N., Conti, S., Gerloni, M., Magliani, W. & Cailliez, J.C. 1997. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 4:142-146.
- Séguy, N., Cailliez, J.C., Delcourt, P., Polonelli, L., Dei-Cas, E. & Camus, D. 1997. *Mol. Med.*, 3:544-552.
- Séguy, N., Polonelli, L., Dei-Cas, E. & Cailliez, J.C. 1998. *FEMS*, 22: 145-149.

LES TOXINES KILLER DE LEVURE

C. GUYARD¹, W. MAGLIANI², L. POLONELLI² ET J.-C. CAILLIEZ^{1,3}

RÉSUMÉ

Cette revue synthétise l'état actuel de nos connaissances sur les structures moléculaires des toxines killer de levure, leurs modes de synthèse et les mécanismes d'action qu'elles développent contre leurs cellules cibles. Elle permet de comparer les toxines killer dont les gènes sont nucléaires avec celles codées par des gènes extra-chromosomiques. Une description générale des mécanismes d'action de ces toxines est présentée, avec plus de précision lorsque la nature biochimique de leurs

récepteurs a été caractérisée. Un ensemble de tableaux permet d'avoir une vue rapide sur les différents systèmes killer décrits et de comparer les structures moléculaires et les modes d'action des toxines concernées. La lecture de ce travail souligne l'existence d'une certaine hétérogénéité entre les mécanismes d'action des toxines killer de levure et la nature de leurs récepteurs à la surface des cellules cibles.

SUMMARY : Yeast killer toxins

This review is a description of the molecular structures of yeast killer toxins, their synthesis pathway in the killer strains and their activity against target cells. Yeast killer toxins encoded by nuclear genes are described in the first part of the review, whereas yeast killer toxins encoded by extra-chromosomal genes are shown in the second part. In some models, the molecular structure of the yeast killer toxin receptors

has been clearly characterized, whereas in others, only few data are known on the biochemical nature of the molecules involved in the killer phenomenon. This work underlines the heterogeneity of mechanisms of action in the different killer systems as well as the nature of yeast killer toxin receptors at the surface of target cells.

INTRODUCTION

Le phénomène killer désigne l'interaction spécifique entre une toxine sécrétée par une cellule « tueuse » (souche killer) et une cellule cible sensible à cette toxine. Chez les levures, les souches killer sécrètent des toxines protéiques ou glycoprotéiques qui ont une activité létale, ou seulement inhibitrice, sur la croissance et le développement d'autres souches de microorganismes. Ces toxines sont des protéines codées par des gènes plasmidiques (à ADN ou ARN) ou chromosomiques (55).

Découvert en 1963 par Makower et Bevan (56), ce phénomène fut d'abord décrit chez *Saccharomyces cerevisiae* comme une interaction stricte entre levures avant d'être élargi en 1968 par Woods et Bevan (111). Depuis, de nombreuses souches killer ont été décrites et caractérisées chez différentes espèces de levure telles que *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Zygosaccharomyces* spp., *Ustilago maydis*, *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. maltosa*, *C. pseudotropicalis*, *C. apis*, *C. bombicola*, *C. fructus*, *C. krusei*, *C. sorbosa*, *Cryptococcus*

laurentii, *C. albidus*, *Debaryomyces* spp., *Torulopsis* spp., *Rodotorula* spp., *Trichosporon* spp., *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia occidentalis*, *Kloeckera apis*, *Sporobolomyces roseus*, *S. salmonicolor*, *Zygowillipsis* spp., *Williopsis mrakii*, *W. californica*, *W. canadensis*, *W. dimennae*, *W. subpelliculosa*, *W. nonfermentans*, *W. bimundalis*, *W. fabianii*, *W. petersonii*, *W. holstii*, *Pichia anomala*, *P. kluyveri*, *P. farinosa*, *P. spartinae*, *P. membranaefaciens*, *P. guilliermondii*, *P. carsonii* ou *P. ohmeri* (1, 55, 75, 76).

Le phénomène killer chez les levures a été observé dans les écosystèmes naturels comme dans les milieux industriels. En effet, de nombreuses souches killer ont été isolées de plantes, de fruits, de champignons, de sols (94, 97), tandis que d'autres ont été retrouvées dans les produits de fermentation du vin ou de la bière (93, 118). Les applications dérivant de l'étude de ce phénomène biologique sont multiples et variées. Dans le domaine de la recherche, elles peuvent concerner la mise au point de modèles d'études fondamentaux comme ceux de la sécrétion et de la glycosylation de protéines, de la régulation de leur synthèse et de leur fixation à des récepteurs spécifiques à la surface de cellules cibles. Elles peuvent intéresser le domaine du génie génétique en permettant la construction de vecteurs portant les gènes des toxines killer et la production de peptides recombinants reproduisant les propriétés antibiotiques de ces molécules fongiques. Dans l'industrie agro-alimentaire, le phénomène killer présente un intérêt évident dans la lutte contre les microorganismes indésirables contaminant les milieux de fermentation (65), mais aussi dans la production de souches killer utilisables elles-mêmes pour la production de bière, de vin ou de pain (7, 9, 37, 117). Enfin, dans le domaine médical, les toxines

¹ Département de Microbiologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, France.

² Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Parma, Italia.

³ Laboratoire Environnement & Santé, Faculté Libre des Sciences et Faculté Libre de Médecine, Université Catholique de Lille, France.

Reçu le : 3 septembre 1999 ; acceptation définitive le : 24 septembre 1999.

Tirés à part : J.-C. Cailliez, Département de Microbiologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, B.P. 245, 59019 Lille, France.

Tél : + 33.3.20.87.71.57 ; Fax : + 33.3.20.87.79.08.

E-mail : jean-charles.cailliez@pasteur-lille.fr

killer peuvent être utilisées pour le biotypage de souches de microorganismes pathogènes (62, 69), comme pour la production de nouveaux agents antifongiques, sous la forme de peptides recombinants killer ou d'anticorps anti-idiotypiques reproduisant leurs propriétés antibiotiques (20, 21, 54, 70, 73, 77-79). Dans cette revue, sont présentés les structures moléculaires et les mécanismes d'action des systèmes killer qui ont été le mieux caractérisés depuis la découverte de ce phénomène chez les levures.

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES NUCLÉAIRES

Toxines de *Williopsis* spp.

Depuis quelques années, les espèces du genre *Hansenula* sont classées dans les genres *Williopsis* et *Pichia* (5). Les souches killer du genre *Williopsis* sécrètent des toxines killer, capables de tuer des espèces de levures sensibles appartenant à des genres tels *Saccharomyces* ou *Candida* (63). Parmi les espèces du genre *Williopsis* qui forment des ascospores, des souches de *W. mrakii*, *W. saturnus*, *W. saturnus* var. *subsufficiens* et *W. beijerinckii* exercent une activité killer contre des levures d'autres espèces. Des comparaisons entre les structures moléculaires de toxines sécrétées par différentes souches de *Williopsis* spp. ont été réalisées par analyse génotypique et/ou phénotypique. Des toxines provenant de certaines souches killer de *W. mrakii* et *W. saturnus* présentent des similarités structurales, alors que d'autres ont des structures complètement différentes. Ceci malgré des spectres d'activité semblables. C'est le cas des toxines de *W. beijerinckii* et de *W. californica* (47). Il est maintenant évident que toutes les souches killer d'une même espèce ne synthétisent pas les mêmes toxines, certaines produisant vraisemblablement plusieurs toxines différentes.

La toxine HM-1 (HMK) de *Williopsis mrakii* est une protéine monomérique sécrétée par la souche IFO 0895 (ou souche LKB 169). Codée par un gène de 0,85 kbp, elle est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur de 125 acides aminés. La maturation de cette protoxine donne une toxine non glycosylée de 10 721 Da constituée de 88 acides aminés dont 10 cystéines. L'activité biologique de la toxine est inactivée par réduction des ponts disulfures au 2-mercaptoéthanol ou au dithiothréitol. Contrairement à la majorité des autres toxines de levure, HM-1 est une protéine alcaline thermostable. Elle a un pI de 9.1 et reste stable dans une gamme de pH de 2 à 11. Enfin, elle se distingue de la toxine K-500 de *W. mrakii* par le fait qu'elle est encore active après 10 minutes à 100 °C, à condition d'être maintenue à pH 4.0 (4).

Des anticorps monoclonaux ont été produits contre la toxine HM-1. Ils possèdent des activités neutralisantes qui ont permis de purifier la toxine par chromatographie d'affinité (113). La toxine HM-1 a également été purifiée par deux autres méthodes chromatographiques. Dans la première méthode, les surnageants de culture des levures killer ont été concentrés par ultrafiltration avant d'être séparés par chromatographie de gel-filtration (Séphadex G-50). Les fractions ayant une activité killer ont ensuite été purifiées par HPLC sur une colonne SP-2SW après élution en gradient linéaire de NaCl de 0 à 0,5 M (43, 114). Dans la seconde méthode, les surnageants de culture

ont été passés dans une colonne de chromatographie d'échange d'ions (SP-Séphadex C25) équilibrée à pH 3.0. La toxine HM-1 a ainsi été éluée en gradient de pH avant d'être purifiée par HPLC sur une colonne SP-2SW (101).

La toxine K-500 de *Williopsis mrakii* est sécrétée par la souche NCYC 500. C'est une toxine polypeptidique acide de masse moléculaire comprise entre 1,8 et 5,0 kDa (4). Elle a une activité killer contre des souches de *C. albicans*, *C. glabrata* et *S. cerevisiae* (39). Elle est active pour des valeurs de pH et de température proches de 4.0 et de 30 °C respectivement. En dehors de ces valeurs, son activité décroît. A faible concentration, la toxine garde son effet fongicide, mais ce n'est qu'à plus fortes concentrations qu'elle entraîne des dommages visibles de la membrane plasmique de la cellule cible. Afin de purifier cette toxine, les surnageants de culture de la souche NCYC 500 ont été traités par chromatographie de gel-filtration sur une colonne Séphadex G-25 (39). L'activité killer a été retrouvée dans les fractions correspondant à des masses moléculaires inférieures ou égales à 5-10 kDa. Ces fractions actives ont ensuite été purifiées sur une colonne Biogel P2. L'élution de deux pics actifs dans le volume mort a permis de conclure que la toxine K-500 avait une masse moléculaire minimale de 1,8 kDa.

La toxine HSK (HYI) de *Williopsis saturnus* var. *saturnus* est une protéine sécrétée par la souche killer IFO 0117 (46, 64). Elle est codée par *HSK*, un gène homologue à *HMK*, le gène de la toxine HM-1 (HMK). La toxine HSK est d'abord synthétisée sous la forme d'une protoxine de 124 acides aminés qui subit une maturation aboutissant à une protéine d'environ 8,5 kDa, composée de 87 acides aminés. Le pI de cette toxine est proche de 5.8 et son activité antibiotique résiste à une incubation d'1 heure à 60 °C (64). Afin de la purifier, des surnageants de culture ont été concentrés sous vide, puis déposés sur une colonne DEAE-cellulose (DE-52, Whatman) équilibrée en Tris-HCl, pH 6.7 avant d'être élués en gradient NaCl (de 0 à 1 M). Les fractions killer ont été concentrées par ultrafiltration puis analysées par gel filtration sur une colonne Ultrogel AcA 54 équilibrée en PBS 100 mM, pH 7.3. Après ultrafiltration, la toxine HYI a été cristallisée entre 3 et 5 °C (64).

Toxines de *Pichia* spp.

La toxine de 19 kDa de *P. kluyveri* est une glycoprotéine monomérique acide de 19 kDa qui provoque la formation de pores perméables aux ions. Son action est comparable à celle de la toxine K1 de *S. cerevisiae*. Cette toxine entraîne ainsi chez la cellule cible une fuite extra-cytoplasmique d'ions potassium et d'ATP, une baisse du pH cellulaire et l'inhibition des mécanismes d'incorporation d'acides aminés. Elle a été purifiée par précipitation fractionnée à l'éthanol et chromatographie sur colonne de butyl-sépharose. Cette toxine résiste à une température maximale de 40 °C et son activité biologique reste stable dans une gamme de pH entre 2.5 et 5.0 (60).

La toxine SMK (« salt-mediated killer toxin ») ou KK1 de *P. farinosa* est sécrétée par la souche KK1 de la levure halotolérante *P. farinosa*. C'est un hétérodimère de 14,214 kDa codé par un gène de 0,6 kbp. La toxine SMK est composée d'une sous-unité α de 6,6 kDa (63 acides aminés) et d'une sous-unité β de 7,9 kDa (77 acides aminés). Ces sous-unités

sont fortement liées en conditions acides (pH inférieure à 5.0) sans qu'il y ait formation de ponts disulfures. L'activité de la toxine mature est maximale dans ces conditions et en présence de NaCl 2M. En conditions neutres, les deux sous-unités se dissocient et l'agrégation du monomère α qui en résulte rend la toxine inactive (100). La structure secondaire de la toxine SMK change radicalement pour des valeurs de pH entre 5.1 et 5.5. Au-delà, la dissociation des sous-unités empêche le monomère β de reprendre sa conformation secondaire correcte. Des études récentes en cristallographie ont permis de montrer que la conformation de la toxine SMK avait la forme d'un simple domaine protéique ellipsoïdal formé par les 2 monomères α et β (45). Enfin, ces études ont confirmé que le maintien de la conformation active de la toxine nécessitait une forte concentration saline.

Bien qu'il y ait peu de similarités de séquence entre la toxine SMK et les autres, la structure de la protoxine de 222 acides aminés à l'origine de cette toxine ressemble à celle de la protoxine de K1 de *S. cerevisiae*. Chez cette protoxine, les futures sous-unités α et β correspondent respectivement aux positions d'acides aminés 19-81 et 146-222. La maturation de la protoxine en toxine active semble être due à l'action d'endopeptidases pseudo-KEX2 et de carboxypeptidases pseudo-KEX1, comme dans le cas de la toxine K1 de *S. cerevisiae* (99).

La toxine WC65 de *P. anomala* est une glycoprotéine acide monomérique de 83,3 kDa. Son activité killer s'exerce vis-à-vis de souches variées de levure comme *C. albicans* ou *P. himundalis*. Elle est stable pour des valeurs de pH entre 2.0 et 5.0 (84). L'intensité d'activité de cette toxine se sature à partir d'une certaine concentration, ce qui suggère un mécanisme moléculaire dépendant de l'existence de récepteurs spécifiques à la surface de la cellule cible (83). De plus, la sensibilité à la toxine WC65 de certaines souches de *C. albicans* décroît avec l'âge des cellules cibles.

La toxine ATCC 96603 de *P. anomala* (UP 25F) est une protéine probablement glycosylée, caractérisée par un large spectre d'activité à l'encontre de microorganismes nombreux non reliés d'un point de vue taxonomique (71). Elle est active pour des valeurs de pH et de température proches de 4.5 et 28 °C respectivement. Les immunolocalisations réalisées en microscopie de fluorescence avec un anticorps anti-toxine (mAbKT4) ont montré que les sites de fixation de la toxine à la surface de souches sensibles de *C. albicans* étaient plus nombreux sur les jeunes cellules, les bourgeons et les tubes germinatifs. La sécrétion d'une toxine active en présence de tunicamycine indique que la N-glycosylation n'est pas indispensable à son activité (18). Des études ultrastructurales avec le mAbKT4 ont montré que la toxine pouvait se concentrer dans l'épaisseur de la paroi fongique de la souche killer avant d'être sécrétée dans le milieu extérieur (17, 19).

La toxine ATCC 96603 a aussi une activité inhibitrice sur la croissance et la pathogénicité de *Pneumocystis carinii*, un parasite pulmonaire ayant des affinités taxonomiques avec les champignons microscopiques. Ces études ont montré que la toxine inhibait l'attachement *in vitro* du parasite, que celui-ci provienne de rat ou de souris et réduisait son infectivité pour la souris SCID ou le rat nude (3, 90). Le fait que l'attachement et l'infectivité du parasite soit réduits suggère l'existence de

récepteurs spécifiques à la surface des formes végétatives de *P. carinii*, ces récepteurs pouvant aussi être impliqués dans le mécanisme d'attachement du parasite à sa cellule cible : le pneumocyte de type I (20).

Puisque cette toxine ne peut être utilisée comme agent thérapeutique, une nouvelle stratégie a été envisagée. Ainsi, des anticorps antiidiotypiques reproduisant l'effet antibiotique de la toxine ont été obtenus par immunisation contre le mAbKT4. Il s'agit soit d'anticorps polyclonaux monospécifiques obtenus chez le lapin, soit d'anticorps monoclonaux obtenus chez le rat (mAbK10). Ces anticorps antiidiotypiques sont spécifiques de la région variable (idiotype) du mAbKT4, dont le site actif peut être considéré comme la réplique des récepteurs de la toxine sur la cellule cible. Ces anticorps, porteurs d'une région hypervariable spécifique des récepteurs, sont capables d'inhiber l'attachement *in vitro* du parasite ainsi que son infectivité chez le rat nude ou la souris SCID (91, 92). Dans une perspective de stratégie thérapeutique, les effets antibiotiques *in vivo* du mAbK10 ont été étudiés dans un modèle de pneumocystose chez le rat nude. Les résultats ont montré que le traitement des animaux par cet anticorps antiidiotypique killer en aérosol pouvait réduire le taux d'infection pulmonaire.

Toxines de *Saccharomyces cerevisiae*

Bien que les toxines killer de *S. cerevisiae* soient généralement codées par des gènes plasmidiques, certaines peuvent l'être aussi par des gènes nucléaires. C'est le cas de la toxine KHR (« killer of heat resistant ») et de la toxine KHS (« killer of heat susceptible »).

La toxine KHR de *S. cerevisiae* est une protéine monomérique de 20 kDa dont le gène *KHR* de 888 bp se trouve sur le bras gauche du chromosome IX (33). Ce gène code pour une protoxine de 33 kDa qui possède une séquence signal hydrophobe dans sa région N-terminale, 4 sites de glycosylation, et 5 sites potentiels de clivage par la protéase *kex2*. La toxine KHR mature n'a pas de région hydrophobe.

La toxine KHS de *S. cerevisiae* est une protéine monomérique de 75 kDa dont le gène *KHS* de 2.124 bp se trouve sur le bras droit du chromosome V (34). Ce gène code pour une protoxine de 79 kDa qui porte une séquence N-terminale hydrophobe. La conformation de cette séquence N-terminale est probablement réorganisée dans l'espace pour donner la toxine mature. La toxine KHS possède 3 motifs conservés hydrophobes ayant une fonction ionophore similaire à celles de toxines de *S. cerevisiae* codées par des gènes plasmidiques.

Mécanismes d'action de ces toxines killer

Chez les levures, le rôle des glycoprotéines et polysaccharides de surface dans la formation de récepteurs pariétaux a été mis en évidence. Avant d'atteindre la membrane plasmique des levures cibles, les toxines killer entrent en contact avec les molécules qui composent la paroi de celles-ci. Parmi ces molécules de surface, certaines ont été particulièrement impliquées dans ces mécanismes de reconnaissance plus ou moins spécifiques et ainsi considérées comme les récepteurs des toxines killer.

TABLEAU I. — Structure des toxines killer codées par des gènes nucléaires.
Structure of killer toxins encoded by nuclear genes.

Levure killer	Toxine	SU (kDa)	Masse moléculaire	GP ?	ProT	pH ou pI/T°
<i>Williopsis mrakii</i>	HM-1 (HMK)	mono	10,7 kDa (88 aa)	non	125 aa	2,0 à 12,0
<i>Williopsis mrakii</i>	K-500	mono ?	1,8 et 5,0 kDa			± 4,0 / ± 30 °C
<i>Williopsis saturnus</i>	HSK (HY1)	mono	8,5 kDa (87 aa)		124 aa	pI = 5,8
<i>Pichia kluyveri</i>	19 kDa	mono	19 kDa	oui		
<i>Pichia farinosa</i>	SMK	α (6,6) β (7,9)	14,2 kDa		222 aa	< 5,0 + NaCl (2M)
<i>Pichia anomala</i>	WC65	mono	83,3 kDa	oui		2,0 à 5,0
<i>Pichia anomala</i>	UP25F	?				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHR	mono	20 kDa	oui	33 kDa	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHS	mono	75 kDa		79 kDa	

[aa = acides aminés ; GP = nature glycoprotéique ; mono = toxine monomérique ; SU = sous-unités]

TOXINES DE *WILLIOPSIS* SPP.

La toxine HM-1 (HMK) de *W. mrakii* inhibe la croissance de souches sensibles de *S. cerevisiae* en agissant sur la synthèse de leurs β-1,3-glucanes. La production d'autres composants pariétaux comme la chitine, les mannanes et les glucanes alcali-solubles n'est pas affectée (114). Des expériences plus récentes ont confirmé que la toxine HM-1 inhibait l'activité de la β-1,3-glucane synthase (101). La toxine HM-1 n'est pas active contre les protoplastes des levures qui lui sont normalement sensibles. Des levures cibles dont le gène *KRE6* est non fonctionnel, c'est à dire présentant un taux particulièrement réduit de β-1,6-glucanes pariétaux (par réduction de l'activité de la β-glucane synthase), résistent à de fortes concentrations de toxine. L'activité de la toxine HM-1 est d'ailleurs inhibée par des incubations prolongées avec des β-1,3- ou des β-1,6-glucanes, plus faiblement avec des mannanes. Ce phénomène n'est pas observé lorsque l'on utilise des α-1,4- glucanes ou de la chitine (44). Ces expériences indiquent ainsi qu'une quantité minimale de β-glucanes pariétaux est vraisemblablement nécessaire pour que la cellule cible soit sensible à l'activité de la toxine HM-1.

