



**HAL**  
open science

# Etude sur le changement de type sexuel et les cassures chromosomiques chez *Candida glabrata*

Laetitia Maroc

► **To cite this version:**

Laetitia Maroc. Etude sur le changement de type sexuel et les cassures chromosomiques chez *Candida glabrata*. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL008 . tel-03193616

**HAL Id: tel-03193616**

**<https://theses.hal.science/tel-03193616>**

Submitted on 8 Apr 2021

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

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

Etude sur le changement de type sexuel et les  
cassures chromosomiques chez  
*Candida glabrata*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

Ecole doctorale n°577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech,

GQE - Le Moulon, 91190, Gif-sur-Yvette, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 12 février 2021, par**

**Laetitia MAROC**

**Composition du Jury**

**Fabienne MALAGNAC**

Professeure, Université Paris Saclay

Présidente

**Stefania FRANCESCONI**

Chargée de recherche (HDR), Institut Pasteur

Rapporteuse & examinatrice

**Joseph SCHACHERER**

Professeur, Université de Strasbourg

Rapporteur & examinateur

**Mathieu FALQUE**

Ingénieur de recherche, GQE-Le Moulon

Examinateur

**Valérie BORDE**

Directrice de recherche, Institut Curie

Examinatrice

**Cécile FAIRHEAD**

Professeure, Université Paris Saclay

Directrice de thèse



*A mes grands-mères,*



*Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse. En particulier, je remercie Stefania Francesconi et Joseph Schacherer de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur.e.s de ma thèse. Merci également à Valérie Borde, Mathieu Falque ainsi que Fabienne Malagnac d'examiner mon travail.*

*Je souhaite bien évidemment remercier ma directrice de thèse, Cécile Fairhead, pour son long et inconditionnel accompagnement. Merci d'avoir cru en moi dès mes premiers pas à la fac. Après avoir effectué mon premier stage d'études supérieures, j'ai effectué mon dernier stage ainsi que ma thèse dans son laboratoire, sous sa supervision. Je pense qu'on peut dire que la boucle est bouclée. Je suis plus qu'heureuse d'être arrivée jusqu'ici avec elle et grâce à elle. Je crois qu'il n'existe pas de mots assez forts pour décrire la gratitude que je ressens, à son égard, pour m'avoir fait grandir scientifiquement et humainement. Je finirai ces remerciements par cette question-réponse : « Mais qu'est-ce que l'art ? C'est plus compliqué que ça ».*

*J'adresse mes remerciements au reste de mon équipe de recherche pour m'avoir soutenue, écoutée, conseillée, aidée durant ce long chemin. Particulièrement, merci à Youfang Zhou-Li pour son soutien inconditionnel et son aide technique précieuse. Merci à Monique Bolotin-Fukuhara pour sa disponibilité permanente et son avis critique. Je remercie chaleureusement Adela Enache-Angoulvant pour son soutien ainsi que ses bons conseils. Enfin, merci à toutes pour tous les moments jovioux que l'on a pu passer et qui vont beaucoup me manquer.*

*Je tiens à remercier Fabienne Malagnac et Pierre Grognet, nos collaborateurs, pour leur aide, leurs conseils et leur écoute durant tout le long de mes travaux. Merci à Fabienne de m'avoir accueillie (une nouvelle fois) dans son laboratoire pour réaliser mes nombreux Southern-blot et merci à Pierre de m'avoir appris la technique du Southern-blot et de m'avoir rafraîchi la mémoire sur le western-blot. Merci pour votre soutien sans faille, quels que soient les moments, c'était toujours un bonheur de venir vous retrouver au laboratoire.*

*Merci à Gilles Fischer de m'avoir conseillée durant un peu plus de trois ans, et de m'avoir écrit un certain nombre de lettres de recommandations, parfois même dans l'urgence.*

*Je remercie également mes collègues d'équipes de recherches voisines au bâtiment 400 de l'Université Paris Sud pour les moments de détente que l'on a pu avoir. J'ai notamment une*

*pensée particulière pour Agnès Delahodde qui nous a récemment quittés et avec qui j'ai pu partager de nombreux bons moments.*

*Merci à Sandrine Le Bihan pour sa gentillesse et sa disponibilité dès que j'ai eu besoin de son aide dans mes démarches administratives.*

*Je souhaite remercier mes collègues et étudiant.e.s de l'iGEM 2019 et 2020 avec qui j'ai pu m'amuser sur des projets de biologie synthétique sur E. coli. Merci de m'avoir permis de partir au Giant Jamboree 2019 à Boston qui était une expérience très enrichissante et unique.*

*Merci à mes collègues qui travaillent physiquement au Moulon, même si on ne se voyait pas souvent du fait de notre localisation dans la vallée, j'ai toujours été très bien accueillie et c'était un plaisir de vous revoir à chaque fois « qu'on montait ».*

*Merci à Julie Soutourina d'avoir accepté de partager son protocole de ChIP sur la levure avec moi.*

*Merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail.*

*Enfin, un grand merci à ma petite famille, Charlotte, Moon, Ulysse, Pongo et Mowglie de m'avoir aidé à déstresser quand il le fallait et à réaliser, notamment, cette fin de thèse dans des conditions si particulières.*

# Table des matières

Liste des abréviations .....	1
I. Introduction.....	1
I.1 Intérêts de la reproduction sexuée .....	1
I.2 Stratégies de reproduction sexuée chez les champignons .....	1
I.3 Le changement de type sexuel : un événement programmé de recombinaison de l'ADN	6
I.4 Cassures double-brin de l'ADN et leur réparation chez les eucaryotes .....	7
I.4.1 Découverte de la RH chez les eucaryotes.....	9
I.4.2 Choix de la voie de recombinaison : RH ou NHEJ ? .....	15
I.4.3 Mécanismes moléculaires de réparation des CDBs par RH chez la levure.....	16
I.4.4 Mécanismes moléculaires de réparation des CDBs par NHEJ chez la levure.....	22
I.5 Le changement de type sexuel chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
I.5.1 Identité cellulaire .....	25
I.5.2 Structure des trois locus sexuels de <i>S. cerevisiae</i> .....	27
I.5.3 Etat chromatinien aux locus <i>HML</i> et <i>HMR</i> .....	28
I.5.4 Le mécanisme de changement de type sexuel .....	32
I.5.5 La préférence du donneur .....	34
I.6 Ho, une protéine de la famille des LAGLIDADG endonucléases .....	38
I.6.1 Origine de la protéine Ho .....	38
I.6.2 Régulation la protéine Ho.....	40
I.7 Le changement de type sexuel chez les autres champignons.....	41
I.7.1 Le changement de type sexuel chez <i>Kluveromyces lactis</i> .....	41
I.7.2 Le changement de type sexuel chez <i>Schizosacharomyces pombe</i> .....	44
I.7.3 Le changement de type sexuel chez les levures méthanotrophes.....	46
I.7 Evolution du changement de type sexuel chez les levures.....	48

I.8 Intérêts du changement de type sexuel.....	50
I.9 Reproduction (a)sexuée chez les levures pathogènes de l'être humain .....	52
I.10 Phylogénie et conservation des éléments du changement de type sexuel dans le clade des <i>Nakaseomyces</i> .....	54
I.11 Induction du changement de type sexuel chez <i>Candida glabrata</i> et létalité.....	57
I.12 Objectifs de la thèse .....	58
II. Matériels et méthodes supplémentaires .....	59
II.1 Souches, amorces pour PCR et plasmides .....	59
II.2 Construction des souches non publiées.....	63
II.3 Induction du gène <i>HO</i> de <i>S. cerevisiae</i> et du gène <i>cas9</i> de <i>Streptococcus pyogenes</i> et quantification de la mortalité .....	65
II.3.1 Induction en milieu solide .....	65
II.3.2 Induction en milieu liquide .....	66
I.3.3 Quantification de l'efficacité du changement de type sexuel.....	66
II.4 Cinétique des coupures à <i>HML</i> , <i>MAT</i> et <i>HMR</i> et vérification génomique des souches construites par Southern-blot.....	67
II.5 Extraction protéiques et western-blot .....	68
II.5.1 Extraction protéiques chez la levure .....	68
II.5.2 Western-blot.....	69
III. Résultats .....	70
III.1 Construction et utilisation du premier système CRISPR-Cas9 inductible chez <i>C. glabrata</i> .....	70
III.1.1 Résumé de la publication .....	70
III.1.2 Publication .....	71
III.2 Etude de la létalité liée au changement de type sexuel chez <i>C. glabrata</i> .....	85
III.2.1 Résumé de la publication .....	85
III.2.2 Publication .....	87

III.2.3 Résultats supplémentaires .....	111
III.4 Mise en évidence des coupures de ScHo aux locus <i>HML</i> , <i>MAT</i> et <i>HMR</i> chez <i>C. glabrata</i> par Southern-blot .....	114
III.4.1 Mise en évidence de la coupure de la protéine Ho de <i>S. cerevisiae</i> par Southern-blot dans une souche sauvage .....	114
III.4.2 Mise en évidence de la coupure de ScHo aux locus <i>HML</i> et <i>MAT</i> par Southern-blot dans des souches portant des locus sexuels sauvages et inconvertibles .....	118
III.5 La communication entre les locus sexuels <i>HML</i> , <i>MAT</i> et <i>HMR</i> chez <i>C. glabrata</i> est complexe.....	122
III.3 Létalité liée à la présence de ScHo en dehors des coupures aux locus sexuels chez <i>C. glabrata</i> .....	126
III.3.1 L'expression de ScHO chez <i>C. glabrata</i> est associée à une létalité non liée aux coupures aux locus sexuels .....	127
III.3.2 L'interaction entre les locus sexuels et la protéine Ho de <i>S. cerevisiae</i> semble toxique chez <i>C. glabrata</i> .....	128
III.3.3 Expériences préliminaires réalisées en vue d'étudier la fixation de ScHo aux locus sexuels sauvages ou inconvertibles chez <i>C. glabrata</i> par CHIP-PCR.....	129
III.5 Recherche d'une reproduction sexuée chez <i>C. glabrata</i> .....	135
IV. Discussion .....	142
Un nouvel outil efficace d'édition du génome construit chez <i>C. glabrata</i> : un système CRISPR-Cas9 inductible .....	142
Une meilleure compréhension de la réparation des CDB chez <i>C. glabrata</i> .....	144
Le changement de type sexuel peut être induit par CRISPR-Cas9 chez <i>C. glabrata</i> et sans létalité .....	150
La CDB au locus <i>MAT</i> chez <i>C. glabrata</i> n'est létale que lorsqu'elle est réalisée par ScHo .....	151
La fixation de ScHo aux locus sexuels chez <i>C. glabrata</i> semble être toxique .....	156
Le changement de type sexuel semble être en train de dégénérer chez <i>C. glabrata</i> .....	158
Bibliographie.....	161
Annexes .....	176



## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**CDB** : Cassure double-brin  
**CSB** : Cassure simple-brin  
**UV** : Ultra-violet  
**RH** : Recombinaison homologue  
**NHEJ** : *Non-homologous end-joining*  
**CO** : *Crossing-over*  
**DSBR** : *Double-strand break repair*  
**SDSA** : *Synthesis-dependent strand annealing*  
**SSA** : *Single-strand annealing*  
**CDK** : *Cyclin-dependent kinase*  
**BIR** : *Break-induced replication*  
**NCO** : *Non crossing-over*  
**FBI** : *Facilitator of BIR*  
**kb** : kilobases  
**pb** : paire de bases  
**c-NHEJ** : *classical-NHEJ*  
**alt-NHEJ** : *alternative-NHEJ*  
**ORC** : *Origin recognition complex*  
**H4K16Ac** : Acétylation de la lysine 16 de l'histone 4  
**RE** : *Recombination enhancer*  
**ChIP** : *Chromatin Immunoprecipitation*  
**HEG** : *Homing endonuclease gene*  
**ARNm** : Acide ribonucléique messenger  
**min** : minutes  
**IR** : *Inverted repeats*  
**WGD** : *Whole genome duplication*  
**MTL** : *Mating-type-like loci*  
**ScHO** : gène *HO* de *S. cerevisiae*  
**ScHo** : endonucléase *Ho* de *S. cerevisiae*  
**ARNg** : ARN guide  
**rpm** : *rotation per minute*  
**CFU** : *Colony forming unit*



# I. Introduction

## I.1 Intérêts de la reproduction sexuée

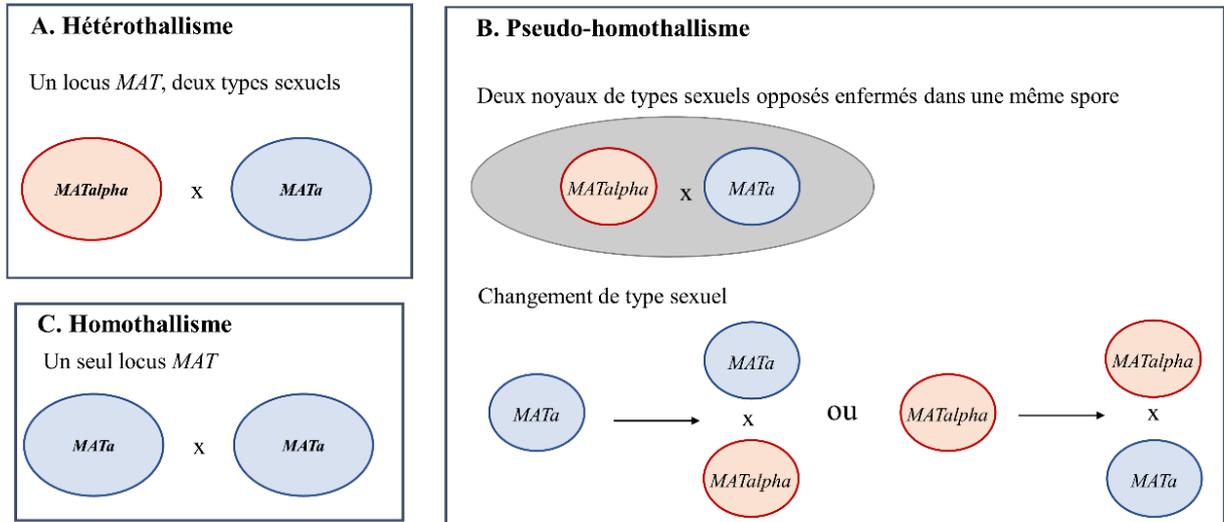
Chez les eucaryotes, la reproduction sexuée est une caractéristique quasi-ubiquitaire (Hofstatter and Lahr, 2019). Elle implique des changements de ploïdie grâce à la méiose par la formation des gamètes et grâce à la fécondation par la fusion des noyaux de gamètes compatibles. La reproduction sexuée permet l'échange de matériel génétique entre organismes, et permet ainsi de purger les génomes de mutations délétères ainsi que d'accroître la diversité génétique, utile à l'adaptation à de nouvelles conditions environnementales (Gouyon, 1999).

Bien que les caractéristiques principales de la méiose soient hautement conservées à travers l'embranchement des eucaryotes (Hofstatter and Lahr, 2019), les mécanismes qui contrôlent la détermination du sexe, régissant la plasmogamie ainsi que la caryogamie, sont plastiques et divers.

## I.2 Stratégies de reproduction sexuée chez les champignons

C'est dans le règne fongique que la plus grande diversité de la reproduction sexuée est retrouvée (Ni et al., 2011). Ce règne offre ainsi la possibilité d'étudier la nature moléculaire de la reproduction sexuée, sa spécificité et son évolution au sein des eucaryotes (Ni et al., 2011). Les champignons ont développé de nombreuses stratégies afin de se reproduire de façon sexuée et de se propager dans la nature par la dissémination de spores (produites par la méiose). Il existe, dans les cellules de champignons, une identité sexuelle appelée type sexuel (*mating-type* en anglais) qui est contrôlée par les locus *MAT* (Ni et al., 2011). Il existe deux grands systèmes de croisements fongiques, les systèmes tétrapolaires et les systèmes bipolaires, dans lesquels un ou deux locus *MAT*, respectivement, détermine le type sexuel de la cellule. Dans les systèmes bipolaires, le locus *MAT* est bi-allélique, il n'existe donc que deux types sexuels dans les populations, alors que dans certains systèmes bipolaires et

tétrapolaires, les locus *MAT* peuvent être multi-alléliques et il peut ainsi exister jusqu'à des centaines de types sexuels au sein d'une population (Ni et al., 2011). Je ne parlerai ici que des systèmes bipolaires et bi-alléliques (pour en savoir plus sur les systèmes de reproduction fongiques, voir la revue (Kothe, 1996)). Chez les ascomycètes, un locus *MAT* unique code des facteurs de transcription qui régulent les gènes contrôlant l'identité cellulaire, la fusion cellulaire et la formation de l'état zygote, et enfin la méiose ainsi que la sporulation. Le locus *MAT* peut ainsi exister sous deux formes, portant des gènes différents en fonction du type sexuel. Les gènes présents au locus *MAT* des deux types sexuels sont appelés idiomorphes plutôt qu'allèles en raison de la grande différence des gènes contenus dans les deux types (leur origine d'un même ancêtre commun est incertaine (Giraud et al., 2008)). Deux cellules ne peuvent fusionner que si elles sont compatibles, c'est-à-dire si, et seulement si, elles portent des types sexuels compatibles. Cette compatibilité passe un système de détection de partenaire de fécondation par un système de phéromones/récepteurs. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, une cellule *MAT $\alpha$*  produit une phéromone alpha qui est reconnue par les cellules *MAT $\alpha$*  et *vice versa*. Les récepteurs à ces phéromones décorent la surface des cellules compatibles et la fixation de la phéromone sur son récepteur déclenche une voie de signalisation MAP kinase, commune aux deux types sexuels, qui aboutit au croisement des deux cellules (Herskowitz, 1988). Chez les champignons, trois modes de reproduction sont décrits : l'hétérothallisme, l'homothallisme et le pseudo-homothallisme (Figure 1).



**Figure 1. Différents modes de reproduction sexués chez les champignons bipolaires (modifié d'après (Ni et al., 2011)).** Le locus *MAT* porte l'identité sexuelle, appelé type sexuel, chez les champignons. La croix représente la compatibilité sexuelle, c'est-à-dire la capacité de deux cellules ou noyaux à pouvoir se croiser.

Je vais, par la suite, utiliser la nomenclature de *S. cerevisiae* pour désigner les types sexuels, à savoir *MAT*<sub>alpha</sub> et *MAT*<sub>a</sub>. Ce ne sont pas les mêmes gènes dans toutes les espèces mais il existe des homologues entre les idiomorphes de type « a » et entre ceux de type « alpha », respectivement (Coppin et al., 1997). L'hétérothallisme nécessite deux partenaires compatibles pour que la fécondation ait lieu, dans le cas des systèmes bipolaires bi-alléliques, des types sexuels compatibles signifient opposés (une cellule *MAT*<sub>alpha</sub> doit rencontrer une cellule *MAT*<sub>a</sub> et *vice versa*). A l'inverse, les champignons avec un mode de reproduction homothallique vrai (par opposition au pseudo-homothallisme, décrit plus bas) sont auto-fertiles et ainsi, un seul individu haploïde isolé après la méiose, peut réaliser un cycle sexué en culture. Ceci implique que le locus *MAT* soit identique entre cellules se croisant (un seul type sexuel dans la population) et que toutes les cellules puissent se croiser avec toutes les autres. En réalité, dans les populations, à l'heure actuelle, sont surtout connus des champignons qui peuvent changer d'un mode de reproduction homothallique vraie vers un mode de

reproduction hétérothallique et *vice versa* (un exemple de l'espèce *Cryptococcus neoformans* est donné dans le paragraphe suivant). Il existe très peu d'exemple de champignons qui ne se reproduisent que de manière homothallique vraie (Ni et al., 2011). Le troisième mode de reproduction est donc le pseudo-homothallisme. Le pseudo-homothallisme est similaire à l'homothallisme vrai car une seule cellule issue de la méiose peut réaliser un cycle sexué complet, mais il s'en distingue par les conditions de fécondation : dans le pseudo-homothallisme, un seul individu isolé peut réaliser un cycle sexué en culture mais deux cellules ne peuvent fusionner que si elles sont de type sexuel opposé. Plusieurs mécanismes permettant le pseudo-homothallisme existent dans la nature (Bennett and Turgeon, 2016). Le plus connu, et celui qui nous intéresse plus particulièrement, est celui de *S. cerevisiae*, où la fécondation n'a lieu qu'entre une cellule *MAT $\alpha$*  et une cellule *MAT $a$* . Toutefois, un mécanisme appelé changement de type sexuel permet à une cellule *MAT $\alpha$*  de donner naissance à une cellule *MAT $a$* , et *vice versa*, les deux cellules alors produites pouvant se féconder. Ce même mécanisme se retrouve chez *Schizosacharomyces pombe* (Klar et al., 2014) l'autre levure modèle, très éloignée phylogénétiquement de *S. cerevisiae*, dans un phénomène de convergence évolutive. Plus récemment, des mécanismes de pseudo-homothallisme différents ont été compris, comme chez le champignon ascomycète filamenteux *Podospora anserina* chez qui dans 99% des méioses, les noyaux haploïdes sont regroupés deux à deux dans une même ascospore, appelée spore binucléée. Si l'asque est post-réduit (98% des méioses), il provient d'une méiose où un et un seul évènement de recombinaison a eu lieu entre le centromère et le locus du type sexuel. Dans ce cas, les deux noyaux présents dans les ascospores portent chacun un type sexuel différent et les mycéliums issus de telles ascospores sont auto-fertiles (Coppin et al., 1997).

Ces modes de reproduction ont évolué de manière dynamique afin de remplir les conditions de fécondation pour chaque espèce et il semble que le (pseudo)homothallisme ait évolué à partir d'un système ancestral hétérothallique

(Billiard et al., 2011). Comme énoncé ci-dessus, il n'est pas rare que plusieurs modes de reproduction existent de façon concomitante chez des espèces d'un même genre ou même au sein d'une même espèce (Ni et al., 2011). Il existe plusieurs exemples de transition entre les modes de reproduction hétérothallique et homothallique (ou pseudo-homothallique). Certains chercheurs interprètent ces transitions comme un choix entre l'endogamie et l'exogamie dans les populations (Hanson and Wolfe, 2017; Lee et al., 2010), ainsi l'hétérothallisme favoriserait l'exogamie alors que l'homothallisme favoriserait l'endogamie. Pour d'autres, l'homothallisme ne favoriserait pas l'endogamie dans les populations mais plutôt l'exogamie en permettant une compatibilité universelle entre cellules d'une même espèce (Giraud et al., 2008). La fréquence à laquelle un mode de reproduction ou un autre se produit dépendrait de conditions environnementales ainsi que des conditions génétiques favorisant une stratégie de reproduction ou une autre, cela n'étant pas totalement élucidé (Ni et al., 2011). Un exemple intéressant est celui du champignon basidiomycète pathogène *C. neoformans* chez qui la morphologie est liée à la reproduction sexuée et va jouer sur le choix entre homothallisme et hétérothallisme. Durant la croissance végétative et l'infection, *C. neoformans* croît sous forme unicellulaire (forme levure) mais lorsque deux cellules levures compatibles se rencontrent, elles entament une transition morphologique de la forme levure vers la forme hyphe afin de fusionner et de former un hyphe dicaryotique, caractéristique des champignons basidiomycètes (Hull and Heitman, 2002). Ainsi ce champignon réalise une fécondation avec un partenaire de type sexuel opposé (hétérothallisme) qui ne peut avoir lieu uniquement sous forme d'hyphe, après infection, alors qu'en absence de partenaire compatible, *C. neoformans* sous forme levure peut se croiser avec lui-même (Lin et al., 2005). Un autre exemple peut être trouvé chez la levure pathogène opportuniste *Candida albicans*. En absence de la protéase Bar1 (qui inactive la phéromone alpha et qui est produite par les cellules *MATa*) ou en présence de la phéromone alpha, *C. albicans* peut se reproduire de manière homothallique par la fécondation de deux cellules *MATa* (Alby et al., 2009).

### **I.3 Le changement de type sexuel : un événement programmé de recombinaison de l'ADN**

Comme énoncé ci-dessus, le changement de type sexuel est une des stratégies permettant le pseudo-homothallisme. Il permet à une cellule haploïde d'un type sexuel donné de donner naissance à une cellule haploïde de type opposé. Par la production d'une cellule de type sexuel opposé, le changement de type sexuel donne ainsi la possibilité à une cellule isolée de réaliser un cycle sexué complet, donc sans nécessité de trouver un partenaire sexuel compatible.

Le changement de type sexuel fait intervenir un événement programmé de recombinaison de l'ADN au niveau du locus *MAT*. Au cours de l'évolution, plusieurs processus de différenciation cellulaire impliquant de tels événements de recombinaison ont été mis en place et peuvent affecter un seul gène ou bien le génome entier (Zufall et al., 2005). Un de ces événements est le processus méiotique, très répandu puisque la reproduction sexuée est quasi-ubiquitaire chez les eucaryotes. Ce processus implique des événements de recombinaison entre chromosomes homologues, initiés par de multiples cassures double-brins (CDBs). D'autres exemples peuvent être cités comme celui des ciliés, eucaryotes unicellulaires, où l'ADN somatique et l'ADN germinale sont contenus dans deux noyaux séparés, appelés respectivement macronoyau et micronoyau. Le développement du macronoyau résulte de la duplication et de la fragmentation drastique et programmée de l'ADN du micronoyau (Chen et al., 2014).

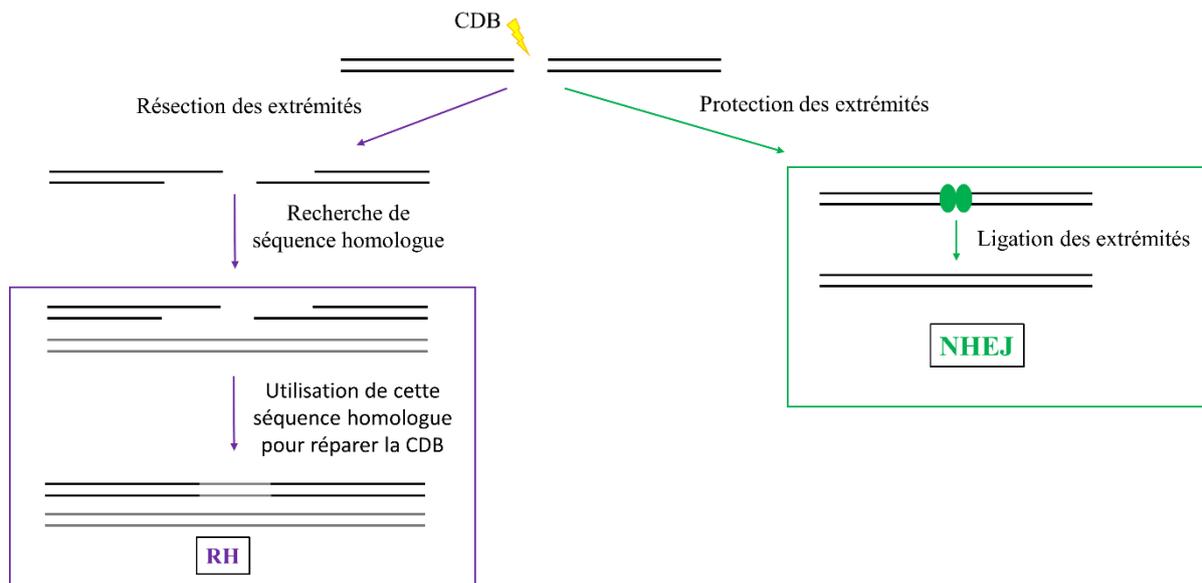
Les événements de recombinaisons cités ci-dessus font intervenir une(des) CDB(s) de l'ADN programmée(s) suivies de leur réparation. Certains systèmes reposent sur une(des) cassure(s) simple brin (CSB) pratiquement aussi dangereuse(s) qu'une CDB. En effet, une CSB a de fortes chances de résulter en une CDB par le passage d'une fourche de réplication si elle n'a pas été réparée avant. Chez les mammifères, par exemple, la recombinaison V(D)J est un événement fondamental qui permet de créer une grande diversité de récepteurs antigéniques des cellules lymphoïdes impliquées

dans le système immunitaire (Roth, 2014). Cette recombinaison implique notamment une CSB à un site spécifique présent au niveau des segments géniques V, J et, dans certains cas, D qui codent pour la partie amino-terminale des chaînes des récepteurs de l'antigène.

Il peut paraître étonnant que plusieurs systèmes impliquant ces événements programmés de l'ADN existent et persistent, alors que les CDBs de l'ADN font partie des lésions les plus toxiques pour la cellule. En effet, elles peuvent mener à des instabilités génomiques et dans le plus grave de cas, à la mort cellulaire. Ainsi, le succès de tels mécanismes réside dans la capacité à réparer efficacement et rapidement les CDBs, permettant de préserver l'intégrité du génome et d'assurer la viabilité cellulaire.

#### **I.4 Cassures double-brin de l'ADN et leur réparation chez les eucaryotes**

Comme énoncé précédemment, l'ADN peut subir des CDBs programmées mais aussi différentes lésions liées à l'environnement comme l'exposition aux UVs, des stress oxydatifs ou encore par la réplication d'un brin d'ADN portant une CSB. Une seule CDB persistante chez la levure peut entraîner la mort de la cellule (Fairhead and Dujon, 1993; Moore and Haber, 1996; Yarrington et al., 2018). Alors, en réponse à même une seule CDB, les organismes doivent mettre en place une suite d'événements afin de réparer la cassure et ainsi de préserver l'intégrité génomique et assurer la viabilité cellulaire. Les cellules doivent établir un équilibre critique entre les différentes voies de réparation agissant en compétition les unes avec les autres au sein d'une même cellule. Le choix est différent selon l'espèce, l'étape du cycle cellulaire à laquelle se trouve la cellule, ou encore selon la ploïdie de la cellule. Un chromosome cassé peut être réparé par deux voies distinctes que sont la recombinaison homologue (RH) et la ligation non homologue des extrémités, NHEJ pour *Non-homologous end-joining* (Figure 2), voies qui seront détaillées précisément plus loin dans cette introduction.



**Figure 2. Schéma des différentes voies de réparation possibles à la suite d'une CDB chromosomique chez les eucaryotes (modifié d'après (Jasin and Rothstein, 2013)).** Une étape déterminante dans le choix de la voie de réparation est la résection des extrémités 5' de la CDB afin de générer des extrémités 3' simples brins qui sont requises pour entrer dans la voie de RH mais qui inhibe la voie de NHEJ. A l'inverse, dans le NHEJ, les extrémités d'ADN de la CDB sont protégées de la résection afin de permettre une ligation de celles-ci.