Chez des souches de *S. cerevisiae* sensibles à HM-1, deux gènes responsables de la sensibilité à la toxine ont été clonés. L'un d'eux (*KNR4*) est impliqué dans la synthèse des β-1,3-glucanes. Il complète une mutation permettant à la levure de résister à la toxine. Cette résistance la rend sensible à la cercosporamide, un agent antifongique isolé de *Cercosporidium hemmingsii* qui inhibe la synthèse des β-1,3-glucanes (40). Des souches mutantes pour ce gène, présentant une activité réduite de la β-1,3-glucane synthase, sont résistantes à la toxine HM-1. Le second gène est *HKR1*. Sa mutation par insertion conduit à un phénotype de résistance de *S. cerevisiae* à la toxine HM-1 (48). Les souches mutantes *hkr* de *S. cerevisiae* sont résistantes à la toxine HM-1. Le gène *HKR1* complète ce phénotype. Il contient un cadre de lecture ouvert, ou ORF (*open reading frame*), codant pour une protéine membranaire de haut

poids moléculaire (Hkr1p) riche en sérine et en thréonine. Il ne participe pas directement à la synthèse des β-1,3-glucanes, mais la protéine qu'il code semble réguler la synthèse de ces β-glucanes et les mécanismes de bourgeonnement de la levure (112). *HKR1* est donc impliqué dans la synthèse du récepteur de la toxine HM-1. L'étude de la séquence de Hkr1p permet de penser que cette protéine a une activité mannosyl-transférase calcium-dépendante qui interviendrait dans la glycosylation des mannoprotéines reconnues par la toxine HM-1 (48, 112).

Récepteurs de la toxine K-500 de *W. mrakii*. Cette toxine a une forte activité anti-*Candida* mais ses mécanismes d'action restent encore inconnus. La susceptibilité des cellules cibles de K-500 répond à un effet dose-dépendant, ce qui sous-entend l'existence de récepteurs pariétaux. Certaines évidences laissent penser que K-500 agit comme la toxine de *P. kluyveri* et comme la toxine K1 de *S. cerevisiae* en induisant la formation de canaux ioniques chez la cellule cible.

TOXINES DE *PICHIA* SPP.

Récepteurs de la toxine SMK de *P. farinosa*. La structure de la toxine SMK (en particulier les domaines responsables de sa polarité) et de son gène présentent des similarités avec celles des toxines K1 et K2 de *S. cerevisiae* (45). Ces observations permettent de penser que la toxine SMK agit vraisemblablement sur la membrane plasmique des cellules cibles même si des expériences avec des souches mutantes *kre* de levure ont suggéré que des molécules de surface différentes des β-1,6-D-glucanes pouvaient aussi jouer le rôle de récepteurs.

Récepteurs de la toxine WC65 de *P. anomala*. L'étude de l'influence de quantités croissantes de toxine WC65 sur la vitesse de croissance de souches sensibles de *C. albicans* a suggéré l'existence de deux sites de fixation pour la toxine. Le premier de ces récepteurs pariétaux fixe la toxine WC65 de manière non compétitive en faisant vraisemblablement intervenir des β-1,6-D-glucanes. Le second site fixe la toxine de manière compétitive. Des souches mutantes de *Candida* ayant

un déficit en glucanes pariétaux ont une sensibilité plus faible à la toxine. La localisation des sites de fixation de la toxine dans la paroi de la cellule cible a été réalisée en immunofluorescence indirecte (85). Des souches mutantes de *S. cerevisiae*, ayant une synthèse déficiente en β -1,6-glucanes, présentent aussi une résistance à la toxine, ce qui suggère que ces glucanes sont impliqués dans la constitution ou la conformation des récepteurs de la toxine WC65. Ces récepteurs pourraient ne pas être uniquement pariétaux puisque des sphéropastes de souches résistantes de *S. cerevisiae* restent sensibles à la toxine WC65. Des expériences en immunofluorescence ont montré que la toxine était toujours localisée à la surface de la membrane plasmique de sphéropastes de *C. albicans* (85).

Récepteurs de la toxine ATCC 96603 de *Pichia anomala* (UP 25F). La localisation des sites de fixation de la toxine a d'abord été réalisée par immunofluorescence indirecte en employant le mAbKT4 (72). Cette méthode n'ayant donné de résultats que lorsqu'elle fût employée sur des cellules vivantes, une approche expérimentale différente a été menée. Grâce à la production d'un antisérum polyclonal de lapin produit contre le mAbKT4, des anticorps anti-idiotypiques possédant les propriétés « killer » de la toxine ont été obtenus. Il s'agit d'anticorps à activité antibiotique (« antibiocorps ») mimant *in vitro* l'effet « killer » de la toxine à l'encontre des mêmes microorganismes sensibles (75). Ces antibiocorps ont été utilisés pour localiser les récepteurs de la toxine à la surface des levures sensibles (74). Ces expériences ont montré l'obtention d'une fluorescence à la surface de microorganismes sensibles appartenant à diverses souches de *C. albicans*, *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*. Aucune réaction positive n'a été observée lorsque l'antisérum a été testé avec un autre anticorps monoclonal non spécifique de *C. albicans*, montrant ainsi que l'antisérum

anti-idiotypique est un outil valide pour localiser les récepteurs de la toxine à la surface de la cellule cible.

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES EXTRA-CHROMOSOMIQUES

Toxines codées par des plasmides linéaires à ADN

TOXINE DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*

La toxine de *Kluyveromyces lactis*, codée par les plasmides pGKL1, L2 a été découverte lors d'expérimentations cherchant uniquement à caractériser de nouveaux plasmides chez les levures (36). Les souches killer de *K. lactis* contiennent de 50 à 100 copies de chacun des plasmides linéaires désignés pGKL1 (k_1) et pGKL2 (k_2), comprenant respectivement 8,874 bp et 13,447 bp. Le plasmide k_1 possède 4 cadres ouverts de lectures (ORFs), nommés ORF1, ORF2, ORF3 et ORF4, tandis que le plasmide k_2 possède 10 ORFs (ORF1 à ORF10) (23, 35, 105, 107). La toxine de *K. lactis* est constituée de 3 monomères protéiques codés par k_1 : une sous-unité α de 99 kDa possédant une seule chaîne oligosaccharidique N-glycosylée, une sous-unité β de 30 kDa et une sous-unité γ de 27,5 kDa (95). Le cadre ORF2 de k_1 code un précurseur de 128 kDa comprenant les sous-unités α et β , le peptide signal N-terminal et des sites de clivage pour une protéase de type *kex2*. Ce précurseur est dirigé vers le réticulum endoplasmique de la levure où il commence à être glycosylé. Il est ensuite transporté vers l'appareil de Golgi où une protéase de type *kex2* le mature en sous-unités natives. Au même moment, le peptide signal est clivé au niveau de

TABLEAU II. — Modes d'action des toxines killer codées par des gènes nucléaires.
Mechanisms of action of killer toxins encoded by nuclear genes.

Levure killer	Toxine	Cibles	Récepteurs	Activité
<i>Williopsis mrakii</i>	HM-1 (HMK)	<i>S. cerevisiae</i>	β -1,3-glucanes pariétaux	- inhibition de la synthèse de la β -1,3-glucane synthase
<i>Williopsis mrakii</i>	K-500	<i>Candida</i> spp.		- similaire à K1 ? - formation de canaux ionophores ?
<i>Williopsis saturnus</i>	HSK (HY1)	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. anomala</i> <i>C. glabrata</i>		
<i>Pichia kluyveri</i>	19 kDa			- similaire à K1
<i>Pichia farinosa</i>	SMK		β -1,6-glucanes ?	- formation de canaux ionophores
<i>Pichia anomala</i>	WC65	<i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>P. bimundalis</i>	en partie : β -1,6-glucanes pariétaux et membranaires	
<i>Pichia anomala</i>	UP25F	<i>Pichia</i> spp. <i>S. cerevisiae</i> <i>Pneumocystis</i> <i>Staphylococcus</i> <i>E. coli</i> <i>Mycobacterium</i>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHR	<i>C. glabrata</i>		- formation de canaux ionophores
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KHS			- similaire à KHR

Arg²⁹. De son côté, le cadre ORF4 de *k₁* code le précurseur de la sous-unité γ ainsi qu'un peptide signal N-terminal.

La toxine de *K. lactis* a été purifiée par chromatographie de filtration en gel Sephadex G-75 après précipitation au sulfate d'ammonium. Les fractions présentant une activité « killer » ont ensuite été séparées par chromatographie sur une colonne échangeuse d'ions (hydroxylapatite) équilibrée à pH 6.8. L'élu-tion a été réalisée par un gradient de tampon phosphate de potassium de 50 à 500 mM (102). La toxine ainsi purifiée ne présente pas d'activité « killer » supérieure à celle du surnageant de culture de départ.

TOXINES DE *PICHA* SPP.

La toxine de *P. inositolovora* codée par les plasmides **pPin 1-1** (18 kbp) et **pPin 1-3** (10 kbp) est une protéine multimérique de masse moléculaire supérieure à 100 kDa. Cette toxine est apparemment une glycoprotéine acide thermolabile (38). Les souches killer curées de leurs plasmides demeurent auto-immunes vis-à-vis de leur toxine. Il est donc probable que le mécanisme d'auto-immunité soit dû à des caractères portés par des gènes nucléaires.

La toxine de *P. acaciae* codée par **pPac 1-1** (13,6 kbp) et **pPac 1-2** (6,8 kbp) est une protéine trimérique d'environ 190 kDa (monomères de 110, 39 et 38 kDa) (6). Les plasmides codant ces deux toxines ont des organisations fonctionnelles et structurales proches des plasmides de *K. lactis*. Cette toxine a un large spectre d'activité biologique pour des valeurs de pH comprises entre 7.0 et 7.5.

Toxines codées par des plasmides à ARN encapsidés

TOXINES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Parmi les toxines killer les mieux caractérisées d'un point de vue moléculaire, se trouvent celles sécrétées par l'espèce *S. cerevisiae*. Ces toxines ont été classées en 3 groupes (K1, K2 et K28) en fonction de leurs caractéristiques moléculaires, leur spectre d'activité killer, l'existence ou non d'immunité croisée et la nature de leurs déterminants géniques. Les toxines K1, K2 et K28 sont codées par des ARN bicaténares (dsRNA ou « double-strand RNA ») ou satellites nommés respectivement M1 (1,8 kb), M2 (1,5 kb) et M28(1,9 kb). Chaque dsRNA de satellite M porte les gènes responsables de la toxicité et de l'auto-immunité de la levure killer vis-à-vis de sa propre toxine. Ces dsRNA sont encapsidés dans des particules pseudo-virales (VLPs ou « virus-like particles ») et sont dépendants de virus « helper » (L-A) pour leur réplication et encapsidation (10, 27). Les satellites M co-infectés avec un mycovirus L-A sont à la fois responsables de la production de toxine killer et de l'auto-immunité de la levure. Certains aspects de la synthèse, de la maturation et de la sécrétion des toxines K1, K2 et K28, ainsi que les organisations moléculaires de leurs dsRNA sont comparables. Il n'existe néanmoins pas d'homologies de séquences significatives entre ces toxines (87-89, 109, 110). Bien qu'elles se ressemblent, les toxines K1, K2 et K28 sont des protéines ayant des compositions différentes en acides aminés. Chaque toxine est codée par un seul ORF sous la forme d'une

pré-prototoxine comprenant un large domaine amino-terminal hydrophobe, des sites potentiels de clivage par les endopeptidases *kex2/kex1* et des sites de N-glycosylation. Ces pré-prototoxines vont subir des étapes de maturation dans le réticulum endoplasmique granulaire, l'appareil de Golgi et les vésicules de sécrétion, ce qui donnera une toxine active prête à être sécrétée par la levure.

La toxine K1 de *S. cerevisiae* est une protéine dimérique de 19 kDa, thermolabile et active dans un gamme de pH entre 4.2 et 4.6. Elle est sécrétée sous la forme de 2 sous-unités α et β non glycosylées, reliées par un pont disulfure. La sous-unité α est composée de 172 acides aminés et a une masse moléculaire de 9,5 kDa, tandis que la sous-unité β est composée de 140 acides aminés et a une masse moléculaire de 9,0 kDa. Elles dérivent toutes les deux d'une prototoxine glycosylée de 42 kDa. Cette prototoxine dérive elle-même d'une pré-prototoxine polypeptidique M1p de 35 kDa, formée de 316 acides aminés. La structure de M1p comprend une séquence leader N-terminale δ de 44 acides aminés (position : 1 à 44) dans laquelle se trouve un peptide signal de 26 acides aminés, un domaine (de 103 acides aminés (position : 45 à 147) et un domaine β de 83 acides aminés (position : 234 à 316). Les domaines α et β sont reliés par un peptide central γ (position : 148 à 233) portant 3 sites de N-glycosylation (11, 98, 119). La pré-prototoxine de 35 kDa entre ensuite dans le réticulum endoplasmique et subit une maturation en prototoxine après clivage de son peptide signal et glycosylation du domaine γ (53). La maturation de la prototoxine se poursuit dans l'appareil de Golgi. Une activité endopeptidase codée par le gène *KEX2* permet de générer les formes définitives des domaines α et β (41, 61). L'extrémité C-terminale de la sous-unité α est ensuite maturée par une sérine-carboxypeptidase codée par le gène *KEX1* (26). La toxine mature est alors sécrétée par la levure sous la forme d'un dipeptide où les sous-unités α et β sont reliées par un pont disulfure.

La toxine K2 de *S. cerevisiae* présente une organisation structurale similaire à celle de la toxine K1, surtout en ce qui concerne la synthèse de ses précurseurs. La toxine K2 est une glycoprotéine hétérodimérique de 21,5 kDa formée d'une sous-unité α de 180 acides aminés, N-glycosylée en position 177 et 214, et d'une sous-unité β de 140 acides aminés. La toxine K2 mature est dérivée d'une pré-prototoxine M2p de 38,7 kDa et contenant 362 acides aminés. M2p est constituée d'un peptide signal de 43 acides aminés (position : 1 à 43), d'un domaine α de 179 acides aminés (position : 43 à 222) et d'un domaine β de 140 acides aminés (position : 222 à 362). Contrairement à la toxine K1, il n'y a pas de domaine de liaison γ entre les domaines α et β . De plus, M2p contient 3 sites potentiels de N-glycosylation sur des asparagines en position 177, 214 et 261. M2p possède aussi un signal potentiel de sécrétion en position N-terminale et des sites de clivage pour *kex1p* et *kex2p* (25, 59). Pendant les processus de maturation, une peptidase clive le peptide signal après une alanine (Ala⁴³) et la molécule restante est clivée après une arginine (Arg²²²) par *kex2p*, ce qui permet d'obtenir de la toxine mature formée de ses 2 sous-unités α et β .

La toxine K28 de *S. cerevisiae* est une glycoprotéine hétérodimérique de 21,5 kDa formée d'une sous-unité α de 10,5 kDa et d'une sous-unité β de 11 kDa (89). Elle dérive

d'une pré-prototoxine M28p de 37,6 kDa composée de 345 acides aminés et dont l'organisation structurale est très proche de M1p. La pré-prototoxine M28p est constituée d'un peptide signal de 30 acides aminés (position : 1 à 30), d'un domaine δ de 18 acides aminés (position : 31 à 48), de la sous-unité α de 100 acides aminés (position : 49 à 148), d'une sous-unité de liaison γ de 96 acides aminés (position : 149 à 244) ayant 3 sites de N-glycosylation et de la sous-unité β de 100 acides aminés (position 245 à 345). La maturation de la pré-prototoxine est assurée par l'endoprotéase kex2p qui clive M28p entre γ et β en position 245. Une autre enzyme coupe entre les sous-unités α et γ , en position 149, pour permettre à la toxine K28 mature de prendre sa forme définitive.

TOXINES DE *USTILAGO MAYDIS*

Des virus à ARN double-brin (dsRNA) sont responsables de la production de toxine killer chez l'espèce *Ustilago maydis* (49, 50). Les différentes souches killer de cette espèce peuvent sécréter 3 catégories de toxines (KP1, KP2 ou KP6). Les toxines KP semblent être synthétisées sous la forme de prototoxines qui subissent des processus de maturation dans le cytoplasme de la levure killer. Elles ont des spécificités killer différentes. Ainsi, une cellule résistante à une toxine KP particulière peut être sensible à d'autres toxines KP. Les toxines KP exercent des activités antibiotiques contre des espèces relativement proches d'un point de vue taxonomique (51). Chaque levure killer peut contenir de 3 à 7 segments de dsRNA de 0,36 à 6,2 kb, répartis en 3 groupes désignés H (*heavy*), M (*medium*) et L (*light*) (12, 51). Ces dsRNA sont encapsidés dans des particules virales de 43 nm formées d'une protéine majeure de 73 à 75 kDa. Les souches killer de l'espèce *U. maydis* sont résistantes à leurs propres toxines, cependant contrairement à ce qui est observé chez *S. cerevisiae*, elles ne doivent pas cette auto-immunité aux déterminants génétiques responsables de l'activité killer. Chez les souches killer de type KP1, l'auto-immunité est associée aux segments L, tandis que chez les souches de type KP4 et KP6, elle est due à des mutations chromosomiques (28, 52, 66, 67).

La toxine P1 (KP1) d'*U. maydis* est une toxine dimérique de 19,0 kDa formée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β , liées de manière non covalente. La sous-unité β , apparemment glycosylée, possède des domaines hydrophobes similaires à ceux de la toxine K2 de *S. cerevisiae*. La toxine KP1 provient d'un virus à 6 segments de dsRNA (H1, H2, M1, M2, M3 et L).

La toxine P4 (KP4) d'*U. maydis* est une toxine monomérique non glycosylée de 11,1 kDa qui est formée de 105 acides aminés (29, 66). Elle a un point isoélectrique de 8.1 et contient 10 cystéines probablement impliquées dans la formation de ponts disulfures (30). La toxine KP4 provient d'un virus à 7 segments de dsRNA (H1, H2, H3, H4, M2, M3 et L). Son ADNc a été cloné, séquencé et exprimé chez *S. cerevisiae* (66). Elle est synthétisée sous la forme d'une préprototoxine de 13,6 kDa, composée de 127 acides aminés, ne contenant aucun site de N-glycosylation.

La toxine P6 (KP6) d'*U. maydis* est une toxine dimérique non glycosylée de 17,7 kDa. Elle est composée d'une sous-unité α de 8,6 kDa, formée de 78 acides aminés, et d'une sous-unité β de 9,1 kDa, formée de 81 acides aminés. Ces 2 sous-unités

sont liées de manière non covalente. La toxine KP6 provient d'un virus à 5 segments de dsRNA (H1, H2, M2, M3 et L). C'est la toxine d'*U. maydis* la mieux caractérisée. Son ADNc a été cloné, séquencé et exprimé dans différents systèmes d'expression hétérologue (28, 68, 103, 104). Le segment M2 code pour une prototoxine de 24,1 kDa, composée de 219 acides aminés, qui sera clivée par différentes protéases dont une ayant une activité de type kex2. Cette prototoxine comprend un peptide signal, la sous-unité α glycosylée, un domaine de liaison et la sous-unité β (103).

Modes d'action et récepteurs des toxines killer

MODES D'ACTION DE LA TOXINE DE *KLUYVEROMYCES LACTIS*

La toxine de *K. lactis* exerce une activité killer à l'encontre de souches sensibles appartenant à différentes espèces comme *Candida* spp., *Kluyveromyces* spp., *Saccharomyces* spp., *Torulopsis* spp. ou *Zygosaccharomyces* spp. (36). La toxine mature provoque un arrêt définitif du cycle cellulaire de la cellule cible en phase G₁ conduisant à une perte rapide de la viabilité (35, 108). Cet arrêt du cycle cellulaire en G₁ est attribué à la sous-unité γ (15). La sous-unité α , de son côté, montre des homologies de séquences avec des protéines à activité de type chitinase. Son activité de chitinase est essentielle pour permettre à la toxine d'agir sur les cellules cibles (16, 106). Des études ultérieures ont montré que des souches mutantes de *S. cerevisiae*, incapables de synthétiser de la chitine, sont résistantes à la toxine de *K. lactis* (13). Chez cette levure, la chitine semble être impliquée dans la formation des récepteurs pariétaux de la toxine de *K. lactis* (102). Dès que la toxine s'est fixée à la surface de la cellule cible, une partie de celle-ci, probablement la sous-unité β en raison de ses domaines hydrophobes, est sans doute transloquée à travers la membrane plasmique vers le cytoplasme. La sous-unité β agit aussi probablement de manière simultanée avec la sous-unité α . Les cellules cibles exposées au contact de la toxine killer maintiennent leur potentiel de membrane à une valeur constante, ce qui indique que la toxine de *K. lactis* n'agit pas comme un ionophore. Malgré cela, le mode d'action de cette toxine n'est pas encore complètement compris.

MODES D'ACTION DES TOXINES DE *PICCHIA* SPP.

La toxine de *P. acaciae* codée par pPac 1-1 et pPac 1-2 est inhibée par l'allosamidine, un inhibiteur de chitinase. Une fixation de la toxine sur la chitine de la cellule cible est essentielle pour obtenir une activité toxique. Cette activité arrête le cycle cellulaire de la cellule cible en G₁. Les mécanismes d'action de cette toxine semblent proches de ceux de la toxine de *K. lactis*. Cependant, alors que des souches mutantes *k₁* de *K. lactis*, qui ont perdu le plasmide *k₁*, deviennent sensibles à la toxine de *P. acaciae* comme à leur propre toxine, les souches mutantes de *P. acaciae* ne deviennent sensibles qu'à leur propre toxine (6). Ces observations suggèrent que les mécanismes d'immunité de ces deux toxines sont sans doute différents.

TABLEAU III. — Structure des toxines killer codées par des gènes extra-chromosomiques.
Structure of killer toxins encoded by extra-chromosomal genes.

Levure killer	Toxine	SU (kDa)	Masse moléculaire	GP ?	ProT	pH ou pI/T°
<i>Kluyveromyces lactis</i>	codée par pGKL1 (k ₁) et pGKL2 (k ₂)	α (99) β (30) γ (27.5)	156.5 kDa	oui	128 kDa	
<i>Pichia inositovora</i>	codées par pPin 1-1 et pPin 1-3		> 100 kDa	oui		de 3.4 à 4.2
<i>Pichia acaciae</i>	codées par pPac 1-1 et pPac 1-2	α (110) β (39) γ (38)	± 190 kDa			de 7.0 à 7.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K1	α (9,5) β (9,0)	172 aa + 140 aa 19 kDa	non	35 kDa, puis 42 kDa	de 4.2 à 4.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K2	α β	180 aa + 140 aa 21.5 kDa	oui	38.7 kDa	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K28	α (10,5) β (11)	21.5 kDa	oui	37,6 kDa	
<i>Ustilago maydis</i>	P1 (KP1)	α β	19,0 kDa	oui		
<i>Ustilago maydis</i>	P4 (KP4)	mono	11,1 kDa (105 aa)	non	13,6 kDa (127 aa)	
<i>Ustilago maydis</i>	P6 (KP6)	α (8,6) β (9,1)	17,7 kDa	non	24,1 kDa (219 aa)	
<i>Phaffia rhodozyma</i>						
<i>Hanseniaspora uvarum</i>			± 18 kDa	non		
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	KT412		± 10 kDa	non		
<i>Tilletiopsis albescens</i>			± 10 kDa			de 3.5 à 8.0

[aa = acides aminés ; GP = nature glycoprotéique ; mono = toxine monomérique ; SU = sous-unités]

MODES D'ACTION DES TOXINES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

La toxine K1 se fixe, dans un premier temps, sur les β-1,6-D-glucanes de la paroi de la cellule cible grâce à sa sous-unité β (2, 8). Les conditions de fixation de la toxine sur ces récepteurs pariétaux sont fortement liées aux conditions de pH. La valeur optimale du pH permettant la fixation de la sous-unité β est de 4,6 (14). Dans un second temps, la sous-unité α de la toxine interagit avec la membrane plasmique de la cellule cible par un mécanisme énergie-dépendant responsable de l'effet toxique entraînant la mort de la cellule. Ces conclusions ont été obtenues en observant que les sphéroplastes des cellules cibles étaient sensibles à la toxine (120). Il s'avère aussi que de jeunes cellules en bourgeonnement soient plus sensibles à l'activité de la toxine K1 que les levures en phase stationnaire de croissance, ce qui suggérerait que seulement quelques récepteurs membranaires puissent être impliqués dans la fixation de la toxine (14). La toxine ainsi fixée agit sur la cellule cible en inhibant la synthèse de macromolécules et en causant des dommages à la membrane plasmique de celle-ci ce qui conduit à une fuite d'ions potassium et de molécules d'ATP cytoplasmiques (24, 57).

La toxine K2 semble avoir le même mode d'action que celui de K1.

La toxine K28 se fixe sur la paroi de la cellule cible par un autre mécanisme. Elle reconnaît un récepteur pariétal de 185 kDa composé de résidus α-1,3-mannanes (86). La fixation de la toxine K28 à son récepteur mannoprotéique induit apparemment un arrêt du cycle cellulaire. On observe dans le cas de cellules cibles en cours de division que la toxine K28 neutralise la division cellulaire, confinant l'ADN nucléaire dans la cellule mère (87).

Des souches sensibles aux activités killer des toxines K1, K2 ou K28 peuvent devenir résistantes à ces mêmes toxines par mutation des gènes *KEX*. Certains de ces gènes sont impliqués dans la synthèse des récepteurs pariétaux. Les sphéroplastes de ces mutants *kex* restent cependant sensibles à l'activité killer des toxines en question, ce qui suggère l'existence d'un récepteur secondaire membranaire (58).

MODES D'ACTION DES TOXINES DE *USTILAGO MAYDIS*

La toxine P6 (KP6) est la toxine d'*U. maydis* dont l'activité a été la mieux caractérisée. Elle est composée de 2 sous-unités α et β qui agissent de manière séquentielle. La sous-unité β est responsable de l'activité antibiotique, mais n'agit qu'après interaction de la sous-unité α avec la paroi de la cellule cible. Les récepteurs à KP6 des cellules sensibles n'ont pas été identifiés. On pense qu'ils sont présents dans la paroi des

cellules cibles, car les protoplastes de celles-ci sont insensibles à KP6 (96). La sous-unité α présente des similarités avec des neurotoxines de scorpions et des cytotoxines. Elle contient des domaines hydrophobes et 8 cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfures. Ces ponts disulfures sont indispensables à l'activité antibiotique de la toxine. Celle-ci conduit vraisemblablement à la création de canaux ioniques.

La toxine P1 (KP1) a un mode d'action plus ou moins proche de celui de KP6 dans la mesure où les 2 sous-unités α et β agissent indépendamment sur la cellule cible.

La toxine P4 (KP4) a un mode d'action encore inconnu.

LES AUTRES TOXINES DE LEVURES

D'autres souches killer ont été caractérisées chez d'autres espèces de levure comme *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* ou *Phaffia rhodozyma*. Il s'agit en général de toxines codées par des gènes plasmidiques localisés sur des ARN bicaténaires (dsRNA) satellites. La toxine killer KT412 de *Z. bailii* est une protéine d'environ 10 kDa (82). Elle est probablement non glycosylée et se fixe sur les mannanes pariétaux de souches sensibles de *S. cerevisiae* ou *C. glabrata*. La toxine killer de *H. uvarum* est une protéine d'environ 18 kDa (81). Elle n'est probablement pas N-glycosylée car elle peut être synthétisée en présence de tunicamycine. Elle se fixe à la surface de cellules cibles, vraisemblablement sur les β -1,6-glucanes. Chez l'espèce *Phaffia rhodozyma*, une toxine killer codée par un ou plusieurs dsRNA associés à des particules pseudo-virales a été isolée (22). Cette toxine est active contre des souches killer de *P. rhodozyma* sécrétant d'autres types de toxines. Des souches de *Tilletiopsis albescens* sécrètent une

toxine killer d'environ 10 kDa qui est active pour des valeurs de pH entre 3,5 et 8,0 (32). Cette toxine (ou mycocine) a une activité fongicide contre des souches de *Rhodotorula* spp., *Exobasidium* spp., *Farysia* spp., *Protomyces* spp., *Pseudozyma* spp., *Sporisorium* spp., *Tapphrina* spp. et *Ustilago* spp.. Par contre, elle n'agit pas contre les Ascomycètes. Elle est thermostable et sensible à la protéinase K. Les mêmes auteurs ont montré que des souches de *Cryptosporidium humicola* sécrètent de petites toxines killer thermostables (nommées microcines), actives en conditions acides et solubles en méthanol (31). Des études ultérieures en microscopie et fluorimétrie ont montré que cette toxine est active contre des souches sensibles de *Cryptococcus terreus* (80). D'autres toxines killer ont été caractérisées chez des souches de *Candida* spp. ou *Torulopsis* spp. (42). Chez *Candida* spp., une toxine dimérique formée de sous-unités glycoprotéiques I et II d'environ 36 kDa, chacune, a été caractérisée (115, 116). La sous-unité I est la plus active, notamment contre des souches de *Candida glabrata*, *Pichia anomala*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula rubra* et *Saccharomyces cerevisiae*, alors qu'elle n'agit pas contre d'autres souches de levure, ni même contre des Bactéries.

CONCLUSIONS

Malgré leurs différences structurales et fonctionnelles, les toxines killer des différentes espèces de levure présentent des caractéristiques communes intéressantes. Sécrétées par des souches particulières, souvent dans des conditions environnementales bien déterminées, elles possèdent un spectre d'activité spécifique à l'encontre d'une variété plus ou moins étendue de

TABLEAU IV. — Mode d'action des toxines killer codées par des gènes extra-chromosomiques.
Mechanism of action of killer toxins encoded by extra-chromosomal genes.

Levure killer	Toxine	Cibles	Récepteurs	Activité
<i>Kluyveromyces lactis</i>	codée par pGKL1 (k ₁) et pGKL2 (k ₂)	<i>Candida</i> spp. <i>Kluyveromyces</i> spp. <i>Torulopsis</i> spp. <i>Zygosaccharomyces</i> <i>S. cerevisiae</i>	Chitine	- arrêt du cycle en G ₁ - chitinase
<i>Pichia inositolovora</i>	codées par pPin 1-1 et pPin 1-3	<i>S. cerevisiae</i> <i>Cephaloscyus</i> <i>Citeromyces</i>		
<i>Pichia acaciae</i>	codées par pPac 1-1 et pPac 1-2		Chitine	- arrêt du cycle en G ₁ - chitinase
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K1	<i>S. cerevisiae</i>	β -1,6 D-glucane	- formation de canaux ionophores
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K2	<i>S. cerevisiae</i>	β -1,6 D-glucane	- formation de canaux ionophores
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K28	<i>S. cerevisiae</i>	α -1,3-mannose	- inhibition de la synthèse d'ADN
<i>Ustilago maydis</i>	P1 (KP1)			- formation de canaux ionophores
<i>Ustilago maydis</i>	P4 (KP4)			- formation de canaux ionophores ?
<i>Ustilago maydis</i>	P6 (KP6)		pariétaux	- formation de canaux ionophores
<i>Phaffia rhodozyma</i>				
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		<i>S. cerevisiae</i>	β -1,6-glucanes	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	KT412	<i>S. cerevisiae</i> <i>Candida glabrata</i>	mannanes	

cellules cibles, procaryotes ou eucaryotes. Elles peuvent être protéiques ou glycoprotéiques, monomériques ou polymériques, codées par des gènes chromosomiques ou extra-nucléaires. Elles peuvent partager entre plusieurs sous-unités leurs propriétés de reconnaissance des récepteurs et leurs activités antibiotiques ou alors regrouper ces différentes fonctions sur la même structure protéique. Enfin, la sensibilité de leurs cellules cibles est liée à la présence de récepteurs, pariétaux ou membranaires. L'absence de tels récepteurs, ou simplement leur modification structurale ou conformationnelle engendre des résistances à l'activité killer.

L'étude des systèmes killer de levure peut se limiter à la compréhension du phénomène au niveau moléculaire. Elle permet d'appréhender et caractériser les relations existant entre les microorganismes fréquentant un écosystème donné, notamment dans la compétition qui les oppose face à la même chaîne alimentaire, donc aux mêmes opportunités de développement. Cette étude peut aussi avoir des applications potentielles dans le domaine de la thérapie ou celui de la prophylaxie de maladies causées par des microorganismes pathogènes pouvant être sensibles à ces toxines. En effet, les méthodes modernes du génie génétique et de la biotechnologie moléculaire permettent de reproduire la structure de ces molécules antimicrobiennes et donner ainsi naissance à de nouvelles drogues ou de nouveaux médicaments. Pour l'ensemble de ces raisons, les toxines killer de levure ont aussi un avenir certain en recherche médicale.

Remerciements : Le travail de Cyril Guyard est financé par l'Institut Pasteur de Lille et le Conseil Régional Nord, Pas-de-Calais.

RÉFÉRENCES

- Abranches J, Morais PB, Rosa CA, Mendonca-Hagler LC, Hagler AN. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Can J Microbiol* 1997;43:328-36.
- Al-Aidroos K, Bussey H. Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Can J Microbiol* 1978;24:228-37.
- Aliouat EM, Cailliez JC, Séguy N, Dei-Cas E, Polonelli L, Gerloni M, Conti S, Camus D. Inhibitory effect of a yeast killer toxin to the *in vitro* *Pneumocystis carinii* attachment. *Serodiaz Immunother Infect Dis* 1993;5:102-6.
- Ashida ST, Shimazaki T, Kitano K, Hara S. New killer toxin of *Hansenula mrakii*. *Agric Biol Chem* 1983;47:2953-5.
- Barnett A, Payne RM, Yarrow D. Yeasts. Characteristics and identification, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
- Bolen PL, Eastman EM, Clark PL, Hayman GT. Isolation and sequence analysis of a gene from the linear DNA plasmid pPac 1-2 of *Pichia acaciae* that shows similarities to a killer toxin gene of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 1994;10:403-14.
- Boone C, Sdicu AM, Wagner J, Degre R, Sanchez C, Bussey H. Integration of the yeast K1 killer toxin gene into the genome of marked wine yeast and its effect on vinification. *Am J Enol Vit* 1990;41:37-42.
- Boone C, Sommer SS, Hensel A, Bussey H. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J Cell Biol* 1990;110:1833-43.
- Bortol A, Nudel C, Fraille E, de Torres R, Giuletti A, Spencer JFT, Spencer D. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986;24:414-6.
- Bostian KA, Sturgeon JA, Tipper DJ. Encapsulation of yeast killer double-stranded ribonucleic acid : dependance of M on L. *J Bacteriol* 1980;143:463-70.
- Bostian K A, Elliott Q, Bussey H, Burn VE, Smith A, Tipper DJ. Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast : multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell* 1984;36:741-51.
- Bozarth RF, Koltin Y, Weissman MB, Parker RL, Dalton RE, Steinlauf R. The molecular weight and packaging of dsRNAs in the mycovirus from *Ustilago maydis*. *Virology* 1981;118:492-502.
- Bulawa CE. « Genetics and Molecular Biology of Chitin Synthesis in Fungi » *Ann Rev Microbiol* 1993;10:505-34.
- Bussey H, Saville D, Hutchins K, Palfree RGE. Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1979;140:888-92.
- Butler AR, Porter M, Stark MJR. Intracellular expression of *Kluyveromyces lactis* toxin (subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant. *Yeast* 1991;7:617-25.
- Butler AR, O'Donnell RW, Martin VJ, Gooday GW, Stark MRJ. *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur J Biochem* 1991;199:483-8.
- Cailliez JC, Gerloni M, Morace G, Conti S, Cantelli C, Polonelli L. Ultrastructural immunodetection of a *Pichia anomala* killer toxin : a preliminary study. *Biol Cell* 1992;75:19-23.
- Cailliez JC, Cantelli C, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Morace G et al. *Pichia anomala* toxin secretion in the presence of tunicamycin. *J Med Vet Mycol* 1993;31:337-42.
- Cailliez JC, Cantelli C, Séguy N, Conti S, Gerloni M, Morace G et al. Killer toxin secretion through the cell wall of the yeast *Pichia anomala*. *Mycopathologia* 1994;126:173-77.
- Cailliez JC, Séguy N, Aliouat EM, Polonelli L, Camus D, Dei-cas E. The yeast killer phenomenon : a hypothetical way to control *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Med Hypoth* 1994;43:167-71.
- Cassone A, Conti S, De Bernardis F, Polonelli L. Antibodies, killer toxins and antifungal immunoprotection : a lesson from nature ? *Immunol Today* 1997;18:164-9.
- Castillo A, Cifuentes V. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr Genet* 1994;26:364-8.
- Chen XJ, Wesolowski-Louvel M, Tanguy-Rougeau C, Bianchi MM, Fabiani L, Saliola, M et al. A gene-cloning system for *Kluyveromyces lactis* and isolation of a chromosomal gene required for killer toxin production. *J Basic Microbiol* 1988;28:211-20.
- de la Pena P, Barros F, Gascon S, Lazo PS, Ramos S. The effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1981;256:10420-5.
- Dignard D, Whiteway M, Germain D, Tessier D, Thomas DY. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer gene. *Mol Gen Genet* 1991;227:127-36.
- Dmochowska A, Dignard D, Henning D, Thomas DY, Bussey H. Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell* 1987;50:573-84.
- El-Sherbeini M, Tipper DJ, Mitchell DJ, Bostian KA. Virus-like particles capsids proteins encoded by different L double-stranded RNAs of *Saccharomyces cerevisiae* : their role in maintenance of M double-stranded killer plasmids. *Mol Cell Biol* 1984;4:2818-27.
- Finkler A, Peery T, Tao J, Bruenn JA, Koltin Y. Immunity and resistance to the KP6 toxin of *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* 1992;233:393-403.
- Ganesa C, Chang Y, Flurkey WH, Randhawa ZI, Bozarth RF. Purification and molecular properties of the toxin encoded by *Ustilago maydis* virus P4. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;162:651-7.
- Ganesa C, Flurkey WH, Randhawa ZI, Bozarth RF. *Ustilago maydis* virus P4 killer toxin : characterization, partial amino terminus sequence, and evidence for glycosylation. *Arch Biochem Biophys* 1991;286:195-200.
- Golubev WI, Shabalin Y. Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiol Lett* 1994;119:105-10.
- Golubev WI. Killer activity of *Tilletiopsis albescens* Gokhale : taxonomic and phylogenetic implication. *Syst Appl Microbiol* 1998;21:429-32.

33. Goto K, Ywase Y, Kichise K, Kitano K, Totuka A, Obata T *et al.* Isolation and properties of a chromosome-dependant KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem* 1990;54:505-9.
34. Goto K, Fukuda H, Kichise K, Kitano K, Hara S. Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem* 1991;55:1953-8.
35. Gunge N, Sakaguchi K. Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid plasmids pGKL1 and pGKL2 from *Kluyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. *J Bacteriol* 1981;147:155-60.
36. Gunge N, Tamaru A, Ozawa F, Sakaguchi K. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid associated killer character. *J Bacteriol* 1981;145:382-90.
37. Hara S, Iimura Y, Otsuka K. Breeding of useful killer wine yeasts. *Am J Enol Vit* 1980;31:28-33.
38. Hayman GT, Bolen PL. Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Curr Genet* 1991;19:389-93.
39. Hodgson VJ, Button D, Walker GM. Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol* 1995;141:2003-12.
40. Hong Z, Mann P, Brown NH, Tran LE, Shaw KJ, Hare RS *et al.* Cloning and characterization of KNR4, a yeast gene involved in (1,3)- β -glucan synthesis. *Mol Cell Biol* 1994;14:1017-25.
41. Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R, Thorner J. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine cleaving endopeptidase required for processing of yeast pre-pro-alpha factor. *Cell* 1984;37:1075-89.
42. Kandel JS, Stern TA. Killer phenomenon in pathogenic yeast. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;15:568-71.
43. Kasahara S, Yamada H, Mio T, Shiratori Y, Miyamoto C, Yabe T *et al.* Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, which inhibits β -glucan synthesis. *J Bacteriol* 1994;176:1488-99.
44. Kasahara S, Inoue SB, Mio T, Yamada T, Nakajima T, Ichishima E *et al.* Involvement of cell wall β -glucan in the action of HM-1 killer toxin. *FEBS Lett* 1994;348:27-32.
45. Kashiwagi T, Kunishima N, Suzuki C, Tsuchiya F, Nikkuni S, Arata Y *et al.* The novel acidophilic structure of the killer toxin from halotolerant yeast demonstrates remarkable folding similarity with a fungal killer toxin. *Structure* 1997;15:81-94.
46. Kimura T, Kitamoto K, Matsuoka K, Nakamura K, Iimura Y, Kito Y. Isolation and nucleotide sequences of the genes encoding killer toxins from *Hansenula mrakii* and *Hansenula saturnus*. *Gene* 1993;137:265-70.
47. Kimura T, Kitamoto N, Ohta Y, Kito Y, Iimura Y. Structural relationships among killer toxins secreted from the killer strains of the genus *Williopsis*. *J Ferment Bioengin* 1995;80:85-7.
48. Kimura T, Kitamoto N, Kito Y, Iimura Y, Shirai T, Komiyama T *et al.* A novel yeast gene, *RHK1*, is involved in the synthesis of the cell wall receptor for the HM-1 killer toxin that inhibits β -1,3-glucan synthesis. *Mol Gen Genet* 1997;254:139-47.
49. Koltin Y, Day DR. Specificity of *Ustilago maydis* killer proteins. *Appl Microbiol* 1975;30:694-6.
50. Koltin Y, Day DR. Inheritance of killer phenotypes and double-stranded RNA in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:594-8.
51. Koltin Y, Kandel JS. Killer phenomenon in *Ustilago maydis* : the organization in the viral genome. *Genetics* 1978;88:267-76.
52. Koltin Y, Levine R, Peery T. Assignment of functions to segments of the dsRNA genome of the *Ustilago* virus. *Mol Gen Genet* 1980;178:173-8.
53. Lolle SJ, Bussey H. *In vivo* evidence for posttranslational translocation and signal cleavage of the killer preprotoxin of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1986;6:4274-80.
54. Magliani W, Conti S, De Bernardis F, Gerloni M, Bertolotti D, Mozzoni P *et al.* Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity. *Nature Biotechnol* 1997;15:155-8.
55. Magliani W, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Polonelli L. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:369-400.
56. Makower M, Bewan EA. The physiological basis of killer character in yeast. In *Genetics Today's*, vol. 1. *Proceedings of the XI International Congress of Genetics*, pp 202-203. Edited by S.J. Goerts. The Hague : Mac Millan, 1963.
57. Martinac B, Zhu H, Kubalski A, Zhou X, Culbertson M, Bussey H *et al.* Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6228-32.
58. Meaden P, Hill K, Wagner J, Slipetz D, Sommer S, Bussey H. The yeast *KRE5* gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1 \rightarrow 6) β -D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol Cell Biol* 1990;10:3013-9.
59. Meskauskas A, Civitavicius D. The K2-type killer toxin- and immunity-encoding region from *Saccharomyces cerevisiae* : structure and expression in yeast. *Gene* 1992;111:135-9.
60. Middelbeek EJ, Hermans JM, Stumm C. Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek* 1979;45:437-50.
61. Mizuno K, Nakamura T, Takada K, Sakakibara S, Matsuo H. A membrane-bound, calcium dependent protease in yeast a-cell cleaving on the carboxyl side of paired basic residues. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;144:807-14.
62. Morace G, Manzara S, Dettori G, Fanti F, Conti S, Campani L, Polonelli L, Chezzi C. Biotyping of bacterial isolates using the yeast killer system. *Eur J Epidemiol* 1989;5:303-10.
63. Nomoto H, Kitano K, Shimazaki K, Kodama K, Hara S. Distribution of killer yeast in the genus *Hansenula*. *Agric Biol Chem* 1984;48:807-9.
64. Ohta Y, Tsukada Y, Sugimori T. Production, purification and characterization of HY1, an anti-yeast substance, produced by *Hansenula saturnus*. *Agric Biol Chem* 1984;48:903-8.
65. Palpacelli V, Ciani M, Rosini G. Activity of different killer yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol Lett* 1991;84:75-8.
66. Park CM, Bruenn JA, Ganesa G, Flurkey WF, Bozarth RF, Koltin Y. Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Mol Microbiol* 1994;11:155-64.
67. Peery T, Koltin Y, Tamarkin A. Mapping the immunity functions of the *Ustilago maydis* PI virus. *Plasmid* 1982;7:52-8.
68. Peery T, Shabat-Brand T, Steinlauf R, Koltin Y, Bruenn J. Virus-encoded toxin of *Ustilago maydis* : two polypeptides are essential for activity. *Mol Cell Biol* 1987;7:470-7.
69. Polonelli L, Archibuacci C, Sestito M, Morace G. Killer system : a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J Clin Microbiol* 1983;17:774-80.
70. Polonelli L, Lorenzini R, De Bernardis F, Morace G. Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathologia* 1986;96:103-7.
71. Polonelli L, Morace G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J Clin Microbiol* 1986;24:866-9.
72. Polonelli L, Morace G. Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1987;25:460-2.
73. Polonelli L, Morace G. Yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J Clin Microbiol* 1988;26:602-4.
74. Polonelli L, Fanti F, Conti S, Campani L, Gerloni M, Castagnola G. *et al.* Detection by immunofluorescent anti-idiotypic antibodies of yeast killer toxin cell wall receptors of *Candida albicans*. *J Immunol Methods* 1990;132:205-9.
75. Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Castagnola M, Chezi C. 'Antibodies' : antibiotic-like antiidiotypic antibodies. *J Med Vet Mycol* 1991;29:235-42.
76. Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Magliani W, Morace G, Chezzi C. Interfaces of the yeast killer phenomenon. *CRC Critical Rev Microbiol* 1991;8:47-87.
77. Polonelli L, Lorenzini R, De Bernardis F, Gerloni M, Conti S, Morace G. Idiotypic vaccination : Immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity. *Scand J Immunol* 1993;37:105-10.
78. Polonelli L, De Bernardis F, Conti S, Bocanera M, Gerloni M, Morace G *et al.* Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like antiidiotypic antibodies. *J Immunol* 1994;152:3175-82.