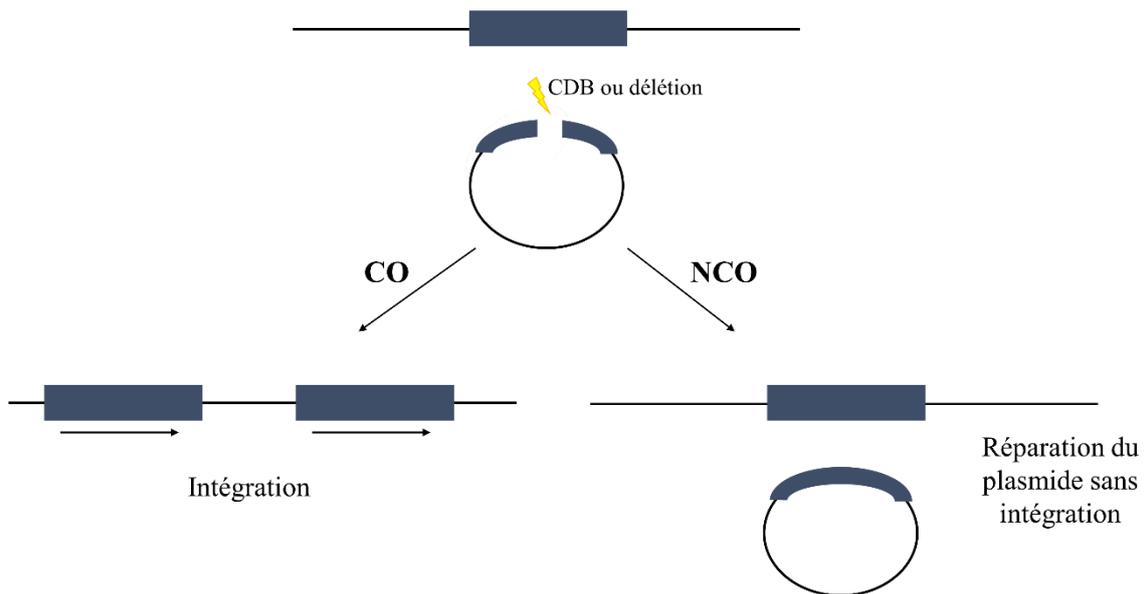
Dans le cas de la RH, la création d'une CDB entraîne la recherche d'une séquence similaire à celle coupée dans le génome et la réparation implique l'appariement de longues portions d'ADN entre ces deux séquences homologues (Aylon and Kupiec, 2004). A l'inverse de la RH, le NHEJ est un mécanisme capable de lier les extrémités d'ADN de la cassure sans avoir besoin d'homologie de séquences, ou très peu (Pannunzio et al., 2018).

### I.4.1 Découverte de la RH chez les eucaryotes

Les mécanismes de réparation des CDBs sont fortement conservés à travers l'évolution, et la plupart des grandes étapes de ces voies élucidées chez la levure sont aussi valables chez les autres organismes eucaryotes. Les premiers résultats d'études des mécanismes de la réparation de l'ADN par RH sont issues d'expériences de génétiques formelles du début des années 60 puis ceux-ci ont été complétés par des expériences de biologie moléculaire à partir de la fin des années 80. Chez la levure modèle *S. cerevisiae*, la méiose produit quatre spores haploïdes enfermées dans un même asque (tétrade) (le cycle sexué de *S. cerevisiae* sera détaillé plus loin dans l'introduction). Ces spores peuvent être micromanipulées de façon à être isolées une à une et ainsi à pouvoir réaliser une analyse génétique des tétrades. Selon les lois de Mendel, des marqueurs hétérozygotes indépendants ségrégent de façon 2:2 dans la très grande majorité des tétrades. Toutefois, des exceptions à cette règle ont rapidement pu être identifiées. En effet, dans environ 1 % des méioses, des ségrégations non-Mendéliennes sont observées. La plus commune de ces exceptions (ségrégation 3:1 ou 1:3) est due à l'échange non-réciproque d'information génétique entre l'ADN donneur et l'ADN receveur, appelé la conversion génique. Il a ensuite été démontré que la conversion génique pouvait aussi se produire dans des cellules mitotiques (Roman, 1956) avant qu'un long travail des années 60 aux années 70 ne permettent également d'établir que la conversion génique soit causée par la RH et non pas par un processus de mutation (Fogel and Hurst, 1967; Fogel et al., 1979).

Avec le développement de méthodes efficaces permettant d'introduire des molécules exogènes d'ADN chez la levure à la fin des années 70, il est devenu clair que les cellules de *S. cerevisiae* utilisent majoritairement la RH comme mécanisme par défaut pour réparer une CDB et cette recombinaison a commencé à être décrite notamment grâce à l'expérience historique de R.J Rothstein et de ses collègues (Orr-Weaver et al., 1981). Ces derniers ont construit des plasmides non répliatifs contenant un ou plusieurs gènes de *S. cerevisiae*. Ces plasmides ont été linéarisés par une seule

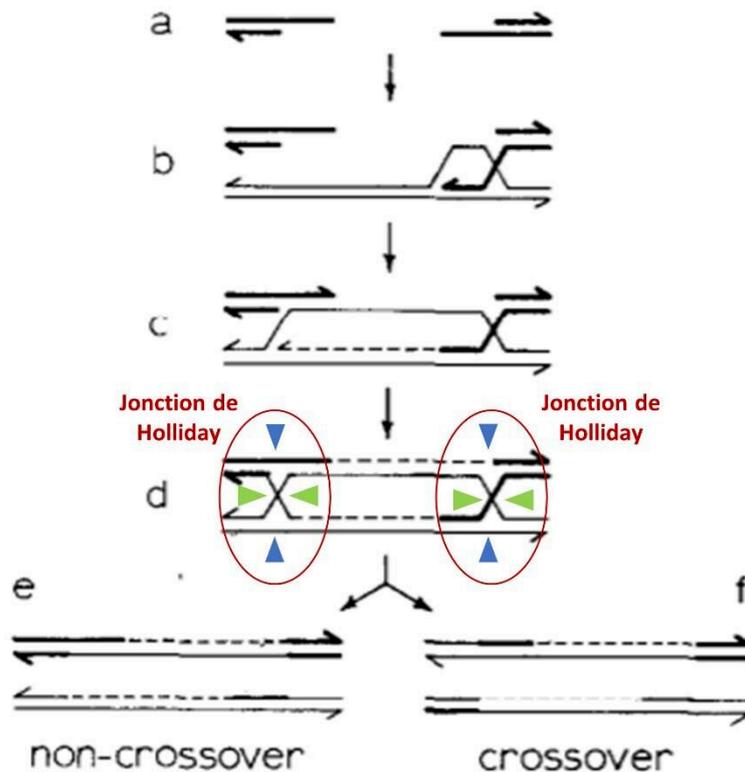
CDB dans un seul des gènes portés, grâce à des enzymes de restriction. Des cellules de *S. cerevisiae* ont ensuite été transformées avec ces plasmides ouverts ou, en parallèle, avec les mêmes plasmides non linéarisés. En coupant ces plasmides, le nombre de transformants a été augmenté de 10 à 1 000 fois, comparé au nombre de transformants obtenus avec les plasmides non linéarisés. De plus, la majorité des transformants avait intégré les plasmides dans leur génome (Figure 3).



**Figure 3. Schéma des premières expériences portant sur l'étude de la RH à la suite d'une CDB dans un plasmide répliatif ou non chez *S. cerevisiae* (modifié d'après (Jasin and Rothstein, 2013)).** Une CDB ou une délétion (correspondant à deux CDBs) est réalisée dans un gène de *S. cerevisiae* (rectangle bleu) porté par un plasmide. Des cellules de *S. cerevisiae* portant une copie génomique du gène coupé sont transformées avec le plasmide ouvert. Si le plasmide est non répliatif, il est intégré au locus du gène en question grâce à un crossing-over (CO) (recombinaison réciproque entre deux portions d'ADN). S'il est répliatif, le plasmide peut aussi être intégré au locus du gène en question mais également être réparé par la copie chromosomique de ce gène par RH et ainsi se maintenir dans les cellules.

Lorsque les plasmides contenaient deux gènes de *S. cerevisiae*, l'évènement d'intégration était dirigé à la copie chromosomique du gène dont la copie plasmidique avait été préalablement coupée. De plus, leur laboratoire avait construit un plasmide dans lequel un gène de *S. cerevisiae* était cloné et portait une délétion dont les extrémités n'étaient pas liguées. La transformation de *S. cerevisiae* avec ce plasmide menait quand même à son intégration dans le génome de la levure au locus chromosomique de la copie du gène et la séquence manquante était rajoutée en utilisant la séquence du gène chromosomique comme matrice, s'agissant du

phénomène de "gap-repair" (Orr-Weaver et al., 1981). Ainsi, ces travaux furent alors les premiers à commencer à décrire moléculairement des événements de RH avec crossing-over (CO) (recombinaison réciproque entre deux portions d'ADN). La découverte et l'utilisation de plasmides contenant des origines de réplifications de levures, donc auto-répliatif, a permis la découverte d'événement de recombinaison homologue non associés à des COs chez *S. cerevisiae* (Orr-Weaver and Szostak, 1983) (Figure 3). Le laboratoire de Szostak a ainsi montré que si un plasmide auto-répliatif porte un gène de *S. cerevisiae* contenant une CDB ou une délétion et qu'une copie de ce gène est présente dans le génome de la souche transformée, alors ce gène plasmidique peut être réparé dans la cellule, après transformation, et le plasmide peut se maintenir (Orr-Weaver and Szostak, 1983). Ces observations ont permis de proposer le modèle de réparation des CDBs par RH (Szostak et al., 1983) impliquant une double jonction de Holliday (dJH) (correspondant aujourd'hui au DSBR pour *Double-strand break repair* en anglais, aussi appelé Résolution des dJH) (Figure 4). Les jonctions de Holliday ont été nommées d'après la structure d'échange entre brins d'ADN entrecroisés du modèle de recombinaison génétique de Robin Holliday (Holliday, 1964).



**Figure 4. Modèle de réparation d'une CDB par RH proposé par J W Szostak et ses collègues (modifié d'après (Szostak et al., 1983)).**

(a) Les extrémités 5' d'une CDB chromosomique subissent une résection. (b) Une extrémité 3' simple brin envahit une séquence homologue formant une D-loop (pour *displacement loop* en anglais). (c) La D-loop s'élargit jusqu'à ce que la seconde extrémité 3' de la CDB puisse elle-aussi s'hybrider sur la séquence homologue. (d) La synthèse à partir de la seconde extrémité 3' élimine le trou de séquence et le déplacement des brins résulte en la formation d'une double jonction de Holliday. La résolution des deux jonctions en coupant les brins intérieurs ou extérieurs au duplex d'ADN mène à deux configurations possibles sans crossing-over (e) ou avec crossing-over (f). Dans cette illustration de résolution, les jonctions de Holliday ont été résolue en coupant les brins intérieurs entrecroisés (au niveau des doubles têtes flèches vertes) dans le cas (e) et en coupant les brins extérieurs (au niveau des doubles têtes de flèches bleues et vertes) dans le cas (f).

Ainsi, les expériences citées ci-dessus ont permis d'étudier la RH à partir d'ADN exogène mais il a fallu attendre la fin des années 80 afin que la RH mitotique entre

chromosomes ne commence à être étudiée. En effet, la recombinaison mitotique spontanée se produit à plus faible fréquence que la recombinaison méiotique, ce qui a limité son étude. Il a fallu attendre le développement d'outils moléculaires qui introduisent des CDBs à des sites spécifiques dans le génome, afin d'identifier les déterminants moléculaires de la RH, décrits dans le sous-chapitre «[1.4.3 Mécanismes moléculaires de réparation des CDBs par RH chez la levure](#)». Ainsi, les endonucléases Ho et I-SceI de *S. cerevisiae* ont été utilisées afin d'induire des CDBs à des sites spécifiques dans le génome et d'en étudier la réparation chez la levure (Rudin and Haber, 1988) et pour I-SceI dans des organismes aussi variés que les cellules de mammifères (Rouet et al., 1994) et un peu plus tard chez les drosophiles (Bellaïche et al., 1999), les plantes (Puchta et al., 1993) et même chez les bactéries (Ponder et al., 2005). Chez *S. cerevisiae*, l'endonucléase Ho coupe l'ADN double-brin à son site spécifique au locus *MAT* (Strathern et al., 1982). La réparation de cette coupure aboutit au changement de type sexuel dont le processus est décrit dans le chapitre «[1.5 Le changement de type sexuel chez \*S. cerevisiae\*](#) ». I-SceI est une endonucléase codée par un intron dans le génome mitochondrial de *S. cerevisiae* qui est capable de couper un site spécifique et dont la réparation aboutit à l'insertion de l'intron codant I-SceI au locus coupé (Jacquier and Dujon, 1985).

La découverte du rôle de la RH pour la réparation des CDBs chez les cellules de mammifères s'est faite beaucoup plus tardivement que pour la levure ou d'autres organismes modèles, dans les années 80. En effet, la RH a longtemps été considérée comme non cruciale chez les mammifères en raison des premières études menées sur la réparation des CDBs chez des cellules de mammifères en culture ou chez la souris. Dans les années 80, l'étude du sort d'un ADN intégré à la suite d'une transfection ou une injection dans des cellules de mammifères ou chez des souris a montré que l'intégration de cet ADN s'effectuait à des sites non homologues à l'ADN intégré, par NHEJ, malgré l'existence de sites homologues dans le génome (Lacy et al., 1983; Smithies et al., 1985). D'autres études ont également démontré la grande efficacité du NHEJ chez les mammifères (Chiruvella et al., 2013; Wake et al., 1984). Il a ensuite été

découvert que la réparation de CDBs par NHEJ était impliquée de manière indispensable dans la recombinaison V(D)J à l'origine de la grande diversité de récepteurs antigéniques chez les vertébrés (Roth et al., 1992), ce qui a suscité l'intérêt des scientifiques pour la recherche sur le NHEJ mais qui, d'un autre côté, les a dissuadés de considérer la RH comme jouant un rôle majeur dans la réparation des CDBs dans les cellules de mammifères (Jasin and Rothstein, 2013). De plus, lors d'études de la réparation de plasmides portant des séquences répétées, il a été montré que la réparation se faisant par alignement de ces séquences répétées (réparation par *single-strand annealing*, SSA) (Lin et al., 1984) plutôt que par invasion d'une séquence répétée par le brin d'ADN cassé de l'autre séquence répétée (réparation par *synthesis-dependent strand annealing*, SDSA et par DSBR). Ces observations ont été importantes afin de comprendre les délétions qui apparaissent durant la recombinaison entre des séquences répétées chez les champignons et dans les cellules de mammifères (Rudin and Haber, 1988; Liang et al., 1996).

#### **I.4.2 Choix de la voie de réparation : RH ou NHEJ ?**

Le choix de la voie de réparation est régulé par plusieurs facteurs. Chez les cellules de mammifères (diploïdes) et les cellules haploïdes de levures, la réparation par HR est restreinte aux phases S/G2 du cycle cellulaire alors que le NHEJ agit tout au long du cycle cellulaire (Rothkamm et al., 2003; Aylon and Kupiec, 2004). Cette restriction chez les mammifères permet aux cellules de réparer grâce à la chromatine sœur, qui n'est pas présente dans les cellules en phase G1, donc avant réplication. A l'inverse, les cellules diploïdes de levures sont capables d'utiliser efficacement la RH pour la réparation des CDBs grâce aux chromosomes homologues (Bressan et al., 1999; Fabre, 1978) à n'importe quel phase du cycle cellulaire. Ainsi, dans les cellules diploïdes de *S. cerevisiae*, le NHEJ est inhibé par la répression transcriptionnelle des gènes *NEJ1* et *LIF1* dont les produits protéiques sont essentiels à cette voie de réparation (Shrivastav et al., 2008). Cette différence de capacité à réparer entre cellules diploïdes de levures et de mammifères pourraient s'expliquer par la probabilité de rencontre

aléatoire entre les chromosomes homologues qui semble être plus élevée dans un plus petit noyau comme celui de la levure que dans le noyau des mammifères (Stark and Jasin, 2003). Cette hypothèse est appuyée par le fait que la recombinaison mitotique est très efficace entre chromosomes homologues chez la drosophile, dans laquelle ces derniers sont groupés deux à deux (Fung et al., 1998). Enfin, le cycle cellulaire joue également un rôle plus actif dans la régulation de la RH du fait que la résection des extrémités est favorisée par des protéines kinases cycline-dépendantes (CDKs). Ainsi, chez la levure, haploïde, l'activité des CDKs est requis pour une résection des CDBs efficace et par conséquent pour une HR efficace en en phase S/G2 (Aylon et al., 2004; Ira et al., 2004).

#### **I.4.3 Mécanismes moléculaires de réparation des CDBs par RH chez la levure**

*[Cette partie de l'introduction ci-dessous n'a pas vocation à décrire très précisément chaque étape de chaque voie de réparation des cassures double-brin, ni de fournir une liste exhaustive des protéines impliquées mais plutôt de donner une vision d'ensemble de ces voies avec les protéines clés, chez la levure.]*

Dans la majorité des cas, la réparation d'une CDB par RH se fait par le biais de la réplication, en utilisant la séquence homologue comme matrice. La RH repose principalement sur la capacité d'un ADN simple brin à former un appariement Watson-Crick avec un autre fragment d'ADN partageant de l'homologie de séquence. Cette séquence homologue peut être présente sur le même brin d'ADN présentant la CDB, la chromatide sœur, un chromosome homologue ou encore un ADN exogène. Comme énoncé précédemment, la première étape, commune à toutes les différentes voies de la RH, est la dégradation bidirectionnelle des extrémités 5' des brins d'ADN de la CDB. Les extrémités 3' simples brins ainsi produites vont alors envahir une séquence homologue grâce à l'action de la protéine Rad51 (dans les mécanismes RH dépendante de de Rad51, qui incluent le SDSA, le DSBR (aussi appelé résolution des dHJ) et certains évènements de *Break induced replication* (BIR)) ou alors vont directement s'apparier

avec une séquence répétée à proximité de la CDB, dans le cas de la SSA (RH non dépendante de Rad51). Que la voie de RH dépende ou non de Rad51, chez *S. cerevisiae*, toutes les voies de RH sont dépendantes de Rad52. La protéine Rad52 permet l'assemblage des protéines Rad51 sur les simples brins de la CDB et aligne également des simples brins d'ADN complémentaires, c'est pourquoi elle a un rôle clé dans la RH (Mortensen et al., 1996). Cette protéine fait partie du groupe épistatique qui inclut les protéines Rad50, Rad51, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11 et Xrs2, toutes impliquées dans la réparation des CDBs par RH (Symington, 2002). Les homologues des gènes du groupe de Rad52 ont été identifiés chez de nombreux eucaryotes et même chez certains procaryotes et archées, indiquant une forte conservation de la HR (Symington, 2002).

### **Initiation de la RH : la résection des extrémités 5' de la CDB comme point de décision**

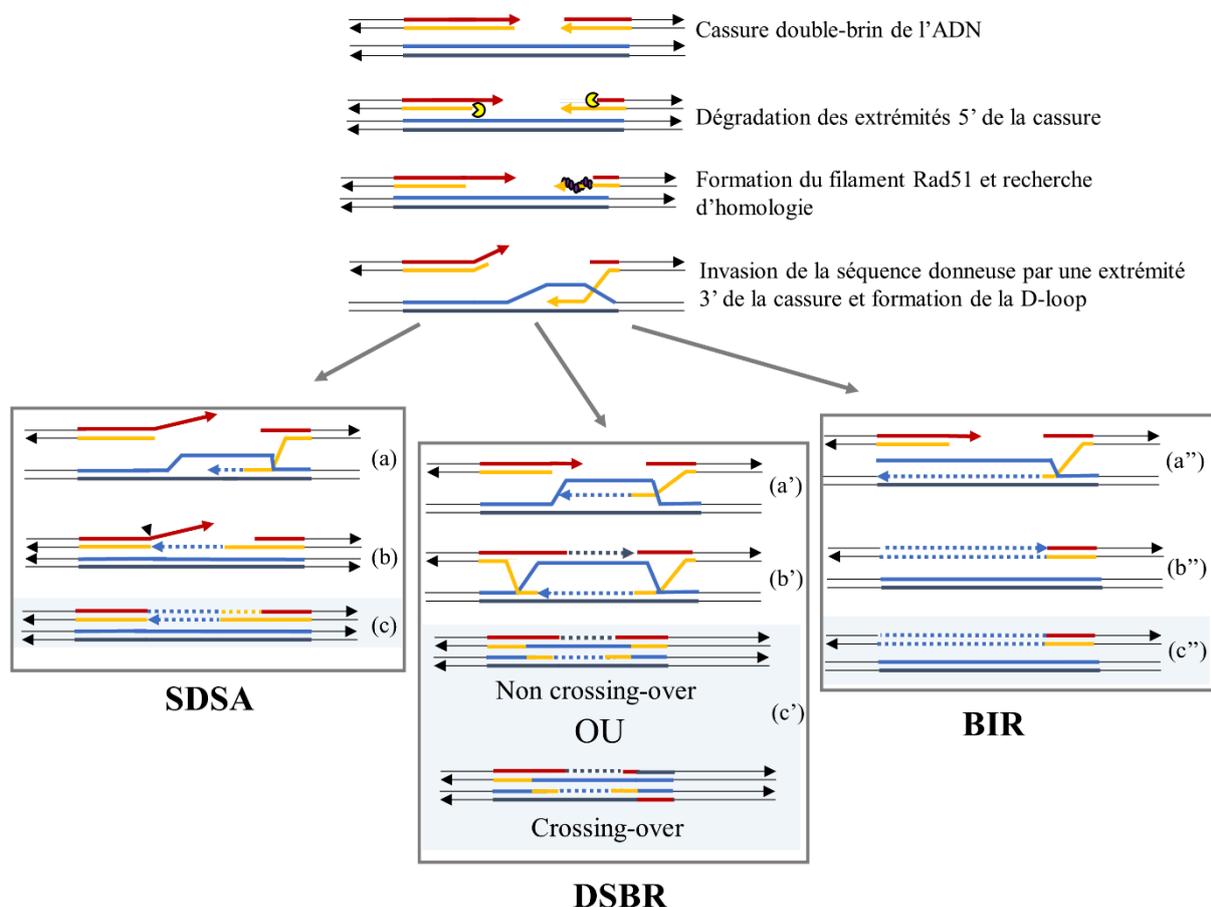
Comme énoncé ci-dessus, l'étape clé qui détermine l'entrée dans la voie de la RH est la génération d'extrémités 3' simples brins par la dégradation des extrémités 5' de la CDB. Dans cette voie et chez la levure, la résection des extrémités 5' vers 3' des extrémités de la cassure double-brin, implique notamment le complexe MRX (Rad50, Mre11 et Xrs2) pour l'initiation de la dégradation (Sugawara and Haber, 1992; Tsubouchi and Ogawa, 1998; Ivanov et al., 1994), et les protéines Exo1 ou du complexe hélicase STR (Sgs1, Top3 et Rmi1) qui poursuivraient cette dégradation (Niu et al., 2010).

### **Assemblage des protéines Rad51 sur les extrémités 3' de la CDB et envahissement de la séquence homologue : un autre point de décision**

Suite à la dégradation des extrémités 5' de la CDB et dans la quasi-totalité des voies de RH, comme décrit plus haut, les protéines Rad51 s'assemblent sur les longs simples brins de la CDB ainsi produits, assemblage qui dépend de la protéine Rad52 (Sugawara et al., 2003; Wolner et al., 2003). Cette étape forme un filament

nucléoprotéique qui a la capacité de rechercher une région d'homologie à celle de la CDB, et ce dans le génome entier. Cette voie repose sur la famille des protéines des recombines homologues RecA (*Escherichia coli*, bactérie)/Rad51 (*S. cerevisiae*, levure)/Dmc1 (humain) (Symington et al., 2014). De façon intéressante, il a été montré que la recombinaise Rad51 était capable d'inhiber la voie de SSA et en même temps de promouvoir l'invasion impliquée dans la RH dépendante de Rad51 (Ivanov et al., 1996), permettant ainsi de privilégier une voie de réparation plus fidèle. L'aboutissement de cette recherche d'homologie est l'échange de brins d'ADN entre homologues qui peut prendre plusieurs formes.

Dans le cadre de la RH type **SDSA**, un simple brin de la CDB envahit et s'apparie avec la séquence complémentaire de la séquence donneuse, formant ainsi une D-loop (pour *displacement loop*) ainsi qu'une jonction de Holliday (Figure 5).



**Figure 5. Schéma du mécanisme moléculaire des voies SDSA, DSBR et BIR (modifié d'après (Li and Heyer, 2008)).** (a) Synthèse d'ADN. (b) Résolution de la jonction

de Holliday et dégradation de l'extrémité non homologue de la CDB. (c) Synthèse d'ADN du second brin puis ligature des extrémités. (a') Synthèse d'ADN et déplacement de la D-loop. (b') Formation d'une double jonction de Holliday : le deuxième brin de la CDB s'aligne et recopie sur le deuxième brin de la séquence homologue donneuse. (c') Résolution des jonctions de Holliday avec ou sans crossing-over (seulement deux possibilités sur les quatre possibles sont illustrées) puis ligature des extrémités. (a'') Synthèse d'ADN sur une très longue portion. (b'') Résolution de la jonction de Holliday et synthèse du deuxième brin de la CDB. (c'') Ligature des extrémités.

L'extrémité 3' du brin envahissant est ensuite utilisée comme amorce afin d'initier le recopiage de la séquence donneuse. Le nouveau brin synthétisé est ensuite dissocié de la séquence donneuse afin de s'hybrider avec des séquences homologues présentes sur le deuxième brin d'ADN de la CDB non impliqué dans la D-loop. L'extrémité 3' non homologue de ce deuxième brin est ensuite clivée par les endonucléases Rad1 et Rad10 laissant une nouvelle extrémité 3' qui peut alors servir d'amorce afin de copier le brin nouvellement synthétisé (Ivanov and Haber, 1995). Cette voie n'implique pas de CO, c'est-à-dire qu'il n'y a d'échange réciproque entre le brin de la CDB envahissant et le brin de la séquence donneuse envahie, c'est ainsi la voie de réparation des CDBs la plus fidèle.

Dans le cas de la RH type **DSBR, ou résolution des dHJ**, et contrairement à la voie précédente, celle-ci peut impliquer un échange réciproque d'ADN entre la séquence donneuse et les séquences de la CDB. Ainsi, les deux extrémités de la CDB sont impliquées avec les séquences donneuses, créant une paire de jonctions de Holliday. Les jonctions de Holliday sont résolues en coupant les brins intérieurs ou extérieurs de la jonction. Cela aboutit soit à un ou des COs soit à un non-crossing-over

(NCO). Ce modèle correspond à l'ancien modèle de Szostak (Szostak et al., 1983), le modèle SDSA étant plus récent il correspond mieux aux résultats observés. En effet, le modèle dHJ implique que 50% des évènements de réparation aboutissent à un CO, ce qui n'est pas le cas en mitose, ni en méiose (Pâques and Haber, 1999).

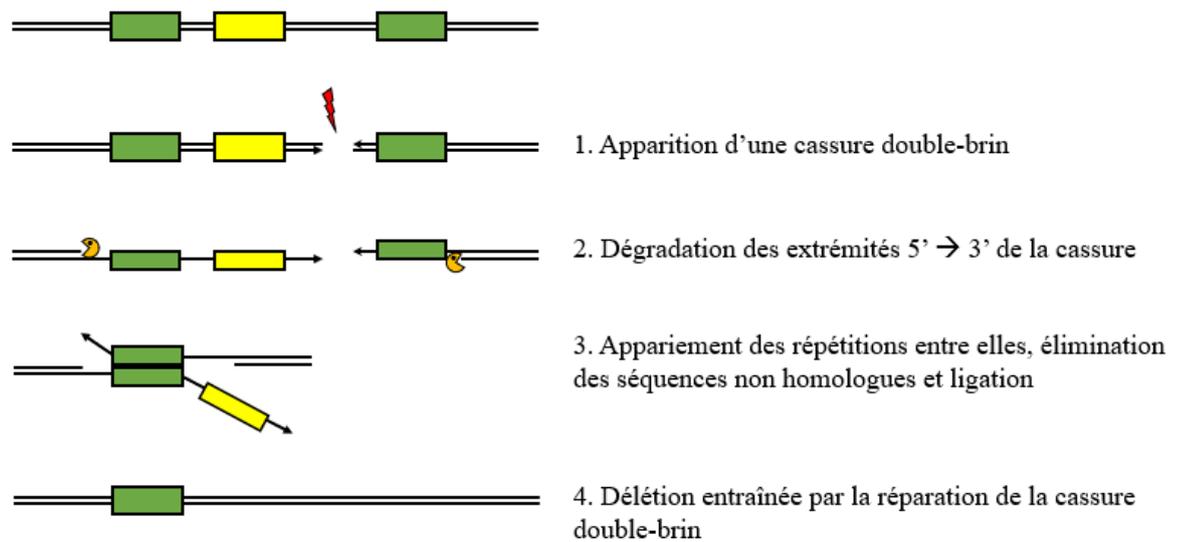
Enfin, dans le cas de la RH type **BIR Rad51-dépendant**, une extrémité 3' de la CDB envahit une séquence homologue, formant une D-loop avec une jonction de Holliday, et recopie une très longue portion d'ADN grâce à la sous-unité Pol32 de la polymérase ADN Pol $\delta$  (Llorente et al., 2008). Ce n'est qu'après que la jonction de Holliday soit résolue sans CO que le deuxième brin de la CDB recopie sur le premier brin néosynthétisé de la CDB (Saini et al., 2013). De ce fait, les deux brins d'ADN néosynthétisés sont obtenus de façon conservative et la séquence donneuse reste intacte (Saini et al., 2013). Ce processus intervient lorsque seulement une extrémité de la CDB partage assez d'homologie avec une séquence donneuse à proximité de la cassure ou lorsque que la CDB intervient à une extrémité tel qu'un télomère ou une fourche de réplication cassée (Llorente et al., 2008). La synthèse d'ADN intervenant dans le BIR est 1 000 fois plus mutagène que la réplication normale de l'ADN, avec des sauts de matrice fréquents (Malkova and Haber, 2012; Smith et al., 2007). Ce type de réparation peut aboutir à de longues régions de perte d'hétérozygotie chez des diploïdes, et à des duplications accompagnées de perte de régions chromosomiques distales à la coupure (et donc non essentielles, chez des haploïdes, où le BIR serait intervenu entre régions homologues sur des chromosomes hétérologues).

### **Cas particuliers de la RH type SSA et BIR Rad51-indépendant**

Il existe également une voie de **BIR indépendante de Rad51**, bien que non totalement élucidée. Le laboratoire de J. Haber a montré que dans une souche diploïde homozygote  $\Delta rad51$ , une CDB pouvait être réparée par BIR (Malkova et al., 1996). Cette voie de BIR est donc indépendante de Rad51 mais requiert toujours la protéine Rad52 (Malkova et al., 1996). Le même laboratoire a ensuite identifié une séquence de 200

pb, nommée FBI (pour *Facilitator of BIR*), qui stimule la voie de BIR Rad51-indépendant (Malkova et al., 2001). Cette séquence FBI pourrait agir jusqu'à, au moins, 34 kb de la CDB (Malkova et al., 2001).