79. Polonelli L, Séguy N, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Cantelli C *et al.* Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:142-6.
80. Puchkov EO, Yurkova TV, Golubev WI. Effects of *Cryptococcus humicola* killer toxin upon *Cryptococcus terreus* envelope : combined fluorometric and microscopic studies. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1381:61-7.
81. Radler F, Schmitt MJ, Meyer B. Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. *Arch Microbiol* 1990;154:175-8.
82. Radler F, Herzberger S, Schonig I, Schwarz P. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol* 1993;139: 495-500.
83. Sawant AD, Abdelal AT, Ahearn DG. Anti-*Candida albicans* activity of *Pichia anomala* as determined by a growth rate reduction assay. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:1099-103.
84. Sawant AD, Abdelal AT, Ahearn DG. Purification and characterization of the anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:48-52.
85. Sawant AD, Ahearn DG. Involvement of a cell wall receptor in the mode of action of an anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala* WC 65. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1331-5.
86. Schmitt MJ, Radler F. Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptors for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol* 1987;133:3347-54.
87. Schmitt MJ, Tipper DJ. K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1990;10:4807-15.
88. Schmitt MJ, Tipper DJ. Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast* 1992;8:373-84.
89. Schmitt MJ, Tipper DJ. Sequence of the M28 dsRNA preprotoxin is processed to an $\alpha\beta$ heterodimeric protein toxin. *Virology* 1995;213:341-51.
90. Séguy N, Aliouat EM, Dei-Cas E, Polonelli L, Camus D, Cailliez JC. Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to a *Pichia anomala* killer toxin. *J Euk Microbiol*, 1994;41:1095.
91. Séguy N, Polonelli L, Conti S, Dei-Cas E, Camus D, Cailliez JC. *In vitro* decrease of rat-derived *Pneumocystis carinii* attachment induced by human natural yeast killer toxin-like antiidiotypic candidacidal antibodies. *J Euk Microbiol* 1996;43:275.
92. Séguy N, Cailliez JC, Delcourt P, Conti S, Camus D, Dei-Cas E, Polonelli L. Inhibitory effect of human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies on *Pneumocystis carinii*. *Mol Med* 1997;3:544-52.
93. Sossin WS, Fisher JM, Scheller RH. Cellular and molecular biology of neuropeptide processing and packaging. *Neuron* 1989;2:1407-17.
94. Starmer WT, Ganter PF, Aberdeen V, Lachance MA, Phaff HT. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol* 1987;33:783-96.
95. Stark MJR, Boyd A. The killer toxin of *Kluyveromyces lactis* : characterization of the toxins subunits and identification of the genes which encode them. *EMBO J* 1986;5:1995-2002.
96. Steinlauf R, Peery T, Koltin Y, Bruenn J. The *Ustilago maydis* virus-encoded toxin : effect of KP6 on cells and spheroplasts. *Exp Mycol* 1988;12:264-74.
97. Stumm C, Hermans JMH, Middelbeek EJ, Croes AF, De Vries GJML. 1977. Killer-sensitive relationships in yeast from natural habitats. *Antonie van Leeuwenhoek* 1977, 43:125-8.
98. Sturley SL, Elliott QE, Le Vitre J, Tipper DJ, Bostian KA. Mapping of functional domains within the type 1 killer preprotoxin. *EMBO J* 1986;5:3381-9.
99. Suzuki C, Nikkuni S. The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *J Biol Chem* 1994;269:3041-6.
100. Suzuki C, Kashiwagi T, Tsuchiya F, Kunishima N, Morikawa K, Nikkuni S *et al.* Circular dichroism analysis of the interaction between the alpha and beta subunits in a killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *Protein Eng* 1997;10:99-101.
101. Takasuka T, Komiyama T, Furuichi Y, Watanabe T. Cell wall synthesis-specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-I on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* 1995;41:575-81.
102. Takita MA, Castilho-Valavicius B. Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Yeast* 1993;9:589-98.
103. Tao J, Ginsberg I, Banerjee N, Held W, Koltin Y, Bruenn J. *Ustilago maydis* KP6 toxin : structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae* and relationship to other cellular toxins. *Mol Cell Biol* 1990;10:1373-81.
104. Tao J, Ginsberg Y, Koltin Y, Bruenn. Mutants of *Ustilago maydis* defective in production of one of two polypeptides of KP6 toxin from the preprotoxin. *Mol Gen Genet* 1993;238:234-40.
105. Tokunaga M, Kawamura A, Omori A, Hishinuma F. Structure of yeast pGKL 128-kDa killer-toxin secretion signal sequence. Processing of the 128 kDa killer-toxin-secretion-signal- α -amylase fusion protein. *Eur J Biochem* 1992;203:415-23.
106. Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K, Ohnishi K, Tanaka H. Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and classe III plant chitinases. *J Bacteriol* 1992;174:408-14.
107. Wesolowski-Louvel M, Tanguy-Rougeau C, Fukuhara H. A nuclear gene required for the expression of the linear DNA-associated killer system in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 1988;4:71-81.
108. White JH, Butler AR, Stark MJR. *Kluyveromyces lactis* toxin does not inhibit adenyl cyclase. *Nature (London)* 1989;341:666-8.
109. Wickner RB. Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol* 1992;46:347-75.
110. Wickner RB. Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 1996;60:250-65.
111. Woods DR, Bevan EA. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 1968;51:115-26.
112. Yabe T, Yamada-Okabe T, Kasahara S, Furuichi Y, Nakajima T, Ichishima E *et al.* *HKR1* encodes a cell surface protein that regulates both cell wall β -glucan synthesis and budding pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1996;178:477-83.
113. Yamamoto T, Imai M., Tachibana K, Mayumi T. Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*. *FEBS Lett* 1986;195:253-7.
114. Yamamoto T, Hiratani T, Hirata H, Imai M, Yamaguchi H. Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS Lett* 1986;197:50-4.
115. Yokomori Y, Akiyama H, Shimizu K. Isolation of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. *Agric Biol Chem* 1988;52:2791-6.
116. Yokomori Y, Akiyama H, Shimizu K. Toxins of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. *Agric Biol Chem* 1988;52:2797-801.
117. Young TW. The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. *J Inst Brew* 1981;87:292-5.
118. Young TW. The properties of brewing performance of brewing yeasts possessing killer character. *J Am Soc Brew Chem* 1982;42:1-4.
119. Zhu H, Bussey H, Thomas DY, Gagnon J, Bell AW. Determination of the carboxyl termini of the α and β subunits of yeast K1 killer toxin. *J Biol Chem* 1987;262:10728-32.
120. Zhu H, Bussey H. The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Appl Environ Microbiol* 1989;55: 2105-7.

Use of Green Fluorescent Protein To Tag Lactic Acid Bacterium Strains under Development as Live Vaccine Vectors

MARIE-CLAUDE GEOFFROY,¹ CYRIL GUYARD,¹ BRIGITTE QUATANNENS,² SONIA PAVAN,¹
MARC LANGE,¹ AND ANNICK MERCENIER^{1*}

Département de Microbiologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille,¹ and UMR 3586,
Institut de Biologie de Lille,² Lille Cedex 59019, France

Received 14 July 1999/Accepted 26 October 1999

The lactic acid bacteria (LAB) are safe microorganisms which are mainly used for the preparation of fermented foods and for probiotic applications. The potential of LAB as live vehicles for the production and delivery of therapeutic molecules such as antigens is also being actively investigated today. However, very little is known about the fate of live LAB when administered *in vivo* and about the interaction of these microorganisms with the nasal or gastrointestinal ecosystem. For future applications, it is essential to be able to discriminate the biotherapeutic strain from the endogenous microflora and to unravel the mechanisms underlying the postulated health-beneficial effect. We therefore started to investigate both aspects in a mouse model with two LAB species presently under development as live vaccine vectors, i.e., *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum*. We have constructed different expression vectors carrying the *gfp* (green fluorescent protein [GFP]) gene from the jellyfish *Aequoria victoria*, and we found that this visible marker was best expressed when placed under the control of the inducible strong *nisA* promoter from *L. lactis*. Notably, a threshold amount of GFP was necessary to obtain a bright fluorescent phenotype. We further demonstrated that fluorescent *L. plantarum* NCIMB8826 can be enumerated and sorted by flow cytometry. Moreover, tagging of this strain with GFP allowed us to visualize its phagocytosis by macrophages *in vitro* and *ex vivo* and to trace it in the gastrointestinal tract of mice upon oral administration.

The lactic acid bacteria (LAB) constitute a family of gram-positive bacteria which are well known for their use in industrial food fermentations and for their probiotic properties (27). During the past 15 years, the characterization of LAB has considerably evolved, and a variety of molecular biology tools have been developed for these microorganisms. Several reporter genes such as those encoding chloramphenicol acetyltransferase (*cat-86* from *Bacillus pumilus* or *cat-194* from *Staphylococcus aureus*) (1, 11), the *Escherichia coli* β -glucuronidase gene (30), the *Leuconostoc mesenteroides* β -galactosidase gene (20), the *Bacillus licheniformis* α -amylase gene (18), the *Vibrio fischeri* luciferase gene (13), and the *S. aureus* nuclease gene (31) have been used for LAB mainly to isolate functional expression or targeting signals. The *lux* system has also been applied to study lactococcal promoter strength in the digestive tract of mice (6). The phenotypic tests linked to these systems require the addition of exogenous substrates for the detection of recombinant strains expressing the reporter genes. As such, they may present limitations for *in vivo* studies. To circumvent this drawback, an original reporter system based on the green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* has been developed (5) and used successfully with a variety of bacteria such as gram-negative bacteria (5), *Mycobacterium bovis* (12, 23), and, very recently, two LAB, *Streptococcus thermophilus* (34) and *Lactococcus lactis* (33). GFP is a protein of 238 amino acids which spontaneously emits green light at 508 nm when excited with blue light at 395 nm in the presence of O₂. Its major advantage results from its intrinsic property of fluorescing in the absence of any added cofactor or substrate, thus allowing

nondestructive detection of recombinant cells expressing this reporter gene (5, 36). GFP is very stable and photobleaches very slowly even after repeated observations under the epifluorescence microscope. Moreover, mutant GFPs have been generated to improve detection and expression of the fluorescent protein in prokaryotic cells. These mutants generally absorb light of a longer wavelength (>396 nm) with little change in the emission spectrum compared to that of wild-type GFP and lead to improved fluorescence over that of the wild type due to increased solubility of the protein (8, 16, 17, 36).

Our laboratory is mainly interested in potential health applications of LAB such as their use for *in vivo* production and delivery of biologically active molecules. Dietary LAB have been consumed since times immemorial and are thus designated "generally recognized as safe" (2), which represents an important advantage for their potential use as live therapeutic vehicles (7, 28, 38). Nevertheless, little is known about the fate of LAB administered *in vivo* and their interaction with either the immune system of the host or its endogenous microflora, which we started to investigate in a mouse model.

In the present report, we describe the implementation of a GFP variant optimized for bacterial expression (GFPuv [8]) as a marker for *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 and *L. lactis* NZ9800, two LAB species presently under study as potential live vaccine vehicles (19, 28, 29, 38). We tested expression of the *gfp* gene under the control of promoters of different strengths and verified whether fluorescent lactobacilli can be enumerated by flow cytometry and traced *in vivo*. We specifically analyzed the interaction of GFP⁺ recombinant *L. plantarum* strains with macrophages which are actively phagocytic antigen-presenting cells that play an essential role in the induction of immune responses.

* Corresponding author. Mailing address: Département de Microbiologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, 1, Rue du Pr. Calmette, B.P. 245, F59019 Lille Cedex, France. Phone: (33) 320-87-71-22. Fax: (33) 320-87-79-08. E-mail: annick.mercenier@pasteur-lille.fr.

TABLE 1. Plasmids and bacterial strains

Plasmid or strain	Relevant characteristics	Antibiotic resistance	Reference or source
Plasmids			
pGIT032	<i>L. hilgardii</i> pLAB1000 replicon; expression vector containing the constitutive <i>ldhL</i> promoter from <i>L. plantarum</i>	Ap ^r Em ^r	15
pTG2247	<i>L. lactis</i> pSH71 replicon (pCK17 derivative); expression vector containing P25 promoter from <i>S. thermophilus</i> followed by the <i>ldhD</i> RBS from <i>L. plantarum</i> and terminator signal T1T2 from <i>E. coli</i>	Km ^r Cm ^r	19
pNZ8037	<i>L. lactis</i> pSH71 replicon; pNZ8032 derivative; expression vector containing <i>nisA</i> promoter from <i>L. lactis</i> NZ9800	Cm ^r	9
pNZ8037mod	pNZ8037 carrying an additional <i>KpnI</i> site	Cm ^r	This study
pBSmod	pBluescript derivative containing an additional <i>SphI</i> site	Ap ^r	P. Chagnaud (unpublished data)
pBAD-GFPuv	pBR322 derivative containing <i>gfp</i> under the control of <i>araC</i> promoter	Ap ^r	Clontech
pMEC7	pBSmod containing the P25-RBS-T1T2 cassette from pTG2247	Ap ^r	This study
pMEC12	pMEC7 derivative containing <i>gfp</i>	Ap ^r	This study
pMEC17	pTG2247 derivative containing the P25-RBS- <i>gfp</i> -T1T2 cassette from pMEC12	Km ^r Cm ^r	This study
pMEC30	pGIT032 derivative containing <i>gfp</i>	Ap ^r Em ^r	This study
pMEC45	pNZ8037 derivative containing <i>gfp</i>	Cm ^r	This study
Bacterial strains			
<i>E. coli</i> MC1061	<i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7696 <i>lacX74 galV galK hsr-hsm rpsL</i>		4
<i>L. plantarum</i> NCIMB8826	Isolated from human saliva		NCIMB ^a
<i>L. plantarum</i> NCIMB8826 Int-1	Integrand carrying the <i>nisRK</i> genes in the tRNA ^{Ser} chromosomal locus		S. Pavan et al. (unpublished data)
<i>L. lactis</i> NZ9800	NZ9700 derivative, Δ <i>nisA</i> , carrying <i>nisRK</i> on the chromosome; non-nisin producer		9

^a NCIMB, National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, United Kingdom.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *gfp* expression experiments were performed with *L. plantarum* NCIMB8826, a human saliva isolate, and *L. lactis* NZ9800 (Table 1). All cloning steps were done with *E. coli* MC1061 (Table 1).

L. plantarum strains were cultured in MRS broth (Difco) at 37°C without shaking. *L. lactis* strains were grown without shaking in M17 broth (Difco) containing 0.5% (wt/vol) glucose at 30°C. *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani medium at 37°C (32) under aeration. When appropriate, antibiotics were added to the culture medium. For LAB strains, chloramphenicol and erythromycin were used at final concentrations of 10 and 5 µg/ml, respectively. Ampicillin was supplied at a concentration of 100 µg/ml in the case of *E. coli*.

Expression of the *gfp* gene placed under the control of the nisin promoter was induced as follows: an overnight culture of *L. plantarum* NCIMB8826 was used to inoculate fresh medium at a dilution of 1:50. After 1 h of incubation, different amounts (2.5, 10, and 25 ng/ml) of nisin (Sigma) were added to the culture, which was further incubated for 3 to 4 h. For *L. lactis*, nisin induction was performed as described previously (10). GFP⁺ cells were observed by UV illumination or epifluorescence microscopy. The bacteria were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco) and concentrated 10- or 100-fold in PBS for *in vitro* or *in vivo* (intranasal administration) experiments, respectively. For feeding experiments, bacteria were resuspended in a 1/100 volume of gavage buffer (0.25 M sodium bicarbonate, 0.6% casein, 0.5% glucose). For bacterial enumeration on agar plates, washed cells were diluted and 100 µl of adequate dilutions was plated on selective medium. CFU were determined after 48 h of growth at 37°C.

DNA manipulation and transformation. Plasmid DNA was purified from *E. coli* by the alkaline lysis method (32) and was isolated from *L. plantarum* and *L. lactis* as described previously (19, 37). Restriction endonucleases, T4 DNA ligase, and *Taq* polymerase were purchased from Boehringer Mannheim and used according to the recommendations of the manufacturer. Electroporation of *L. plantarum* NCIMB8826 and *L. lactis* NZ9800 was performed according to the methods of Jossion et al. (21) and Wells et al. (37), respectively.

Construction of expression plasmids carrying the *gfp* gene. The expression plasmids pTG2247, pGIT032, and pNZ8037mod are described in Table 1. They allow cloning of the gene of interest behind the *S. thermophilus* P25 (pTG2247), the *L. plantarum* *ldhL* (pGIT032), or the *L. lactis* *nisA* inducible (pNZ8037) promoter, respectively, leading to transcriptional fusions in all cases.

(i) **Cloning of *gfp* gene under constitutive promoters.** The *ldhL* promoter from pGIT032 and the P25 promoter from pTG2247 were first chosen to drive the expression of the *gfp* gene. The latter was amplified from pBAD-GFPuv (carrying the GFPuv variant optimized for bacterial expression [Clontech]) by PCR with two oligonucleotides with the following sequences: CAT GCA TGC CAT GGC TAG CAA AGG AGA AGA AC (primer 1) and CCG GGT ACC GAG CTC GAA TTC (primer 2). The first one contained a *NcoI* site (underlined) which included the ATG initiation codon, and the second one included a *KpnI* site (underlined). The 758-bp PCR product was first restricted partially by *NcoI* and then by *KpnI* and cloned into *NcoI-KpnI*-restricted pGIT032 (partial restriction by *KpnI*), giving rise to pMEC30 (Fig. 1A). In this construction, GFP is fused to the first 25 amino acids of lactate dehydrogenase (LDH), giving rise to a hybrid protein with a calculated molecular weight of 29,000.

Two intermediate steps were carried out to bring the *gfp* gene under the control of the P25 promoter. First, the *SphI-EcoRI* fragment of pTG2247, which contains the P25 promoter, the *ldhD* ribosome binding site (RBS), and the TIT2 termination signal was cloned into the *SphI-EcoRI*-restricted pBSmod vector (Table 1). This intermediate plasmid, which replicates only in *E. coli*, was named pMEC7. pBAD-GFPuv was first restricted partially by *NdeI* and then by *XbaI*. The resulting 750-bp fragment containing *gfp* was then cloned into *NdeI-XbaI*-restricted pMEC7, thereby giving rise to pMEC12. Finally, a recombinant shuttle plasmid was obtained by inserting the *SphI-KpnI* fragment of pMEC12 into *SphI-KpnI*-restricted pTG2247. The resulting plasmid, pMEC17, thus carries the *gfp* gene under the control of the P25 promoter (Fig. 1B).

(ii) **Cloning of *gfp* under the nisin-inducible promoter.** The nisin-inducible promoter from pNZ8037 (9) was used to drive the expression of *gfp*. The 758-bp PCR-amplified gene was restricted partially by *NcoI* and then by *KpnI* and cloned into *NcoI-KpnI*-restricted pNZ8037mod, which contains the *nisA* promoter and translational initiation region, giving rise to pMEC45 (Fig. 1C).

Western blotting. Total protein extracts were prepared from exponentially growing cultures. The bacteria were harvested by centrifugation (3,000 × g, 10 min, 4°C), washed with PBS, resuspended in 1 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), and disrupted with a French press (Bioritech). The cell suspension was centrifuged (10,000 × g, 10 min, 4°C) to remove cell debris. The protein concentration was determined with the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad). The samples were boiled in Laemmli buffer (26) and subjected to sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Optitrans BA-S85; Schleicher & Schuell) with a Bio-Rad electroblotter. The blots were blocked for 2 h to overnight with 5% dried milk in blocking buffer (0.1% Tween 20, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.2) and incubated for 1 h at 25°C with rabbit anti-GFP antiserum (Clontech) diluted 1/2,000 in blocking buffer. After three washes in blocking buffer, the membranes were incubated for 1 h at 25°C with alkaline-phosphatase-conjugated anti-rabbit antisera (Sigma) diluted 1/7,000 in blocking buffer. After three washes in blocking buffer and one wash in developing buffer (5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 50

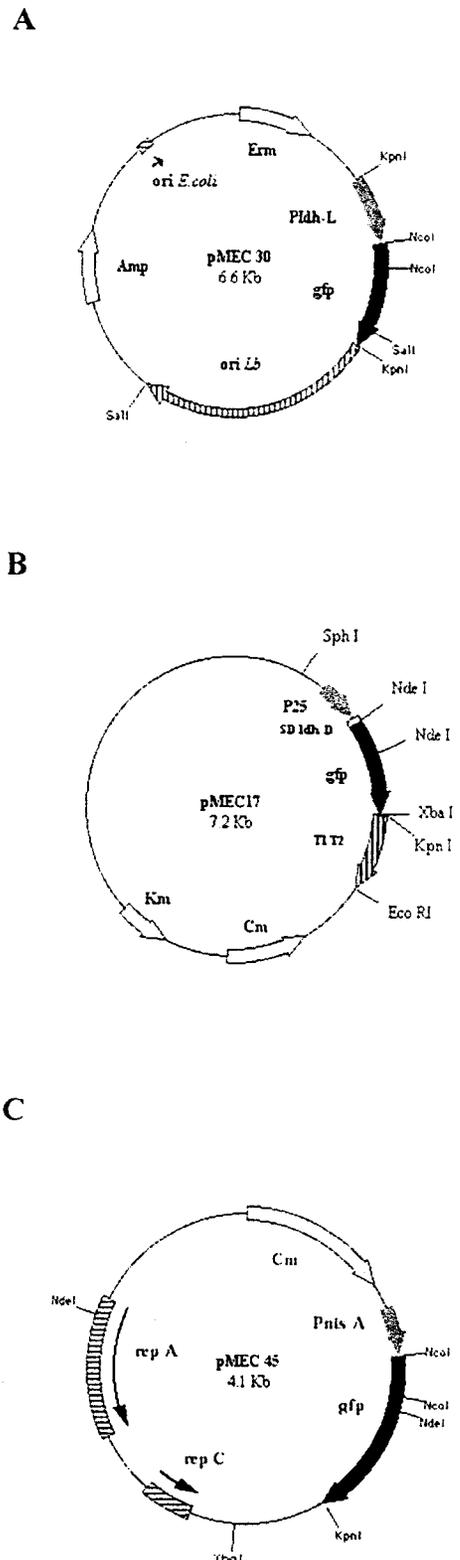


FIG. 1. Plasmids pMEC30 (A), pMEC17 (B), and pMEC45 (C) carrying the *gfp* gene under the control of the *L. plantarum* *ldhL*, the *S. thermophilus* P25, or the *L. lactis* inducible *nisA* promoter, respectively.

mM Tris-HCl, pH 9.5), the blots were developed with 5.0 mg of BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) per ml and 10 mg of nitroblue tetrazolium per ml in developing buffer.

Uptake of *L. plantarum* GFP⁺ strain by macrophages. The mouse monocyte-macrophage cell line J774A.1 (ATCC TIB67) was maintained at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco), supplemented with 10% decomplexed fetal calf serum (Gibco). Macrophages were seeded into 24-well tissue culture plates (Lab-Tek; Nunc) at a concentration of 10⁴ cells per chamber and were grown overnight. Prior to incubation with the *L. plantarum* strains, the adherent macrophage monolayer was washed with DMEM. *L. plantarum* GFP⁺ (nisin-induced culture of NCIMB8826/pMEC45) bacteria were added at a multiplicity of 1 to 5 CFU/cell. After 3 h or overnight incubation at 37°C and 5% CO₂, 50 nM acidotropic probe (LysoTracker Red DND-99; Molecular Probes) was added to each chamber, and incubation was continued for 1 h. The macrophages were then washed three times with DMEM to remove noningested bacteria, fixed with 4% paraformaldehyde, and examined by epifluorescence microscopy. Alternatively, the macrophage suspension was analyzed by flow cytometry after incubation with bacteria (see below).

Administration of *L. plantarum* GFP⁺ cells to mice and histological studies. For nasal administration, four BALB/c mice were given 10 µl (i.e., 10⁸ CFU) of either *L. plantarum* GFP⁺ (nisin-induced culture of NCIMB8826 Int-1/pMEC45) or *L. plantarum* GFP⁻ (noninduced culture of NCIMB8826 Int-1/pMEC45) bacteria in one nostril. Four hours later, the mice were sacrificed and a bronchoalveolar wash was performed on each animal. The cells contained in the lavage suspension were harvested by centrifugation (1,000 × g, 10 min, 4°C), washed twice with PBS, and resuspended in 1 ml of PBS. Half of the suspension was stained with the acidotropic probe as described above and examined by epifluorescence microscopy. The other half was analyzed by flow cytometry (see below).

For feeding experiments, four BALB/c mice received 10⁹ CFU of *L. plantarum* GFP⁺ bacteria by intragastric gavage. Mice were sacrificed 90 min postadministration. The Peyer's patches and flanking intestinal segments were removed, fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. Sequential thin sections (10 µm) were cut, deparaffinized, and mounted in Mowiol 4-88 (Calbiochem) for direct observation by epifluorescence microscopy.

Flow cytometry analysis. Samples were analyzed on a Coulter EPICS ELITE flow cytometer with an air-cooled 488-nm argon ion laser operated at 14 W and 6 A of power. Fluorescein isothiocyanate fluorescence was collected through a 525-nm dichroic band-pass filter after being reflected by a 550-nm dichroic long pass filter. Data were collected on 1.5 × 10⁴ or 2 × 10⁴ individual particles per sample. Before each analysis, 3- and 6-µm green latex beads (Coulter Corporation) were used to calibrate the light scatter and fluorescence parameters. For analysis of bacterial suspensions, exponentially growing *L. plantarum* GFP⁺ or *L. plantarum* GFP⁻ bacteria were harvested by centrifugation (3,000 × g, 10 min, 4°C), washed twice with PBS, resuspended thoroughly in 1 ml of PBS, and mixed with a known concentration of fluorescent beads in order to allow enumeration of viable cells. For examination of macrophages incubated with *L. plantarum* GFP⁺ or *L. plantarum* GFP⁻ bacteria, the monolayers were washed with DMEM and harvested by scraping at 4 h postincubation. The macrophages were collected by centrifugation (1,000 × g, 10 min, 4°C), washed twice with PBS, and centrifuged again. The final pellet was resuspended in 1 ml of PBS. Bronchoalveolar lavage samples were prepared as described above. Detection of a fluorescent signal by flow cytometry was always confirmed by epifluorescence microscopy.

Epifluorescence microscopy. GFP production was examined in bacterial suspensions, macrophage cultures, or tissues by epifluorescence microscopy with a Zeiss Axiophot plan2 microscope equipped with a modular filter cube with band-pass excitation filter BP450-490 and barrier emission filter BA515-IF. Photographs were taken with a MOT DX 35 camera with Provia Fujichrome 1600 films.

RESULTS

Expression of the *gfp* gene in LAB. To attempt *gfp* expression in LAB, we chose to clone a variant of the GFP cDNA from *A. victoria* (i.e., GFPuv) into the vectors pGIT032 and pTG2247, which carry constitutive expression cassettes (Table 1). pGIT032 contains strong expression signals derived from the *L. plantarum* *ldhL* gene and is a shuttle vector based on a *Lactobacillus hilgardii* origin of replication (limited host range). pTG2247 is based on the broad-host-range *L. lactis* pSH71 replicon and carries a mosaic expression cassette including the P25 promoter from *S. thermophilus* followed by the *ldhD* RBS from *Lactobacillus pentosus*.

The GFPuv variant was amplified by PCR from pBAD-GFPuv (Table 1) and cloned under the control of the *ldhL* expression signals into pGIT032 or of the P25 expression cassette into pTG2247, giving rise to pMEC30 and pMEC17,

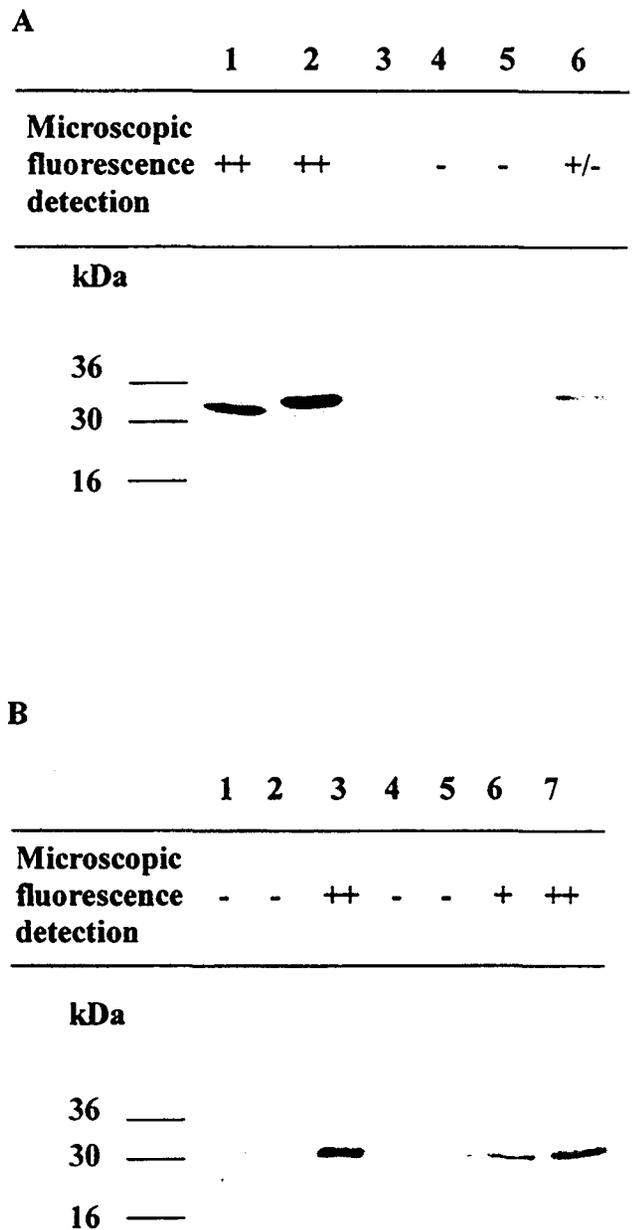


FIG. 2. Immunoblotting of whole-cell extracts of recombinant LAB strains carrying *gfp* under the control of constitutive promoters (A) and the inducible *nisA* promoter (B). (A) Lane 1, *E. coli* MC1061/pMEC17; lane 2, *E. coli* MC1061/pMEC30; lane 3, molecular mass markers; lane 4, *L. lactis* NZ9800/pMEC17; lane 5, *L. plantarum* NCIMB8826/pMEC17; lane 6, *L. plantarum* NCIMB8826/pMEC30. (B) Lane 1, *L. lactis* NZ9800/pMEC17; lanes 2 and 3, *L. lactis* NZ9800/pMEC45, noninduced and induced with 5 ng of nisin per ml, respectively; lane 4, *L. plantarum* NCIMB8826 Int-1/pMEC45, noninduced; lanes 5, 6, and 7, *L. plantarum* NCIMB8826 Int-1/pMEC45 induced with 2.5, 10, or 25 ng of nisin per ml, respectively. Microscopic observations (epifluorescence) of each sample used before Western blotting are shown at the top (-, no fluorescence; +/-, transient fluorescence; ++, bright fluorescence).

respectively. The resulting plasmids were introduced into *E. coli*, and all individual colonies of the recombinant *E. coli* MC1061/pMEC30 and MC1061/pMEC17 were found to be fluorescent upon UV illumination. However, when pMEC17 was transferred by electroporation into *L. lactis* or *L. plantarum*, no fluorescence was detected upon UV illumination or by

TABLE 2. Enumeration of *L. plantarum* GFP⁺ bacteria by flow cytometry or plate counts

Type of count	Bacterial count of <i>L. plantarum</i> GFP ⁺ bacteria at dilution ^c :			
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Plate count (CFU/ml)	1.1 × 10 ⁶	1.3 × 10 ⁵	1.6 × 10 ⁴	1.0 × 10 ³
FACS count (no. of events/ml) ^a	1.6 × 10 ⁶	2.0 × 10 ⁵	1.6 × 10 ⁴	1.2 × 10 ³
FACS count in a mixed population (no. of events/ml) ^b	1.9 × 10 ⁶	1.8 × 10 ⁵	1.8 × 10 ⁴	1.7 × 10 ³

^a One hundred microliters of *L. plantarum* GFP⁺ bacteria was resuspended in 900 μl of PBS, and serial dilutions were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS).

^b One hundred microliters of *L. plantarum* GFP⁺ and 100 μl of *L. plantarum* GFP⁻ bacteria were added to 800 μl of PBS. Serial dilutions of this mixed population were analyzed by fluorescence-activated cell sorting.

^c The numbers in the table represent the mean values of three independent experiments.

epifluorescence microscopy (Fig. 2). Surprisingly, even though the *ldhL* promoter had been used previously to successfully drive high expression of foreign genes in *L. plantarum* (see reference 28), individual colonies of NCIMB8826/pMEC30 were found to exhibit fluorescence only transiently. To check the integrity of the plasmid constructs carried by the transformants, pMEC30 and pMEC17 were extracted from *L. lactis* and *L. plantarum* and reelectroporated into *E. coli*. All transformants were fluorescent upon UV illumination, and DNA analysis showed no sign of structural instability (data not shown). As the lack of a fluorescent phenotype in the pMEC30- or pMEC17-containing *L. lactis* or *L. plantarum* transformants could be linked to a low GFP synthesis, we decided to use a controlled gene expression system allowing induction of the synthesis of foreign proteins in a dose-dependent manner and the attainment of high production levels upon full induction. The nisin-inducible system, originally developed with *L. lactis* (9, 25), is based on signal transduction by the two-component regulatory system consisting of the response-regulator protein NisR and the sensor NisK, found in the nisin gene cluster of *L. lactis* (14, 24). To implement the nisin system in *L. plantarum* NCIMB8826, it was necessary to integrate *nisRK* into the chromosome of this host, generating the NCIMB8826 Int-1 strain (S. Pavan et al., unpublished data). The latter was electroporated with a plasmid containing a reporter gene (*gusA*) under the control of the *nisA* promoter (pNZ8032 [9]) in order to verify that addition of nisin to the culture medium activates transcription of the β-glucuronidase gene, which was found to be the case. The GFP-encoding sequence amplified by PCR was then cloned under the control of the *nisA* promoter into pNZ8037mod (Table 1), giving rise to pMEC45 (Fig. 1C). This plasmid was electroporated into *L. plantarum* NCIMB8826 Int-1 and into *L. lactis* NZ9800. Chloramphenicol-resistant transformants were obtained in both cases, and upon full induction by nisin, all colonies or individual cells of *L. plantarum* and *L. lactis* exhibited fluorescence as observed by UV illumination or epifluorescence microscopy (Fig. 2). As no fluorescence was detected in the absence of nisin, noninduced bacterial cells were used as negative controls in further experiments.

The GFP production levels were examined in all recombinant *L. plantarum* and *L. lactis* strains, as well as in *E. coli* carrying pMEC17 or pMEC30. Total cell extracts were prepared, and equal amounts of protein were analyzed by Western blotting with polyclonal anti-GFP serum. As illustrated in Fig. 2A, GFP was present at low levels in extracts prepared from *L. lactis* NZ9800/pMEC17, *L. plantarum* NCIMB8826/pMEC17, and *L. plantarum* NCIMB8826/pMEC30. The LDH-GFP hybrid protein produced by the latter strain was of the expected size and did not seem to be degraded in the cell extracts. A strong signal was observed in the two recombinant *E. coli* strains and in fully nisin-induced *L. plantarum* NCIMB8826 Int-1/pMEC45 (Fig. 2B, lane 7) and *L. lactis* NZ9800/pMEC45

(Fig. 2B, lane 3). As these results pointed to a correlation between the fluorescent phenotype and the amount of GFP synthesized by the recombinant strains, we performed a dose-dependent nisin induction experiment. Exponentially growing cultures of *L. plantarum* NCIMB8826 Int-1/pMEC45 were induced with 0, 2.5, 10, or 25 ng of nisin per ml, which led to increasing levels of GFP (Fig. 2B, lanes 4 to 7). Bright fluorescence was observed only in the case of fully induced cells (Fig. 2B). Further experiments were thus performed under these conditions.

Detection and enumeration of GFP⁺ lactobacilli by flow cytometry. In addition to microscopic observations of GFPuv expression by epifluorescence, we verified if *L. plantarum* cells producing GFPuv could be enumerated and sorted by flow cytometry. For this purpose, exponentially growing *L. plantarum* GFP⁺ or GFP⁻ (i.e., nisin-induced or noninduced culture of NCIMB8826 Int-1/pMEC45) bacteria were monitored by cell sorting based on fluorescence intensity. As expected, fluorescent lactobacilli can easily be discriminated from their nonfluorescent counterparts by this technique (data not shown). The same suspensions were analyzed by classical counts on agar plates. As shown in Table 2, the bacterial counts determined by both techniques were in excellent agreement. It was also verified that GFPuv-producing *L. plantarum* cells can be enumerated in a mixed population containing both fluorescent and nonfluorescent bacteria (Table 2).

Uptake of *L. plantarum* GFP⁺ bacteria by macrophages: microscopic and flow cytometric analysis. To examine whether the GFP marker could be used to visualize the interaction of fluorescent lactobacilli with specific immune cells, the murine macrophage cell line J774 was incubated in the presence of *L. plantarum* GFP⁺ bacteria at 37°C and observed by epifluorescence microscopy 4 h postincubation. The acidic compartments of the macrophage were stained with a red acidotropic probe (LysoTracker Red). The internalized lactobacilli appeared as bright yellow bacteria in contrast with the green fluorescent ones, which adhered to the surface of the macrophages or remained free in the culture medium. As shown in Fig. 3A, the NCIMB8826 strain was actively phagocytosed by the macrophages. As a control, the same experiment was conducted at 4°C, a temperature preventing activation of the macrophages. In this case, no bacteria were detected inside the macrophages (data not shown).

We further investigated whether macrophages that contain *L. plantarum* GFP⁺ bacteria could be separated by flow cytometry from macrophages containing nonfluorescent lactobacilli or *Lactobacillus*-free macrophages. J774 cultures were therefore incubated for 4 h at a cell-to-bacterium ratio of 1:1 to 5 with either *L. plantarum* GFP⁺ or *L. plantarum* GFP⁻ bacteria and then processed for flow cytometry analysis. As shown in Fig. 4, the macrophages that had taken up fluorescent lactobacilli were easily distinguished from free macrophages or

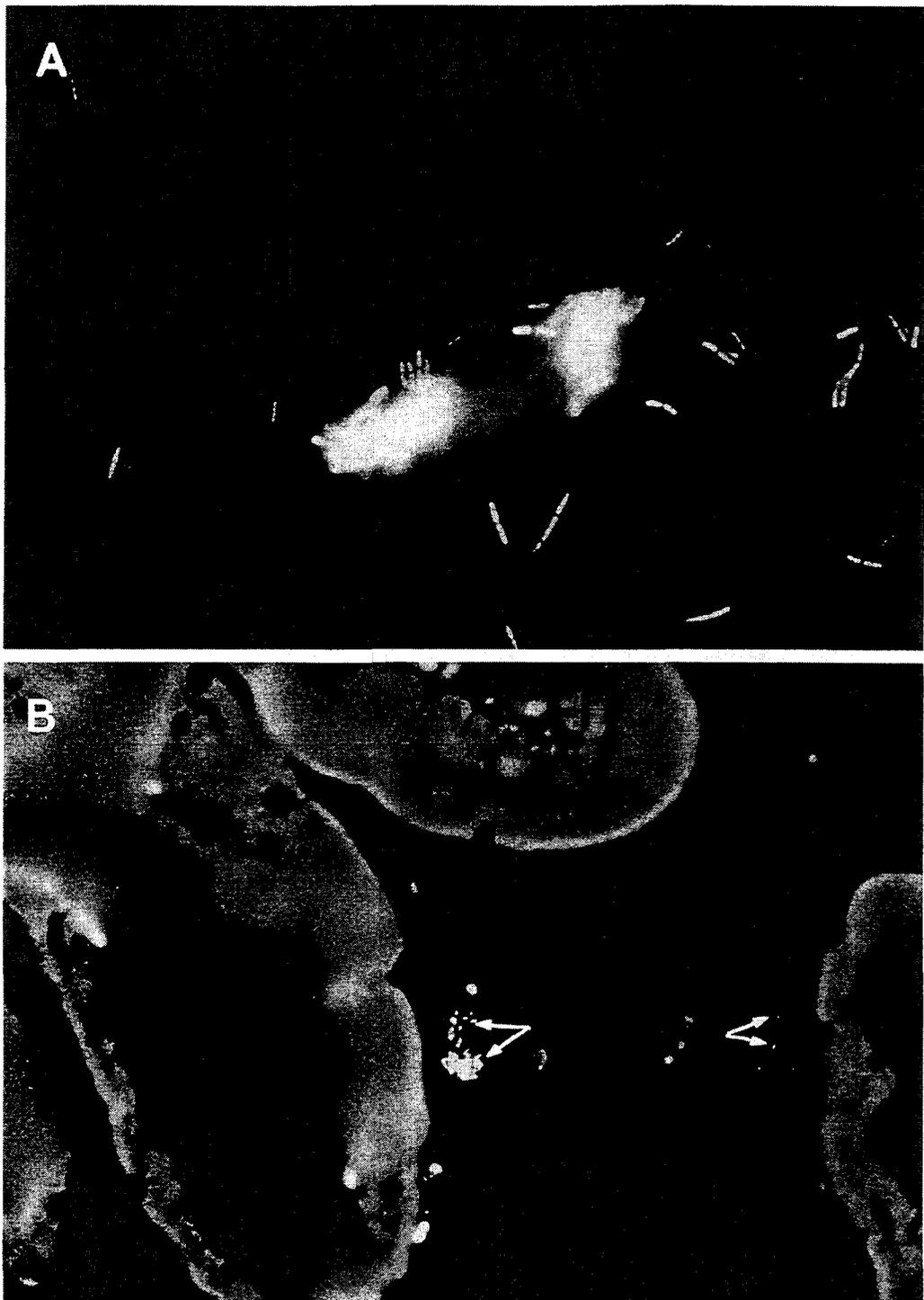


FIG. 3. (A) J774 macrophages after 4 h of incubation with *L. plantarum* GFP⁺ bacteria (nisin-induced cells of *L. plantarum* NCIMB8826 Int-1/pMEC45). Magnification, $\times 1,000$. (B) Thin sections of intestine segments from mice fed *L. plantarum* GFP⁺ bacteria, showing fluorescent cells (indicated by arrows) embedded in the mucus. Magnification, $\times 400$.

from macrophages containing *L. plantarum* GFP⁻ bacteria. This result was confirmed by observations with epifluorescence microscopy.