La RH type **SSA** implique également une recherche d'homologie de séquence indépendante de Rad51, mais toujours dépendante de Rad52 (Ivanov et al., 1996). Le SSA est la forme la plus simple de la RH mais c'est également l'une des voies de la RH les plus mutagènes. Elle entraîne une variation du nombre de copies des séquences répétées ainsi que des réarrangements génomiques comme des délétions entre les répétitions. Le SSA répare efficacement les CDBs formées entre des séquences répétées sur la même molécule d'ADN (répétitions en tandem séparées par un espaceur) dont la longueur est supérieure à 200 pb (Sugawara et al., 2000) (Figure 6). Après la résection caractéristique de la RH et grâce à la protéine Rad52 (Mortensen et al., 1996), les séquences répétées s'alignent par envahissement des simples brins (Figure 6), des queues hétérologues aux séquences répétées peuvent alors être formées si les répétitions sont séparées de la CDB par une séquence unique. Ces queues hétérologues sont alors clivées par un complexe de protéines, dont l'activité nucléique réside dans les protéines Rad1 et Rad50 (Ivanov and Haber, 1995), avant qu'il n'y ait ligation des extrémités.



**Figure 6. Schéma simplifié du mécanisme de SSA.** Les rectangles représentent des séquences répétées (en vert) ou non répétées (en jaune), l'éclair rouge une CDB et les pacmans des nucléases capables de digérer les extrémités 5'. Dans cette illustration les séquences répétées sont séparées de la CDB par une séquence unique qui est éliminée par le processus de réparation du SSA.

#### I.4.4 Mécanismes moléculaires de réparation des CDBs par NHEJ chez la levure

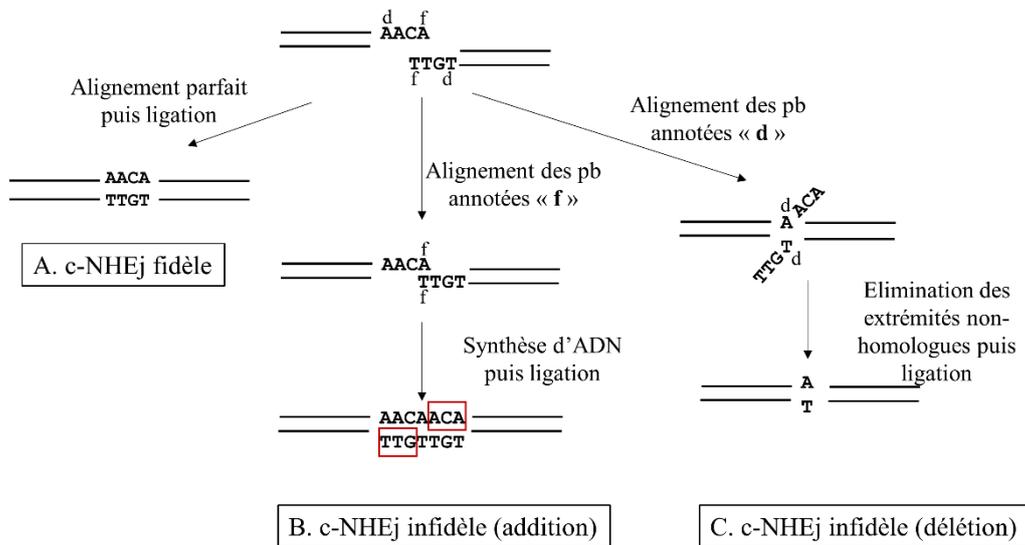
*[Une nouvelle fois, cette partie de l'introduction ci-dessous n'a pas vocation à décrire très précisément chaque étape de chaque voie de réparation des CDBs, ni de fournir une liste exhaustive des protéines impliquées mais plutôt de donner une vision d'ensemble de ces voies avec les protéines clés, chez la levure.]*

Le NHEJ répare, majoritairement, une CDB par la ligation directe des extrémités de cette cassure et peut reconfigurer des extrémités non compatibles (des extrémités ne pouvant réaliser un appariement Watson-Crick parfait). Plusieurs voies de NHEJ existent (Emerson and Bertuch, 2016) dont l'implication dans la réparation des CDBs dépend de l'étape du cycle cellulaire à laquelle est la cellule (Moore and Haber, 1996). La voie de NHEJ la mieux caractérisée est le *classical NHEJ* (c-NHEJ). Le c-NHEJ existe dans les trois domaines de l'arbre du vivant et est fortement conservé des levures aux êtres humains qui requièrent les protéines Ku70 et Ku80 (nommées *HDF1* and *HDF2*

chez *S. cerevisiae* mais que j'appellerai ici YKu70 et YKu80), la ligase ADN 4 (Dnl4 chez *S. cerevisiae*) et XRCC4 (Lif1 chez *S. cerevisiae*) (Chang et al., 2017; Rodgers and McVey, 2016; Seol et al., 2018). Chez *S. cerevisiae*, une autre protéine, Nej1, est impliquée dans le c-NHEJ (Hentges et al., 2006). Même si son rôle précis n'est pas encore connu, on sait que cette protéine interagit avec Dnl4, et Lif1, et qu'elle est nécessaire pour la ligation des extrémités (Frank-Vaillant and Marcand, 2001; Kegel et al., 2001; Ooi et al., 2001). De plus toujours chez *S. cerevisiae*, la ligation des extrémités du c-NHEJ nécessitent le complexe MRX (*RAD50*, *XRS2*, and *MRE11*) (Moore and Haber, 1996). Il est important de relever que le c-NHEJ est indépendant des protéines Rad1, Rad2, Rad51, Rad52, Rad54, Rad57 et Rad55 (Pâques and Haber, 1999).

La cinétique de la mise en place des différentes protéines impliquées dans le c-NHEJ n'est pas complètement élucidée, toutefois les grandes étapes du mécanisme de c-NHEJ chez la levure sont les suivantes. Rapidement après la formation de la CDB et avant une éventuelle initiation de la résection des extrémités 5', le complexe MRX ainsi que les protéines Ku70/80 se lient aux extrémités de la CDB. Il n'est pas connu quelles protéines se lient en premier ainsi que leurs places respectives exactes au niveau de la CDB (Daley et al., 2005). Toutefois, il est connu que les protéines Ku70 et Ku80 ont pour action de protéger les extrémités de la CDB de la résection (Lisby et al., 2004) et que le complexe MRX est capable de rapprocher les extrémités de la CDB, au moins *in vitro* (Chen et al., 2001). Les protéines YKu et le complexe MRX recrutent ensuite la ligase Dnl4 au niveau de la CDB (Chen et al., 2001). L'action coordonnée de ce complexe de réparation essentiel (le complexe MRX, YKu70, YKu80, Lif1, Nej1 et Lig4) avec des facteurs capables de traiter les extrémités de la CDB facilite l'alignement des deux brins d'ADN de la CDB : l'appariement de paires bases sur des séquences très courtes a lieu. Chez *S. cerevisiae*, une à cinq paires de bases strictement homologues sont nécessaires pour aligner les deux extrémités d'une CDB au cours du c-NHEJ (Mézard et al., 1992). À la suite de cet appariement, les facteurs capables de traiter les extrémités de la CDB produisent des extrémités compatibles (élimination d'éventuelles paires de bases non homologues aux extrémités à la suite de l'alignement, synthèse d'ADN pour combler

des brèches simple-brins s'il y a...). Pour finir, la ligase Dnl4 lie ces extrémités et le complexe de réparation se dissout. Cette réparation peut être conservative (c-NHEJ fidèle) ou non-conservative (c-NHEJ infidèle), selon comment sont traitées et liguées les extrémités celle-ci peut entraîner des pertes ou gains de nucléotides au niveau de la CDB (Figure 7).



**Figure 7. Résultats possibles de la réparation par c-NHEJ de la CDB réalisée par la protéine Ho au locus MAT chez *S. cerevisiae* (modifié d'après (Pâques and Haber, 1999)).** La protéine Ho reconnaît un site spécifique au locus MAT chez *S. cerevisiae* et sa coupure génère des extrémités 3' cohésives de 4 pb. Si ces extrémités sont directement liguées sans qu'il y ait de mauvais alignements, donc ici si la séquence « AACAC » s'aligne parfaitement avec la séquence « TTGT » alors le site de coupure de Ho est recréé à l'identique (A), on parle de c-NHEJ fidèle. À l'inverse, dans cet exemple, si les paires de bases notées **f** s'alignent, alors à la suite d'une synthèse d'ADN puis d'une ligation, cela génère l'insertion de trois nucléotides, entourés en rouge sur le schéma (B) (c-NHEJ infidèle). De même, si les paires de bases notées **d** s'alignent, alors à la suite de l'élimination des extrémités non-homologues puis d'une ligation, cela génère la délétion de trois nucléotides (C) (c-NHEJ infidèle).

Il existe d'autres sous-voies du NHEJ (alt-NHEJ pour *alternative NHEJ*) qui diffèrent selon les acteurs protéiques du c-NHEJ qu'elles impliquent. Il n'est pas encore élucidé si le alt-NHEJ est médié par une voie précise qui lui est dédiée ou si ce NHEJ est une extension du c-NHEJ dans lequel des facteurs se substituent à d'autres (Emerson and

Bertuch, 2016). Plusieurs mécanismes de alt-NHEJ existent chez la levure mais restent, aujourd'hui encore, peu caractérisés. Bien que ces derniers nécessitent le complexe MRX (Lee and Lee 2007; Ma et al. 2003; Paull and Gellert 2000), les résultats sont contradictoires concernant la dépendance du alt-NHEJ de certains facteurs comme Dnl4 ou Pol4, par exemple (Galli et al. 2015; Lee and Lee 2007; Ma et al. 2003; Meyer et al. 2015). Une des voies alt-NHEJ est le *Microhomology mediated end-joining* (MMEJ). Cette voie implique la présence de micro-homologies (~8 pb) et leur alignement entre les deux brins de la CDB (Ma et al. 2003). Alors que la réparation par c-NHEJ infidèle mène à une insertion ou délétion de 5pb ou moins, la réparation par MMEJ entraîne des délétions de 5 à 20 pb (Lee and Lee 2007; Ma et al. 2003). Le MMEJ est indépendant des protéines Rad52 YKu70/80 mais nécessite les protéines Rad1/Rad10, probablement pour enlever les extrémités non-homologues formées à la suite de l'alignement de micro-séquences homologues et éloignées de la CDB (Ma et al. 2003).

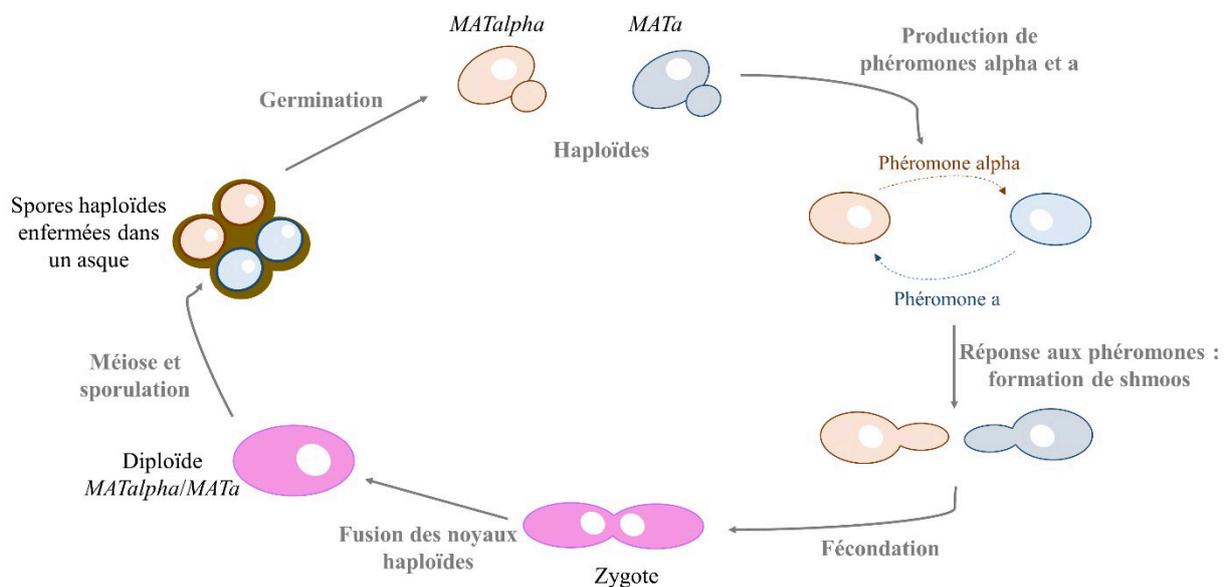
## **I.5 Le changement de type sexuel chez *Saccharomyces cerevisiae***

Le changement de type sexuel le mieux caractérisé est celui de l'espèce modèle *S. cerevisiae*. Son étude a mené à des avancées importantes dans la compréhension de plusieurs processus cellulaires fondamentaux, comme les voies de signalisation de l'identité cellulaire, la réparation des CDBs de l'ADN ou encore l'influence de la structure de la chromatine sur l'expression des gènes (Lee and Haber, 2015).

### **I.5.1 Identité cellulaire**

Chez *S. cerevisiae*, l'identité cellulaire est portée par le locus *MAT* qui peut être présent sous deux formes alternatives, nommées idiomorphes comme expliqué plus haut : *MATalpha* ou *MATa*. Ces idiomorphes déterminent le type sexuel de la cellule haploïde qui le porte. Le locus *MATalpha* contient les gènes *ALPHA1* et *ALPHA2* alors que le locus *MATa* contient le gène *A1*. Ces gènes codent des facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes cibles qui déterminent l'identité de la cellule (haploïde, de type sexuel *MATalpha* ou *MATa*, ou diploïde *MATalpha/MATa*). Le gène

*ALPHA1* code un facteur de transcription qui va réguler les gènes clés de l'identité cellulaire dans une cellule *MATalpha* alors que les gènes *ALPHA2* et *A1* codent des facteurs de transcription qui vont réguler les gènes clés de l'identité cellulaire d'une cellule diploïde et de la reproduction sexuée. Le cycle sexué de *S. cerevisiae* est présenté Figure 8.



**Figure 8. Cycle de reproduction d'une souche hétérothallique (une souche mutante pour le gène *HO*) de *S. cerevisiae* (modifié d'après (Haber, 2012)).**

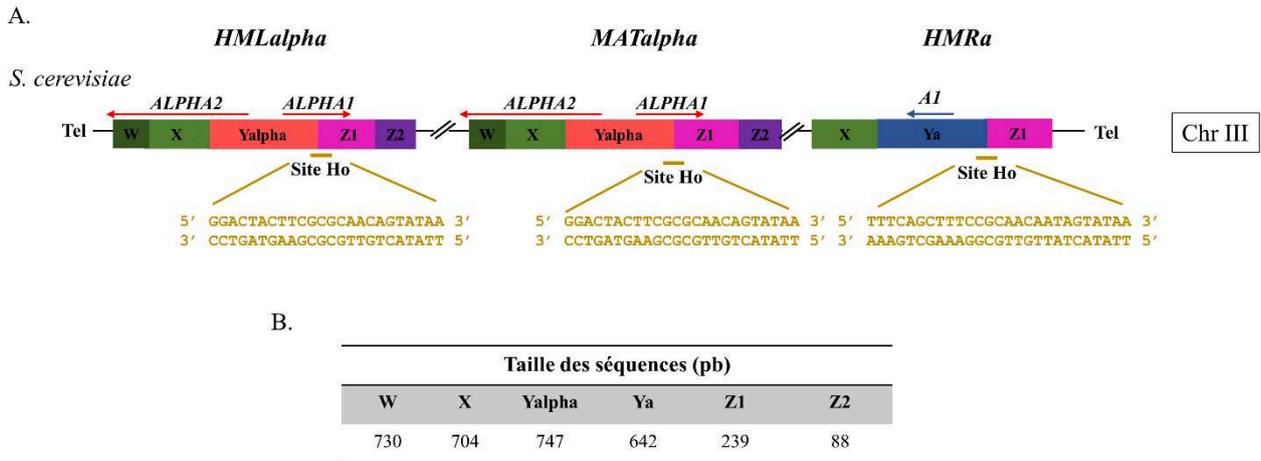
Dans une cellule *MATa*, les gènes spécifiques « a » sont exprimés constitutivement et n'ont donc pas besoin d'être activés. Ces gènes comprennent, entre autres, ceux codant la phéromone sexuelle le « facteur a » (permettant de provoquer la réponse sexuelle des cellules *MATalpha*), et le récepteur transmembranaire au « facteur alpha », phéromone du type opposé, Ste3. Dans une cellule *MATalpha*, la protéine Alpha1, en conjugaison avec la protéine Mcm1, exprimée constitutivement dans la cellule, active l'ensemble des gènes spécifiques de la cellule *MATalpha* comme le gène codant le

« facteur alpha » (permettant de provoquer la réponse sexuelle des cellules *MAT $\alpha$* ) (Haber, 2012) et le récepteur transmembranaire au « facteur a », Ste2. Ce système de phéromone/récepteur permet de provoquer la réponse sexuelle chez la cellule de type sexuel opposé, aboutissant à la fécondation des deux cellules *MAT $\alpha$*  et *MAT $\alpha$*  (Haber, 2012). Les « facteurs a et alpha » par leur fixation à leur récepteur respectif chez la cellule de type sexuel opposé, provoquent l'arrêt de cette cellule en phase G1 du cycle cellulaire et facilite la conjugaison, ce qui assure que le zygote contient deux noyaux non répliqués. L'action de ces facteurs « a et alpha » facilite la conjugaison en entraînant une projection cellulaire chez la cellule de type sexuel opposé, un shmoo, vers la source de la phéromone alpha ou a (Figure 8).

La protéine Alpha2 en complexe avec Mcm1 réprime les gènes spécifiques des cellules *MAT $\alpha$* . Dans une cellule diploïde, *MAT $\alpha$* /*MAT $\alpha$* , les deux idiomorphes sont présents, et a1 forme un hétérodimère avec la protéine Alpha2 afin de réprimer les gènes de l'haploïdie comme *ALPHA1* et à l'inverse activer les gènes de la diploïdie comme les gènes de la méiose (Haber, 2012).

### **I.5.2 Structure des trois locus sexuels de *S. cerevisiae***

Il existe de part et d'autre du locus *MAT*, situés sur le même chromosome, deux autres locus : *HML* (pour *Hidden MAT Left*) et *HMR* (pour *Hidden MAT Right*) portant des copies des gènes *ALPHA1* et *ALPHA2*, et *A1*, respectivement. La structure des trois locus est présentée Figure 9.



**Figure 9. Structure des locus sexuels *HML*, *MAT* et *HMR* chez *S. cerevisiae* (A) et taille des différentes séquences les composant (B) (modifié d'après (Maroc et al., 2020)).** Le site Ho de chaque locus est représenté en jaune.

Les trois locus peuvent être divisés en cinq régions définies selon les séquences identiques strictement partagées entre le locus *MAT* et les locus *HML* et *HMR* (Lee and Haber, 2015). Les trois locus sexuels partagent les régions nommées Z1 et X, situées de part et d'autre de la région Y, qui, elle, contient l'information « alpha » ou « a ». Les locus *HML* et *MAT* partagent deux séquences identiques additionnelles, nommées Z2 et W, augmentant leur homologie de 93 pb (les locus *MAT* et *HMR* partagent 230 pb alors que *MAT* et *HML* partagent 327 pb). Les trois locus sont localisés sur le chromosome III de *S. cerevisiae*. Le locus *MAT* se situe au milieu du bras droit du chromosome III à ~100 kb du centromère et du télomère. Les locus *HML* et *HMR* sont tous deux localisés dans des régions sub-télomériques ; *HML* sur le bras gauche du chromosome III à ~20 kb du locus *MAT* et 12 kb du télomère et *HMR* sur le bras droit à ~100 kb du locus *MAT* et 23 kb du télomère (Lee and Haber, 2015).

### I.5.3 Etat chromatinien aux locus *HML* et *HMR*

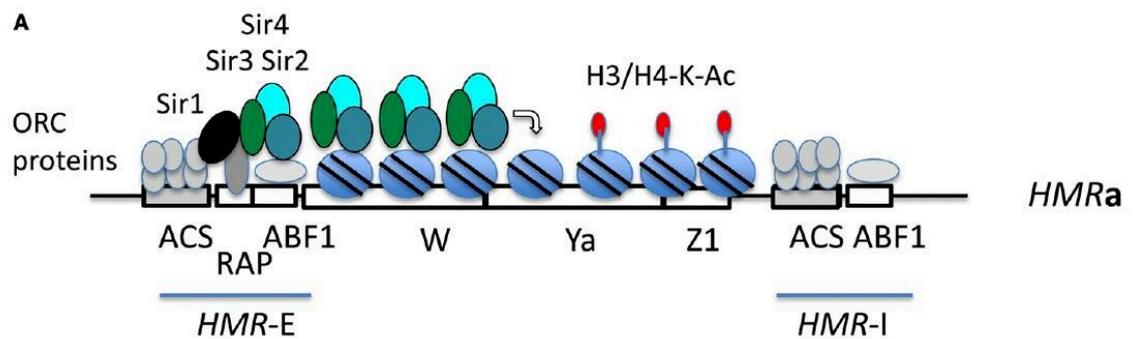
Contrairement au locus *MAT*, les locus *HML* et *HMR* n'expriment pas l'information qu'ils contiennent en raison de l'état chromatinien dans lequel sont les

deux locus. Chez les eucaryotes, la chromatine permet de compacter l'ADN afin qu'il puisse être contenu dans le noyau. Cette organisation implique l'enroulement de l'ADN autour d'un cœur de protéines histones, appelés nucléosomes (Bertin and Mangenot, 2008). Les histones sont sujets à des modifications post-traductionnelles qui influencent la régulation des gènes. Les histones modifiées sont notamment impliquées dans la régulation des gènes à *HMLalpha* et *HMRa*.

### **Etablissement et maintien de la répression génique à *HML* et *HMR* : le rôle clé des protéines Sir**

Les deux locus sont chacun entourés par des paires de séquences régulatrices, nommées *HML-E* et *HML-I*, et *HMR-E* et *HMR-I* respectivement (E pour *essential* et I pour *important*) (Abraham et al., 1984; Brand et al., 1985). Ces séquences permettent de recruter directement et indirectement des éléments régulateurs afin de réprimer la transcription des gènes entourés par ces séquences. Parmi ces éléments, se trouvent les protéines sirtuines, Sir1-4, dont l'enzyme clé est la lysine désacétylase NAD<sup>+</sup> dépendante, Sir2, qui est responsable de la désacétylation d'un certain nombre de lysines sur la queue N-terminale des histones H3 et H4 (Imai et al., 2000). Chez la levure, la drosophile ainsi que les mammifères, cette désacétylation est associée à la répression génique (Blander and Guarente, 2004). Les protéines sirtuines sont conservées dans l'arbre du vivant et plus particulièrement, le gène *SIR2* codant la protéine Sir2, est hautement conservé dans des organismes éloignés allant des archées aux êtres humains. La protéine Sir2 a été la première sirtuine identifiée, chez *S. cerevisiae*, et a été nommée *Silent mating-type information regulation 2* après la découverte de son rôle dans la régulation cellulaire chez cette levure (répression génique des séquences répétées, des locus *HML* et *HMR*, des séquences contenues dans les télomères ainsi que de l'ADN ribosomal) (Blander and Guarente, 2004). La poursuite de la recherche sur les sirtuines a permis de mettre en évidence un lien entre les sirtuines et la sénescence cellulaire chez la levure, la drosophile, le ver *Caenorhabditis elegans* ainsi que chez les mammifères (Guarente, 2007; MICHAN and SINCLAIR, 2007)

Pour revenir à l'établissement de la répression génique à *HML* et *HMR* chez *S. cerevisiae*, aucune des protéines Sir ne se lie directement à l'ADN ; les protéines ORC (*Origin recognition complex*) se lient à *HMR-E* puis recrutent les protéines Sir formant un complexe multi-protéique (Moazed et al., 1997). L'exemple de l'établissement de la répression génique à *HMR-E* est montré Figure 10.



**Figure 10. Etablissement de la répression génique à *HMR* chez *S. cerevisiae* (d'après (Haber, 2012)).** Les protéines ORC qui se fixent directement à la séquence d'ADN *HMR-E* recrutent la protéine Sir1 qui en retour recrute le complexe Sir3-Sir4. Ce même complexe recrute la protéine Sir2 aboutissant à la formation du complexe Sir3-Sir4-Sir2. La protéine Sir2 va désacétyler les lysines des queues d'histone H3 et H4 adjacents, permettant au complexe des protéines Sir3-Sir4 de se lier à ces queues d'histones et de recruter de nouveau Sir2 et ainsi de suite. Sur ce schéma, la répression génétique n'est représentée que dans une direction, depuis *HMR-E*, mais elle se propage en réalité de deux directions : depuis *HMR-E* et depuis *HMR-I*.

Ainsi, la régulation de l'acétylation des queues d'histones H3 et H4 joue directement un rôle dans la répression génique à *HML* et *HMR*. La forme acétylée de la lysine 16 de l'histone H4 (marque H4K16Ac) favorise la fixation des protéines Sir4-Sir2 (dont Sir2 peut ensuite provoquer une désacétylation) alors que la marque H4K16Ac a une affinité réduite pour Sir3 (Oppikofer et al., 2011), ce qui va jouer sur les interactions/fixation des protéines Sir. Ainsi, ces interactions mettent en place le mécanisme progressif d'extinction génique dans lequel Sir2 désacétyle l'histone

adjacente, permettant à Sir3 de s'y fixer et propageant ainsi la formation d'hétérochromatine (Moazed et al., 1997). Il est attendu que l'établissement de la répression génique se fasse d'une manière similaire à *HMR* qu'à *HML* mais cela n'a pas été étudié en détails. L'établissement de la répression génique a pour finalité la formation de régions d'environ 3kb d'hétérochromatine, au sein desquelles se trouvent les séquences de *HML* et *HMR* (Ravindra et al., 1999; Weiss and Simpson, 1998). Ces régions d'hétérochromatine empêchent alors la transcription des gènes par les polymérase PolII ou PolIII et de plus, ces régions sont résistantes à la coupure par l'endonucléase Ho (Loo and Rine, 1994).

Afin de maintenir la répression génique aux locus *HML* et *HMR* via l'hétérochromatine, cette hypo-acétylation des queues d'histones doit être parfaitement répliquée sur les deux chromatides sœurs pendant la phase S de réplication. Toutefois, le processus permettant l'héritabilité de l'état chromatinien au cours de la réplication de l'ADN n'est pas tout à fait clair mais requiert l'interaction entre certains régulateurs de la chromatine avec différents facteurs du réplisome (Brothers and Rine, 2019).

### **Différence entre les mécanismes de répression génique à *HML* et *HMR***

Malgré le fait que les locus *HML* et *HMR* aient, *a priori*, exactement le même rôle dans le changement de type sexuel, plusieurs différences dans les mécanismes de répression génique impliqués à ces locus ont été mises en évidence même si les causes de celles-ci n'ont pas encore été clairement élucidées.

Une première différence a pu être observée dans l'importance qu'ont les séquences *HML-E* et *HML-I* ou *HMR-E* et *HMR-I* dans la répression génique à *HML* et *HMR*. La séquence *HMR-E* seule est suffisante pour éteindre l'expression du gène *A1* à *HMRa* alors que la séquence *HMR-I* seule ne suffit pas à permettre cette répression sans *HMR-E* (Abraham et al., 1984; Brand et al., 1985). A l'inverse, la séquence seule *HML-E* ou *HML-I* est suffisante pour éteindre l'expression génique à *HMLalpha* (Mahoney and Broach, 1989).

L'utilisation d'histone H3 ou H4 modifiés a également pu mettre en évidence des différences dans la répression génique mise en place à *HML* et *HMR*. Alors qu'une seule mutation, le remplacement de la lysine K26 de l'histone H4 par une adénine (mutation H4K16A), entraîne une levée de la répression génique à *HML*, celle-ci a peu d'effet sur la répression génique à *HMR* (Park and Szostak, 1990). Il semblerait que cette différence soit due à un contexte chromosomique ; si les locus *HML* et *HMR* sont insérés à 50 kb chacun du télomère sur le chromosome VI, les deux locus montrent un défaut d'extinction génique lorsque la H4K16 est mutée (Thompson et al., 1994). Aussi, une délétion de la queue de l'histone H3 entraîne une activation de l'expression génique à *HML* mais pas à *HMR*, que *HMR* soit *HMRalpha* ou *HMRa* (Haber, 2012). Il est possible que d'autres séquences intervenant dans l'extinction génique de *HMR* n'aient pas été encore identifiées et que celles-ci permettent une extinction génique plus forte qu'au locus *HML*. Enfin, la répression génique à *HML* requiert les protéines-transacétylases Nat1 et Ard1. Il a été montré que la délétion de Ard1 n'entraînait pas une levée de l'extinction génique à *HMR* alors qu'elle permet au locus *HML* d'être fortement exprimé (Whiteway et al., 1987).