GFP as an in vivo and ex vivo marker for *L. plantarum*. To test whether GFP can be used to monitor the fate of lactobacilli in vivo, BALB/c mice were fed with one dose of 10^9 CFU of fluorescent *L. plantarum*. Intestinal specimens consisting of

Peyer's patches and flanking segments were removed and examined by fluorescence microscopy upon sacrifice of the mice. Fluorescent lactobacilli could readily be detected in the intestinal lumen, mostly embedded in the mucus, while some bacteria were found associated with the epithelial cell surface (Fig. 3B). No bacteria were detected inside Peyer's patches, probably due to the high dilution of the bacterial sample in vivo.

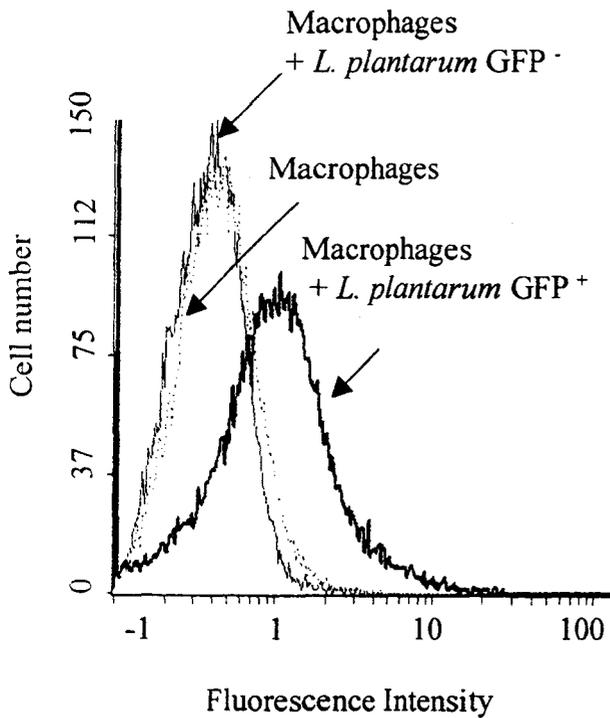


FIG. 4. Flow cytometric analysis of GFP⁺ and GFP⁻ *L. plantarum* strains phagocytosed by J774 macrophage cell lines. Fluorescence data were gated by forward-angle light scatter. Fluorescence intensities are presented on the x axis, and cell counts are presented on the y axis. The cytometric analysis was performed on 2×10^4 events.

Moreover, mice were given *L. plantarum* GFP⁺ or GFP⁻ bacteria intranasally, and after 4 h animals were killed to obtain bronchoalveolar lavage samples that were analyzed by epifluorescence microscopy and flow cytometry. Consistent with the results obtained with J774 cultured cells, *L. plantarum* NCIMB8826 was found to be ingested by the bronchoalveolar macrophages. The proportion of macrophages having phago-

cytosed lactobacilli was estimated by flow cytometry to reach 10% of the total bronchoalveolar macrophage population (Fig. 5).

DISCUSSION

The advantages of using GFP compared to other reporter proteins are now well established, especially for in vivo studies. The GFP expression plasmids constructed in this study were tested in LAB strains belonging to the species *L. lactis* and *L. plantarum*, which are presently under development as live biotherapeutic agents (7, 28, 38). Although the production of GFP could be detected by Western blotting in all recombinant strains, only those synthesizing the highest level of GFP (Fig. 2) exhibited strong and consistent fluorescence. This phenotype thus seemed essentially correlated with the amount of GFP produced. Very strong fluorescence was observed for *E. coli* strains transformed with the plasmids carrying *gfp* under the control of constitutive promoters. In contrast, when pMEC17 or pMEC30 was introduced into *L. lactis* or *L. plantarum*, no fluorescence was observed and the amount of GFP produced in the recombinant LAB was much lower than that in their *E. coli* counterparts. In *L. plantarum*, pMEC30 leads to a hybrid protein of the expected size between GFP and the first 25 amino acids of the L-LDH which was produced at a much lower level than expected from previous work (see reference 28). Notably, this strain fluoresced only transiently, even though we observed no toxicity of GFP for the bacterial hosts and no protein degradation in cell extracts or structural instability of the plasmid. Not surprisingly, when the corresponding *gfp* expression cassette was integrated as a single copy in the chromosome of *L. plantarum* NCIMB8826, no fluorescence was observed (data not shown).

To increase the production level of the reporter protein, we next decided to use the lactococcal nisin-controlled expression system (9, 25). Plasmid pMEC45, carrying the *gfp* gene under the control of the *nisA* promoter, was introduced into the appropriate recipient strains, i.e., *L. lactis* NZ9800 and *L. plantarum* NCIMB8826 Int-1. Upon full induction by nisin, the corresponding transformants produced high amounts of GFP

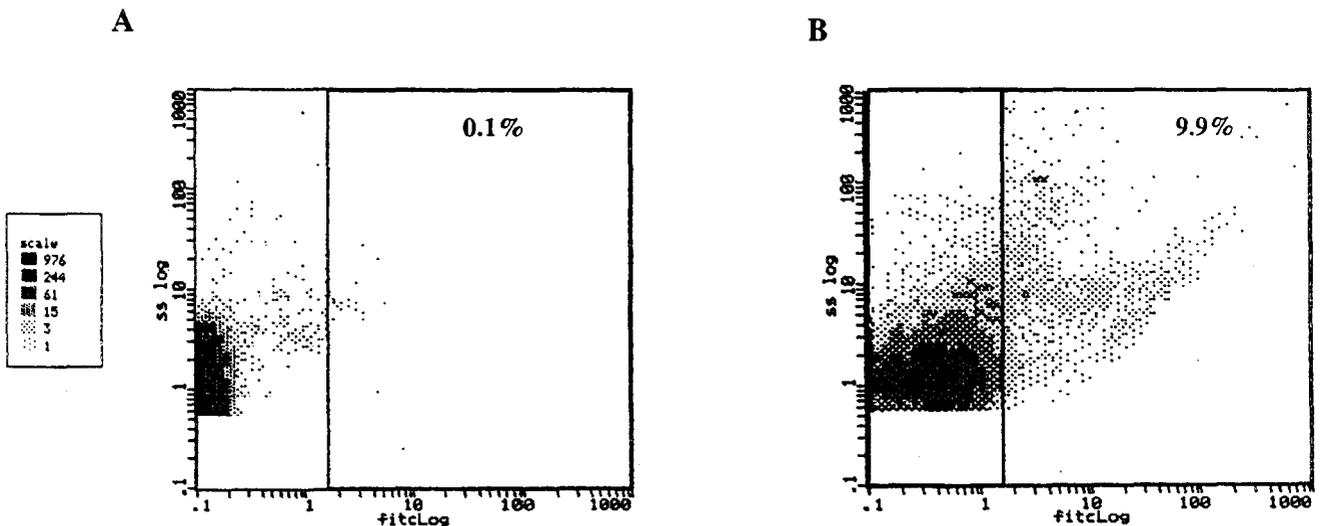


FIG. 5. Flow cytometric analysis of macrophages of bronchoalveolar lavage samples of mice after nasal administration of GFP⁺ or GFP⁻ *L. plantarum* strains. The results are shown as the relative amounts of macrophages having taken up nonfluorescent (A) or fluorescent (B) lactobacilli against the log₁₀ unit of fluorescence. The percentages indicate the proportions of fluorescent cells. The cytometric analysis was performed on 1.5×10^4 events. fitc, fluorescein isothiocyanate.

as evaluated by Western blotting. Consistently, they exhibited a strong fluorescence detectable both by UV illumination and by epifluorescence microscopy as long as the bacteria did not lyse. The hypothesis that a threshold amount of GFP is necessary to obtain bright fluorescence is supported by the following experiment. Nisin was added at increasing concentrations to exponentially growing cells of NCIMB8826 Int-1/pMEC45, leading to the progressive induction of GFP synthesis as shown by immunoblotting. An intense fluorescent signal was obtained only for bacterial cells induced with the highest amount of nisin. Different authors have mentioned the necessity of individually evaluating and adapting the *gfp* expression conditions for different bacterial systems (see, for example, references 3 and 35). The pMEC45 expression vector that we describe in this paper may be considered a transferable *gfp* expression system that should function in at least all lactic acid bacterial strains for which the nisin system has successfully been used (22). We indeed demonstrated that it was working equally well in *L. lactis* and in *L. plantarum*. As our laboratory is mostly interested in health applications of LAB, the major aim of the present study was to assess the validity of GFP as a marker to visualize the interaction of these microorganisms with specific immune cells and to monitor their fate in vivo. We have demonstrated that GFP constitutes an adequate reporter for both applications, focusing on our main model strain *L. plantarum* NCIMB8826. Nisin-induced NCIMB8826 Int-1/pMEC45 bacteria could easily be enumerated and discriminated from their nonfluorescent counterparts by flow cytometry, thus opening the way to quantitative detection of these bacteria in complex microbial communities. By use of an acidic probe to stain macrophage lysosomes, phagocytosis of lactobacilli by these cells could clearly be shown. Macrophages that had taken up GFP⁺ lactobacilli could also be analyzed and counted by flow cytometry. This was performed in vitro or on macrophages collected from bronchoalveolar lavage fluids of mice that had received fluorescent lactobacilli intranasally. The observation that *L. plantarum* cells are actively taken up by antigen-presenting cells is in complete agreement with the fact that recombinant lactobacilli can be used as live vaccine vehicles by the nasal route (28). Moreover, direct observation by epifluorescence microscopy allowed us to trace bacteria in intestinal sections of mice fed with nisin-induced NCIMB8826 Int-1/pMEC45. Fluorescent lactobacilli were found mostly embedded in intestinal mucus or free in the lumen, even though some bacteria seemed to be closely associated with epithelial cells. We further plan to analyze the interaction of *L. plantarum* with Peyer's patches by using a ligated-intestinal-loop system to avoid in vivo dilution of the sample. Preliminary studies have shown that analysis of bacterial translocation in mouse models (D. Dombrowicz, P. Desreumaux, C. Neut, F. Bouzahzah, J. P. Papin, J. F. Colombel, and M. Capron, Abstr. Keystone Symposia on Experimental Models of Immune Dysregulation and Mucosal Inflammation, abstr. 206, p. 53, 1999) is also greatly facilitated by using fluorescent bacteria, as they allow workers to easily distinguish the strain under study from the endogenous lactobacilli (data not shown).

The system that we describe relies on the in vitro induction of GFP synthesis, which alleviates potential problems of oxygen limitation that could interfere with the development of fluorescence (33). As photobleaching of GFP is very slow (36), the preloaded fluorescent bacteria can further be used for a variety of in vitro and in vivo experiments including their visualization in the gastrointestinal tract.

In summary, we have shown that GFP can be used as a useful marker in LAB to monitor their fate when administered to animals or to analyze their interactions with different cell

types, both aspects being critical in the case of vaccine and probiotic applications of these bacteria. GFP⁺ strains will moreover facilitate the study of their survival in the environment and could be used as a tool in monitoring the risk of DNA transfer among the intestinal microflora.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the EU BIO4-CT96-0542 grant and FEDER funds.

We are grateful to C. Granette for her skillful help with animal experiments. The pBluescript modified vector was kindly supplied by P. Chagnaud. We thank P. Hols and C. Loch for critical reading of the manuscript and A. Veithen for helpful suggestions.

REFERENCES

- Achen, M. G., B. E. Davidson, and A. J. Hillier. 1986. Construction of plasmid vectors for the detection of streptococcal promoters. *Gene* 45:45-49.
- Adams, M. R., and P. Marteau. 1995. On the safety of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 27:263-264.
- Bloemberg, G. V., G. A. O'Toole, B. J. J. Lugtenberg, and R. Kolter. 1997. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4543-4551.
- Casadaban, M. J., and S. Cohen. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion cloning in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 138:179-207.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, and D. C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.
- Corthier, G., C. Delorme, S. D. Erhlich, and P. Renault. 1998. Use of luciferase genes as biosensors to study bacterial physiology in the digestive tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2721-2722.
- Corthier, G., and P. Renault. 1998. Future directions for research on biotherapeutic agents: contribution of genetic approaches on lactic acid bacteria, p. 269-304. In G. W. Elmer (ed.), *Biotherapeutic agents and infectious diseases*. Humana Press, Totowa, N.J.
- Crameri, A., E. A. Whitheorn, E. Tate, and W. P. C. Stemmer. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 14:315-319.
- de Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, and W. M. de Vos. 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3662-3667.
- de Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers, M. M. Beerthuyzen, I. Alen-Boerrigter, and W. M. de Vos. 1996. Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 178:3434-3439.
- de Vos, W. M. 1987. Gene cloning and expression in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:281-295.
- Dhandayathapani, S., L. E. Via, C. A. Thomas, P. M. Horowitz, D. Deretic, and V. Deretic. 1995. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of mycobacterial interactions with macrophages. *Mol. Microbiol.* 17:901-912.
- Eaton, T. J., C. A. Shearman, and M. J. Gasson. 1993. The use of bacterial luciferase genes as reporter genes in *Lactococcus*: regulation of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* lactose genes. *J. Gen. Microbiol.* 139:1495-1501.
- Engelke, G., Z. Gutowski-Eckel, P. Kiesau, K. Siegers, M. Hammelmann, and K. D. Entian. 1994. Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:814-825.
- Ferain, T., D. Garmyn, N. Bernard, P. Hols, and J. Delcour. 1994. *Lactococcus plantarum* *ldhL* gene: overexpression and deletion. *J. Bacteriol.* 176:596-601.
- Heim, R., A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien. 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373:663-664.
- Heim, R., D. C. Prasher, and R. Y. Tsien. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12501-12504.
- Hols, P., A. Baulard, D. Garmyn, B. Delplace, S. Hogan, and J. Delcour. 1992. Isolation and characterization of genetic expression and secretion signals from *Enterococcus faecalis* through the use of broad-host-range α -amylase probe vectors. *Gene* 118:21-30.
- Hols, P., P. Slos, P. Dutot, J. Reymund, P. Chabot, B. Delplace, J. Delcour, and A. Mercenier. 1997. Efficient secretion of the model antigen M6-gp41E in *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826. *Microbiology* 143:2733-2741.
- Israelsen, H., S. M. Madsen, A. Vrang, E. B. Hansen, and E. Johansen. 1995. Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-*lacZ* integrants with the new promoter probe vector, pAK80. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2540-2547.
- Josson, K., T. Scheirlinck, F. Michiels, C. Plateeuw, P. Stanssens, H. Joos, P. Dhasee, M. Zabeau, and J. Mahillon. 1989. Characterization of a gram-positive broad-host-range plasmid isolated from *Lactobacillus hilgardii*. *Plasmid* 21:9-20.
- Kleerebezem, M., M. M. Beerthuyzen, E. E. Vaughan, W. M. de Vos, and O. P. Kuipers. 1997. Controlled gene expression systems for lactic acid

- bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4581–4584.
23. Kremer, L., A. Baulard, J. Estaquier, O. Poulain-Godefroy, and C. Loch. 1995. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **17**:913–922.
 24. Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. de Ruyter, E. J. Wesink, and W. M. de Vos. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* **270**:27299–27304.
 25. Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos. 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* **15**:135–140.
 26. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
 27. Marteau, P., and J. C. Rambaud. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:207–222.
 28. Mercenier, A. 1999. Lactic acid bacteria as live vaccines, p. 113–127. In G. M. Tannock (ed.), *Probiotics: a critical review*. Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, United Kingdom.
 29. Mercenier, A., P. Dutot, P. Kleinpeter, M. Aguirre, P. Paris, J. Reymund, and P. Slos. 1996. Development of lactic acid bacteria as live vectors for oral or local vaccines. *Adv. Food Sci.* **18**:73–77.
 30. Platteuw, C., G. Simons, and W. M. de Vos. 1994. Use of the *Escherichia coli* β -glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:587–593.
 31. Poquet, I., S. D. Ehrlich, and A. Gruss. 1998. An export-specific reporter designed for gram positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **180**:1904–1912.
 32. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 33. Scott, K. P., D. K. Mercer, L. A. Glover, and H. J. Flint. 1998. The green fluorescent protein as a visible marker for lactic acid bacteria in complex ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**:219–230.
 34. Solaiman, D. K. Y., and G. A. Somkuti. 1997. Construction of a green-fluorescent protein-based, insertion-inactivation shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **19**:1175–1179.
 35. Stretton, S., S. Techkarnjanaruk, A. M. McLennan, and A. E. Goodman. 1998. Use of green fluorescent protein to tag and investigate gene expression in marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2554–2559.
 36. Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:509–544.
 37. Wells, J. M., P. W. Wilson, and R. W. F. Le Page. 1993. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* **154**:1–9.
 38. Wells, J. M., P. W. Wilson, P. M. Norton, M. J. Gasson, and R. W. F. Le Page. 1993. *Lactococcus lactis*: a high level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol. Microbiol.* **8**:1155–1162.

LES RÉCEPTEURS DES TOXINES KILLER DE LEVURE

C. GUYARD¹, E. DEHECQ², W. MAGLIANI³, L. POLONELLI³ ET J.C. CAILLIEZ^{1, 2}

RÉSUMÉ

Cette revue est la seconde partie d'un travail de synthèse décrivant les structures moléculaires et les propriétés physico-chimiques des toxines killer de levure [Guyard *et al.*, *Journal de Mycologie Médicale* 2000 ;10 : 9-20]. Elle relate nos connaissances actuelles sur la nature biochimique des récepteurs de ces toxines à la surface des souches sensibles de levure. Qu'il s'agisse de toxines codées par des gènes nucléaires ou extra-chromosomiques, les données rapportées dans ce travail apportent des précisions sur les mécanismes d'action qui peuvent

entraîner la mort de la cellule cible après fixation spécifique de la toxine fongique. Les mécanismes d'action à l'origine de l'effet killer sont plutôt variés. Ils se présentent sous la forme de modifications de la perméabilité ionique membranaire, d'inhibition de la synthèse d'ADN, d'activité chitinase et entraînant un arrêt du cycle cellulaire, ou d'inhibition de la synthèse de composants pariétaux comme les β -glucanes. Ils sont spécifiques de chaque système killer et indépendants de l'espèce fongique qui synthétise et sécrète la toxine fongique.

SUMMARY : The receptors of yeast killer toxins

This review is the second part of a previous work on the molecular structures and physiological features of yeast killer toxins [Guyard *et al.*, *Journal de Mycologie Médicale* 2000 ;10:9-20]. Our knowledge concerning the biochemical nature of yeast killer toxin receptors at the surface of sensitive yeast strains is summarized. This review underlines the antifungal processes of yeast killer toxins encoded by nuclear genes or extra-chromosomal genomes after fixation on specific yeast killer

toxin receptors. Different mechanisms can explain the yeast killer phenomenon such as modification of the plasma membrane permeability, inhibition of the DNA synthesis, chitinase activity and arrest of the life cell cycle, or inhibition of the β -glucan components synthesis into the yeast cell wall. These mechanisms are specific for each killer toxin and not related to the species of the yeast killer strain.

INTRODUCTION

Les toxines killer de levure sont des protéines ou glycoprotéines sécrétées qui exercent une activité antifongique contre des souches sensibles de levure par l'intermédiaire de différents mécanismes moléculaires. Ce que l'on nomme le *phénomène killer* commence par une étape de fixation, plus ou moins spécifique, de la toxine à la surface de la cellule cible. Ce sont généralement des structures polysaccharidiques pariétales, liées ou non à des protéines, qui représentent les premiers récepteurs de la toxine, avant qu'une ou plusieurs sous-unités de celle-ci ne traverse la membrane plasmique vers le cytoplasme de la cellule cible. D'autres récepteurs plus spécifiques, membranaires, cytoplasmiques et/ou nucléaires, peuvent ensuite être mobilisés pour que l'effet anti-fongique se propage chez la cellule cible. Dans les systèmes killer où la structure moléculaire des récepteurs des toxines n'a pas encore été déterminée, des réactions d'immunodétection ont tout de même permis de localiser dans la paroi

des cellules cibles les sites de fixation des molécules anti-fongiques. Dans certains cas, les effets des toxines killer peuvent être comparés à ceux des colicines bactériennes. Les toxines peuvent induire des dommages structuraux et fonctionnels de la membrane plasmique des cellules cibles en provoquant, par exemple, des fuites d'ions (surtout potassium) par formation de canaux trans-membranaires, une inhibition du transport actif de métabolites comme les acides aminés ou une acidification du pH intra-cellulaire. Dans cette revue, nous avons classé les activités killer en fonction de leurs effets physiologiques chez les levures sensibles, puis selon la nature biochimique de leurs récepteurs, quand ils ont été caractérisés.

MODIFICATION DE LA PERMÉABILITÉ IONIQUE MEMBRANAIRE

Récepteurs de nature β -glucanes

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES NUCLÉAIRES

Le mécanisme d'action de la toxine K-500 de *Williopsis mrakii* reste relativement peu connu. On constate une activité anti-*Candida albicans* très développée, plutôt à l'encontre des cellules en phase stationnaire par rapport à celles en phase exponentielle de croissance, ce qui est quand même assez différent des observations faites avec les toxines de *Pichia anomala* ATCC 96603 et *W. mrakii* MUCL 41968. On pense que

¹ Département de Microbiologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, France.

² Laboratoire Environnement & Santé, Faculté Libre des Sciences et Faculté Libre de Médecine, Université Catholique de Lille, France.

³ Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Parma, Italia.

Reçu le : 7 décembre 2000 ; acceptation définitive le : 16 mars 2001.

Tirés à part : J.-C. Cailliez, Département de Microbiologie des Ecosystèmes, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille, France.

Tél : +33 3 20 87 71 57. Fax : +33 3 20 87 79 08.

E-mail : jean-charles.cailliez@pasteur-lille.fr

la toxine K-500 agit plutôt à la manière de celle de *P. kluyveri* ou de la toxine K1 de *Saccharomyces cerevisiae*, c'est à dire en induisant la formation de canaux membranaires favorisant ainsi la fuite d'ions et conduisant à la lyse de la cellule cible (26). Les effets dose-réponse observés lors des études cinétiques suggèrent l'existence de récepteurs spécifiques à la surface des levures sensibles. Ces récepteurs pourraient être de nature β -glucanes.

Récepteurs de nature β -1,6-glucanes

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES EXTRA-CHROMOSOMIQUES

Les toxines K1 et K2 de *S. cerevisiae* ont des activités killer semblables, notamment dans la reconnaissance de récepteurs pariétaux β -1,6-glucanes. La toxine K1 de *S. cerevisiae* est sans doute celle dont les mécanismes d'action ont été les plus étudiés et la nature biochimique des récepteurs la mieux caractérisée. Son activité antifongique s'exerce en deux temps. La toxine mature, dimérique, se fixe d'abord sur des récepteurs β -1,6-glucanes dans la paroi des levures cibles. Cette étape d'adsorption qui fait intervenir la sous-unité α de 10,5 kDa, mais surtout dans un premier temps la sous-unité β de 11 kDa, est fortement dépendante du pH (fixation optimale à pH 4.6) et ne prend que quelques minutes (32). L'expression des récepteurs reconnus par la toxine fait intervenir les gènes *KRE* (*killer resistance*) dont la majorité codent des enzymes responsables de la biosynthèse et l'assemblage des β -glucanes pariétaux (4). Comme dans le cas, d'autres systèmes killer, la toxine K1 est aussi capable de se fixer à la surface de cellules qui lui seront résistantes. La présence de récepteurs polysaccharidiques à une toxine fongique n'est donc pas toujours suffisante pour entraîner l'effet killer. La seconde phase de l'activité killer de la toxine K1 consiste à déréguler le flux ionique à travers la membrane plasmique, ce qui conduit à la mort cellulaire (6, 15).

Le fait que des mutants *kre* puissent exprimer une résistance efficace à la toxine K1 alors que leurs sphéroplastes restent sensibles est un argument en faveur de la localisation pariétale des récepteurs polysaccharidiques de la toxine K1 (8). L'altération des sites de fixation de la toxine par oxydation au périodate, contrairement à ce que l'on observe après traitement à la pronase, confirme la nature polysaccharidique des récepteurs. Cependant les choses ne sont pas aussi simples. En effet, des sphéroplastes de souches mutantes *kre3* et *kre12* de *S. cerevisiae* résistantes à la toxine K1, sont également résistants à l'activité killer (2, 53). Il existerait donc un second système de récepteurs, membranaires, qui soit accessible à la toxine une fois que celle-ci a été reconnue par les β -glucanes de la paroi fongique. Des expériences de purifications protéiques à partir de membranes plasmiques de souches mutantes *kre12* et de souches isogéniques exprimant *KRE12* ont permis de caractériser 3 protéines, ou sous-unités protéiques, pouvant jouer un rôle dans les mécanismes de reconnaissance de la toxine K1 par la membrane plasmique de la cellule cible (53).

La toxine K1 agit sur les cellules sensibles en perturbant l'équilibre osmotique des ions potassium de part et d'autre de leur membrane plasmique (9). Elle active principalement les canaux potassium membranaires, en provoque même la syn-

thèse *de novo* (36), ce qui favorise la fuite ionique et la mort cellulaire (7, 15). D'autres ions et métabolites comme les molécules d'ATP peuvent aussi fuir le cytoplasme des cellules atteintes. On a observé récemment que des cellules mutantes pour le gène *TOK1*, responsable de la conformation des canaux potassium membranaires (canaux TOK1), acquièrent une résistance à l'activité antifongique de la toxine K1, de même que des cellules surexprimant le gène *TOK1* ont une sensibilité accrue à la toxine K1 (1). Les auteurs de ces travaux concluent que les canaux TOK1 sont des cibles moléculaires privilégiées de la toxine K1. L'activation de ces canaux est nécessaire et suffisante pour modifier le flux potassium et tuer les cellules cibles de la toxine.

Récepteurs de nature inconnue

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES EXTRA-CHROMOSOMIQUES

Les toxines KP1 et KP6 d'*Ustilago maydis* sont des protéines dimériques formées de sous-unités α et β liées de manière non covalente. Les deux sous-unités ainsi sécrétées par la souche killer interagissent indépendamment avec la surface de la cellule cible, mais de manière séquentielle, la sous-unité α induisant l'activité de la sous-unité β . Les récepteurs pariétaux de ces monomères n'ont pas encore été identifiés, bien que l'on pense qu'ils se localisent dans la paroi de la cellule cible. En effet, des shéroplastes de levures sensibles aux toxines KP1 ou KP6 deviennent résistants (55).

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES NUCLÉAIRES

Les toxines KHR (*killer of heat resistant*) et KHS (*killer of heat susceptible*) de *S. cerevisiae* sont des protéines monomériques de 20 et 75 kDa. La nature de leurs récepteurs est inconnue. La toxine KHS mature possède des domaines hydrophobes qui pourraient jouer un rôle dans les interactions avec la membrane plasmique de la cellule cible et la formation de canaux ionophores. Ces canaux sont semblables à ceux créés par les toxines K1 et K2 de *S. cerevisiae* (19). La toxine KHR, quant à elle, ne présente apparemment aucun domaine hydrophobe qui permette de lui attribuer un mode d'action proche de celui de la toxine K1 de *S. cerevisiae* (18).

La toxine de *P. kluyveri* est une glycoprotéine de 19 kDa qui interagit avec la double couche phospholipidique de la membrane plasmique de la cellule cible. Elle provoque en quelques minutes la formation de pores membranaires, comme dans le cas de la toxine K1 de *S. cerevisiae*, puis une diminution du pH intra-cellulaire et l'inhibition des mécanismes d'incorporation des acides aminés (39). La fuite des ions potassium et des molécules d'ATP du cytoplasme vers le milieu extra-cellulaire entraîne alors la mort cellulaire de la levure cible (27). L'effet killer sur des souches sensibles de *S. cerevisiae* est maximal en début de phase exponentielle de croissance, alors que les cellules en phase stationnaire sont totalement résistantes à la toxine (40).

La toxine dimérique halo-tolérante SMK1 (SMKT ou KK1) de *P. farinosa* présente des similarités structurales avec la toxine K1 de *S. cerevisiae*, surtout par son caractère hydrophobe qui

suppose l'existence d'un récepteur membranaire chez la cellule cible (56). Les auteurs de ces travaux pensent que les récepteurs pariétaux impliqués dans ce système killer sont des β -1-6-glucanes, observations faites à la suite d'expériences avec des mutants *kre* de *S. cerevisiae*. Très récemment, ils ont décrit des mutants *spf1* de *S. cerevisiae* qui sont résistants à la toxine SMK1 (57). Le gène *SPF1* code pour une ATPase transmembranaire, dont la présence n'est pas essentielle chez *S. cerevisiae*, mais qui joue un rôle évident dans la sensibilité de la levure cible à la toxine SMK1. Comme dans le cas de la toxine de *P. kluyveri*, ce sont les cellules de *S. cerevisiae* en phase de croissance, bourgeonnantes, qui s'avèrent être plus sensibles à l'effet killer que les cellules en phase stationnaire.

INHIBITION DE LA SYNTHÈSE D'ADN

Récepteurs de nature α -1,3-mannose

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES EXTRA-CHROMOSOMIQUES

La toxine K28 de *S. cerevisiae*, bien qu'ayant une structure moléculaire comparable à celles des toxines K1 et K2, se distingue de ces dernières par la nature de ses récepteurs et son mode d'action antifongique. Elle se fixe à la surface des levures cibles en reconnaissant des mannoprotéines pariétales. En effet, des anticorps anti-mannoprotéines sont capables de neutraliser les sites de fixation de la toxine à la surface de levures cibles, les rendant ainsi résistantes à son activité (51). De même, des mutants *mun* de *S. cerevisiae*, dont la composition en mannoprotéines est très incomplète, montre une certaine résistance à cette même toxine. On sait maintenant que la toxine K28 se fixe sur un récepteur α -1-3 mannosidique d'une glycoprotéine pariétale de 185 kDa, ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire, apparemment en phase G2 (48-52). La K28 a une activité qui s'exerce directement sur la synthèse d'ADN de la cellule cible (54). Lorsque cette synthèse est bloquée en phase S du cycle cellulaire, la viabilité de la cellule atteinte diminue progressivement. On peut observer alors des cellules présentant des bourgeonnements de taille moyenne et un noyau simple dans la blastoconidie mère contenant de l'ADN non encore répliqué. Les microtubules cytoplasmiques apparaissent normaux, bien qu'aucun fuseau de division ne soit détectable. Les cellules cibles peuvent être rendues expérimentalement résistantes à l'activité toxique de la K28 à condition de les bloquer par un facteur α au point de départ du cycle cellulaire. Cette résistance peut être maintenue plusieurs heures et reste réversible si on libère le facteur α des cellules cibles. D'autres expériences de sensibilité à la toxine K28 ont été réalisées en bloquant le développement des cellules entre la phase G2 et la mitose par des poisons métaboliques comme l'hydroxyurée qui bloque la duplication de l'ADN ou du méthylbenzimidazol-2-yl-carbamate qui empêche la séparation des chromosomes le long du fuseau de division. Les cellules ainsi traitées restent sensibles à l'activité killer de la K28. Cette activité nécessite donc apparemment une entrée de la cellule cible en phase de division cellulaire et de formation de bourgeons en bloquant la synthèse d'ADN et les mécanismes cellulaires du bourgeonnement. Très

récentement, il a été démontré que la toxine K28, une fois entrée dans le cytoplasme de la cellule cible par endocytose, remontait à contre-sens (transport rétrograde) le cycle de sécrétion de la levure afin de libérer son activité toxique (17). Des cellules mutantes défectives dans leur mécanismes de sécrétion cellulaire (ayant par exemple un recyclage défectueux des protéines de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique) sont résistantes à la toxine K28 alors que les souches sauvages correspondantes restent sensibles.

ACTIVITÉ CHITINASE ET ARRÊT DU CYCLE CELLULAIRE

Récepteurs de nature chitine

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES EXTRA-CHROMOSOMIQUES

La toxine de *Kluyveromyces lactis*, dont les sous-unités sont codées par les gènes des plasmides *pGKL1* et *pGKL2*, se fixe à la paroi des cellules cibles avant de traverser probablement la membrane plasmique de celle-ci par un mécanisme qui pourrait être assimilé à une translocation. L'effet toxique observé est un arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G1. Les levures touchées ne montrent pas de forme bourgeonnée et n'entrent plus en division mitotique (20, 62). Elles continuent à synthétiser leurs protéines et leurs ARN, tandis que leur volume cellulaire augmente fortement en absence de division (10). A la différence d'autres systèmes killer, le potentiel membranaire des cellules cibles ne subit ici aucune modification, ce qui élimine les mécanismes de perméabilisation membranaires décrits chez les toxines ionophores de *S. cerevisiae* ou d'*U. maydis*. Dans le cas de la toxine de *K. lactis*, il semble que seule la sous-unité γ de 27,5 kDa n'agisse dans le cytoplasme de la cellule cible pour interrompre le déroulement du cycle cellulaire en phase G1 (11). La nature du récepteur intracellulaire interagissant avec cette sous-unité toxique est encore inconnue. De son côté, la sous-unité toxique α de 99 kDa agirait comme une chitinase sur la paroi de la levure, ce qui permettrait de faciliter le passage et l'activité ultérieure de la particule γ (12). Celle-ci pénétrerait en effet plus facilement dans le cytoplasme après une dégradation partielle de la structure polysaccharidique pariétale. Le rôle de la sous-unité β de 30 kDa reste quant à lui encore inconnu, même si sa nature hydrophobe permet de penser qu'elle joue un rôle auxiliaire dans les mécanismes de translocation de la sous-unité à travers la membrane plasmique.

La chitine pariétale joue sans doute un rôle important comme récepteur pariétal de cette toxine. On observe en effet que des mutants de *S. cerevisiae* sans activité chitine-synthase III sont résistants à l'activité killer de *K. lactis* (5). Des études sur le gène *CAL1*, responsable de l'activité chitine synthase III, ont montré que des souches mutantes récessives *cal1* de *S. cerevisiae* arrêtent leur cycle cellulaire à 37°C sous forme bourgeonnée et deviennent résistantes à la toxine (58). La quantité faible de chitine retrouvée dans la paroi de ces levures mutantes ne les empêche pas de survivre, mais les rends résistantes à la toxine killer de *K. lactis*. D'autres gènes de *S. cerevisiae* sont soupçonnés d'intervenir dans les mécanismes de résistance et de

sensibilité à la toxine de *K. lactis*. C'est le cas par exemple du gène responsable de la synthèse d'ARNt-(Glu3) dont la surexpression confère une sensibilité réduite à la toxine (13).

La toxine de *P. acaciae* codée par les plasmides *pPac1-1* et *pPac1-2* a des propriétés structurales et fonctionnelles proches de celles de *K. lactis* (37). Elle est composée de trois sous-unités de 110, 39 et 38 kDa et a une activité chitinase. Cette activité, qui n'a pas encore été associée précisément à l'une des sous-unités, provoque ensuite sur les souches sensibles de *S. cerevisiae* un blocage du cycle cellulaire en phase G1. Il est intéressant de noter que les mécanismes d'action de cette toxine ne sont sans doute pas très éloignés de celle de *K. lactis*. En effet, parmi la dizaine d'allèles récessifs de *S. cerevisiae* qui induisent une résistance à la toxine de *K. lactis*, trois reproduisent les mêmes effets vis-à-vis de la toxine de *P. acaciae* (37).

UNE INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DES β -1,3-GLUCANES

Récepteurs de nature β -1,3-glucanes

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES NUCLÉAIRES

Les toxines sécrétées par les espèces de *Williopsis*, comme celles de *Pichia*, présentent la particularité de reconnaître des récepteurs polysaccharidiques en rapport avec la synthèse des β -1,3-glucanes et non pas celle des β -1,6-glucanes comme dans le cas des toxines de *S. cerevisiae*. Les β -1,3-glucanes qui constituent le composant majeur de la paroi cellulaire sont impliqués dans le maintien de la morphologie cellulaire et l'intégrité de la pression osmotique. Chez *W. mrakii* la toxine HM-1 (ou HMK) semble interférer avec la synthèse des β -1,3-glucanes ce qui rend la paroi des levures sensibles fragiles du point de vue de la pression osmotique et conduit à la lyse de la cellule cible (61). La toxine HM1 n'est pas active à l'encontre de protoplastes de levure appartenant à des souches sensibles, ni contre des cellules délétées de l'allèle KRE6, présentant alors des quantités très réduites de β -1,6-glucanes. Il est fortement suspecté que ces deux types de β -glucanes pariétaux jouent un rôle important en tant que récepteur de la toxine (28). Récemment, la mise en évidence de mutants *rhk* de *S. cerevisiae*, présentant un phénotype résistant à l'activité de la toxine HM-1, a permis de souligner le rôle de la N-glycosylation dans la sensibilité des levures à l'effet killer de *W. mrakii* (29). La suppression des gènes impliqués dans la synthèse de mannosyl-transférases (*RHK1/ALG3*) ou d'oligosaccharyl-transférases (*RHK2* ou *STT3*), intervenant dans les mécanismes de glycosylation des protéines fongiques, confère aux levures une sensibilité importante à la toxine HM-1. Des mannoprotéines pariétales, liées à la membrane plasmique de la levure cible, se retrouvent ainsi impliquées dans la reconnaissance de la toxine et le déroulement des effets cytotoxiques qui s'en suivent.

Le rôle des β -1,3-glucanes dans les premières phases de fixation de la toxine de *W. saturnus* var. *saturnus* sur la paroi d'une levure cible a aussi été suggéré. Des cellules de *S. bayanus* traitées par la toxine HYI présentent en microscopie électronique un éclatement de la paroi cellulaire dans la région

des jeunes bourgeons, ce qui conduit à une fuite de matériel cytoplasmique et à la mort de la cellule (31). L'effet killer de la toxine HYI est plus intense sur des cellules en phase exponentielle de croissance. La cible potentielle de la toxine HYI serait la voie de biosynthèse des β -1,3-glucanes et les mécanismes enzymatiques concentrés dans les régions bourgeonnantes des levures, ce qui rend les cellules plus sensibles à l'effet killer.

ACTIVITÉ KILLER ENCORE INCONNUE

Récepteurs de nature β -glucanes

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES NUCLÉAIRES

La toxine WC65 de *P. anomala* exerce une activité antifongique à l'encontre de souches de *C. albicans* ou de *P. bimundalis*, avec un mode d'action qui suggère l'existence de récepteurs spécifiques. En effet, les cinétiques d'activité antibiotique de la toxine sur les cellules cibles font apparaître une phase de saturation en présence de concentrations élevées de toxine WC65 (46). La présence de ces récepteurs dans la paroi de souches de *C. albicans* sensibles, comme sur la membrane de sphéroplastes traités par la toxine, est confirmée par des méthodes d'immunodétection en microscopie de fluorescence (47). Leur nature β -1,6-glucanes est, quant à elle, suspectée par l'observation de souches mutantes résistantes de *S. cerevisiae* qui présentent un déficit dans les mécanismes de synthèse de ces composants polysaccharidiques pariétaux (47). Dans ces expériences, il est intéressant de noter que des sphéroplastes de souches résistantes de *S. cerevisiae* peuvent devenir sensibles à l'activité killer de la toxine, ce qui suggère l'existence de mécanismes de reconnaissance plus complexes entre la molécule anti-fongique et ses récepteurs.

Récepteurs de nature β -1,6-glucanes

La toxine CYC 1106 de *P. membranifaciens*, dont on ignore encore si elle est codée par des gènes nucléaires ou extra-chromosomiques, a une activité anti-fongique favorisée par une concentration importante en NaCl, caractéristique qu'elle partage avec la toxine SMK1 de *P. farinosa* (33, 35). La toxine CYC 1106 se fixe en quelques minutes sur les β -1,6-glucanes pariétaux de cellules sensibles de *C. boidinii*, une levure contaminant fréquemment les saumûres d'olives et perturbant sérieusement leur fermentation (45). La résistance de la souche de *C. boidinii* à la toxine KI de *S. cerevisiae* qui reconnaît elle-même les β -1,6-glucanes pariétaux, indique que les mécanismes qui suivent la fixation de la toxine sur la paroi de la cellule cible sont différents entre ces deux systèmes killer.

La toxine killer de *Hanseniaspora uvarum* est une protéine de 18 kDa qui a une activité létale sur des souches sensibles de *S. cerevisiae*. Bien que la protéine sécrétée ne présente aucune chaîne polysaccharidique, des expériences d'inhibition utilisant la tunicamycine ont montré que la N-glycosylation des protéines chez la souche killer était nécessaire à la production d'une toxine protéique active (44). Les auteurs suggèrent que la fixation de cette protéine se fasse à la surface des cellules cibles par l'intermédiaire des β -1,6-glucanes pariétaux.

Récepteurs de nature inconnue

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES EXTRA-CHROMOSOMIQUES

Les mécanismes d'action et la nature biochimique des récepteurs de la toxine de *P. inositovora* codée par les gènes plasmidiques *pPin1-1* et *pPin1-3* restent inconnus. Les spectres d'activité de cette toxine de plus de 100 kDa sont assez larges et comprennent des souches de levures sensibles variées comme *S. cerevisiae*, *Cephalosporium albidus* ou *Citeromyces matritensis* (25).