#### **I.5.4 Le mécanisme de changement de type sexuel**

Le changement de type sexuel est initié par l'endonucléase Ho qui coupe le locus *MAT*, qu'il soit *MATalpha* ou *MATa*, au niveau de son site de reconnaissance. Ce site de reconnaissance de 24 pb se situe à la jonction entre la région Z1, commune aux locus sexuels de type sexuel différent, et la région Y (Y11-Z13), propre à chaque locus sexuel portant l'information « alpha » ou « a ». Le site Ho est ainsi dit dégénéré puisque la séquence Yalpha différant de Ya, une partie du site Ho diffère selon que le locus porte l'information « alpha » ou « a ». La protéine Ho n'est donc pas une endonucléase de restriction mais fait partie de la famille des méganucléases qui reconnaissent des larges sites de restrictions (> 12 pb), dégénérés et non-palindromiques, dont les caractéristiques seront détaillées dans le sous chapitre « [I.6.1 Origine de la protéine Ho](#) ». Le site de coupure de Ho est également présent aux locus *HMLalpha* et *HMRa*

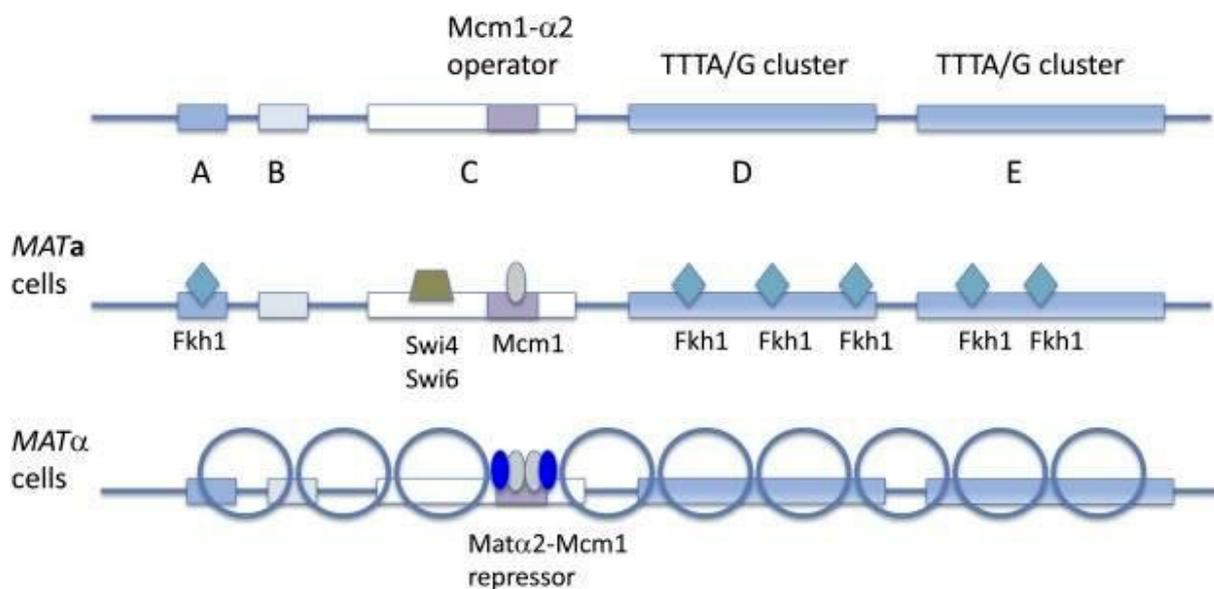
mais ceux-ci sont protégés de la coupure grâce à leur état chromatinien. La coupure du locus *MAT* par Ho entraîne une CDB avec des extrémités sortantes 3' de 4 pb (Nickoloff et al., 1986). La CDB réalisée par la protéine Ho est réparée par RH SDSA. Selon le type sexuel de la cellule, le locus *MAT* va être réparé en utilisant comme matrice de réparation *HML* ou *HMR*. L'information contenue au locus *MAT* (Yalpha ou Ya) va être effacée afin d'être remplacée par l'information présente à la matrice de réparation, Yalpha pour *HML* et Ya pour *HMR*. Cela aboutit à la conversion du locus *MATa* en *MATalpha* et *vice versa*. Etant donné que la coupure est réparée par SDSA, il s'agit d'un mécanisme « copier-coller » : l'information contenue au locus servant de matrice de réparation reste intacte, seule l'information au locus *MAT* coupé change. En effet, la CDB au locus *MAT* ne mène pas à un CO entre celui-ci et le locus servant de matrice de réparation. Les CO seraient majoritairement évités par l'action de deux hélicases Sgs1 (en complexe avec les protéines Top3 et Rmi1) et Mph1 (Ira et al., 2003; Prakash et al., 2009). Le complexe Sgs1 agit comme une « dissolvase » pour résoudre les jonctions d'Holliday qui sans ce complexe, mèneraient à l'apparition de COs (Ira et al., 2003). L'hélicase Mph1 s'assurerait que la voie de réparation SDSA soit utilisée afin de réparer la CDB au locus *MAT* à la place de l'autre voie de réparation des CDBs qui est prévalente lors de la méiose, afin de créer des COs (Prakash et al., 2009).

La réparation de la CDB par Ho au locus *MAT* par RH est également favorisée par l'inhibition, même incomplète, de la voie de réparation non homologue NHEJ. La CDB au locus *MAT* est réparée ~90 % du temps par recombinaison homologue (Lee and Haber, 2015) et 10 % par NHEJ qui relie les extrémités de la CDB (Kramer et al., 1994; Moore and Haber, 1996). Les mécanismes à l'origine de l'inhibition du NHEJ ne sont pas clairement élucidés mais il est probable que la résection efficace des extrémités de la CDB soient impliquées, étant donné qu'il a déjà été démontré que celle-ci était capable d'inhiber le NHEJ (Tomimatsu et al., 2017).

### I.5.5 Le mécanisme de la préférence du donneur

Le choix de la matrice *HML $\alpha$*  ou *HMR $\alpha$*  pour la réparation du locus *MAT* coupé par la protéine Ho ne se fait pas au hasard mais est dicté par un mécanisme complexe appelé préférence du donneur chez *S. cerevisiae*. Celui-ci permet un changement de type sexuel efficace, à quasiment chaque génération, en favorisant l'utilisation du locus de type sexuel opposé. Ce mécanisme repose notamment sur une séquence appelée RE (pour *recombinaison enhancer*) ainsi que sur le type sexuel présent au locus *MAT* (Wu and Haber, 1995).

La séquence RE, située dans une séquence inter-génique à 17 kb du locus *HML*, situé ainsi entre *HML* et le centromère, favorise l'utilisation du locus *HML* comme matrice pour la réparation de *MAT*. Elle peut être divisée en différents domaines selon leur importance dans l'activité du RE ainsi que des domaines de fixation protéique qu'ils contiennent (Figure 11).

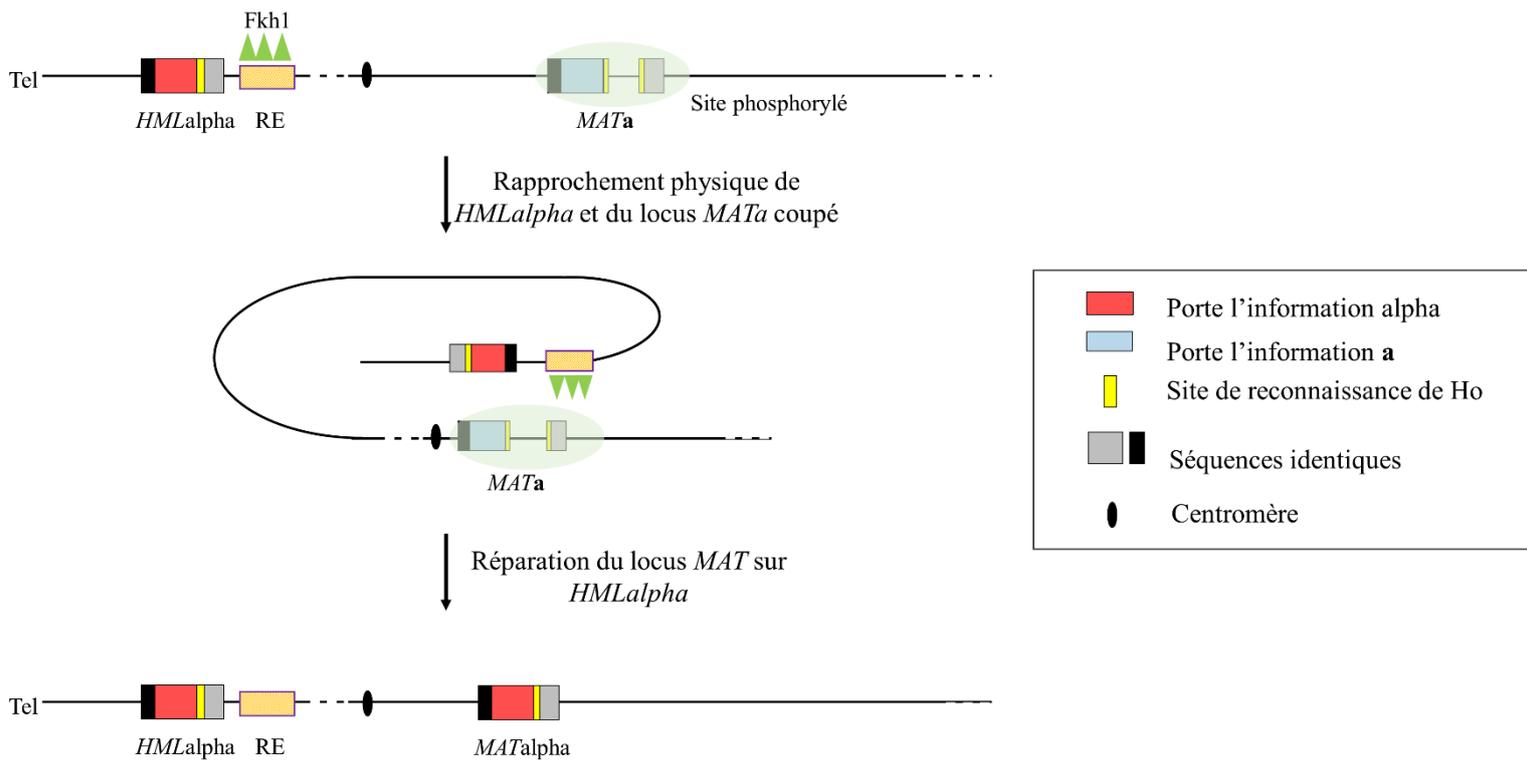


**Figure 11. Eléments consensus du RE ainsi que les protéines qui peuvent s'y fixer chez *S. cerevisiae* (d'après (Haber, 2012)).** Le domaine B est le moins important, sa délétion n'entraînant pas d'effet significatif sur la préférence du donneur, à l'inverse des autres domaines. Dans une cellule *MAT $\alpha$* , les protéines Fkh1 se fixent aux domaines A, D et E du RE alors que dans une cellule *MAT $\alpha$* , la fixation du complexe répresseur Alpha2-Mcm1 à sa région opératrice contenu dans l'élément C empêche la fixation des protéines Fkh1 aux autres domaines.

La préférence du donneur n'est pas dictée par la séquence Ya ou Yalpha contenue au locus silencieux donneur : une souche qui porte par exemple les informations opposées aux locus silencieux (*HMLa MATa HMRalpha*) choisira toujours *HML* à ~85-90 % du temps comme matrice (Klar et al., 1982; Weiler and Broach, 1992). En revanche, selon le type sexuel de la cellule, il existe une différence importante de l'état chromatinien dans la région arborant le RE. Dans les cellules *MATa*, le RE est sous forme d'euchromatine (chromatine ouverte, favorisant l'expression des gènes) et se lie à plusieurs protéines alors que dans les cellules *MATalpha*, la région est recouverte par des nucléosomes, formant une hétérochromatine, couvrant le RE et ses alentours mais son extension s'arrête aux deux ORFs bordant cette région inter-génique (Weiss and Simpson, 1997; Wu et al., 1998). Ainsi, dans des cellules de type *MATa*, le RE est actif et entraîne la réparation avec *HMLalpha*, alors que dans une cellule *MATalpha*, le RE est inactif, et alors la réparation de *MAT* se fait avec la matrice portée par le même bras chromosomique *HMRa*. C'est pourquoi le changement du type sexuel a une efficacité si élevée.

Les mécanismes à l'origine de l'activation du RE ne sont, aujourd'hui encore, pas clairement élucidés. Toutefois, plusieurs protéines ont été identifiées comme participant à son activation. Plusieurs domaines du RE contiennent un ou plusieurs sites de fixation de la protéine Fkh1 dont la fixation à ses domaines a été démontrée par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (technique permettant d'étudier la fixation de protéines à des séquences d'ADN). Ainsi, la fixation des protéines Fkh1 a été démontrée dans des cellules *MATa* alors qu'aucune fixation n'a été détectée dans des cellules *MATalpha*, dans lesquelles le répresseur Alpha2-Mcm1 empêcherait la fixation de Fkh1 (Coïc et al., 2006). La délétion du gène codant Fkh1 affecte fortement la préférence du donneur dans une cellule *MATa* (alors que ce n'est pas le cas dans une cellule *MATalpha*) entraînant une réduction de ~85% à 35% de l'utilisation du locus *HML* comme matrice de réparation (Coïc et al., 2006). Son

utilisation restant à 35% dans ce mutant, cela suggère que d'autres protéines sont impliquées dans l'activation du RE. Le domaine C du RE, en plus de contenir la région opératrice du complexe Alpha2-Mcm1, contient une autre région opératrice, fixant, elle, les protéines régulatrices du cycle cellulaire Swi4 et Swi6. Lorsque cette région régulatrice est mutée ou si le gène codant Swi6 est délété, la préférence du donneur est réduite à environ 35 % (Coïc et al., 2006). Lorsque les gènes codant les protéines Swi4, Swi6 et Fhk1 sont délétés dans une même souche *MATa*, la préférence du donneur est réduite à 15 %, suggérant qu'à la fois le complexe Swi4-Swi6 et Fhk1 jouent des rôles non redondants dans l'activité du RE (Coïc et al., 2006). Il faut noter qu'une délétion totale du RE réduit l'activité de la préférence du donneur à 10 %, suggérant que d'autres protéines que Swi4, Swi6 et Fhk1, interviennent dans l'activité du RE. Le modèle établi pour le fonctionnement du RE est le suivant, la protéine Mcm1 favorise la fixation du complexe Swi4-Swi6 ainsi que des clusters de protéines Fkh1 au RE dans les cellules *MATa* (mais pas *MATalpha*) (Figure 12).



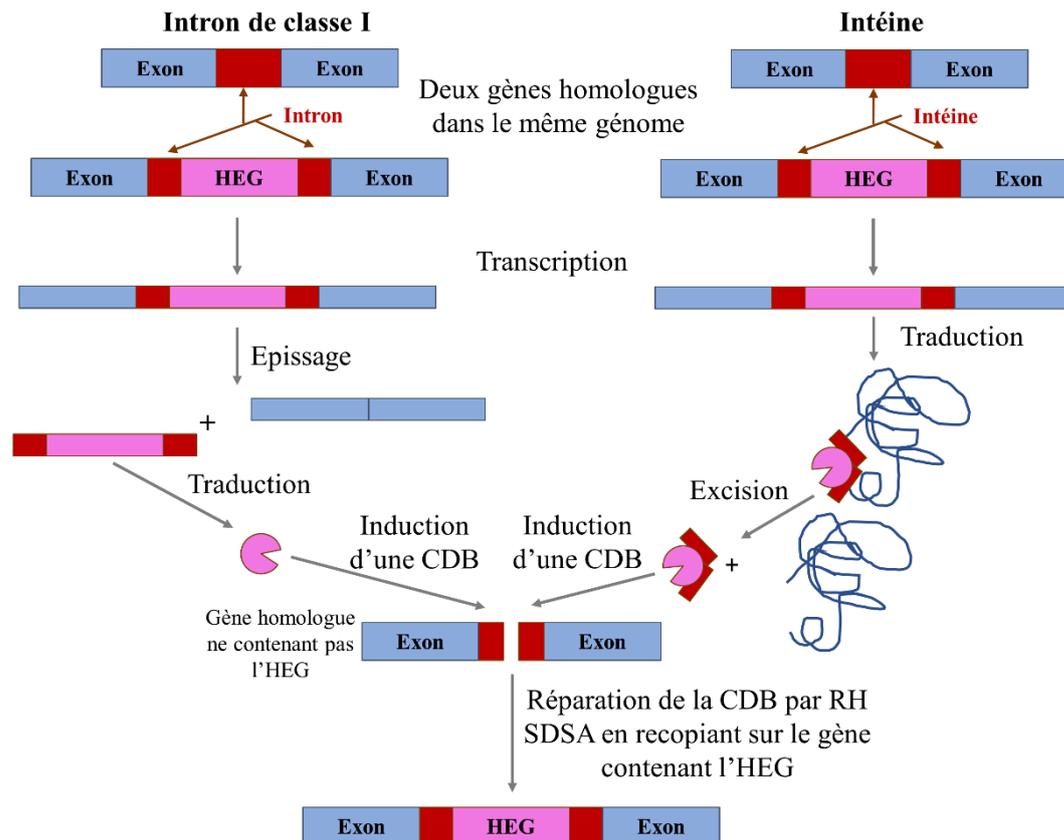
**Figure 12. Modèle établi pour la préférence du donneur (modifié d'après (Lee and Haber, 2015)).** Dans une cellule *MATalpha*, les protéines Fkh1 se fixent au RE et s'associent aux phosphothréonines localisées près de la CDB, et dont la phosphorylation est une réponse à la coupure par Ho. Cette association rapproche physiquement le locus *HMLalpha* de la CDB, facilitant l'utilisation de *HML*, localisée à 100 kb de la *MAT*.

Ces clusters viennent ensuite entrer en contact avec la CDB au locus *MAT* grâce aux protéines qui se lient près de la CDB dont les thréonines phosphorylées sont reconnues par les protéines Fkh1. Cette association a pour effet de rapprocher physiquement le locus *HML* du locus *MAT*, favorisant leur contact et ainsi l'utilisation du locus *HML* comme matrice de réparation. Dans les cellules *MATa*, le répresseur Alpha2-Mcm1 se lie au RE, l'empêchant de jouer son rôle, *HMR* est alors utilisé préférentiellement comme matrice de réparation.

## I.6 Ho, une protéine de la famille des LAGLIDADG endonucléases

### I.6.1 Origine de la protéine Ho

Les protéines les plus proches phylogénétiquement de Ho sont les intéines et plus particulièrement l'intéine PI-Scel (Bakhrat et al., 2004). Les intéines font parties des endonucléases d'Homing qui sont des enzymes qui clivent un site de reconnaissance spécifique. Ces endonucléases reconnaissent et coupent de longues séquences asymétriques (>14-40 pb) laissant une extrémité 3' débordantes cohésives de 4 nucléotides. Les endonucléases d'Homing sont codées par des gènes HEGs, pour *Homing endonuclease gene*, inséré au milieu de leur site de reconnaissance dans un gène hôte (Burt and Koufopanou, 2004) (Figure 13).



**Figure 13. Mode d'action des endonucléases d'Homing des groupes des introns de classe I et des intéines (modifié d'après (Stoddard, 2014)).** Le pacman représente l'endonucléase d'Homing codée par le HEG. Dans les deux cas, l'activité de l'endonucléase mène à une CDB dans le gène ne contenant pas l'HEG. La réparation par RH SDSA avec la copie du gène contenant l'HEG aboutit à l'insertion de l'HEG dans le locus coupé qui ne le contenait pas.

L'HEG ne perturbe pas la fonction codée par le gène hôte en s'excisant, lui-même, de l'ARNm (élément mobile type intron de classe I) ou de la protéine (élément mobile type intéine) de ce gène hôte (Chevalier and Stoddard, 2001). Dans une cellule diploïde nouvellement formée au cours de la reproduction sexuée et qui est hétérozygote pour l'HEG, le chromosome qui ne contient pas cet HEG va être clivé au site de reconnaissance de l'endonucléase codée par cet HEG. L'endonucléase qui coupe ce chromosome est produite grâce à la deuxième copie du chromosome qui contient cet HEG. Le chromosome coupé est ensuite réparé par RH SDSA en utilisant le locus homologue qui contient l'HEG comme matrice. De cette façon, l'HEG est copiée au

chromosome réparé. Ce type d'objet génétique représente ainsi une classe de « gènes égoïstes » ou « parasites », qui envahissent les populations grâce à la reproduction sexuée.

Aucune fonction n'est connue pour les endonucléases d'Homing si ce n'est la capacité à se propager par réparation de cassures chromosomiques avec insertion d'une copie de l'élément. Le gène homologue le plus similaire au gène *HO* dans la famille des HEGs, est le gène de l'intéine PI-Scel (Bakhrat et al., 2004). PI-Scel est une endonucléase d'Homing capable de s'exciser du produit protéique du gène *VMA1*. Les protéines Ho et PI-Scel font partie de la famille LAGLIDADG basée sur la conservation de ce motif chez cette famille d'endonucléases. Ce motif est directement impliqué dans le processus de CDB de ces endonucléases. Les deux protéines, Ho et PI-Scel, partagent 50 % de similarité de séquence, la similarité la plus importante étant dans les motifs LAGLIDADG (Bakhrat et al., 2004).

Contrairement aux HEGs, le gène *HO* est un gène nucléaire indépendant. Il code une endonucléase « domestiquée », c'est-à-dire une endonucléase dont la fonction aurait été détournée, au cours de l'évolution, pour une fonction cellulaire, ici pour le changement de type sexuel. L'endonucléase Ho coupe un site dans le génome de *S. cerevisiae*, sans y insérer son propre gène. En plus des huit motifs protéiques caractéristiques de la famille des LAGLIDADG, l'endonucléase Ho possède un domaine doigt de zinc en C terminal, la rendant unique dans cette famille protéique. Ce doigt de zinc a un rôle supposé de reconnaissance de son site de prédilection (Russell et al., 1986) et il est essentiel à l'activité endonucléase de Ho (Bakhrat et al., 2004).

### **I.6.2 Régulation de la protéine Ho**

Seule une cellule haploïde qui a déjà passé une division de mitose (cellule mère) peut changer de type sexuel (Haber and George, 1979). Le gène *HO* est finement régulé et la région régulatrice en amont de ce gène de 1.4 kb est, encore maintenant, la plus grande identifiée de toutes les régions régulatrices de gènes de levure (Nasmyth,

1993). Dans une souche sauvage, le gène *HO* est finement régulé afin d'être exprimé uniquement dans les cellules haploïdes mères et seulement en phase G1 du cycle cellulaire (Nasmyth, 1987). Dans la région promotrice du gène *HO*, il existe un site de fixation de l'hétérodimère Alpha2-a1 qui réprime l'expression de *HO* dans la cellule diploïde. Dans les cellules haploïdes, le contrôle du gène *HO* dépend du facteur de transcription Swi5 qui est localisé exclusivement dans le noyau de la cellule mère et non de sa cellule fille (Nasmyth, 1987). L'absence de l'expression du gène codant Swi5 dans les cellules filles dépend de la protéine Ash1 qui elle n'est localisée que dans les cellules filles (Bobola et al., 1996; Sil and Herskowitz, 1996). Ash1 agit en amont de Swi5, probablement en réprimant la transcription de *SWI5*, ce qui a pour effet de restreindre l'expression de *HO* dans les cellules mères. La localisation de Ash1 n'est pas due au transport sélectif de la protéine dans les cellules filles mais à la localisation asymétrique de son ARNm dans celles-ci, avant la division cellulaire (Long et al., 1997). Ainsi le modèle établi est que les protéines She2 et She3 se lient avec les ARNm du gène *ASH1* et interagiraient avec des composants du cytosquelette cellulaire tels que la protéine Myo4 (Bobola et al., 1996) ou les filaments d'actine (Takizawa et al., 1997) afin que les ARNm soient tractés dans la cellule fille et uniquement dans celle-ci. Ainsi, il faut attendre la phase G1 du prochain cycle cellulaire pour que les gènes codant Swi5 et donc Ho soient exprimés. Le temps de demi-vie de la protéine Ho participe à la régulation du changement de type sexuel, car il est court, environ 8 min (Kaplun et al., 2000). Si la protéine Ho persistait dans la cellule, elle serait alors capable de couper le locus ayant déjà changé de type sexuel entraînant un second événement de recombinaison au locus *MAT*.

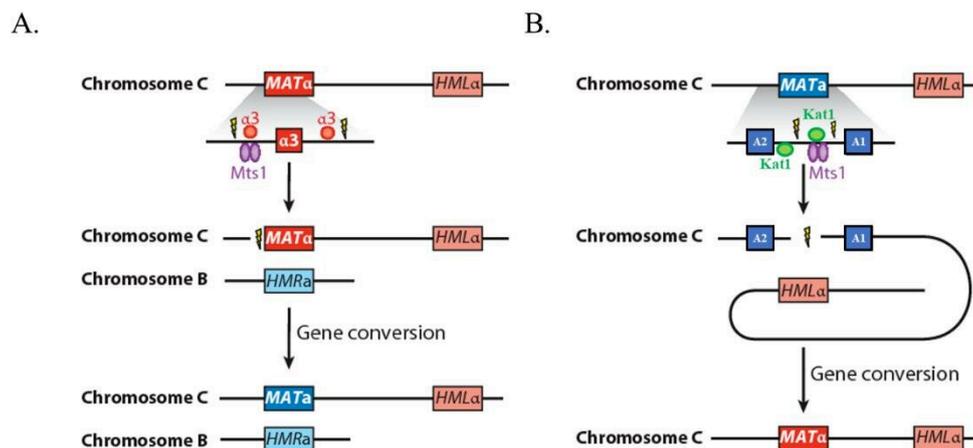
## **I.7 Le changement de type sexuel chez les autres champignons**

### **I.7.1 Le changement de type sexuel chez *Kluyveromyces lactis***

Tout comme *S. cerevisiae*, *K. lactis* porte un locus *MAT* (sous la forme alpha ou a) actif transcriptionnellement et deux locus transcriptionnellement silencieux,

*HMLalpha* et *HMRa*. Tous les trois portent des séquences identiques permettant la RH entre le locus *MAT* et un des deux autres locus sexuels lors du changement de type sexuel. Les locus *MAT* ainsi que les gènes qu'ils contiennent (alpha ou a) sont homologues à ceux de *S. cerevisiae*, mais *K. lactis* possède un gène supplémentaire, *ALPHA3* dans les idiomorphes *MATalpha* et *HMLalpha* (Barsoum et al., 2010). Cependant, aucun gène codant une endonucléase Ho fonctionnelle n'a été retrouvé dans le génome de *K. lactis*, bien qu'un pseudogène *HO* fortement dégénéré ait été identifié (Fabre et al., 2005).

A l'inverse de *S. cerevisiae*, le changement de type sexuel est induit en conditions de carences nutritives chez *K. lactis*. Chez *K. lactis*, il se distingue de manière originale car il fait intervenir deux endonucléases distinctes, et ainsi deux mécanismes différents selon le sens du changement de type sexuel (Barsoum et al., 2010; Rajaei et al., 2014). Ces deux mécanismes font intervenir une CDB au locus *MAT*. La coupure au locus *MATalpha* est réalisée par l'endonucléase domestiquée Alpha3 (Figure 14).



**Figure 14. Changement de type sexuel chez *K. lactis* dans une cellule *MATalpha* (A) et *MATa* (B) (modifié d'après (Ni et al., 2011)).** L'éclair représente une CDB.

La protéine Alpha3 est similaire à la transposase d'ADN des éléments MULEs (Mutator-like éléments) qui fait partie de la superfamille Mutator des transposons (éléments mobiles de classe II qui se déplacent par un mécanisme de couper/coller) (71). Un transposon est un élément mobile génétique capable de se déplacer d'un endroit du génome à un autre. Cette action est catalysée par une transposase qui est, très souvent, codée par ce transposon. Le gène *ALPHA3* codant Alpha3 a été nommé ainsi car c'est le troisième gène localisé dans la région Yalpha du locus *MATalpha* (Aström et al., 2000) mais le produit de ce gène n'est pas un régulateur de la transcription comme Alpha1 et Alpha2. La protéine Alpha3 est amené au locus *MATalpha* par la protéine Mts1 (pour *mating type switch 1*, orthologue de Rme1 chez *S. cerevisiae*) et coupe de part et d'autre du gène *ALPHA3* au locus *MATalpha*, excisant ce gène et laissant une CDB. La coupure est ensuite réparée par conversion génique avec *HMRa*. De manière surprenante, c'est la copie du gène *ALPHA3* qui est localisée au locus *HMLalpha* et non *MATalpha* qui est exprimée et dont l'ARNm est traduit en une protéine Alpha3 capable de couper le locus *MATalpha* (Barsoum et al., 2010). *HMLalpha3* est exprimé en conditions de carences nutritives (Aström et al., 2000).

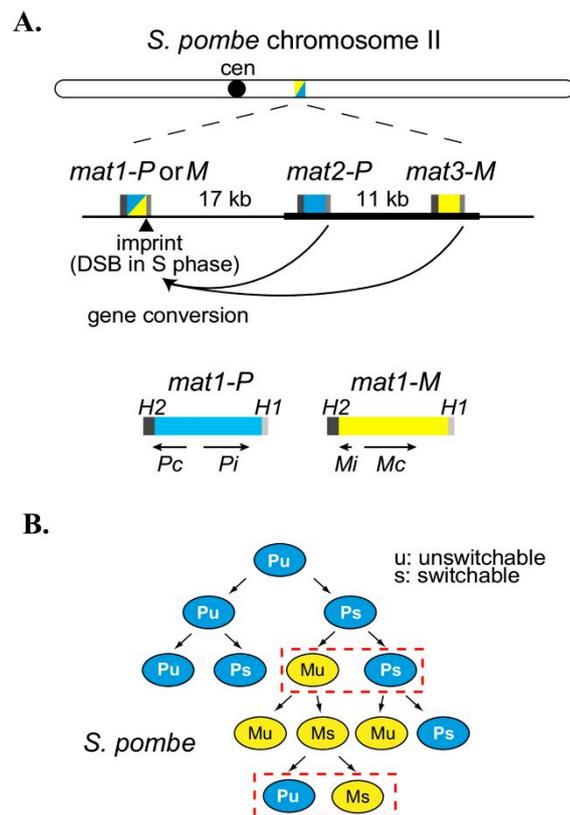
Lorsque *K. lactis* change de type sexuel de *MATa* vers *MATAlpha*, la coupure au locus *MAT* est réalisée par l'endonucléase Kat1, également domestiquée au cours de l'évolution. Kat1, est une protéine membre de la famille Roamer des transposase d'ADN hobo/Activator/Tam3 (Rajaei et al., 2014). Kat1 coupe à deux sites entre les gènes *A1* et *A2*, générant une CDB qui sera ensuite réparée par conversion génique avec *HML*. Le gène *KAT1* n'est pas localisé près de ou dans *MAT* ou *HML/HMR* mais son expression est activée par la protéine Mts1. Ainsi, la protéine Mts1 a un rôle dans les deux sens, *MATalpha* vers *MATa* et *vice versa*, du changement de type sexuel chez *K. lactis*. Il est intéressant de noter que le gène *MTS1* (codant Mts1 chez *K. lactis*) et son orthologue chez *S. cerevisiae* *RME1* (codant Rme1) jouent tous deux un rôle dans la réponse de la cellule haploïde aux conditions de carences nutritives mais par des moyens différents. Chez *S. cerevisiae*, Rme1 empêche l'initiation de la méiose en réprimant le gène *IME1*,

un gène clé dans l'induction de la méiose, et en favorisant la mitose en activant *CLN2* qui code une cycline qui entraîne la passage de la phase G1 vers la phase S dans le cycle cellulaire mitotique (Toone et al., 1995). Bien que *RME1* soit exprimé constitutivement en milieu riche chez une cellule haploïde, il est même sur-exprimé en conditions de carences nutritives dans une telle cellule. A l'inverse, dans une cellule diploïde, *RME1* est réprimé par le complexe Alpha2-a1 (Covitz et al., 1991), permettant ainsi à la cellule d'entrer en méiose en conditions de carences nutritives. Les cellules haploïdes de *K. lactis* répondent à des conditions de carences nutritives par la fécondation suivie tout de suite de la méiose et de la sporulation (Herman and Roman 1966). Toutefois, dans de telles conditions, dans une population clonale, les cellules haploïdes seraient bloquées sans un partenaire de type sexuel compatible, en absence de changement de type sexuel. C'est ainsi que Mts1 permet de surmonter cet obstacle à la reproduction sexuée en favorisant le changement de type sexuel. En effet, Mst1 est uniquement induit en cas de carences nutritives (Barsoum et al., 2010).

### **1.7.2 Le changement de type sexuel chez *Schizosacharomyces pombe***

Le changement de type sexuel chez la levure *S. pombe* utilise des moyens analogues à ceux de *S. cerevisiae* mais sans lien évolutif pour arriver au même but, c'est un exemple de convergence évolutive (Klar et al., 2014). Le type sexuel, *P* (*plus*) (*MATalpha* avec la nomenclature de *S. cerevisiae*) ou *M* (*minus*) (*MATa*), chez *S. pombe* est porté par le locus transcriptionnellement actif *mat1* et il existe une copie de chaque type sexuel aux locus réprimés transcriptionnellement *mat2* et *mat3* respectivement. Les trois locus partagent des séquences identiques, H1 et H2, qui sont analogues aux régions X et Z de *S. cerevisiae* mais ne partagent ni similarité ni synténie avec elles (Beach and Klar, 1984). Malgré le fait que le changement de type sexuel chez *S. pombe* repose également sur un système à trois locus sexuels, l'initiation de celui-ci ne repose pas sur une endonucléase « domestiquée ». Le changement de type sexuel chez *S. pombe*, notamment son initiation, n'est pas complètement élucidé. Il implique une CDB qui serait formée en deux temps (Arcangioli and de Lahondès, 2000; Dalgaard and Klar,

2001) : une empreinte (marque épigénétique) est introduite sur un des deux brins d'ADN du locus *mat1*. La nature de cette empreinte est toujours sujet de controverse et impliquerait une pause au cours de la réplication qui laisserait une CSB ou l'introduction de deux ribonucléotides (probablement par l'élimination incomplète du fragment d'amorce d'Okazaki, l'empreinte étant sensible à la RNase) à un site spécifique sur un des deux brins d'ADN (Holmes et al., 2005; Vengrova and Dalgaard, 2004). Lorsque le brin d'ADN qui porte l'empreinte est répliqué, l'empreinte donne naissance à une CDB qui est ensuite réparée par conversion génique, comme chez *S. cerevisiae*. Du fait de la formation de la CDB en deux temps (deux générations), seulement une cellule sur quatre change de type sexuel chez *S. pombe* contre une sur deux chez *S. cerevisiae* (Figure 15).



**Figure 15. Structure des locus sexuels et changement de type sexuel chez *S. pombe* (modifié d'après (Thon et al., 2019)).** A. La bar noire épaisse sous *mat2-P* et *mat3-M* représente une région d'hétérochromatine. Le rectangle bleu représente l'information P, le rectangle jaune l'information M et les rectangles gris les séquences identiques partagés

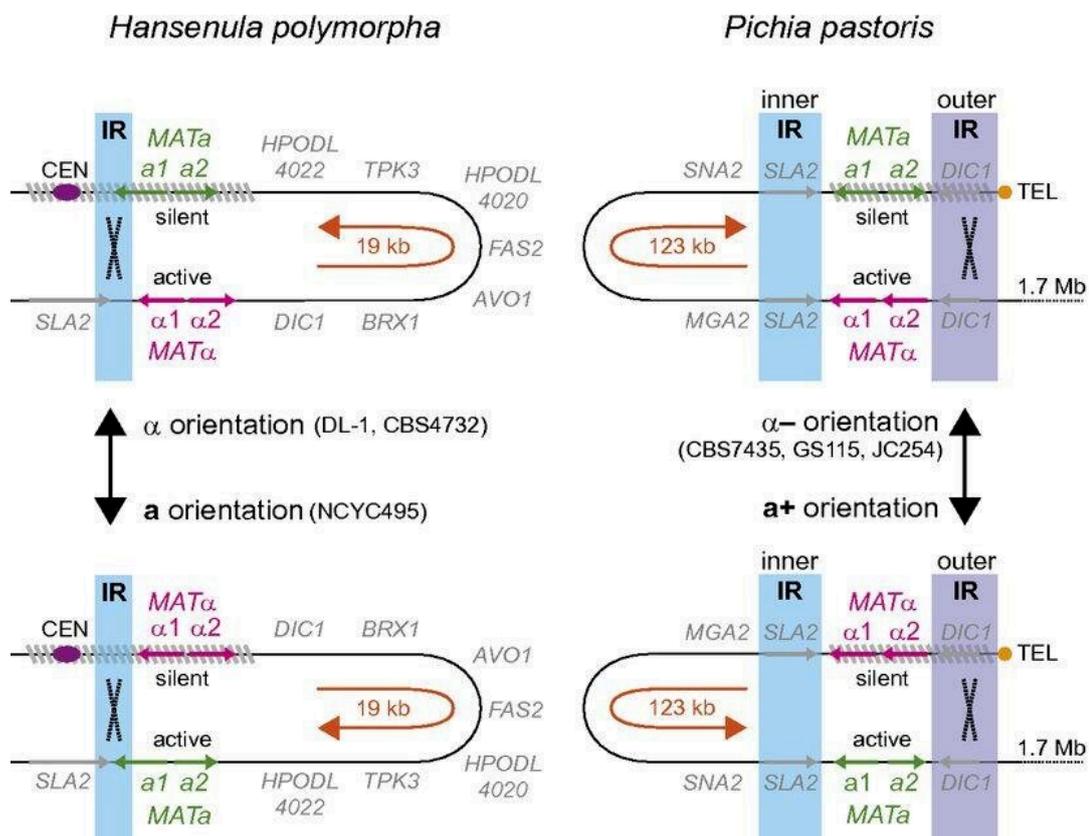
par les trois locus sexuels. Chez *S. pombe*, la CDB dont la réparation aboutit au changement de type sexuel, est introduite en deux temps au locus *mat1*. **B.** Comme énoncé ci-dessus, la CDB se fait deux temps : dans le premier temps une cellule (bleue, Pu) reçoit l’empreinte et devient une cellule qui peut changer de type sexuel (cellule bleue, Ps) et dans un deuxième temps, à la génération suivante, l’empreinte est transformée en CDB aboutissant à un changement de type sexuel (cellule jaune, Mu).

Chez *S. pombe*, il existe également une préférence du donneur qui assure un changement de type sexuel efficace à 80-90 % (Klar et al., 1982). *S. pombe* contient deux séquences RE, SRE2 et SRE3 localisé à proximité des locus *mat2* et *mat3* respectivement (Jakočiūnas et al., 2013). Le complexe Swi2/Sw5 qui favorise la recombinaison se localise de manière différentielle sur ces séquences SRE en fonction du type sexuel de la cellule (Jia et al., 2004). L’expression de Swi2 dépend en partie du polypeptide Mat-Mc (Yu et al., 2012) codé par le gène Mc localisé au locus sexuel de type *M* et c'est la concentration cellulaire en Swi2 qui influence du choix du donneur. Ainsi, dans une cellule de type sexuel *M*, il y a une forte concentration de protéine Swi2, et le locus *mat2-P* sera préférentiellement utilisé pour réparer la CDB, alors que dans une cellule *mat1-P*, le locus *mat3-M* sera utilisé préférentiellement comme matrice.

### **1.7.3 Le changement de type sexuel chez les levures méthanotrophes**

Le changement de type sexuel existe chez plusieurs levures méthanotrophes de la famille Pichiacea (Hanson et al., 2014) et se distingue par le fait de faire intervenir un échange réciproque entre le locus *MAT* actif déterminant le type sexuel et la copie du locus *MAT* silencieuse utilisée pour le changement de type sexuel. Chez ces levures de la famille Pichiacea, il existe deux copies du locus *MAT*, *MAT $\alpha$*  et *MAT $\beta$* , sur un même chromosome. Ces locus sont adjacents avec une ou deux (dans ce cas-ci, de part et d’autre du locus) séquences inversées (IR pour *inverted sequence*). Ces séquences sont orthologues aux séquences X et Z des Saccharomycetaceae. Une copie de ces locus *MAT* est localisée à proximité d’une région d’hétérochromatine dans le génome

qui peut être un centromère chez *O. polymorpha* ou un télomère chez *Komagataella phaffii* (Hanson et al., 2014). Cet arrangement confère une répression génique à ce locus, lorsque l'autre locus *MAT* est actif transcriptionnellement et détermine ainsi le type sexuel de la cellule. Le changement de type sexuel dans ces espèces s'effectue par recombinaison homologue entre ces IRs, qui aboutit à l'inversion de la région entière entre *MAT* $\alpha$  et *MAT* $\alpha$  (19 kb chez *O. polymorpha*, 138 kb chez *K. phaffii*) en conditions de carences nutritives. Cela a pour effet d'inverser la position de tous les gènes entre les deux locus *MAT* et échangeant aussi les positions du locus *MAT* qui était actif et de celui qui était inactif par rapport au centromère au télomère (Hanson et al., 2014) (Figure 16).

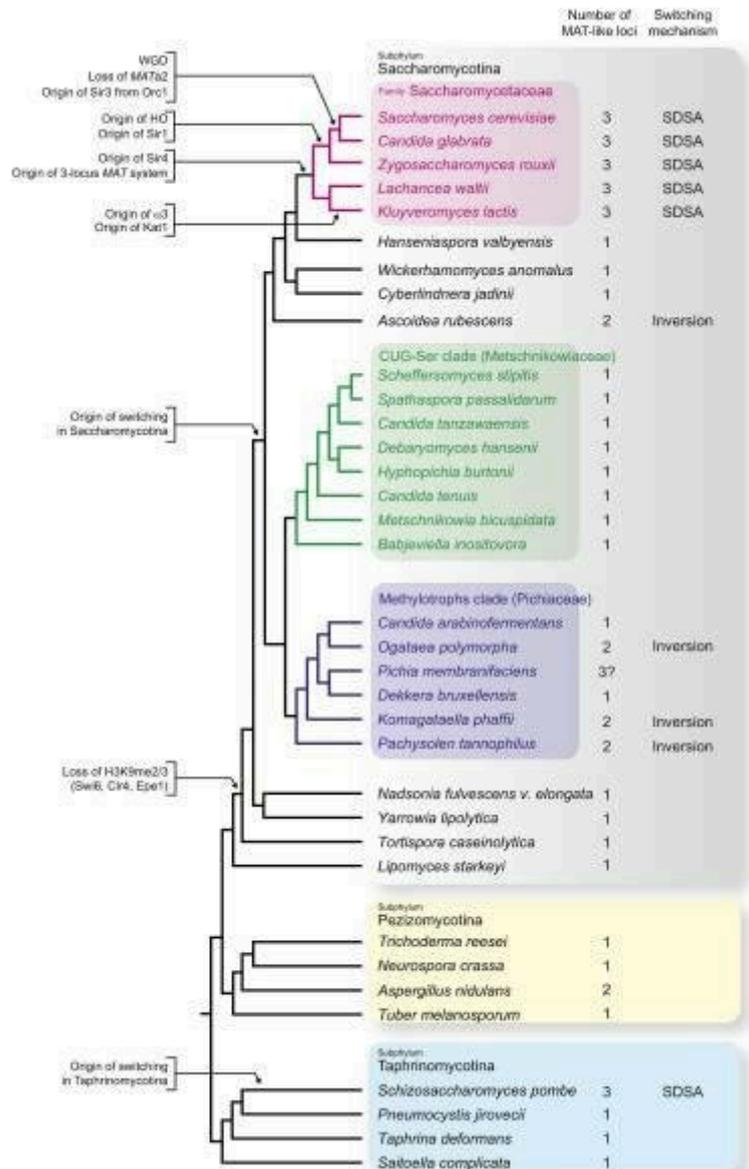


**Figure 16. Structure des locus *MAT* $\alpha$  et *MAT* $\alpha$  et changement de type sexuel chez les espèces *H. polymorpha* et *P. pastoris* de la famille des levures Pichiaceae (modifié d'après (Hanson et al., 2014)).** Les ombres bleues et violettes montrent les IRs. Les flèches orange montrent l'orientation des régions inversibles. Deux autres arrangements de ces régions (*alpha+* and *a-*), sont possibles pour *P. pastoris* mais ne sont pas montrées ici.

Ainsi, dans ce changement de type sexuel, seulement deux locus sexuels sont impliqués et il y a un échange réciproque d'ADN. Seule la position des locus change mais pas leur nombre. Il n'y également pas besoin d'un mécanisme de préférence du donneur car il n'y a pas de choix à faire.

## **I.7 Evolution du changement de type sexuel chez les levures**

Le fait que les mécanismes de changement de type sexuel chez les différentes espèces, notamment décrites ci-dessus, ne soient pas homologues dans la majorité des cas conduit à la conclusion que ces espèces ont acquis de manière indépendante le processus complexe qu'est le changement de type sexuel (Hanson and Wolfe, 2017). Cette conclusion est appuyée par le fait qu'un cas de changement de type sexuel a été rapporté chez un basidiomycète, *Agrocybe aegerita*, suggérant une évolution indépendante de ce mécanisme chez les basidiomycètes (Labarere and Noel, 1992). De plus, les gènes orthologues à *ALPHA3* et *KAT1* de chez *K. lactis* ne sont uniquement retrouvés chez des levures du genre *Kluyveromyces*, suggérant que le changement de type sexuel tel qu'il existe chez *K. lactis* est spécifique du genre *Kluyveromyces* (Rajaei et al., 2014). Ainsi, le processus de changement de type sexuel serait apparu dans la famille des Saccharomycetaceae (Butler et al., 2004a) et un processus similaire mais indépendant serait apparu dans la levure éloignée phylogénétiquement *Schizosaccharomyces pombe* ainsi que chez *Agrocybe aegerita* (Hanson and Wolfe, 2017; Klar, 2007; Ni et al., 2011) (Figure 17).



**Figure 17. Arbre phylogénétique des ascomycètes montrant les clades majeurs, le nombre de locus *MAT* par espèce et le type de changement de type sexuel dans les espèces portant plus d'un locus *MAT* (d'après (Hanson and Wolfe, 2017)).**

Concernant le changement de type sexuel tel qu'il existe chez *S. cerevisiae*, il a été proposé qu'il soit apparu en deux étapes distinctes (Keeling and Roger, 1995; Butler et al., 2004a). Dans un premier temps, une ou plusieurs copie(s) supplémentaire(s) du locus *MAT*, qui peu(ven)t être maintenue(s) dans un état de répression génique, a(ont) été acquise(s). L'existence alors de ces locus sexuels dans une même cellule aurait

permis un changement de type sexuel à faible fréquence par le biais de recombinaison homologue fortuite entre ces locus. Dans un deuxième temps, une endonucléase d'Homing aurait été domestiquée afin d'induire le changement de type sexuel à haute fréquence en coupant le locus *MAT* actif. Le fait que plusieurs endonucléases, Ho chez *S. cerevisiae* Alpha3 et Kat1 chez *K. lactis*, proviennent d'endonucléases domestiquées suggère une facilité relative de l'évolution à détourner la fonction des éléments mobiles génétiques

La structure, la position ainsi que l'orientation des locus sexuels dans les systèmes à trois locus ont également évolué de manière différente selon les espèces. La longueur des séquences identiques partagées par les trois locus (Z et W selon la nomenclature de *S. cerevisiae*) varie selon les espèces et peut également ne pas être égale entre les trois locus sexuels d'une même espèce ; par exemple, les régions identiques partagées sont plus longues entre *MAT* et *HML* qu'entre *MAT* et *HMR* chez plusieurs espèces (Gordon et al., 2011). De même, chez les espèces appartenant aux Saccharomycetaceae autres que celles du genre *Saccharomyces*, l'orientation des locus sexuels est parallèle et la région Z de chaque locus est plus proche du télomère du bras gauche du chromosome que du droit (Gordon et al., 2011). A l'inverse, les trois locus sexuels des espèces appartenant au genre *Saccharomyces* ont subi un réarrangement ; l'orientation parallèle des trois locus sexuels est conservée mais l'orientation relative aux télomères et centromères est inversée (Fabre et al., 2005). Les points abordés dans ce dernier sous paragraphe seront plus détaillés et notamment illustrés par le clade des *Nakaseomyces* dans le sous-chapitre intitulé « [1.10 Phylogénie et conservation des éléments du changement de type sexuel dans le clade des \*Nakaseomyces\*](#) ».

## **1.8 Intérêts du changement de type sexuel**

Dans la majorité des espèces, le changement de type sexuel fait intervenir une CDB qui fait partie des lésions de l'ADN les plus dangereuses pour l'intégrité du génome. De plus, la synthèse du nouveau locus *MAT* lors de sa réparation est associée à un taux élevé de mutation (Hicks et al., 2010). Par conséquent et dans une perspective

évolutive, le changement de type sexuel devrait avoir une fonction importante, ou donner un avantage sélectif aux espèces qui le possèdent, et qui l'emporterait sur le coût mutagène ; autrement, il est plausible d'imaginer que la sélection naturelle n'aurait pas maintenu un tel processus dans autant d'espèces (Hanson and Wolfe, 2017).

Lors du changement de type sexuel chez *S. cerevisiae*, une cellule mère produit une cellule fille, de manière clonale par mitose, puis change de type sexuel de façon à pouvoir alors se féconder avec sa cellule fille, ou toute autre variation dans la programmation de cet événement selon l'espèce, mais aboutissant toujours à la formation de cellules identiques de type opposé. En effet, les deux cellules à l'origine de la formation du zygote portent un génome strictement identique (à l'exception du locus *MAT*) et la reproduction sexuée permise ainsi par le changement de type sexuel, ne permet ni élimination des mutations délétères ni brassage génétique. Toutefois, cela permet de revenir à un état ou de passer par un état diploïde. Cet état diploïde donne aux levures un certain nombre d'avantages évolutifs que n'ont pas les haploïdes, dont la capacité à pouvoir passer la méiose et ainsi produire des spores, notamment en conditions de carences nutritives (Lee and Haber, 2015). Contrairement aux cellules végétatives, la paroi cellulaire des spores contient plusieurs couches de chitosane et dityrosine, ce qui leur permettrait d'être plus résistantes à divers stress tels que l'exposition à des chocs thermiques (Briza et al., 1990), à des traitements à différentes enzymes (Herman and Rine, 1997) à des pH très acides ou basiques ou encore à de fortes pressions osmotiques (Coluccio et al., 2008). Cette plus haute résistance permet notamment de survivre à des conditions extrêmes tel que l'intestin des animaux par exemple (Coluccio et al., 2008). La méiose participe également à la plasticité du génome. Il n'est pas rare que, lors de la méiose, la ségrégation des chromosomes soit altérée, ce qui conduit en général à des aneuploïdies. Les aneuploïdies sont peu tolérées chez la plupart des eucaryotes "complexes", mais sont très bien tolérées chez *S. cerevisiae*. Il arrive, par exemple, que celles-ci confèrent un avantage sélectif dans

certains environnements stressants pour les cellules (Kwon-Chung and Chang, 2012; Selmecki et al., 2009) et soient alors conservées. De nombreux exemples ont été trouvés chez des pathogènes fongiques de l'être humain pour lesquels il a été montré que l'apparition d'aneuploïdies était liée à l'émergence de résistance à certains antifongiques, tels que les azolés (Kwon-Chung and Chang, 2012).

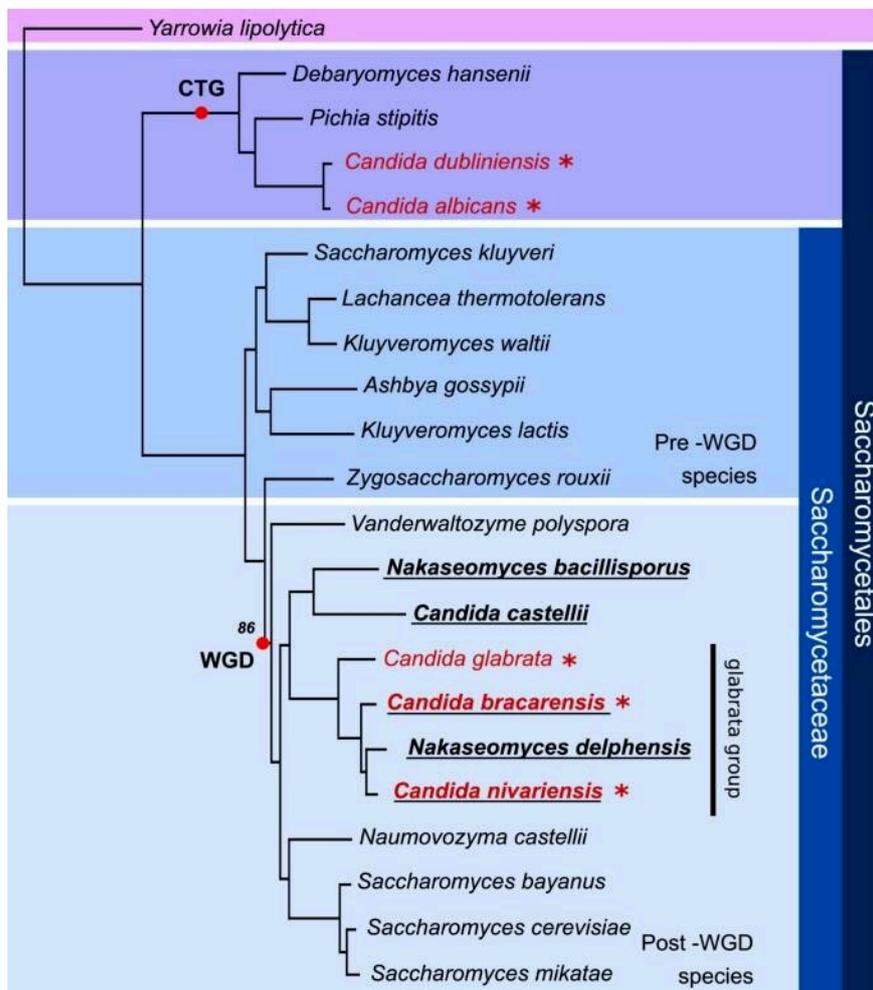
## **I.9 Reproduction (a)sexuée chez les levures pathogènes de l'être humain**

Pour revenir vers le sujet de la reproduction sexuée, à laquelle est liée le changement de type sexuel, la reproduction sexuée est particulièrement plastique chez les espèces fongiques pathogènes de l'être humain (Butler, 2010) (Heitman et al., 2014). Alors que nombre de ces pathogènes étaient considérés comme asexués, plusieurs cycles sexués ou parasexués ont été découverts. Il a ainsi été démontré que la levure pathogène *C. albicans*, première cause de candidoses (infections fongiques par des espèces *Candida*) dans le monde, peut réaliser un cycle parasexué par fécondation de deux cellules diploïdes, formant une cellule tétraploïde. Cette cellule peut ensuite subir une perte de chromosome aléatoire permettant de revenir vers un état diploïde (Bennett and Johnson, 2003). Il a également été montré que des cellules haploïdes de *C. albicans* peuvent être formées à partir de cellules diploïdes par un mécanisme de perte concertée de chromosomes, dans des conditions *in vivo* et *in vitro* (Hickman et al., 2013). Si deux de ces cellules sont de types sexuels opposés, elles peuvent se féconder afin de reformer une cellule diploïde (Hickman et al., 2013). Le pathogène opportuniste filamenteux *Aspergillus fumigatus*, possède, lui, un cycle sexué "classique" mais rare : la fécondation ne s'opère qu'après que le champignon ait passé six à douze mois dans l'obscurité (O'Gorman et al., 2009). *A. fumigatus* est un champignon saprophyte des plantes en décomposition (Tekaia and Latgé, 2005) dont la niche écologique est le sol des sous-bois. Il a donc une reproduction sexuée adaptée à son mode de vie. Ce champignon peut infecter des personnes immunodéprimées lorsqu'elles inhalent des conidies (spores asexuées) de celui-ci transportées par l'air.

Cela suggère que pour la plupart des champignons, réaliser un brassage génétique est primordial, même pour les pathogènes de l'être humain bien adaptés à leur hôte humain ainsi que pour les espèces commensales pouvant donner naissance à des infections (cas des *Candida*) et pour les espèces environnementales pathogènes opportunistes pouvant donner des populations clonales et asexuées (cas d'*Aspergillus*). Chez la plupart des pathogènes fongiques de l'être humain, les gènes majeurs impliqués dans la reproduction sexuée sont retrouvés dans leurs génomes par recherche d'homologie, qu'on ait démontré un cycle (para)sexué ou non. C'est par ailleurs la raison pour laquelle les recherches sur les cycles sexués des espèces pathogènes majeures ont repris activement après la publication des séquences de leurs génomes. La levure sur laquelle j'ai travaillé durant ma thèse, *Candida glabrata*, n'échappe à cette « règle ». *C. glabrata* est le deuxième pathogène responsable de candidoses, après *C. albicans*, dans de nombreux pays développés (Guinea, 2014; Rodrigues et al., 2014) et il est associé à une résistance aux antifongiques majeurs utilisés couramment aujourd'hui (Ksiezopolska and Gabaldón, 2018; Robbins et al., 2017).

## I.10 Phylogénie et conservation des éléments du changement de type sexuel dans le clade des *Nakaseomyces*

Les *Nakaseomyces* forment un clade de levures proches phylogénétiquement de *S. cerevisiae* (Figure 18).)



**Figure 18. Arbre phylogénétique de 22 espèces des Saccharomycotina (d'après (Gabaldón et al., 2013)).** L'arbre a été construit par la méthode de maximum de vraisemblance par l'alignement concaténé des 603 gènes orthologues un à un. Les gènes orthologues choisis sont partagés par les 22 espèces. Les espèces écrites en rouge représentent des espèces pathogènes de l'être humain. Les événements d'évolution importants comme la duplication complète du génome (WGD pour *Whole genome duplication*) ou la transition du code génétique (CTG) dans le clade *Candida* sont notés sur l'arbre. Les espèces faisant parties du clade des *Nakaseomyces* sont écrites en caractères gras. \*: espèces pathogènes opportunistes de l'être humain.

Ce clade contient des espèces qui se différencient à la fois par leur mode de vie et leur mode de reproduction. Cinq des *Nakaesomyces* sont uniquement isolés sous forme de cellules haploïdes de type sexuel *MAT $\alpha$*  ou bien *MAT $\alpha$* , alors que l'espèce *Nakaseomyces bacillisporus* est diploïde (Fabre et al., 2005). Le fait que quatre espèces des *Nakaseomyces* portent en nom de genre « *Candida* » ne signifie pas un lien de parenté proche avec les autres espèces pathogènes *Candida* incluant *C. albicans*. Ainsi, *C. nivariensis*, *C. glabrata*, *C. bracarensis* et *C. castelli* portent le nom de genre *Candida* uniquement en raison de leur apparente asexualité. Ce nom, donné avant que l'on ne séquence des génomes de levure, ne décrit ainsi pas un clade monophylétique, et est distribué sur tout l'arbre des Saccaryomycetales. Ce nom devrait être abandonné (sauf pour le clade de *C. albicans*, le seul à le conserver), à la suite de l'établissement d'arbres basés sur la phylogénie moléculaire, mais il est néanmoins largement utilisé, ce qui justifie que nous l'utilisions nous-mêmes. *N. bacillisporus*, *N. delphensis* et *C. castelli* sont trois espèces environnementales : elles n'ont été isolées que dans l'environnement (arbres, fleurs, fruits, respectivement) alors que *C. nivariensis*, *C. glabrata* et *C. bracarensis* sont des pathogènes opportunistes de l'être humain : elles ont été décrites à partir de prélèvements humains. Néanmoins, certaines souches de *C. glabrata* sont isolées dans des environnements non humains mais anthropisés (Brisse et al., 2009). Ces pathogènes sont responsables de candidoses et notamment de candidémies (infection du sang causées par des espèces *Candida*) (Angoulvant et al., 2015). Le plus connu, *C. albicans*, est une espèce commensale qui colonise de manière asymptomatique l'être humain sain mais peut aussi causer des infections superficielles des muqueuses (mycoses orales ou vaginales) chez des individus sains (Poulain, 2015), le plus souvent suite à un déséquilibre de la flore microbienne, par exemple après une prise d'antibiotiques. Cette espèce peut devenir invasive et causer des infections systémiques chez des patients immunodéprimés chez lesquels le taux de mortalité peut aller jusqu'à 40 % (Kett et al., 2011). Il a été établi par des méthodes de typage moléculaire, que dans la majorité des cas d'infections chez des personnes immunodéprimées, l'infection était causée par la souche déjà portée par la personne.

Chez ces patients-e-s, une combinaison entre une maladie sous-jacente (personnes atteintes de cancers et traitées par chimiothérapie ou encore atteintes du SIDA, par exemple) et des procédures médicales invasives comme, la chirurgie, entraîne le développement de la levure en tant que pathogène (Voss et al., 1994).

Le génome des six *Nakaseomyces* a été séquencé et il contient, pour toutes les espèces, les gènes majeurs impliqués dans la reproduction sexuée ainsi qu'un gène *HO*, identifiés par homologie de séquence à partir des gènes de *S. cerevisiae* (Gabaldón et al., 2013; Butler et al., 2004b). Pourtant, seules deux espèces environnementales réalisent un cycle sexué, toutes les autres sont considérées comme asexuées. Le génome des six *Nakaseomyces* contient également un gène homologue au gène *HO* de *S. cerevisiae* ainsi que les trois locus sexuels *HML*, *MAT* et *HMR* (appelés *MTLs* pour *Mating-type-like loci*) qui varient en nombre et position (Gabaldón et al., 2013). Les *Nakaseomyces* portent le(s) locus *HMR* sur un chromosome différent de celui portant les locus *HML* et *MAT* à l'exception de *N. delphensis* qui porte les trois sur le même chromosome, comme *S. cerevisiae*. Quant à *C. nivariensis*, le génome de cette levure porte deux copies du locus *HMR*, chaque copie étant sur deux chromosomes différents. La duplication du locus *HMR* et/ou sa localisation sur un autre chromosome que celui de *HML* et *MAT* n'est pas spécifique au clade des *Nakaseomyces* mais existe chez d'autres levures (Hanson and Wolfe, 2017).

En ce qui concerne le changement de type sexuel, il est connu chez *N. delphensis* et le laboratoire où j'ai effectué ma thèse a récemment démontré qu'il était dépendant de la protéine Ho (Gabaldón et al., 2013; Li et al.). Chez *N. bacillisporus*, les travaux préliminaires de l'équipe ont montré que les spores isolées de la méiose donnent naissance à des cellules diploïdes, laissant supposer un mécanisme de changement de type sexuel (Résultats non publiés).

Ainsi, malgré les ressemblances/différences génomiques que partagent ou non ces espèces, il est impossible aujourd'hui de déterminer seulement par génomique comparée la capacité d'une espèce à réaliser ou non un changement de type sexuel ou un cycle sexuel hétérothallique ou homothallique.

La conservation des gènes et des éléments impliqués dans la reproduction sexuée et dans le changement de type sexuel chez les espèces ne montrant ni cycle sexué ni changement de type sexuel spontané soulève plusieurs questions évolutives. Est-ce que, chez ces espèces, l'induction du changement de type et/ou la reproduction se fait dans des conditions différentes de *S. cerevisiae* ou de *N. delphensis/N. bacillisporus* et qui resteraient à déterminer ? Est-ce que ces gènes et ces éléments ont acquis d'autres fonctions, chez ces espèces, qui resteraient à identifier et caractériser ? Mes travaux de thèse se sont inscrits dans cette perspective évolutive et, par des approches de génomique fonctionnelle, j'ai essayé de mieux caractériser le changement de type sexuel chez le pathogène opportuniste *C. glabrata*.