TOXINES CODÉES PAR DES GÈNES NUCLÉAIRES

Bien que les toxines de *Pichia anomala* ATCC 96603 et *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 soient produites par des souches appartenant à des genres maintenant différenciés, elles ont des structures moléculaires et des spectres d'activité antimicrobienne très proches (22, 23). La nature biochimique des récepteurs de ces toxines n'a pas encore été caractérisée, mais de nombreuses expériences ont permis de les localiser à la surface de levures sensibles. Ces récepteurs se retrouvent par exemple en plus grandes quantités sur les bourgeons et les tubes germinatifs de souches sensibles de *C. albicans*, comparativement aux blastoconidies et aux cellules mères. Ces observations ont été faites à la suite de réactions en immunofluorescence avec des anticorps antiidiotypiques mimant l'activité de la toxine killer (43). La présence des récepteurs à la toxine de *P. anomala* a même été suggérée à la surface de souches sensibles de *Mycobacterium tuberculosis* (14). Pour cela, les auteurs ont utilisé successivement des anticorps antiidiotypiques killer polyclonaux, monoclonaux, puis recombinants. La localisation de ces récepteurs à la surface des bactéries n'a pas été entreprise, les expériences n'ayant été menées que sous la forme de tests de sensibilité aux molécules killer en utilisant l'anticorps neutralisant la toxine, le mAbKT4, comme contrôle de spécificité. Très récemment, des souches transformées de *Streptococcus gordonii*, exprimant un peptide (anticorps antiidiotypique) recombinant killer (sous la forme de *single-chain* : scFv-H6) mimant la toxine killer de *P. anomala*, ont permis de circonscrire *in vivo* le développement de candidoses muco-sal chez le rat (3) (tableau 1).

« AUTO-IMMUNITÉ » DES SOUCHES KILLER

Toxines codées par des gènes extra-chromosomiques

Les souches de *S. cerevisiae* produisant les toxines K1 ou K28 développent des mécanismes de résistance (« auto-immunité ») à leurs propres toxines assez semblables. Cette auto-protection est liée aux déterminants génétiques codant l'activité killer, plus particulièrement aux ARN double-brin M1 ou M28 (24, 34, 38, 59). Par des expériences de mutagenèse dirigée, il a ainsi été démontré que les domaines α et γ des précurseurs protéiques M1p ou M28p étaient impliqués dans l'établissement de l'auto-immunité chez la souche killer. La protoxine en cours de maturation pourraient interagir avec les

récepteurs membranaires et les rendre ainsi inaccessibles à la toxine mature avant la production en masse de celle-ci. Le fait que les sphéroplastes, comme les formes levures, des souches killer puissent fixer de grandes quantités de toxine, sans en subir l'effet toxique, suppose que les récepteurs membranaires de K1 ou K28 peuvent être masqués ou modifiés.

A l'inverse, les mécanismes d'auto-immunité des souches de *S. cerevisiae* produisant la toxine K2 sont indépendants de ceux responsables de l'activité killer, en l'occurrence les étapes de maturation contrôlées par l'endopeptidase du gène *KEX2* et la carboxypeptidase du gène *KEX1* (16). Une modification des acides aminés dans la partie amino-terminale de la séquence primaire de la toxine K2 entraîne une réduction de l'auto-immunité sans altérer l'activité killer. Dans ces travaux, des expériences de mutagenèse dirigée suggèrent que l'un des deux sites de clivage *KEX2* de la protoxine pourrait être impliqué dans l'établissement de l'auto-immunité de la souche killer.

Chez *U. maydis*, les souches killer ne sont pas sensibles à leurs propres toxines, KP1, KP4 ou KP6, mais à l'inverse de celles de *S. cerevisiae*, leur auto-immunité ne semble pas liée aux précurseurs, ni aux produits de leurs toxines. Chez la souche productrice de la toxine KP1, l'auto-immunité est lié à un segment L du génome viral qui rend la levure killer, mais dont on ignore encore la nature. Chez d'autres systèmes killer de *U. maydis*, comme les souches sécrétant les toxines KP4 et KP6, l'auto-immunité est due à des mutations chromosomiques récessives (41, 42). Chez *U. maydis*, les mécanismes moléculaires responsables de l'auto-immunité sont très différents de ce que l'on observe dans les systèmes killer K1 et K2 de *S. cerevisiae*, notamment avec les mutations *kre*. En effet, chez *U. maydis*, aucune mutation simple connue n'a encore rendu les souches killer résistantes à plus d'une toxine (30).

Chez *K. lactis*, le cadre de lecture ouvert (*open reading frame*) ORF5 du plasmide *pGKL1* a été identifié comme un déterminant de l'auto-immunité de la souche killer vis-à-vis de sa toxine. De plus, chez cette souche, la présence de l'autre plasmide *pGKL2* est essentielle à l'expression du phénotype d'immunité (60).

Chez *P. inositovora*, il a été démontré que des souches killer débarrassées (curées) de leurs plasmides à ADN double-brin *pPin1-1* et *pPin1-3*, bien que perdant leurs propriétés killer, ne deviennent pas forcément sensibles à leur toxine (25). Ces observations suggèrent que les mécanismes d'immunité des souches killer de *P. inositovora* ne sont pas liés à des gènes plasmidiques, mais peut-être à des gènes nucléaires.

Des observations différentes ont été faites avec des souches killer de *P. acaciae* débarrassées de leurs plasmides à ADN double-brin *pPac1-1* et *pPac1-2* par irradiation aux ultraviolets. En effet, dans ce cas, les souches ainsi traitées perdent leur activité killer et deviennent sensibles à la toxine produite par les souches mères sauvages (63). Dans le cas de *P. acaciae*, les mécanismes d'immunité à la toxine killer ne sont apparemment pas liés au génome nucléaire.

CONCLUSIONS

Bien que les systèmes killer soient assez différents d'une espèce ou d'une souche à l'autre, des similitudes se retrouvent

TABLEAU I. — Nature biochimique des récepteurs de toxines killer de levure.
Biochemical nature of the receptors of the yeast killer toxins.

Modification de la perméabilité ionique membranaire				
Récepteurs	Toxines killer	Gén.	Principales cibles	Effets killer et résistances
β -glucanes	<i>W. mrakii</i> K-500	Ncl	<i>Candida</i> spp. Cellules en phase stationnaires	Canaux transmembranaires Fuite d'ions
β -1,6-glucanes Protéines membranaires	<i>S. cerevisiae</i> K1, K2	Plm	<i>S. cerevisiae</i> Sphéroplastes et levures	Fuite d'ions, d'ATP et de métabolites Canaux K ⁺ Mutants <i>kre3</i> , <i>kre12</i> résistants Mutants <i>tok1</i> résistants
β -1,6-glucanes ?	<i>P. farinosa</i> SMK1 (SMKT, KK1)	Ncl	<i>S. cerevisiae</i> Cellules en phase de croissance	Mutants <i>kre</i> résistants Mutants <i>sfl</i> résistants (ATPase membranaire)
Inconnu	<i>U. maydis</i> KP1, KP6	Plm	Sphéroplastes et levures	
	<i>S. cerevisiae</i> KHR, KHS	Ncl	<i>C. glabrata</i>	Formation de canaux ionophores ?
	<i>P. kluyveri</i>	Ncl	<i>S. cerevisiae</i> Cellules en phase exponentielle de croissance	Pores membranaires Diminution du pH cytoplasmique Inhibition de l'incorporation des acides aminés Fuite K ⁺ et ATP Cellules en phase stationnaire = résistances
Inhibition de la synthèse d'ADN				
α -1,3-mannose sur une GP185	<i>S. cerevisiae</i> K28	Plm	<i>S. cerevisiae</i>	Activité toxique cytoplasmique Arrêt du cycle cellulaire (phase S ?) Anticorps anti-mannane pariétaux neutralisant l'effet killer Facteur α bloquant l'effet killer Mutants <i>mun</i> résistants Mutants sécrétoires résistants
Activité chitinase et arrêt du cycle cellulaire				
Chitine pariétale	<i>K. lactis</i> (PGKL1, pGKL2)	Plm	<i>Candida</i> spp. <i>Kluyveromyces</i> spp. <i>Torulopsis</i> spp. <i>Zygosaccharomyces</i> spp. <i>S. cerevisiae</i>	Activité cytoplasmique Arrêt du cycle cellulaire en G1 Mutants <i>cal1</i> (sans activité de chitine-synthase III) résistants Mutants défectifs en ARN-Glu3 résistants
Chitine pariétale	<i>P. acaciae</i> (pPac1-1, pPac1-2)	Plm	<i>S. cerevisiae</i>	Arrêt du cycle cellulaire en G1 Mutants récessifs résistants
Inhibition de la synthèse des β-glucanes				
β -1,6-glucanes β -1,3-glucanes	<i>W. mrakii</i> HM-1 (HMK)	Ncl	<i>S. cerevisiae</i> Cellules entières	Fragilité de la paroi et lyse cellulaire Protoplastes résistants Mutants <i>kre6</i> résistants Mutants <i>rhk1/alg3</i> résistants (synthèse de mannosyl-tranfèrase) Mutants <i>rhk2/sn3</i> résistants (synthèse d'oligosaccharyl-transfèrase)
β -1,3-glucanes	<i>W. saturnus</i> HY1 (HSK)		<i>S. cerevisiae</i> <i>S. bayanus</i> <i>P. anomala</i> <i>C. glabrata</i> Cellules bourgeonnantes	Eclatement de la paroi cellulaire Fuite de matériel cytoplasmique
Activité inconnue				
β -1,6-glucanes	<i>P. anomala</i> WC65	Ncl	<i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>P. bimundalis</i>	Mutants résistants (synthèse de β -1,6-glucanes) Sensibilité de sphéroplastes de souches résistances
β -1,6-glucanes	<i>P. membranifaciens</i>	?	<i>C. boidinii</i>	
β -1,6-glucanes ?	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	?	<i>S. cerevisiae</i>	
Inconnu	<i>P. inositavora</i> (pPin1-1, pPin1-3)	Plm	<i>S. cerevisiae</i> <i>Cephaloscyus</i> spp. <i>Citeromyces</i> spp.	
	<i>P. anomala</i> ATCC96603	Ncl	<i>Pichia</i> spp.	Fixation préférentielle sur les tubes germinatifs, bourgeons et cellules en phase de croissance
	et		<i>S. cerevisiae</i> <i>Pneumocystis carinii</i> <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
	<i>W. mrakii</i> MUCL1968			

Ncl = nucléaire, Plm = plasmidique, ? = non déterminé.

dans les mécanismes d'action des toxines killer comme dans la nature de leurs récepteurs. Ces similitudes ne sont pas liées à la nature du déterminant génétique (gènes plasmidiques ou chromosomiques). Les premiers récepteurs rencontrés par les toxines se trouvent à travers et en surface de la paroi des cellules cibles. Ils sont plutôt de nature polysaccharidiques. Par la répétition de leurs motifs glucidiques, α -mannoses ou β -glucanes, ils permettent une adsorption importante de toxine au travers de cette paroi, mais ne rendent pas très spécifiques les interactions moléculaires ainsi créées. Une seconde catégorie de récepteurs, membranaires voire même cytoplasmiques ou nucléaires et dont la nature protéique ou glycoprotéique est plus probable, interviennent de manière plus spécifiques avec les toxines. Ces récepteurs sont sans doute plus responsables de la spécificité des spectres d'activités des toxines killer que les récepteurs pariétaux polysaccharidiques. Dans plusieurs systèmes killer, les cellules cibles bourgeonnantes ou les jeunes cellules, aux parois plus fines, s'avèrent être plus sensibles aux toxines par rapport aux blastoconidies et autres formes cellulaires plus âgées (9).

Il reste encore de nombreuses choses à découvrir sur la nature des récepteurs des toxines killer de levures, ce qui pourra permettre de mieux comprendre la spécificité de l'activité de ces molécules antifongiques naturelles. Ce champ d'expérimentation est essentiel dans les études visant à utiliser des molécules antifongiques contre des micro-organismes pathogènes infectant l'espèce humaine.

Remerciements : Le travail de Cyril GUYARD est financé par l'Institut Pasteur de Lille et le Conseil Régional Nord — Pas de Calais, France. Celui d'Eric DEHECQ est pris en charge en partie par la Grande Campagne « Ensemble, Bâtissons Demain » de la Fédération Universitaire et Polytechnique de Lille (FUPL).

RÉFÉRENCES

- Ahmed A, Sesti F, Ilan N, Shih TM, Sturley SL, Goldstein SAN. A molecular target for viral killer toxin : TOK1 potassium channels. *Cell* 1999;99:283-91.
- Al-Aidroos K, Bussey H. Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Can J Microbiol* 1978;24:228-37.
- Beninati C, Oggioni MR, Bocanera M, Spinosa MR, Maggi T, Conti S, Magliani W, De Bernardis F, Teti G, Cassone A, Pozzi G, Polonelli L. Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nature Biotechnol* 2000;18:1060-4.
- Boone C, Sommer SS, Hensel A, Bussey H. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J Cell Biol* 1990;110:1833-43.
- Bulawa CE. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Ann Rev Microbiol* 1993;10:505-34.
- Bussey H, Sherman D, Somers JM. Action of yeast killer factor : a resistant mutant with sensitive spheroplasts. *J Bacteriol* 1973;113:1193-7.
- Bussey H, Skipper N. Killing of *Torulopsis glabrata* by *Saccharomyces cerevisiae* killer factor. *Antimicrob Agents Chemother* 1976;9:352-4.
- Bussey H, Boone C, Zhu H, Vernet T, Whiteway M, Thomas DY. Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. *Experientia* 1990;46:193-200.
- Bussey H. K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol Microbiol* 1991;5:2339-43.
- Butler AR, White JH, Stark MRJ. Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *J Gen Microbiol* 1991a;137:1749-57.
- Butler AR, Porter M, Stark MRJ. Intracellular expression of *Kluyveromyces lactis* toxin γ subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant. *Yeast* 1991b;7:617-25.
- Butler AR, O'Donnell RW, Martin VJ, Gooday GW, Stark MRJ. *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur J Biochem* 1991c;199:483-8.
- Butler AR, White JH, Folawiyi Y, Edlin A, Gardiner D, Stark MRJ. Two *Saccharomyces cerevisiae* genes which control sensitivity to GI arrest induced by *Kluyveromyces lactis* toxin. *Mol Cell Biol* 1994;14:6306-16.
- Conti S, Fanti F, Magliani W, Gerloni M, Bertolotti D, Salati A, Cassone A, Polonelli L. Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *J Infect Dis* 1998;177:807-11.
- de la Pena P, Barros F, Gascon S, Lazo PS, Ramos S. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1981;256:10420-5.
- Dignard D, Whiteway M, Germain D, Tessier D, Thomas DY. Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer gene. *Mol Gen Genet* 1991;227:127-36.
- Eisfeld K, Riffer F, Mentges J, Schmitt MJ. Endocytotic uptake and retrograde transport of a viral encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol* 2000;37:926-40.
- Goto K, Ywase Y, Kichise K, Kitano K, Totuka A, Obata T, et al. Isolation and properties of a chromosome-dependant KHR killer toxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem* 1990;54:505-9.
- Goto K, Fukuda H, Kichise K, Kitano K, Hara S. Cloning and nucleotide sequence of the KHS killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric Biol Chem* 1991;55:1953-8.
- Gunge N, Sakaguchi K. Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid plasmids pGKL1 and pGKL2 from *Kluyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. *J Bacteriol* 1981;147:155-60.
- Guyard C, Séguy N, Lange M, Ricard I, Polonelli L, Cailliez JC. First steps in the purification and characterization of a *Pichia anomala* killer toxin. *J Euk Microbiol* 1999;46(Suppl.):144S.
- Guyard C, Magliani W, Polonelli L, Cailliez JC. Les toxines killer de levure. *J Mycol Med* 2000;10:9-20.
- Guyard C, Evrard P, Corbisier-Colson AM, Louvart H, Dei-Cas E, Menozzi FD, Polonelli L, Cailliez JC. Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with *Williopsis saturnus* var. *markii* killer toxin. *Med Mycol* 2001 ; in press.
- Hanes SD, Burn VE, Sturley SL, Tipper DJ, Bostian KA. Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene : implications for processing and immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1675-9.
- Hayman GT, Bolen PL. Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Curr Genet* 1991;19:389-93.
- Hodgson VJ, Button D, Walker GM. Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol* 1995;141:2003-12.
- Kagan BL. Mode of action of yeast killer toxins : channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature (London)* 1983;302:709-11.
- Kasahara S, Inoue SB, Mio T, Yamada T, Nakajima T, Ichishima E, Furuichi Y, Yamada H. Involvement of cell wall β -glucan in the action of HM-1 killer toxin. *FEBS Lett* 1994;348:27-32.
- Kimura T, Komiyama T, Furuichi Y, Iimura Y, Karita S, Sakka K, Ohmiya K. N-glycosylation is involved in the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to HM-1 killer toxin secreted from *Hansenula mrakii* IFO 0895. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:176-84.
- Koltin Y, Day DR. Inheritance of killer phenotypes and double-stranded RNA in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:594-8.
- Komiyama T, Shirai T, Ohta T, Urakami H, Furuichi Y, Ohta Y, Tsukada Y. Action properties of HY1 killer toxin from *Williopsis saturnus* var. *saturnus*, and antibiotics, aculeacin A and papulacandin B. *Biol Pharm Bull* 1998;21:1013-9.

32. Kurzweilowa H, Sigler K. Kinetic studies of killer toxin K1 binding to yeast cells indicate two receptor populations. *Arch Microbiol* 1994;162:211-4.
33. Llorente P, Marquina D, Santos A, Peinado JM, Spencer-Martins I. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:1165-7.
34. Lolle S, Skipper N, Bussey H, Thomas DY. The expression of cDNA clones of yeast M1 double-stranded RNA in yeast confers both killer and immunity phenotypes. *EMBO J* 1984;3:1383-7.
35. Marquina D, Toufani S, Llorente P, Santos A, Peinado JM. Killer activity in yeast isolates from olives brines. *Adv Food Sci* 1997;19:41-6.
36. Martinac B, Zhu H, Kubalski A, Zhou XL, Culbertson M, Bussey H, Kung C. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6228-32.
37. McCracken DA, Martin VJ, Stark MJR, Bolen PL. The linear-plasmid-encoded toxin produced by the yeast *Pichia acaciae*: characterization and comparison with the toxin of *Kluyveromyces lactis*. *Microbiol* 1994;140:425-31.
38. Meskauskas A, Civitavicius D. The K2-type killer toxin- and immunity-encoding region from *Saccharomyces cerevisiae*: structure and expression in yeast. *Gene* 1992;111:135-9.
39. Middelbeek EJ, Stumm C, Vogels GD. Effects of *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. *Antonie Leeuwenhoek* 1980a;46:205-20.
40. Middelbeek EJ, van de Laar HH, Hermans JM, Stumm C, Vogels GD. Physiological conditions affecting the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to a *Pichia kluyveri* killer toxin and energy requirement for toxin action. *Antonie Leeuwenhoek* 1980b;46:483-97.
41. Park CM, Bruenn JA, Ganesa G, Flurkey WF, Bozarth RF, Koltin Y. Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Mol Microbiol* 1994;11:155-64.
42. Peery T, Koltin Y, Tamarkin A. Mapping the immunity functions of the *Ustilago maydis* P1 virus. *Plasmid* 1982;7:52-8.
43. Polonelli L, Fanti F, Conti S, Campani L, Gerloni M, Castagnola G, et al. Detection by immunofluorescent anti-idiotypic antibodies of yeast killer toxin cell wall receptors of *Candida albicans*. *J Immunol Methods* 1990;132:205-9.
44. Radler F, Schmitt MJ, Meyer B. Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. *Arch Microbiol* 1990;154:175-8.
45. Santos A, Marquina D, Leal JA, Peinado JM. (1-6)-beta-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1809-13.
46. Sawant AD, Abdelal AT, Ahearn DG. Anti-*Candida albicans* activity of *Pichia anomala* as determined by a growth rate reduction assay. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:1099-103.
47. Sawant AD, Ahearn DG. Involvement of a cell wall receptor in the mode of action of an anti-*Candida* toxin of *Pichia anomala* WC 65. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1331-5.
48. Schmitt MJ, Radler F. Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptors for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol* 1987;133:3347-54.
49. Schmitt MJ, Radler F. Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin K28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1988;170:2192-6.
50. Schmitt MJ, Brendel M, Schwarz R, Radler F. Inhibition of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by yeast toxin K28. *J Gen Microbiol* 1989;135:1529-35.
51. Schmitt MJ, Radler F. Blockage of cell receptors for yeast killer toxin KT28 with antimannoproteins antibodies. *Antimicrob Agents Chemother* 1990a;34:1615-8.
52. Schmitt MJ, Tipper DJ. K28, a unique double-strand RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1990b;10:4807-15.
53. Schmitt MJ, Compain P. Killer-toxin-resistant kre12 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and biochemical evidence for a secondary K1 membrane receptor. *Arch Microbiol* 1995;164:435-43.
54. Schmitt MJ, Klavehn P, Wang J, Schonig I, Tipper DJ. Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiol* 1996;142:2655-62.
55. Steinlauf R, Peery T, Koltin Y, Bruenn J. The *Ustilago maydis* virus-encoded toxin: effect of KP6 on cells and spheroplasts. *Exp Mycol* 1988;12:264-74.
56. Suzuki C, Nikkuni S. The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast, *Pichia farinosa*. *J Biol Chem* 1994;269:3041-6.
57. Suzuki C, Shimma YI. P-type ATPase *spf1* mutants show a novel resistance mechanism for the killer toxin SMKT. *Mol Microbiol* 1999;32:813-23.
58. Takita MA, Castilho-Valavicius B. Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Yeast* 1993;9:589-98.
59. Tipper DJ, Schmitt MJ. Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol* 1991;5:2331-8.
60. Tokunaga M, Wada M, Hishinuma F. Expression and identification of immunity determinants on linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 in *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res* 1987;15:1031-46.
61. Yamamoto T, Iratani T, Hirata H, Imai M, Yamaguchi H. Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS Lett* 1986;197:50-4.
62. White JH, Butler AR, Stark MJR. *Kluyveromyces lactis* toxin does not inhibit adenylyl cyclase. *Nature (London)* 1989;341:666-8.
63. Worsham PL, Bolen PL. Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Curr Genet* 1990;18:77-80.