## **I.11 Induction du changement de type sexuel chez *Candida glabrata* et létalité**

*C. glabrata* n'est pas capable de changer de type sexuel de manière efficace et spontanée, même si quelques rares signes d'un changement de type sexuel ont pu être observés en culture (Butler et al., 2004a; Edskes and Wickner, 2013) et dans les populations (Carreté et al., 2018). De plus, au laboratoire, les souches que nous manipulons sont stables et nous n'avons jamais détecté de changement de type sexuel spontané. L'équipe de recherche dans laquelle j'ai effectué ma thèse, dirigée par la professeure Cécile Fairhead à l'Université Paris Saclay, a montré qu'il était possible d'induire le changement de type sexuel chez *C. glabrata* en exprimant le gène *HO* de *S. cerevisiae* (*ScHO*) (Boisnard et al., 2015) à l'aide d'un plasmide d'expression, p7.1. Dans le plasmide p7.1, *ScHO* est cloné sous contrôle du promoteur inducible de *C. glabrata* pMET3, ainsi son expression est induite en absence de méthionine et cystéine dans le milieu de culture et à l'inverse, elle est réprimée en présence de forte concentration de ces deux acides aminés. De façon surprenante, l'induction du changement de type sexuel chez *C. glabrata* dans ces conditions est liée à une très forte létalité avec plus de 99 % des cellules qui ne survivent pas à cette expression (Boisnard et al., 2015). L'équipe de la Pr. Fairhead a également montré, à la suite de

l'expression de *ScHO* chez *C. glabrata*, que non seulement le locus *MAT* peut changer de type sexuel mais également le locus *HML*. Si ces locus peuvent changer de type sexuel, cela veut dire qu'ils sont coupés par l'endonucléase Ho de *S. cerevisiae* (*ScHo*) (Boisnard et al., 2015). Cette situation-le locus *HML* coupé par Ho- n'arrive jamais dans des souches sauvages de *S. cerevisiae* mais seulement des souches mutantes pour des gènes dont les produits sont impliqués dans la répression génique des locus *HML* et *HMR* (Haber, 2012).

## **I.12 Objectifs de la thèse**

Les objectifs de ma thèse ont été de :

- identifier et caractériser l'origine de la forte létalité induite par le changement de type sexuel chez *C. glabrata*
- mieux comprendre le fonctionnement de changement de type sexuel chez *C. glabrata*

## II. Matériels et méthodes supplémentaires

### II.1 Souches, amorces pour PCR et plasmides

La très grande majorité de souches, amorces de PCR et plasmides utilisés au cours de la thèse sont résumés dans les deux articles qui paraissent dans celle-ci (Maroc and Fairhead, 2019; Maroc et al., 2020). Les souches, amorces et plasmides non publiés ainsi que celles et ceux publiés mais utilisés dans des expérimentations non publiées sont résumés dans les Tableaux 1, 2 et 3.

**Tableau 1. Résumé des souches utilisées au cours de cette thèse dans des expériences non publiées**

<b>Souches de <i>C. glabrata</i> ne portant que des sites Ho sauvages</b>			
<b>Souche</b>	<b>Parent</b>	<b>Génotype</b>	<b>Référence</b>
CBS318		<i>HMLalpha MATalpha HMRA</i>	(Gabaldón et al., 2013)
HM100	CBS138	<i>HMLalpha MATalpha HMRA ura3Δ::KANMX</i>	(Muller et al., 2008)
BG2		<i>HMLalpha MATa HMRA</i>	(Fidel et al., 1996)
BG14	BG2	<i>HMLalpha MATa HMRA ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	(Fidel et al., 1996)
BG87	BG14	<i>HMLalpha MATa HMRA ura3::Neo<sup>R</sup> his3Δ</i>	(Cormack and Falkow, 1999)
HM3alpha*	HM100	<i>HMLalpha MATalpha HMRAalpha ura3Δ::KANMX</i>	Le laboratoire.
HM3a*	HM100	<i>HMLa MATa HMRA ura3Δ::KANMX</i>	Le laboratoire.
HM3alpha ade2-*	HM3alpha	<i>HMLalpha MATalpha HMRAalpha ura3Δ::KANMX ade2-</i>	Le laboratoire.
HM3a ade1-*	HM3a	<i>HMLa MATa HMRA ura3Δ::KANMX ade1-</i>	Le laboratoire.
<b>Souches de <i>C. glabrata</i> avec une combinaison de locus sauvages et inconvertibles</b>			
YL01	HM100	<i>HMLalpha MATalpha HMRA-inc ura3Δ::KANMX</i>	(Maroc et al., 2020)
YL09	YL01	<i>HMLa-inc MATa-inc HMRA-inc ura3Δ::KANMX</i>	(Maroc et al., 2020)
YL05	YL09	<i>HMLalpha MATa-inc HMRA-inc ura3Δ::KANMX</i>	(Maroc et al., 2020)

<b>Souches de <i>C. glabrata</i> avec une combinaison de locus sauvages, délétés et/ou inconvertibles</b>			
CGM460	BG14	$\Delta hml MAT\alpha HMRa ura3\Delta::Tn903 G418^R$	(Ramírez-Zavaleta et al., 2010)
CGM390	BG14	$HML\alpha \Delta mat HMRa ura3\Delta::Tn903 G418^R$	(Ramírez-Zavaleta et al., 2010)
CGM498	BG14	$\Delta hml \Delta mat HMRa ura3\Delta::Tn903 G418^R$	(Ramírez-Zavaleta et al., 2010)
SL01	BG87	$HML\alpha MAT\alpha \Delta hmr ura3::Neo^R his3\Delta$	(Maroc et al., 2020)
SL-CG1	CGM390	$HML\alpha \Delta mat \Delta hmr ura3\Delta::Tn903 G418^R$	(Maroc et al., 2020)
SL-CG4	CGM390	$HML\alpha-inc \Delta mat HMRa ura3\Delta::Tn903 G418^R$	Ce travail.
SL-CG5	CGM460	$\Delta hml MAT\alpha-inc HMRa ura3\Delta::Tn903 G418^R$	Ce travail.
SL-CG6	CGM390	$HML\alpha \Delta mat HMRa-inc ura3\Delta::Tn903 G418^R$	Ce travail.
SL-CG7	SL01	$HML\alpha MAT\alpha-inc \Delta hmr ura3::Neo^R his3\Delta$	Ce travail.
<b>Souches de <i>C. glabrata</i> délétées pour les trois locus sexuels</b>			
$\Delta\Delta\Delta T10.5$	SL-CG1	$\Delta hml \Delta mat \Delta hmr ura3\Delta::Tn903 G418^R$	Ce travail.
$\Delta\Delta\Delta T14$	CGM498	$\Delta hml \Delta mat \Delta hmr ura3\Delta::Tn903 G418^R$	Ce travail.

\* Ces souches ont été construites par Youfang Zhou-Li, ingénieur d'études dans le laboratoire.

**Table 2. Résumé des amorces utilisées au cours de cette thèse dans des expériences non publiées**

Nom	Séquence (5'→3')	Localisation
<b>Amorces utilisées pour la construction des fragments de délétion utilisés lors de délétion par « pop-in/pop-out » ou par CRISPR-Cas9</b>		
Sc-URA3-F	AAGAGCTTTTCAATTCATCATT	Dans le promoteur de <i>URA3</i> de <i>S. cerevisiae</i> , sens
Sc-URA3-R	TTAGTTTTGCTGGCCGCATC	CDS <i>URA3</i> , antisens
68	cgggatccACTCTTTCTTTTGACGCG	Z1, sens
70	cggaattcTAATTTTGCAGTCCTCGG	Z1, antisens
74	cggaattcATGTCCCAAATATTTTGATCC	Yalpha, Sens
69	cggctcgacACAAAGAGCTCCTTTGGTC	Yalpha, antisens
Delta-HML-F1	CTTAAGGTATGCGCACGCA	En amont de <i>HML</i> , sens
Delta-HML-R1	atttcttaggtgtttaaatccacctaccatagtcagaccG CACCTTCATCTGCTGAATA	En amont de <i>HML</i> , antisens
Delta-HML-F2	GGTCTGACTATGGTAGGTG	En aval de <i>HML</i> , sens
Delta-HML-R2	GGCCTATAGAATCAATGATGT	En aval de <i>HML</i> , antisens
<b>Amorces utilisées pour la détermination du changement de type sexuel</b>		
GS01	TACCAAGAAGCAAGAGCCCA	En amont de <i>MAT</i> , sens
GS02	TCTTGCGTAGTCGAGACCTC	En aval de <i>MAT</i> , antisens
GS06	GACAGGAACATCTAAGCGAT	En amont de <i>HMR</i> , sens
GS07	GTGGATGACTACTGGGTGGA	En aval de <i>HMR</i> , antisens
GS08	GCTGTAGTGGCGAAAATAAG	En amont de <i>HML</i> , sens
GS09	GATCACTTCGTAGTAGAAAAC	En aval de <i>HML</i> , antisens
120-R	TATTTGGGACATGAATTAATTC	Site Ho alpha-inc, antisens
121-R	TGGGACATATTCGCGCAG	Site Ho alpha sauvage, antisens
122-R	CAAACATCTGAAGCTAATTC	Site Ho a-inc, antisens
123-R	TATCTGCTTTTCGCAACAG	Site Ho a sauvage, antisens
<b>Amorces utilisées pour les analyses de la CDB par ScHo à <i>HML</i>, <i>MAT</i> et <i>HMR</i> par Southern-blot</b>		
Southern-HML-F	GCATAGAGCCAAGATAATTC	En amont de <i>HML</i> , sens
Southern-HML-R	TCCTGCTTATTTTGAAGGTC	En amont de <i>HML</i> , antisens
Southern-HML-2F	AGGTCTCCACGACAATATTC	En amont de <i>HML</i> , sens
Southern-HML-2R	AGTGTATAAATATTAGGAAGGC	En amont de <i>HML</i> , antisens
Southern-MAT-F	AGATAGAAGGATAAAATAAGC	En amont de <i>MAT</i> , sens

Southern-MAT-R	GTCGGCAGGCAGGTATTC	En amont de <i>MAT</i> , antisens
Southern-MAT-2F	CCAAAAGGCTAAGAGAAGAC	En amont de <i>MAT</i> , sens
Southern-MAT-2R	AACTATGCAGAACAAGTTAGC	En amont de <i>MAT</i> , antisens
Down-HMR-F	GGAGTACGTTGAGTGAAG	En aval de <i>HMR</i> , sens
Check-HMR-R	CACATAATGGAGGATCTAC	En aval de <i>HMR</i> , antisens
Southern-HMR-F	CTACTGTAATGACAATGATG	En aval de <i>HMR</i> , sens
Southern-HMR-R	ACCACAACCTTTCATTAGC	En aval de <i>HMR</i> , antisens
<b>Amorces utilisées pour la vérification génomique des souches construites, par Southern-blot</b>		
LM6-F	GGAACTATAGCTAGTCACG	Dans a1, sens
LM14-R	GATGACAGTAGACCCAATAC	Dans a1, antisens
21-F	CTGAGAGAATGACGGAGAG	Dans Yalpha (dans <i>ALPHA1</i> ), sens
GS04-R	AAAACACTACTCCCTGTCTA	Dans Yalpha (entre <i>ALPHA1</i> et <i>ALPHA2</i> ), antisens

Les lettres en minuscule représentent les séquences sans homologie de séquence avec la cible ADN cible alors que les régions antisens complémentaires sont indiquées en majuscule.

**Table 3. Résumé des plasmides utilisés au cours de cette thèse dans des expériences non publiées**

Name	Description	Reference
<b>Plasmids for <i>S. cerevisiae</i>'s <i>HO</i> gene expression in <i>C. glabrata</i></b>		
pYR32	Plasmide d'expression de <i>C. glabrata</i> , Ura3+	(Zordan et al., 2013)
p7.1	<i>ScHO</i> sous contrôle du promoteur inducible <i>MET3</i> cloné dans le plasmide pYR32, Ura3+	(Boisnard et al., 2015)
pMATa-inc	Locus <i>MATa-inc</i> clone dans p7.1, Ura3+	(Maroc et al., 2020)
pMATalpha-inc	Locus <i>MATalpha-inc</i> clone dans p7.,1 Ura3+	(Maroc et al., 2020)
p7.1-Ho-GFP	<i>ScHO</i> fusionné au gène codant la GFP sous contrôle du promoteur inducible <i>MET3</i> cloné dans le plasmide pYR32, Ura3+	Le laboratoire.
pCGLM1	Vecteur CRISPR-Cas9 inducible, Ura3+	(Maroc and Fairhead, 2019)
pCGLM1-Ya2	Séquence codant un ARNg ciblant Ya cloné dans pCGLM1, Ura3+	(Maroc et al., 2020)
pJH2972	Vecteur CRISPR-Cas9, Ura3+	<a href="https://protocolexchange.researchsquare.com/article/np-rot-5791/v1">https://protocolexchange.researchsquare.com/article/np-rot-5791/v1</a>

## II.2 Construction des souches non publiées

Les protocoles de construction des souches par la méthode pop-in/pop-out, par changement de type sexuel ou encore par CRISPR-Cas9 sont décrits dans (Maroc et al., 2020). Le fragment  $\Delta hml$  utilisé pour déléter *HML* a été construit comme décrit dans (Maroc et al., 2020) en utilisant les amorces Delta-HML-F1, Delta-HML-F2, Delta-HML-R1 et Delta-HML-FR2 et la souche BG87 comme matrice. Le fragment *HMRa-inc* utilisé pour remplacer *HMRa* par *HMRa-inc* a été construit par une PCR sur la souche YL09 en utilisant les amorces gs06 et gs07. Le fragment  $\Delta hmr$  utilisé pour déléter *HMR* est celui construit dans (Maroc et al., 2020). La construction des différentes souches non publiées et utilisées au cours de ces travaux sont résumés Tableau 4.

**Tableau 4. Construction des souches non publiées utilisées au cours de cette thèse.**

<b>Souches construites par pop-in/pop-out</b>				
<b>Nom et génotype</b>	<b>Souche parentale</b>	<b>Locus ciblé</b>	<b>Fragment de PCR utilisé pour le pop-in</b>	<b>Fragment de PCR utilisé pour le pop-out</b>
$\Delta\Delta\Delta$ T10.5	SL-CG1	<i>HML</i>	ZUALPHA	$\Delta hml$
SL-CG6	CGM390	<i>HMR</i>	ZUA	<i>HMRa-inc</i>
<b>Souches construites par changement de type sexuel</b>				
<b>Nom et génotype</b>	<b>Souche parentale</b>	<b>Locus ciblé</b>	<b>Plasmide utilisé</b>	<b>Matrice pour la mutation du(des) locus ciblé(s)</b>
SL-CG4	CGM390	<i>HML</i>	p7.1-MATalpha-inc	Le locus plasmidique <i>MATalpha-inc</i>
SL-CG5	CGM460	<i>MAT</i>	p7.1-MATalpha-inc	Le locus plasmidique <i>MATalpha-inc</i>
SL-CG7	SL01	<i>MAT</i>	p7.1-MATa-inc	Le locus plasmidique <i>MATa-inc</i>
<b>Souches construites par CRISPR-Cas9</b>				
<b>Nom et génotype</b>	<b>Souche parentale</b>	<b>Locus ciblé</b>	<b>Plasmide utilisé</b>	<b>Matrice pour la mutation du(des) locus ciblé(s)</b>
$\Delta\Delta\Delta$ T14	CGM498	<i>HMR</i>	pJH2972-Ya2	$\Delta hmr$

## **II.3 Induction du gène *HO* de *S. cerevisiae* et du gène *cas9* de *Streptococcus pyogenes* et quantification de la mortalité**

Le protocole utilisé pour induire l'expression de *ScHO* ou de *CAS9* est déjà publié dans les articles qui constituent la majorité des résultats obtenus au cours ma thèse (Boisnard et al., 2015; Maroc and Fairhead, 2019; Maroc et al., 2020). Toutefois, étant donné qu'il a été utilisé dans la quasi-totalité des expériences réalisées, publiées ou non, au cours de cette thèse, il est, de nouveau, détaillé ici.

Les gènes *ScHO* et *CAS9* sont tous deux clonés sous contrôle du promoteur pMET3 dans les plasmides p7.1 et pCGLM1 respectivement (Boisnard et al., 2015; Maroc and Fairhead, 2019). Le promoteur pMET3 est induit en absence de méthionine et cystéine et est réprimé en présence de forte concentration (2mM) de ces deux acides aminés. L'induction de ces gènes a été faite en milieu solide et liquide dans différentes souches. Avant chaque induction, le type sexuel de chacun des locus portant un site Ho sauvage des transformants est vérifié par PCR afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu de changement de type sexuel avant induction. La PCR est réalisée en utilisant des couples d'amorces spécifiques (Maroc et al., 2020) à chaque locus et à chaque type sexuel. Ainsi la spécificité du locus est assurée par une amorce s'hybridant dans une région en amont du locus étudié et la spécificité du type sexuel est assurée par une amorce de la version sauvage ou mutée des sites de coupures de l'endonucléase Ho.

### **II.3.1 Induction en milieu solide**

Les transformants portant le plasmide d'intérêt sont mis en culture toute une nuit à 28 °C avec agitation (rpm = 140). Le lendemain, les cellules sont comptées au microscope optique sur cellule de Thoma et diluées afin d'en étaler un nombre contrôlé sur milieu solide inducteur et sur le milieu solide répresseur (dont les compositions sont détaillées (Maroc et al., 2020)). Les cultures sur milieu solide sont incubées deux jours à 28°C. La quantification de la létalité se fait, pour le même nombre de cellules étalées, par le

rapport du nombre de colonies obtenues sur milieu inducteur et du nombre de colonies obtenues sur milieu répresseur, exprimée en pourcentage. Lorsque le taux de survie est inférieur à 1 %, les colonies sont confluentes sur le milieu répresseur à une dilution pour laquelle des colonies isolées peuvent être observées sur milieu inducteur. Dans ce cas, la survie est calculée de la façon suivante : i) par comparaison du nombre de *Colony Forming Units* (CFU) sur le milieu inducteur avec le nombre théorique de cellules étalées sur ce même milieu, estimé par le comptage sur cellule de Thoma; ii) ce ratio est ensuite corrigé par le ratio de CFU avec le nombre de cellules comptées, estimées en étalant 200 cellules sur milieu répresseur. Toutes les valeurs proviennent d'un minimum de deux transformants indépendants.

### **II.3.2 Induction en milieu liquide**

Les transformants sont mis en culture toute la nuit à 28 °C et le lendemain, les cellules sont dénombrées sur cellule de Thoma, lavées avec de l'eau miliQ et resuspendues dans de l'eau miliQ. Un erlen contenant du milieu inducteur liquide est ensuite inoculé avec ces cellules de façon à avoir un titre de départ de  $10^6$  cellules/mL et la culture est placée à 28 °C avec agitation. Pour chaque point de la cinétique, un échantillon de culture est compté au microscope sur cellule de Thoma, dilué dans de l'eau miliQ et étalé sur milieu répresseur. La survie est calculée en comparant le nombre de CFU obtenu sur milieu répresseur après 48 H de croissance avec le nombre théorique de cellules étalées, estimé par comptage.

### **I.3.3 Quantification de l'efficacité du changement de type sexuel**

Lors d'induction solide, la détermination du type sexuel pour chaque locus se fait par PCR sur des colonies isolées obtenues sur milieu inducteur, appelés clones induits ou survivants (au moins 10 colonies sont testées par transformant induit). À cette étape, pour un locus donné, il est possible d'obtenir : i) des colonies « mixtes » présentant au moins deux types sexuels différents ou ii) des colonies ne présentant qu'un seul type sexuel. Après cette étape, au moins quatre colonies « mixtes » sont diluées puis étalées

sur milieu YPglu répresseur (YPglu +2mM de Methionine et Cystéine) afin d'obtenir des colonies « pures » (sous clones) pour un même type sexuel. Le type sexuel des locus est déterminé par PCR pour au moins huit colonies obtenues après sous-clonage d'une colonie issue du milieu inducteur.

Lors d'induction liquide, la détermination du type sexuel pour chaque locus se fait par PCR sur des colonies isolées obtenues sur milieu répresseur (au moins 20 colonies ont été testées par expérience).

#### **II.4 Cinétique des coupures à *HML*, *MAT* et *HMR* et vérification génomique des souches construites par Southern-blot**

Une induction liquide est réalisée dans un litre de culture inductrice. A chaque temps d'intérêt de la cinétique, i) un échantillon de cellules de volume 50 à 300 mL est prélevé et les cellules sont récupérées en centrifugeant l'échantillon 1 minute à 11 000 g à 4°C. Le culot cellulaire est soit gardé à -80°C soit utilisé tout de suite après la centrifugation. ii) un échantillon de cellules est prélevé, compté sur cellule de Thoma, dilué et étalé sur milieu répresseur solide afin de vérifier, par la létalité, que l'induction de *ScHO* a bien été réalisée. La même chose est réalisée afin d'obtenir les cellules pour réaliser des extraits protéiques en vue d'un western-blot.

Les étapes suivantes sont réalisées pour tous les Southern-blot, que ce soient des cinétiques de coupures ou de la vérification génomique de souches construites. L'ADNg est extrait en utilisant le kit QiaAmp DNA Mini Kit selon les recommandations du fabricant (© Qiagen) et resuspendu dans 50 µL de TE 1X. Cinq µL de la solution d'ADNg sont déposés sur gel et sa concentration est déterminée par l'utilisation d'un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc). Un à deux µg d'ADNg sont digérés avec les enzymes de restriction adéquates selon les recommandations du fabricant (Thermo Fisher Scientific Inc). L'ADN digéré est ensuite précipité par ajout de 10 µL de NaAc 3M pH 5,2 et de 200 µL d'éthanol 100% pour 100 µL de mélange réactionnel de digestion. Le tube est placé à -80 °C pendant 30 min puis il est centrifugé pendant 5 min à 12 000

g à 4°C, deux fois, en éliminant bien le surnageant après chaque centrifugation. L'ADN est finalement repris dans 20 µL de TE 1X. Le protocole du Southern-blot est détaillé dans (Boisnard et al., 2015). Pour la vérification génomique des souches construites, les membranes ont été hybridées deux fois avec des sondes différentes et ont donc, après la première hybridation, été strippées afin d'enlever la première sonde. Cela a été fait en incubant les membranes à 45°C pendant 30 min puis deux fois à température ambiante dans du NaOH 0,2M + SDS 0,1%. Les membranes ont ensuite été lavées deux fois dans du SSC pendant 5 min à température ambiante puis elles ont été utilisées afin de refaire un Southern-blot à partir de l'étape d'hybridation de la membrane.

## II.5 Extraction protéiques et western-blot

### II.5.1 Extraction protéiques chez la levure

Les cellules, récoltées suite à une induction liquide, sont lavées une fois avec de l'H<sub>2</sub>O milliQ et sont resuspendues dans de l'H<sub>2</sub>O milliQ. Un volume correspondant à un total de 10 unités de DO<sub>600nm</sub> de chaque culture est centrifugé dans des tubes Eppendorf de 2 mL pendant 5 min à 4 000 t/min. Après élimination du surnageant, les cellules sont reprises dans 200 µl d'urée 8M et 200 µl de solution Laemmli 2X et 100 µl de billes de verre de 0,45 mm de diamètre sont ajoutés. Les tubes sont incubés à 95 °C dans un bloc chauffant pendant 3 min avant d'être vortexé pendant 30 s, deux fois de suite. Les tubes sont mis à centrifuger 1 min à 11 000g et le surnageant (extrait protéique) est transféré dans un tube propre.

**Tampon Laemmli 2X**: Tris-HCl (pH 6,8) à 125 mM, SDS (vol/vol) à 4%, β-mercaptoéthanol (vol/vol) à 1%, Glycérol pur (vol/vol) à 20% et Bleu de Bromophénol (p/vol) à 0,05%

## II.5.2 Western-blot

Dix  $\mu\text{l}$  d'extrait protéique sont déposés sur un gel polyacrylamide 4–20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gel (© 2020 Bio-Rad Laboratories, Inc). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF Trans-Blot Turbo Mini 0.2  $\mu\text{m}$  (© 2020 Bio-Rad Laboratories, Inc) dans un appareil de transfert Trans-Blot Turbo Transfer System (© 2020 Bio-Rad Laboratories, Inc) en suivant les recommandations du fabricant. Après avoir été bloquée toute une nuit à 4 °C dans du TBS-Tween contenant 2 % de lait, la membrane est hybridée avec un anticorps primaire anti-GFP de qualité CHIP (ab290, © 1998-2020 Abcam plc). La membrane est révélée par chemiluminescence.



## III. Résultats

### III.1 Construction et utilisation du premier système CRISPR-Cas9 inducible chez *C. glabrata*

#### III.1.1 Résumé de la publication

Le système CRISPR-Cas9 est un outil puissant d'édition des génomes qui est aujourd'hui utilisé dans de nombreuses espèces. Chez les levures, le système a tout d'abord été mis au point chez *S. cerevisiae* (DiCarlo et al., 2013) et depuis 2016, il a été adapté chez *C. glabrata* (Cen et al., 2015; Enkler et al., 2016). Toutefois, les systèmes existant chez *C. glabrata* ne permettaient pas de contrôler la coupure puisque, dans ces systèmes, le gène *CAS9* est sous contrôle d'un promoteur constitutif et le promoteur sous contrôle duquel peut être cloné l'ARNg est également constitutif. Au cours de ma thèse, afin d'étudier la létalité liée à la coupure double brin par Ho au locus *MAT*, j'ai eu besoin d'utiliser un système CRISPR-Cas9 inducible chez *C. glabrata*. En effet, j'ai voulu savoir si la forte létalité liée au changement de type sexuel chez *C. glabrata* était dû à la coupure double brin, *per se*, au locus *MAT*. Afin de tester cette hypothèse, j'ai voulu induire une cassure double brin au locus *MAT*, avec une autre endonucléase que la protéine Ho, en utilisant la protéine Cas9 (cette partie de ma thèse est détaillée dans le chapitre « [III.2 Etude de la létalité liée au changement de type sexuel chez \*C. glabrata\*](#) »). Afin que les conséquences (potentielle létalité induite et réparation de la coupure) d'une coupure au locus *MAT* par la protéine Ho et par la protéine Cas9 soient comparables, il fallait que je puisse induire cette coupure dans les mêmes conditions. De plus, je n'ai pas pu utiliser le système CRISPR-Cas9 inducible de chez *S. cerevisiae*. En effet, plusieurs systèmes existent chez *S. cerevisiae*, certains sont constitutifs alors que d'autres sont inducibles (DiCarlo et al., 2013; Xie et al., 2018). Toutefois, ces derniers reposent sur les promoteurs des gènes *GAL* dont l'expression activée par l'ajout de galactose, comme source de carbone, dans le milieu. Or, *C. glabrata* est gal- et n'a pas conservé les gènes *GAL*, il m'était donc impossible de les

utiliser chez *C. glabrata*. Par conséquent, j'ai construit le premier système CRISPR-Cas9 inductible chez *C. glabrata* qui a fait l'objet de la publication « *A new inducible CRISPR-Cas9 system useful for genome editing and study of double-strand break repair in Candida glabrata* » dans le journal *Yeast*.

Le système CRISPR-Cas9 construit repose sur un unique plasmide *URA3*. Le gène *CAS9* de *Streptococcus pyogenes* est cloné sous contrôle du promoteur inductible de *C. glabrata* pMET3 et l'ARNg peut être cloné sous contrôle du promoteur constitutif de *S. cerevisiae* pSNR52. Ainsi, par le contrôle de l'expression du gène *CAS9*, la coupure de Cas9 est contrôlée, dans les mêmes conditions que celle de la protéine Ho ; elle est induite si le milieu ne contient pas de méthionine ni de cystéine et elle est réprimée si le milieu contient 2 mM de chacun de ces deux acides aminés. Dans cette publication, j'ai démontré que qu'il n'y avait pas de fuite d'expression du gène *CAS9* dans mon système et que la coupure est très efficace (d'au moins 95 %, dans le gène *ADE2*). Ce système CRISPR-Cas9 permet non seulement la construction de mutants efficace et rapide par NHEJ infidèle mais permet également l'augmentation de l'efficacité de la RH entre un locus donné et une séquence donneuse d'un facteur. De plus, par l'induction de coupure par Cas9 dans le gène *ADE2*, dans la souche sauvage HM100, en milieu liquide et solide, j'ai pu observer une différence de survie entre ces deux milieux (95 % de survie sur milieu solide contre 5 % de survie en milieu liquide à T=2H d'induction de *cas9*). Ces résultats suggèrent un NHEJ fidèle très efficace chez *C. glabrata* ainsi que des checkpoints du cycle cellulaire moins stricts que chez *S. cerevisiae* qui permettraient aux cellules de continuer à se diviser malgré la présence d'une CDB. Enfin, j'en ai conclu que ce système permettrait une édition efficace du génome de *C. glabrata* et par le contrôle de la coupure par Cas9, cela permettrait l'étude de la réparation de cassures double brin génomiques comme cela a pu être fait chez *S. cerevisiae* (Lemos et al., 2018).

### **III.1.2 Publication**

## RESEARCH ARTICLE

# A new inducible CRISPR-Cas9 system useful for genome editing and study of double-strand break repair in *Candida glabrata*

Laetitia Maroc  | Cécile Fairhead 

Génétique Quantitative et Évolution–Le Moulon, INRA–Université Paris-Sud–CNRS–AgroParisTech, Batiment 400, UFR des Sciences Orsay, Orsay, France

**Correspondence**

Cécile Fairhead, Génétique Quantitative et Évolution–Le Moulon, INRA–Université Paris-Sud–CNRS–AgroParisTech, Batiment 400, UFR des Sciences, Orsay, CEDEX F 91405, France.  
Email: cecile.fairhead@u-psud.fr

**Abstract**

In recent years, the CRISPR-Cas9 system has proven extremely useful for genome editing in many species, including the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* and other yeast species such as *Candida glabrata*. Inducible CRISPR-Cas9 systems have the additional advantage of allowing to separate the transformation step of the organism by the CRISPR-Cas9 system, from the cutting and repair steps. This has indeed been developed in *S. cerevisiae*, where most inducible expression systems rely on the *GAL* promoters. Unfortunately, *C. glabrata* is gal<sup>-</sup> and lacks the *GAL* genes, like many other yeast species. We report here the use of a vector expressing *cas9* under the control of the *MET3* promoter, with the guide RNA cloned into the same plasmid. We show that it can be used efficiently in *C. glabrata*, for both described outcomes of CRISPR-Cas9-induced chromosome breaks; nonhomologous end joining in the absence of a homologous repair template; and homologous recombination in the presence of such a template. This system therefore allows easy editing of the genome of *C. glabrata*, and its inducibility may allow identification of essential genes in this asexual yeast, where spore lethality cannot be observed, as well as the study of double-strand break repair.

**KEYWORDS**

DSB repair, genome editing, inducible CRISPR-Cas9, nonhomologous end joining, yeast

## 1 | INTRODUCTION

Non-*albicans* *Candida* species have been on the rise in recent years and *Candida glabrata* is the major non-*albicans* *Candida* in many developed countries (Rodrigues, Silva, & Henriques, 2014). The *Candida* genus is not monophyletic, and *C. glabrata* is not part of the major clade that includes *C. albicans*. It is, in fact, quite closely related to the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Dujon et al., 2004). Thanks to this, certain molecular tools and gene constructs can be transferred from *S. cerevisiae* to *C. glabrata* such as marker genes like *kanMX* (Wach, Brachat, Pöhlmann, & Philippsen, 1994) and autonomous replication sequences (Muller, Hennequin, Gallaud, Dujon, & Fairhead, 2008), but specific systems still need to be set up in some cases.

One of the most promising genome engineering technologies is the CRISPR-Cas9 system (Knott & Doudna, 2018; Roy et al., 2018), and this bacterial system, relying on the Cas9 endonuclease and a guide RNA (gRNA), has been adapted to provoke chromosome double-strand breaks (DSBs) at targeted loci in many species. The DSBs can be repaired through nonhomologous end joining (NHEJ) if no homologous sequence is present. Error-prone NHEJ that introduces small insertions or deletions (indels) at religation makes the cut site disappear so that it is not recut (Adames, Gallegos, & Peccoud, 2019). This results in modifications that are markerless but can be challenging to screen. A recent large-scale analysis of such events has shown that, in human cells, targeted loci differ in the number of types of repair events observed, with some sites exhibiting a major repair mechanism,

whereas others exhibit a variety of different indels after repair (Chakrabarti et al., 2019). In the presence of a homologous sequence, homologous recombination (HR) can occur, with varying efficiency depending on the organism involved and on the type of homologous template (circular or linear, double strand or single strand; Cubbon, Ivancic-Bace, & Bolt, 2018). This leads to the replacement of the existing cut locus by a construct that bears flanking sequences identical to the cut ends of the chromosome.

In yeasts, the system has been used, first and foremost, in *S. cerevisiae*, for genome engineering (DiCarlo et al., 2013) but also for the study of the repair of DSBs (Lemos et al., 2018) and for mating-type switching (Xie et al., 2018). Several versions of the CRISPR-Cas9 systems have also been designed for *C. glabrata* (Cen, Timmermans, Souffriau, Thevelein, & Van Dijck, 2017; Enkler, Richer, Marchand, Ferrandon, & Jossinet, 2016; Vyas et al., 2018), with success in obtaining repair events of both NHEJ and HR types.

All systems in *C. glabrata* rely on constitutive promoters, but having an inducible CRISPR-Cas9 system is of major interest in a species where no traditional genetics can be performed. *C. glabrata* is an asexual species, and only haploid cells are ever isolated. In such cases, the essentiality of a gene can never be proven by tetrad analysis of a heterozygous diploid deletion that is made to undergo meiosis. It is difficult, when deletion experiments yield no transformants, to determine whether this is because the gene is essential or because experiments fail for other reasons such as rarity of recombination due to nonaccessibility of chromatin, for example. In the CRISPR-Cas9 systems developed previously for *C. glabrata*, the expression of both components is constitutive and happens as soon as the construct is transformed into the recipient cell. If the expression and cut are efficient, this results in colonies that have repaired the cut, either through NHEJ or HR (Enkler, Richer, Marchand, Ferrandon, & Jossinet, 2016). An inducible system allows the transformation step and subsequent selection for colonies to be distinct from the DNA-cutting step, thus enabling controlled analysis of the appearance of colonies with repaired genomes.

In *S. cerevisiae*, some of the most widely used inducible promoters are those of the *GAL* genes, because they are both strongly induced and turned off (Johnston, 1987). The system relies on the sugar source in the medium, and these represent nontoxic and "physiological" growth conditions for the yeast, even though growth in glucose is always the most efficient one, all other conditions being equal. The *GAL1* and *GAL2* promoters have been used with CRISPR-Cas9 efficiently in *S. cerevisiae* (DiCarlo et al., 2013; Xie et al., 2018), but *C. glabrata* is *gal*<sup>-</sup> and lacks the *GAL* genes (Dujon et al., 2004), thereby prohibiting the use of these promoters. Luckily, another efficient inducible system for protein expression has been developed in *C. glabrata* that relies on the *MET3* promoter (Zordan et al., 2013). We have cloned the *cas9* gene, shown to function in an *S. cerevisiae* system (kind donation from J. E. Haber), under the control of the *MET3* promoter in a *C. glabrata* plasmid containing the *URA3* marker. Along with the *cas9* gene, in the same plasmid, we inserted the constitutive promoter *SNR52*, from the same *S. cerevisiae* system, for gRNA cloning. We show that, following transformation of the plasmid and

selection for Ura<sup>+</sup> colonies, the CRISPR-Cas9 system can be expressed conditionally in *C. glabrata*. We targeted the *ADE2* gene and show that both NHEJ and HR pathways are used for repair of the induced DSB.

Our inducible system has allowed us to follow the fate of cells upon chromosome cutting. This shows that the continuous induction of a DSB induces cell death and that faithful NHEJ is more prevalent than unfaithful NHEJ in *C. glabrata*.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Strains, cultures, and transformation

Two *C. glabrata* strains were used (Table 1), HM100 is a derivative of the sequenced type strain and BG87 a derivative of BG2, commonly used in laboratories. Yeast strains are grown in broth or on plates at 28°C, in YPD (nonselective, 1% yeast extract, 1% peptone, and 2% glucose), synthetic complete medium lacking uracil, methionine, and cysteine (induction conditions for the *MET3* promoter, SC-UMC, 0.34% yeast nitrogen base without amino acids, 0.7% ammonium sulfate, 2% glucose, supplemented with adenine and all amino acids except methionine and cysteine), or minimal medium supplemented with adenine and/or uracil (induction conditions for the *MET3* promoter, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, supplemented with adenine and/or uracil, WO + A, WO + U, WO + AU). For SC-UMC, medium is buffered by 10 ml of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 M and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.95 M per litre.

For selection of transformants of the Cas9 plasmid, and maintenance in repressive conditions for the *MET3* promoter, strains are grown in SC-Rep supplemented with 2 mM each of methionine and cysteine (SC-Rep) and in YPD supplemented with 2 mM each of methionine and cysteine (YPD-Rep) when repression but no selection is needed. Transformation is done according to the one-step lithium acetate transformation protocol from Gietz, Schiestl, Willems, and Woods (1995).

The *Escherichia coli* strain used is DH5α. It is grown in broth or on plates at 37°C, in LB supplemented with 100 µg/µl of ampicillin. Transformation was done as follows: 350 ng of the insert (PCR fragment) and 350 ng of the digested plasmid were mixed in H<sub>2</sub>O (molar ratio of 1:1) and used to transform a 100-µl aliquot of chemically ultracompetent *E. coli* DH5α cells (Hanahan, 1983). Cells were incubated with the DNA mix for 5 min on ice, and a heat shock was performed for 45 s at 42°C. The cells were then incubated 15 min on ice before adding 500 µl of LB. Finally, after a 1-hr incubation at 37°C with agitation (700 rpm), cells were spread on LB agar plates containing 100 µg/µl of ampicillin. Clones were obtained after a 24-hr incubation at 37°C.

**TABLE 1** Yeast strains used in this study

Name	Parent	Genotype	Reference
BG87	BG2	<i>MATa, ura3Δ:: NeoR, his3Δ</i>	Cormack and Falkow (1999)
HM100	CB138	<i>MATalpha, ura3Δ:: KANMX</i>	Muller et al. (2008)

## 2.2 | PCR for cloning and analysis

Fragments for cloning were amplified using Phusion Polymerase (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's conditions. For analysis of repair events, PCR were performed with Dream Taq (Thermo Fisher Scientific), on colonies (Boisnard et al., 2015).

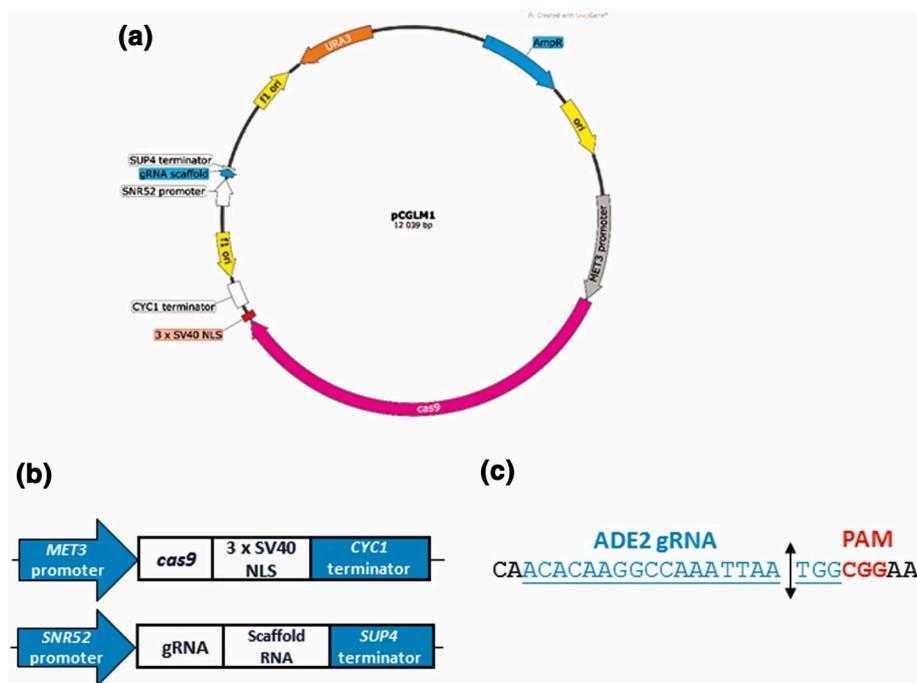
## 2.3 | Construction of the inducible CRISPR-Cas9 system for *C. glabrata*

We cloned a fragment from plasmid pJH-2972 (kind donation from J. E. Haber, <https://protocolexchange.researchsquare.com/article/nprot-5791/v1>), into plasmid pCU-MET3 (Zordan et al., 2013) at the *Xba*I/*Xho*I restriction sites (deleted in the construction; Figure 1a). The segment comprises the *Streptococcus pyogenes cas9* gene upstream of three copies of an SV40 nuclear localization signal and the *CYC1* terminator from *S. cerevisiae*, as well as the *Bp*II restriction site for insertion of the gRNA, between the constitutive *SNR52* promoter and the terminator of the *SUP4* gene from *S. cerevisiae*. This puts the *cas9* gene under the control of the inducible *MET3* promoter, whereas the gRNA is under the control of a constitutive promoter (Figure 1b). The segment was amplified by PCR using primers Pyr32-Cas9-F and Pyr32-Cas9-R, which share, respectively, 40 bp of homology to the ends of the digested plasmid. This allows PCR fragment cloning by HR in *E. coli* (Beyer et al., 2015). Correct assembly was confirmed by both analytic colony PCR and restriction digests. We also

checked that no mutation has been introduced in the *cas9* gene as well as in the *SNR52* promoter by Sanger sequencing at GENEWIZ Germany GmbH. The final construct, pCGLM1, is shown in Figure 1a (plasmid map generated by the SnapGene® software). Selection and maintenance of yeast transformants is achieved by growing on media selective for *URA3* (i.e., SC-Rep, SC-UMC, and WO + A). The plasmid can easily be lost by growing transformants on nonselective medium and isolating *Ura*<sup>-</sup> clones.

## 2.4 | Cloning of gRNA for ADE2 targeting, into plasmid pCGLM1

The *ADE2* gene targeted is gene CAGL0K10340g of *C. glabrata* (GRYC, <http://gryc.inra.fr/index.php?page=home>). The gRNA gene was synthesized (Integrated DNA Technologies [IDT Inc.]) as two 20-bp complementary single-strand DNA oligonucleotides with the last five nucleotides at their 3' ends complementary to the *Bp*II-digested plasmid ends (Table 2). They were duplexed by mixing 0.5 nmol of each oligonucleotide in ligase buffer before heating the DNA mix at 99°C for 5 min. The mix was then let to cool to room temperature on the bench. Duplexed gRNA was diluted 1,000-fold and 0.5 pmol of the duplex was used for ligation by T4 ligase with 15 ng of the *Bp*II-digested pCGLM1. The ligation reaction was used to transform *E. coli* DH5α ultracompetent cells. Insertion of the gRNA was checked by PCR, at both junctions, using each oligonucleotide as a primer in association with primers in Table 2 (pSNR52-F/gRNA-ADE2-R and gRNA-ADE2-F/Pyr-2R). This yielded plasmid pCGLM1-ADE2.



**FIGURE 1** The *Candida glabrata* inducible CRISPR-Cas9 system and the gRNA used in this study. (a) Plasmid map of pCGLM1. pCGLM1 is a centromeric *Ura*<sup>+</sup> selectable plasmid. (b) Context of the *cas9* and gRNA genes in the plasmid. Promoters, terminators, and gene structures are shown. Drawing not to scale. (c) gRNA targeting the *ADE2* gene of *C. glabrata*. Sequence shown is a segment of the *ADE2* gene of strain HM100, including the gRNA underlined and the PAM sequence in bold. Double arrow indicates the Cas9 cleavage site [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

**TABLE 2** Primers used in this study

Name	Sequence (5'3')	Localization
Primers for construction of the pCGLM1		
Pyr32-CAS9-F	gtcaggatataacactccagaaaagaacacctaacaatc CGGATCTCAAATGGATAAAAAG	Downstream of the <i>PCGK1</i> promoter and upstream of the <i>Streptococcus pyogenes cas9</i> ORF in pJH2972, Fw
Pyr32-CAS9-R	ataaatattgttgatggtgtagctgtgggtgtgttctc CATGATTACGCCAAGCTCGG	Downstream of the structural gRNA in pJH2972, Rv
gRNA for CRISPR/Cas9 and primers for checking gRNA insertion into pCGLM1		
gRNA-ADE2-F	ACACAAGGCCAAATTAATGG gtttt	In the <i>ADE2</i> ORF sequence, Fw
gRNA-ADE2-R	CCATTAATTTGGCCTTGTGT gatca	In the <i>ADE2</i> ORF sequence, Rv
pSNR52-F	GCTTCACTCATATTTATAC	In the <i>SNR52</i> promoter, Fw
Pyr2-R	GACGGTCTGATGGTAGTTC	In the <i>HIS3</i> terminator, Rv
Primers for <i>ADE2</i> deletion cassette construction and check of its insertion		
124	CATGTACCACAGTCAAGAG	Upstream of <i>HIS3</i> promoter, Fw
His3-ter-R	AAGAAGCAGAAGAACTAAC	Downstream of <i>HIS3</i> terminator, Rv
Up-Ade2-F	TAATTCAATTGCCATTTGTC	Upstream of <i>ADE2</i> , Fw
Up-Ade2H-R	acagagtcattggtccatacctcttgactgtgtacatg TGTATCGTTGGTAACAAATG	Upstream of <i>ADE2</i> , Rv
Down-Ade2H-F	aagtaatacatatccaatgatgactgagtagcagagca CCATCTATAAAAACCAAGTTAGTC	Downstream of <i>ADE2</i> , Fw
Down-Ade2-R	CTCCTAATCCCGTGCTTAC	Downstream of <i>ADE2</i> , Rv
Control-Ade2-F	ACAGCAATGATATTCTTAGC	Upstream of <i>ADE2</i> , Fw
Control-Ade2-R	CAAGATATACACACAGTTAC	Downstream of <i>ADE2</i> , Rv
CDS-his3-F	GTGGTTGACTTCTTCCAATA	In the <i>HIS3</i> ORF sequence, Fw
CDS-his3-R	CATCACCACACTAGCATATTC	In the <i>HIS3</i> ORF sequence, Rv
Primers for sequencing		
seq-ade2-1F	GGCGAACAGACCACTATAC	In the <i>ADE2</i> ORF sequence, Fw
seq-ade2-2R	CAACACAAGCATTAAATGGTG	In the <i>ADE2</i> ORF sequence, Rv

The lowercase letters represent sequence with no homology to template DNA, whereas homologous regions are indicated in uppercase.

Abbreviations: Fw, forward; Rv, reverse.

## 2.5 | Induction of *cas9* expression for NHEJ experiments

These experiments were done both in solid and liquid media. The control experiment where *cas9* is expressed without a gRNA was performed on plates as described below.

For induction on solid medium, transformants carrying the Cas9 plasmid are grown overnight in liquid SC-Rep medium, counted, and plated on SC-UMC plates as well as on repressive SC-Rep medium. Colonies are grown and counted, and plates are compared in order to estimate the survival rate (number of colonies obtained on induction medium divided by number of colonies obtained on repression medium, expressed as a percentage).

When targeting *ADE2*, colonies from induction plates are replica plated onto YPD-Rep, grown, and left to "age" so that the red pigment accumulates. Six colonies with the red phenotype were subcloned onto YPD-Rep (see Section 3 and Figure 2). All subclones obtained were then checked for adenine auxotrophy and at least 30 were

checked at the target locus by PCR using primers seq-ade2-1F and seq-ade2-2R (Table 2), located around the targeted cut site, and the PCR fragment was sequenced for six of them (GENEWIZ Germany GmbH).

For time course of induction in liquid medium, transformants were grown overnight in liquid SC-Rep medium, counted, washed, and resuspended in miliQ water at  $4.10^7$  cells/ml; 100  $\mu$ l was used to inoculate 40 ml of liquid SC-UMC medium, and the culture was placed at 28°C with agitation. For each time point, a sample of the culture was counted under the microscope, diluted in miliQ water, and plated on SC-Rep plates. These were also replica plated onto YPD-Rep, so that the red colony phenotype appeared. Survival rate is calculated by comparing the number of colony-forming units (CFUs) on SC-Rep with the number of cells plated, as estimated by counting. This is done on plates where 200 cells were spread. Because the percentage of red colonies is very low (see Section 3), we also plated a much larger number of cells in order to have a better estimation (see Table 5) at later time points.



**FIGURE 2** Pure Ade<sup>-</sup> and Ade<sup>+</sup> colonies obtained after plating a sectored red colony after *cas9* induction on plates in strain HM100. Cells were spread on YPD-Rep medium and grown for 48 hr at 28°C. The image is representative of the six subcloning experiments done [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

## 2.6 | Induction of *cas9* expression for HR experiments

In these experiments, the Cas9 cut is induced at the *ADE2* locus and a PCR fragment template for repair, harbouring the *HIS3* selection marker, is provided by transformation. This experiment has been conducted in strain BG87 as it is His<sup>-</sup>. The *HIS3* donor DNA was constructed in two steps: first, the *C. glabrata HIS3* gene under its own promoter was amplified by PCR, using the 124/His3-ter-R primers and HM100 genomic DNA as template (HM100 has the wild-type *HIS3* gene). The 500-bp upstream and downstream of the *ADE2* gene were also amplified by PCR with BG87 genomic DNA as template, using primers Up-ade2-F/Up-ade2H-R and Down-ade2H-F/Down-ade2-R, respectively. Primers Up-ade2H-R and Down-ade2H-F, respectively, contain 40 bp of homology to the 5' and 3' ends of the *HIS3* PCR fragment. These three fragments were then combined by fusion PCR using primers Up-ade2-F and Down-ade2-R.

Transformants containing the Cas9 plasmid, maintained in SC-Rep, are further transformed with the above PCR fragment and plated on WO + A, that is, medium selective for the Cas9 plasmid and for integration of the *HIS3* gene. Ade<sup>-</sup> colonies become red on this medium after refrigeration and do not need to be replica plated onto YPD-Rep. These colonies were then checked for adenine auxotrophy by replica plating on WO and 20 were checked at the target locus by PCR amplification of the 3' and 5' junctions of the inserted fragment (Table 2), using primers CDS-his3-F/Control-Ade2-R and Control-Ade2-1F/CDS-his3-R, respectively. Two quantities of donor DNA were used (Table S1) in the same transformation experiments in order to test for an effect on recombination efficiency.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Use of the pCGLM1 plasmid

We combined two plasmids, plasmid pCU-MET3 from Zordan et al. (2013) and plasmid pJH-2972 from J. E. Haber (<https://protocolexchange.researchsquare.com/article/nprot-5791/v1>), to construct pCGLM1 as explained in Section 2 (Figure 1a). The result is a single CEN-autonomous replication sequence-based plasmid, with

the *URA3* gene as marker, that expresses a gRNA constitutively and the Cas9 protein under the control of the *MET3* promoter that is activated in the absence of methionine and cysteine in the medium (induction medium).

Before cloning a gRNA, we checked whether there was a deleterious effect linked to expression of *cas9*, by transforming strains BG87 and HM100 with the *URA3*-containing pCGLM1 plasmid that does not encode any gRNA. Ura<sup>+</sup> transformants were plated on induction and repression plates. We compared the number of colonies on the two types of plates. As seen in Table 3, expression of *cas9* leads to a loss of about 10% of CFUs in the suspension that was plated.

A chosen gRNA can be cloned into pCGLM1 at the *BpI* site, in the form of a double-stranded oligonucleotide, as explained in Section 2. The final plasmid is used to transform the desired strain, and the DSB can be induced directly in order to obtain NHEJ repair events, or the DSB can be induced after further transformation with a PCR fragment for recombination.

After the desired construction has been obtained, the strain can easily be cured of the plasmid, by simply plating on YPD-Rep and checking the uracil auxotrophy by replica plating.

### 3.2 | Repair of the CRISPR-Cas9 cut by NHEJ

In the following experiment conducted in strain HM100, derived from the type strain (Table 1), the gRNA targets the *ADE2* gene (Figure 1c) and no template for HR is provided. We plated six Ura<sup>+</sup>, pCGLM1-*ADE2* transformants on induction medium without uracil for the selection of the plasmid. Table 4 shows that there is no apparent lethality associated to the CRISPR-Cas9 cut at *ADE2*, as cell survival is similar to that when expressing only *cas9*.

We analysed the molecular structure of repaired chromosomes in colonies from induction plates. As seen on Table 4, although no red colonies are observed out of 922 colonies on repressive medium, 112 out of 844 colonies exhibit a sectored red colony phenotype on induction plates. Such colonies were subcloned by plating on YPD-

**TABLE 3** Effect of *cas9* expression under the control of the *MET3* promoter, without a gRNA, in the two wild-type strains studied here

Strain	Plasmid	Transformant	Colony counts on repression plate	Colony counts on induction plate	Survival rate (%)	
HM100	pCGLM1	1	127	111	87	
		2	100	76	76	
		3	152	144	95	
		4	148	140	95	
		5	164	151	92	
		Mean ± SEM (%)				89 ± 4
BG87	pCGLM1	1	173	142	82	
		2	166	141	85	
		3	166	200	120	
		4	153	109	71	
		Mean ± SEM (%)				90 ± 11

**TABLE 4** Effect of targeting the *ADE2* gene on survival and efficiency of gene disruption

Transformant	Colony counts on repression plate	Colony counts on induction plate	Survival rate (%)	Number of sectored red colonies <sup>a</sup> on induction plate	Targeting efficiency <sup>b</sup> (%)	Number of sectored red colonies <sup>a</sup> on repression plate
1	113	98	87	31	32	ND
2	86	94	109	27	29	ND
3	146	77	53	4	5	0
4	177	173	98	19	11	0
5	215	184	86	15	8	0
6	185	218	118	16	7	0
Mean ± SEM (%)			92 ± 9		15 ± 5	

Abbreviation: ND, not done.

<sup>a</sup>After replica plating on YPD-Rep.

<sup>b</sup>Targeting efficiency is the ratio of the number of sectored red colonies to the total number of colonies on induction plates.

Rep and then checked for auxotrophy, in order to isolate pure *ade2*<sup>-</sup> mutants (Figure 2). As expected, all red colonies obtained after subcloning were auxotrophic for adenine, whereas all white colonies were prototrophs. Eight subclones each from six sectored red colonies (48 in total) were analysed by PCR around the cut site and revealed no large deletion or major rearrangement. One subclone from each independent colony was sequenced. Five out of six mutants show a 1-bp deletion, and one shows a 2-bp deletion (Figure 3).

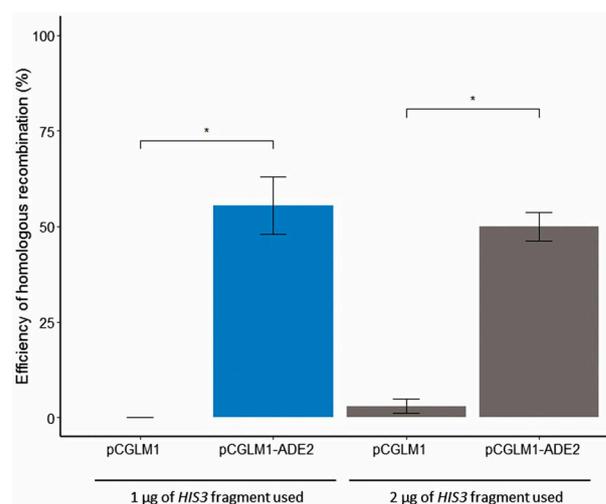
### 3.3 | Repair of the CRISPR-Cas9 cut by HR

In order to replace the *ADE2* gene by *HIS3* in strain BG87, derived from strain BG2 (Table 1), pCGLM1-*ADE2* transformants were transformed a second time with either 1 or 2 µg of the PCR *HIS3* DNA donor fragment that bears 500 bp of homology to the *ADE2* locus at each end (Section 2). Cells were directly plated onto medium selecting for (a) integration of *HIS3*, (b) presence of the plasmid, and (c) expression of the *MET3* promoter (i.e., WO + A). We first checked transformation of cells harbouring the pCGLM1 plasmid (without the gRNA gene) by the *HIS3* fragment (Figure 4). This confirmed that HR is not highly efficient in *C. glabrata*; very few *Ade*<sup>-</sup> red colonies were obtained; thus most transformants result from integration of the *HIS3* fragment outside of the *ADE2* gene.

When we expressed a gRNA along with *cas9*, in the presence of the same *HIS3* fragment, three types of colonies were obtained: white colonies (corresponding to the integration of *HIS3* in the genome but not at the *ADE2* locus), red colonies (corresponding to the integration

Strain	Sequence (5'→3')	Deletion
Wild-type	ACACAAGGCCAAATTAATGG <b>CGG</b>	NA
Mutant 1	ACACAAGGCCAAATT--TGG <b>CGG</b>	-2bp
Mutants 2 to 6	ACACAAGGCCAAATTA-TGG <b>CGG</b>	-1bp

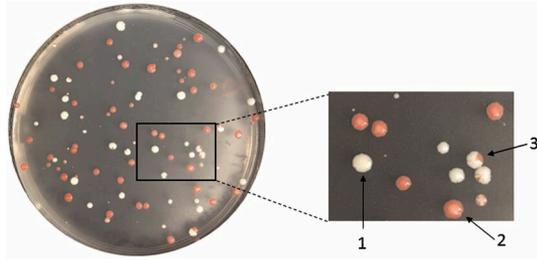
**FIGURE 3** The two different kinds of mutants obtained after *cas9* induction targeting *ADE2*, on plates, in strain HM100. NA, nonapplicable. Bold letters represent the PAM sequence



**FIGURE 4** Efficiency of homologous recombination at the *ADE2* locus with the *HIS3* fragment in strain BG87. Efficiency of homologous recombination is defined as the number of pure red *Ade*<sup>-</sup> colonies on the total number of colonies obtained on a same plate. Values from four experiments were averaged, the SEM used as estimate of the error, and the *p* value was calculated using the Wilcoxon test. \*: *p* value < .05 [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

of *HIS3* at the *ADE2* locus), and sectored white/red colonies (Figure 5). These colonies must result from two events: first, recombination of the *HIS3* marker in the genome but not at the *ADE2* locus. This must occur straight away so that the colony may form on plates depleted in histidine. Some cells from that colony must then have had their chromosome cut by *Cas9* at *ADE2* and this has been repaired by unfaithful NHEJ. No sectored colonies were observed without the gRNA, confirming the role of the *Cas9* cut in their formation. We obtained more than 50% of pure red colonies, and the rest was either white or sectored (Table S1). Thus, inducing a DSB at *ADE2* using the pCGLM1-*ADE2* plasmid highly stimulates HR with the donor DNA (Figure 4).

The efficiency of HR with the donor DNA does not significantly increase when 2 µg of donor DNA are used instead of 1 µg.



**FIGURE 5** Example of a transformation plate of strain BG87 harbouring both pCGLM1-ADE2 and the *HIS3* fragment. The original plate and a close-up are shown. (1) Pure Ade<sup>+</sup> His<sup>+</sup> white colony; (2) pure Ade<sup>-</sup> His<sup>+</sup> red colony; and (3) sectored His<sup>+</sup> colony containing both Ade<sup>+</sup> (white) and Ade<sup>-</sup> (red) cells. The image is representative of four repetitions of the same transformation (done with 2 µg of the *HIS3* fragment) [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### 3.4 | Survival of *C. glabrata* cells to the CRISPR-Cas9 cut

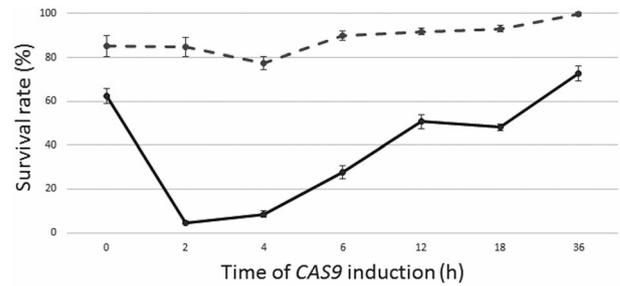
Our inducible system allows for the first time to follow the fate of *C. glabrata* cells upon Cas9 cutting, because the survival rate can be estimated without being confused with transformation efficiency, in the case of NHEJ repair in the absence of the *HIS3* fragment. As said above, we observe no lethality on plates (Table 4), but only around 15% of colonies are mutated at the cut locus. The others must have not been cut or religated faithfully and mutated the expression plasmid so that they can escape going back and forth between cut and religation. We reasoned that, perhaps, induction in liquid medium for a long time followed by plating on repression plates might result in a higher percentage of colonies mutated for the *ADE2* gene.

Unfortunately, this did not increase the percentage of red colonies, but performing a time course in liquid medium allowed us to observe the lethality induced by continuous recutting at the site.

Figure 6 shows that around only 5% of counted cells having spent 2 hr in liquid induction medium are able to give rise to a colony when subsequently plated on repressive medium. This indicates that at least 95% of cells undergo a Cas9 DSB. The number of CFU counted on plates then rises quite rapidly to give an apparent survival of ~50% after 12 hr.

Table 5 shows that, during a time course in liquid medium, survival is accompanied by unfaithful NHEJ in a minority of cases, as shown by the small number of red colonies. This is why we plated a large number of cells (see Section 2), which allows us to observe red colonies but not to estimate their percentage with precision.

We hypothesized that the majority of survivors, which are white, must have religated the broken ends faithfully, but there must have been a high selection pressure for a mutated copy of the plasmid because of continuous recutting. We checked whether expression plasmids were indeed mutated, by picking two independent white-colony survivors to the first induction, checking that they were indeed Ade<sup>+</sup>, and performing a second time course in induction medium. The lethality should be the same as in the original time course if the plasmid has remained intact. Figure 6 shows that this is not the case, as these survivors behave like the control cells that do not express the



**FIGURE 6** Survival rate during *cas9* induction. Black curve: HM100 expressing Cas9 targeting *ADE2* (harbouring pCGLM1-ADE2; mean from four experiments). Dashed curve: Survivors (Ade<sup>+</sup> white colonies from the time course experiment of HM100 carrying pCGLM1-ADE2 after 36 hr of *cas9* induction) placed anew in induction medium (mean from two experiments). Survival rate is calculated by comparing the number of colony-forming units on SC-Rep with the number of cells plated (200 cells), as estimated by counting, and is normalized by dividing it by the survival rate of the control strain, that is, the strain transformed by pCGLM1 grown in the same conditions. Error bars denote standard errors of the means

**TABLE 5** Disruption of the *ADE2* gene during the time course experiment of *cas9* induction

Number of cells plated	Number of pure red colonies							
	Before induction	Time of <i>cas9</i> induction (hr)						
		0	2	4	6	12	18	36
High	ND	ND	ND	ND	ND	0	6	5
200	0	0	0	1	1	2	0	1

High: 10<sup>3</sup> cells were plated at 12 hr, 10<sup>4</sup> cells at 18 hr, and 10<sup>5</sup> cells at 36 hr.

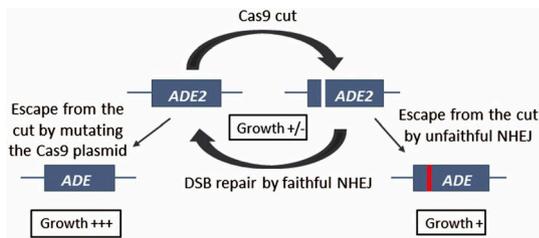
Abbreviation: ND, not done.

gRNA. Thus, we conclude that mutations in the expression plasmid allow cells to escape the cut and religation cycle.

## 4 | DISCUSSION

In this work, we report the construction and use of the first inducible CRISPR-Cas9 system for *C. glabrata*. Both the *cas9* gene under the control of the *MET3* promoter and the gRNA gene are on the same *URA3* plasmid. We show that this system induces DSBs at loci targeted thanks to the gRNA and that these can be repaired either through HR when a homologous sequence is present or through NHEJ when there is no donor DNA.

This system can be used for genetic engineering in *C. glabrata* and has the double advantage over previous systems, of being borne by a single plasmid and of being inducible. This allows the selection of transformants prior to the induction of cutting and repair, thus allowing distinction between these two steps. This also means that collections of transformed strains can be kept and stably stored. Furthermore, cells can easily be cured of this plasmid, thereby ensuring that the *URA3* marker can be reused for other experiments.



**FIGURE 7** Model for the DSB repair at *ADE2* in *Candida glabrata*. At least until 2 hr of *cas9* induction, *C. glabrata* cells are stuck in a futile cut/religation cycle preventing cell division. After 2 hr, some cells escape, either by mutagenic NHEJ at *ADE2* or by mutagenesis of the *Cas9* plasmid [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

We have shown that our system allows highly efficient gene replacement by HR upon *Cas9*-induced DSB. Indeed, we obtain more than 50% of correct on-target recombinants, whereas the same construction, with 500 bp of homology on either side of the fragment, in the absence of any DSB, leads to a maximum of 3% of on-target recombinants in our hands. When performing experiments on target genes that do not confer a quantifiable phenotype when mutated, such as *ADE2*, transformation with at least 2  $\mu\text{g}$  of donor DNA should insure that one transformant out of two is correct. Given the high efficiency of this system, the absence of correct transformants would be a better indicator of the essentiality of a gene than the absence of correct transformants in a classical gene-targeting experiment, that is, without DSB.

For the study of repair by NHEJ, in the absence of donor DNA, we performed DSB inductions both on plates and in liquid medium. This allowed us to see that there is no observable lethality on plates, even though the time course experiment shows that there is, at 2 hr of *cas9* induction, a high lethality (95%) caused by the DSB, thereby confirming that the cut is very efficient. This discrepancy between cultures on plates and in broth is surprising, but efficient NHEJ repair in cells and “leaky” cell cycle checkpoints may explain what we observe. Indeed, despite the fact that we could not find, in the literature, a study in *S. cerevisiae* where viability upon *Cas9* cutting is measured in the same way as we have done in this work, continuous induction of DSBs in this species, on plates or in liquid medium, in the absence of homology, leads to cell death. This is true whatever the endonuclease used, that is, *Ho*, *I-Sce I* or *Cas9* (Fairhead & Dujon, 1993; Moore & Haber, 1996; Yarrington, Verma, Schwartz, Trautman, & Carroll, 2018). The high survival rate observed on plates in *C. glabrata*, in the absence of donor DNA, must be due to NHEJ mechanisms that are more efficient than in *S. cerevisiae*, as already described (Cormack & Falkow, 1999; Corrigan, Kerwin-Iosue, Kuczmariski, Amin, & Wykoff, 2013). Because we obtained few sectorized red colonies and no pure red colonies, most NHEJ events must be faithful so as to recreate the intact *ADE2* gene. This induces a futile cycle of cut/religation that the cells can only escape by mutagenic NHEJ at *ADE2* or by mutagenesis of the *Cas9* plasmid, as illustrated by Figure 7. We reason that escape from the cut/religation cycle does not occur at the first cell division readily because we never obtained pure red colonies on induction plates and because the time course shows that only 5% of the cells

survive to the DSB at 2 hr. It could be argued that 5% of cells never undergo the DSB and that observed colonies result from these cells, but in order to obtain one surviving cell, a microcolony of at least 30 cells must have developed before cutting and the time course shows the highest lethality occurs after 2 hr. Furthermore, the presence of sectorized colonies shows that the *Cas9* plasmid is not mutated at the start of the experiment. Therefore, we favour the faithful NHEJ followed by recutting hypothesis. This futile cycle must allow some cells to divide, perhaps because of less restrictive cell cycle checkpoints that in *S. cerevisiae*, so that they can finally escape further cutting, by mutation of the cut site or mutation of the *Cas9* plasmid. On plates, this allows the formation of colonies and in liquid medium, this explains the increase in survival after the minimum observed at 2 hr. The fact that we observe much fewer red colonies when plating from liquid induction, even after 12 hr of induction, than when plating directly on induction medium can be explained by the much slower growth of *Ade*<sup>-</sup> compared with *Ade*<sup>+</sup> cells, as seen on Figure 2. *Ade*<sup>+</sup> cells that escape cutting will invade the liquid culture so that *Ade*<sup>-</sup> cells will be too diluted to be observed by plating.

In conclusion, our system allows easy genome editing in *C. glabrata*. Furthermore, the protocol allows for better control of the cutting step, so that it can also be used, for example, to examine repair of DSBs in the same fashion that it is done in *S. cerevisiae* (Lemos et al., 2018). In this work, we have used the system to confirm that faithful NHEJ is a major repair mechanism of chromosomal DSBs in *C. glabrata*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank J. E. Haber for providing the unpublished *cas9* plasmid. We thank members of our lab and the iGenolevures consortium (IRN from the CNRS N°0814) for stimulating discussions.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ORCID

Laetitia Maroc  <https://orcid.org/0000-0003-3144-0511>

Cécile Fairhead  <https://orcid.org/0000-0002-0456-0377>

## REFERENCES

- Adames, N. R., Gallegos, J. E., & Peccoud, J. (2019). Yeast genetic interaction screens in the age of CRISPR/Cas. *Current Genetics*, *65*, 307–327. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0887-8>
- Beyer, H. M., Gonschorek, P., Samodelov, S. L., Meier, M., Weber, W., & Zurbriggen, M. D. (2015). AQUA cloning: A versatile and simple enzyme-free cloning approach. *PLoS ONE*, *10*, e0137652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137652>
- Boisnard, S., Zhou Li, Y., Arnaise, S., Sequeira, G., Raffoux, X., Enache-Angoulvant, A., ... Fairhead, C. (2015). Efficient mating-type switching in *Candida glabrata* induces cell death. *PLoS ONE*, *10*, e0140990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140990>
- Cen, Y., Timmermans, B., Souffriau, B., Thevelein, J. M., & Van Dijck, P. (2017). Comparison of genome engineering using the CRISPR-Cas9 system in *C. glabrata* wild-type and *lig4* strains. *Fungal Genetics and Biology*, *107*, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.08.004>

- Chakrabarti, A. M., Henser-Brownhill, T., Monserrat, J., Poetsch, A. R., Luscombe, N. M., & Scaffidi, P. (2019). Target-specific precision of CRISPR-mediated genome editing. *Molecular Cell*, 73, 699–713.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.031>
- Cormack, B. P., & Falkow, S. (1999). Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics*, 151, 979–987.
- Corrigan, M. W., Kerwin-Iosue, C. L., Kuczmariski, A. S., Amin, K. B., & Wykoff, D. D. (2013). The fate of linear DNA in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida glabrata*: The role of homologous and non-homologous end joining. *PLoS ONE*, 8, e69628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069628>
- Cubbon, A., Ivancic-Bace, I., and Bolt, E.L. (2018). CRISPR-Cas immunity, DNA repair and genome stability. *Bioscience Reports* 38, BSR20180457, DOI: <https://doi.org/10.1042/BSR20180457>.
- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 41, 4336–4343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., ... Goffard, N. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430, 35–44. <https://doi.org/10.1038/nature02579>
- Enkler, L., Richer, D., Marchand, A. L., Ferrandon, D., & Jossinet, F. (2016). Genome engineering in the yeast pathogen *Candida glabrata* using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*, 6, 35766. <https://doi.org/10.1038/srep35766>
- Fairhead, C., & Dujon, B. (1993). Consequences of unique double-stranded breaks in yeast chromosomes: Death or homozygosity. *MGG Molecular & General Genetics*, 240, 170–180. <https://doi.org/10.1007/BF00277054>
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., & Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11, 355–360. <https://doi.org/10.1002/yea.320110408>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Johnston, M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: The GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 51, 458–476.
- Knott, G. J., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 361, 866–869. <https://doi.org/10.1126/science.aat5011>
- Lemos, B. R., Kaplan, A. C., Bae, J. E., Ferrazzoli, A. E., Kuo, J., Anand, R. P., ... Haber, J. E. (2018). CRISPR/Cas9 cleavages in budding yeast reveal templated insertions and strand-specific insertion/deletion profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E2040–E2047. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716855115>
- Moore, J. K., & Haber, J. E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 2164–2173. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.5.2164>
- Muller, H., Hennequin, C., Gallaud, J., Dujon, B., & Fairhead, C. (2008). The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types. *Eukaryotic Cell*, 7, 848–858. <https://doi.org/10.1128/EC.00456-07>
- Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33, 673–688. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2009-3>
- Roy, B., Zhao, J., Yang, C., Luo, W., Xiong, T., Li, Y., ... Kristiansen, K. (2018). CRISPR/Cascade 9-mediated genome editing-challenges and opportunities. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00240>
- Vyas, V. K., Bushkin, G. G., Bernstein, D. A., Getz, M. A., Sewastianik, M., Barrasa, M. I., ... Fink, G. R. (2018). New CRISPR mutagenesis strategies reveal variation in repair mechanisms among fungi. *MSphere*, 3. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00154-18>
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., & Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10, 1793–1808. <https://doi.org/10.1002/yea.320101310>
- Xie, Z.-X., Mitchell, L. A., Liu, H.-M., Li, B.-Z., Liu, D., Agmon, N., ... Boeke, J. D. (2018). Rapid and efficient CRISPR/Cas9-based mating-type switching of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)*, 8, 173–183. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300347>
- Yarrington, R. M., Verma, S., Schwartz, S., Trautman, J. K., & Carroll, D. (2018). Nucleosomes inhibit target cleavage by CRISPR-Cas9 in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 9351–9358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810062115>
- Zordan, R. E., Ren, Y., Pan, S.-J., Rotondo, G., De Las Peñas, A., Iluore, J., & Cormack, B. P. (2013). Expression plasmids for use in *Candida glabrata*. *G3 (Bethesda)*, 3, 1675–1686. <https://doi.org/10.1534/g3.113.006908>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Maroc L, Fairhead C. A new inducible CRISPR-Cas9 system useful for genome editing and study of double-strand break repair in *Candida glabrata*. *Yeast*. 2019;1–9. <https://doi.org/10.1002/yea.3440>

## III.2 Etude de la létalité liée au changement de type sexuel chez *C. glabrata*

### III.2.1 Résumé de la publication

Cette partie de ma thèse concerne principalement l'étude de la létalité liée au changement de type sexuel induit par *ScHO* chez *C. glabrata*. Il s'agissait de mieux caractériser la CDB réalisée par l'endonucléase *ScHo* aux trois locus sexuels, *HML*, *MAT* et *HMR*, la réparation de ces locus ainsi que d'explorer le lien qui existe entre induction du changement de type sexuel et forte létalité chez *C. glabrata*. La majeure partie des résultats de ce chapitre sont publiés dans l'article intitulé « *A single Ho-induced double-strand break at the MAT locus is lethal in Candida glabrata* » publié dans le journal PLOS Genetics et présenté ci-dessous.

Dans cette publication, j'ai démontré que le locus *HMR* peut également changer de type sexuel à la suite de l'induction de *ScHO* et donc qu'il est coupé par *ScHo* chez *C. glabrata*. Par la construction d'un mutant  $\Delta rad51$  dans la souche sauvage HM100, j'ai apporté la preuve formellement que le changement de type sexuel, aux trois locus sexuels, repose sur la RH Rad51-dépendante. Dans le but de comprendre d'où vient cette forte létalité associée au changement de type sexuel chez *C. glabrata*, Youfang Zhou-Li avait construit au laboratoire, tout une série de souches mutées précisément sur le site Ho de telle façon qu'un locus sexuel portant cette mutation ne puisse plus être coupé par la protéine Ho et donc ne puisse plus changer de type sexuel, il est inconvertible (*Inc*); *HML-inc*, *MAT-inc* et *HMR-inc*. Les mutations ont été introduites dans la région du site Ho identifiée comme essentielle pour la coupure par la protéine Ho chez *S. cerevisiae* (Nickoloff et al., 1986). Cette série de souches permet de contrôler à la fois le nombre et la position de la/des coupure(s) par *ScHo* aux différents locus sexuels et n'avait pas été publiée avant ma publication (Maroc et al., 2020). J'ai utilisé ces souches fréquemment, au cours de ma thèse, afin d'apporter plusieurs résultats. L'utilisation de souches mimant la situation de *S. cerevisiae*, dans laquelle seul le locus

*MAT* peut être coupé par la protéine Ho et les locus *HML* et *HMR* sont protégés de la coupure, souches YL03 (*HMLalpha-inc MATalpha HMRa-inc* et *HMLalpha-inc MATa HMRa-inc*), a permis de démontrer que l'expression de *ScHO* dans ces souches entraîne une létalité similaire à celle de la souche sauvage avec plus de 99,9 % de mort cellulaire. A l'inverse, lorsque le locus *MAT*, seul, est protégé de la coupure (souche YL04, *HMLalpha MATalpha-inc HMRa*), et à la suite de l'induction de *ScHO*, la survie augmente considérablement jusqu'à environ 21 %. Cela démontre que la coupure au locus *HML* ou *HMR* n'a pas de rôle important dans l'induction de la très forte létalité, et qu'il suffit d'une seule coupure de *ScHo* au locus *MAT* pour entraîner une mort cellulaire drastique chez *C. glabrata*. J'ai également démontré que les coupures à *HML* et *HMR* par *ScHo* étaient très efficaces et menaient uniquement à une mort cellulaire élevée lorsqu'il n'y avait pas de matrice pour la RH. Par la construction de souches dans lesquelles le locus *MAT* peut être coupé par la protéine Ho et ne peut se réparer qu'avec une seule matrice de réparation inconvertible, présente soit à *HML* soit à *HMR*, j'ai démontré que la forte létalité induite par l'expression de *ScHO* ne résultait pas de produits de réparation intermédiaires toxiques du locus *MAT* avec ses matrices de réparation. Le fait de réduire le temps d'expression de l'endonucléase de *ScHO* ne sauve pas les cellules de la mort ; l'arrêt cellulaire est précoce et irréversible, menant à la mort cellulaire. Par l'induction d'une CDB au locus *MAT* par la protéine Cas9 grâce à mon système inductible CRISPR-Cas9 décrit ci-dessus, j'ai pu déterminer que i) le changement de type sexuel peut être induit chez *C. glabrata* par le système CRISPR-Cas9 et sans létalité, ii) que la forte létalité liée la coupure au locus *MAT* est spécifique de la CDB de *ScHo*.

De plus, lorsque les trois locus sexuels, *HML*, *MAT* et *HMR* sont inconvertibles et donc protégés de la coupure, la survie n'atteint pas 100 %, à la suite de l'induction de l'expression de *ScHO*, mais atteint au plus 61 %. Cela suggère une toxicité de l'endonucléase *ScHo* en dehors de son rôle de coupure aux locus sexuels chez *C. glabrata* que j'ai essayé de caractériser. Par la construction de souches dans lesquelles un locus sexuel est entièrement délété et les deux autres sont inconvertibles (et ce dans

toutes les combinaisons possibles), j'ai démontré que dans ces souches la survie augmente significativement jusqu'à ~ 80 %, quel que soit le locus délété. Cela suggère une toxicité de la simple fixation de ScHo (sans coupure) aux locus sexuels chez *C. glabrata*.

Finalement, j'ai étudié si chacun des trois locus sexuels utilisait préférentiellement une matrice de réparation pour réparer la coupure par Ho. Quel que soit le type sexuel porté, le locus *MAT* répare préférentiellement avec le locus *HML*. Ainsi, la préférence du donneur de *S. cerevisiae*, qui favorise l'utilisation de la matrice de type sexuel opposé, n'est pas conservée chez *C. glabrata*. Le locus *HML* répare préférentiellement avec le locus *MAT* alors que le locus *HMR* répare préférentiellement avec le locus *HML*. Cela suggère que lors du processus de RH, une CDB sur un chromosome est réparée préférentiellement avec une matrice intra-chromosomique et lorsque celle-ci n'existe pas, une coupure dans un locus sub-télomérique est réparée préférentiellement avec une matrice également sub-télomérique.

Concernant l'étude de la létalité liée au changement de type sexuel, d'autres résultats ont été obtenus mais n'ont pas encore fait l'objet d'une publication, ils sont présentés dans la sous-section [Résultats supplémentaires](#).

### **III.2.2 Publication**

## RESEARCH ARTICLE

A single Ho-induced double-strand break at the *MAT* locus is lethal in *Candida glabrata*Laetitia Maroc<sup>1</sup>, Youfang Zhou-Li<sup>1</sup>, Stéphanie Boissard<sup>2</sup>, Cécile Fairhead<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE—Le Moulon, Gif-sur-Yvette, France,<sup>2</sup> Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette, France\* [cecile.fairhead@universite-paris-saclay.fr](mailto:cecile.fairhead@universite-paris-saclay.fr)

## OPEN ACCESS

**Citation:** Maroc L, Zhou-Li Y, Boissard S, Fairhead C (2020) A single Ho-induced double-strand break at the *MAT* locus is lethal in *Candida glabrata*. PLoS Genet 16(10): e1008627. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627>

**Editor:** Joseph Heitman, Duke University Medical Center, UNITED STATES

**Received:** January 22, 2020

**Accepted:** September 12, 2020

**Published:** October 15, 2020

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627>

**Copyright:** © 2020 Maroc et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** LM is recipient of a PhD fellowship from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur,

## Abstract

Mating-type switching is a complex mechanism that promotes sexual reproduction in Saccharomycotina. In the model species *Saccharomyces cerevisiae*, mating-type switching is initiated by the Ho endonuclease that performs a site-specific double-strand break (DSB) at *MAT*, repaired by homologous recombination (HR) using one of the two silent mating-type loci, *HMLalpha* and *HMRa*. The reasons why all the elements of the mating-type switching system have been conserved in some Saccharomycotina, that do not show a sexual cycle nor mating-type switching, remain unknown. To gain insight on this phenomenon, we used the yeast *Candida glabrata*, phylogenetically close to *S. cerevisiae*, and for which no spontaneous and efficient mating-type switching has been observed. We have previously shown that expression of *S. cerevisiae*'s Ho (*ScHo*) gene triggers mating-type switching in *C. glabrata*, but this leads to massive cell death. In addition, we unexpectedly found, that not only *MAT* but also *HML* was cut in this species, suggesting the formation of multiple chromosomal DSBs upon *HO* induction. We now report that *HMR* is also cut by *ScHo* in wild-type strains of *C. glabrata*. To understand the link between mating-type switching and cell death in *C. glabrata*, we constructed strains mutated precisely at the Ho recognition sites. We find that even when *HML* and *HMR* are protected from the Ho-cut, introducing a DSB at *MAT* is sufficient to induce cell death, whereas one DSB at *HML* or *HMR* is not. We demonstrate that mating-type switching in *C. glabrata* can be triggered using CRISPR-Cas9, without high lethality. We also show that switching is Rad51-dependent, as in *S. cerevisiae*, but that donor preference is not conserved in *C. glabrata*. Altogether, these results suggest that a DSB at *MAT* can be repaired by HR in *C. glabrata*, but that repair is prevented by *ScHo*.

## Author summary

Mating-type switching is one of the strategies developed by fungi to promote sexual reproduction and propagation. This mechanism enables one haploid cell to give rise to a cell of the opposite mating-type so that they can mate. It has been extensively studied in the yeast *S. cerevisiae* in which it relies on a programmed double-strand break performed by the Ho endonuclease at the *MAT* locus which determines sexual identity. Little is

de la Recherche et de l'Innovation". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

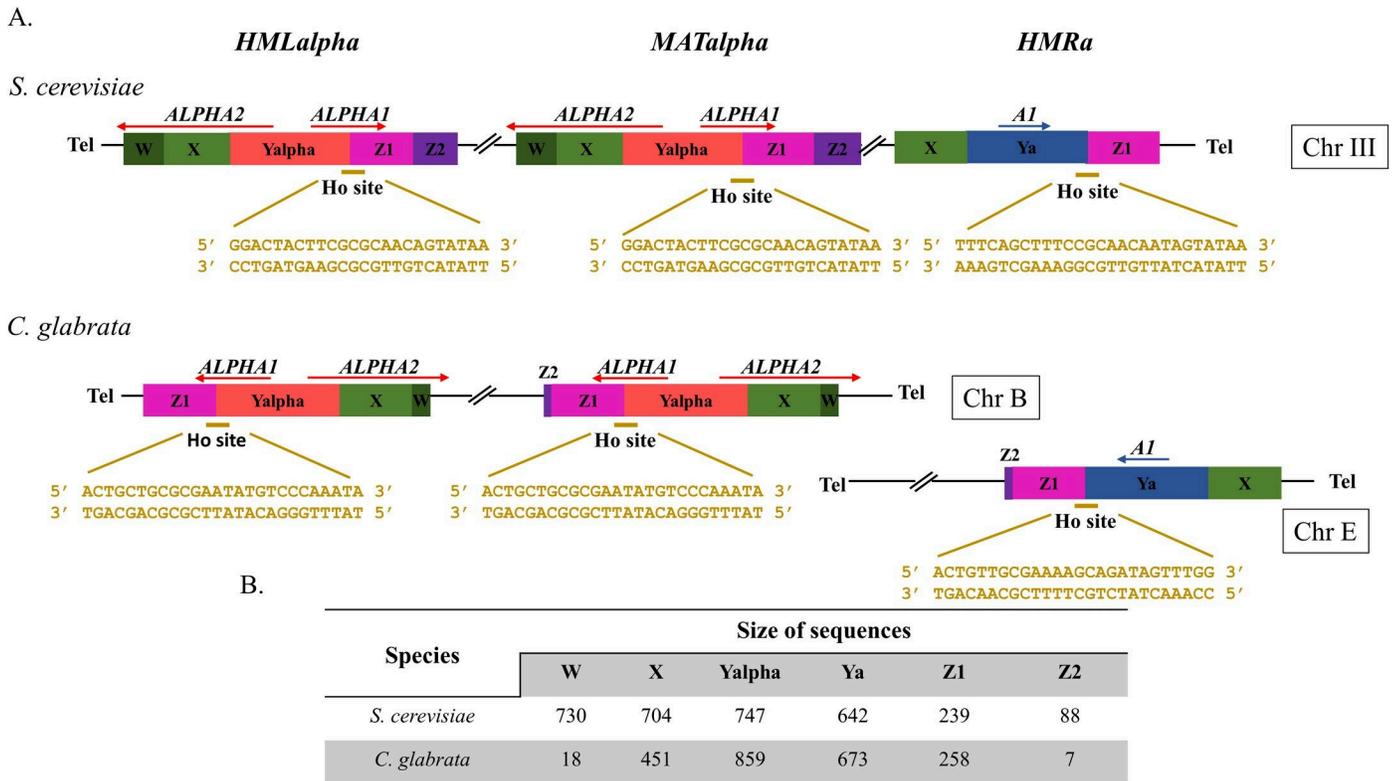
known about why the mating-type switching components have been conserved in species like *C. glabrata*, in which neither sexual reproduction nor mating-type switching is observed. We have previously shown that mating-type switching can be triggered, in *C. glabrata*, by expression of the *HO* gene from *S. cerevisiae* but this leads to massive cell death. In this work, we show that mating-type switching in *C. glabrata* can be triggered by CRISPR-Cas9 and without any high lethality. We demonstrate that the cut at *MAT* is only lethal when the Ho endonuclease performs the break, a situation unique to *C. glabrata*. Our work points to a degeneration of the mating-type switching system in *C. glabrata*. Further studies of this phenomenon should shed light on the evolution of mating systems in asexual yeasts.

## Introduction

In eukaryotes, sexual reproduction is a nearly ubiquitous feature and implies fundamental conserved processes such as gamete fusion, zygote formation and meiosis [1]. Sexual reproduction leads to genetic recombination between organisms and thus enables them to purge their genomes from deleterious mutations, as well as to increase their genetic diversity. It is in the fungal kingdom that the greatest diversity of sexual reproduction is found [1]. Particularly, sexual reproduction in fungal pathogens of human exhibits a considerable plasticity between species [2,3]. While many were thought to be asexual, several atypical sexual or parasexual cycles have been discovered. It has been shown that the yeast *Candida albicans* can perform a parasexual cycle by mating of two diploid cells, forming a tetraploid, that can undergo chromosome loss [4]. The more distant filamentous opportunistic pathogen, *Aspergillus fumigatus* exhibits a sexual cycle but only mates after spending 6–12 months in the dark [5]. Altogether, this suggests that, in most fungi, performing genetic exchange is crucial, even in well-adapted human pathogens.

In fungi, sexual reproduction can occur through three mechanisms [1]: heterothallism (requiring two compatible partners for mating to occur), homothallism (self-fertility), and pseudo-homothallism (where a single individual can go through a complete sexual cycle but mating only occurs between two compatible partners). Pseudo-homothallism has mainly been described in ascomycete yeasts where it occurs through a programmed differentiation process called mating-type switching [6]. This mechanism enables one haploid cell to give rise to a cell of the opposite mating-type so that they can mate. In all cases studied so far, it implies a genomic DNA rearrangement of the mating-type locus (*MAT*, encoding the key regulators of sexual identity) and species have evolved very different molecular pathways for the same aim. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, an imprint at *mat1* (it is unknown whether the imprint is an epigenetic mark or a single nick) is introduced, that leads to a DSB during DNA replication [7,8]. Repair occurs with one of the two silent copies of *mat1*, called *mat2* and *mat3*. In the ascomycete *Kluyveromyces lactis*, mating-type switching involves a DSB at *MAT* but it is performed by two specific nucleases depending on the mating-type of the cell [9,10]. Mating-type switching has been extensively studied in the model yeast *S. cerevisiae* and has notably allowed a better understanding of cell identity, DSB repair and silencing mechanisms [11].

In *S. cerevisiae*, haploid cells can be of either mating-type, *MAT* $\alpha$  or *MAT* $a$ , which encodes “alpha” or “a” information, respectively, at the Y sequence of the *MAT* locus [12] (Fig 1). Mating-type switching relies on a programmed DSB at the *MAT* locus performed by the Ho endonuclease at its 24-bp recognition site (Fig 1). DSBs are highly toxic DNA lesions, and



**Fig 1. Arrangement of HML, MAT and HMR in *S. cerevisiae* and in *C. glabrata* and size of sequences.** (A) Arrangement of the HML, MAT, HMR loci in *S. cerevisiae* and in *C. glabrata*. The Ho site sequence of each locus and species is shown in yellow. (B) Size of sequences forming the HML, MAT, HMR loci in *S. cerevisiae* and in *C. glabrata*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.g001>

thus have to be efficiently repaired to ensure cell viability. This can be achieved through two major pathways, non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) in the presence of a repair template. The DSB at MAT is repaired ~90% of the time by HR [11], probably because of efficient resection of the DSB that has been shown to prevent NHEJ [13]. The Ho cut at the MAT locus generates 4 bp, 3'-overhanging ends and its repair involves the following steps: the DSB ends are processed by several 5' to 3' exonucleases to create long 3'-ended tails [14]; single-strand tails are then converted to Rad51-coated nucleoprotein filaments, which search for homology and promote homologous template invasion [11]; once the homologous donor is found, the MAT locus is repaired by gene conversion. The homologous donor is one of the two silent loci located on the same chromosome as MAT: HML carrying the "alpha" information or HMR carrying the "a" information. The "alpha" or "a" sequence from HML or HMR respectively, replaces the original Y MAT sequence whereas HML and HMR remain unchanged. Despite the fact that HML and HMR contain the Ho recognition site, both are resistant to Ho cleavage, being located in heterochromatic regions [15]. It must be noted that the Ho recognition site is quite different between the "a" and "alpha" versions, one side is unchanged since it is located in the identical Z sequence, while the other side, corresponding to the end of the Y fragment, is different between the two mating-types (Fig 1). There is no measurable difference in the efficacy of the cut between the two sequences, nor between efficiency of mating-type switching from one to another [16,17]. This illustrates the fact that Ho is part of the family of meganucleases, that do not function like type II restriction endonucleases, but recognize large (larger than 12bp), degenerate, non-palindromic cut-sites.

In *S. cerevisiae*, a "donor preference" mechanism ensures an efficient mating-type switching at *MAT* by promoting the use of the silent locus from the opposite mating-type (*MATa* is preferentially repaired by *HMLalpha* and *MATalpha* by *HMRa*). This donor preference depends on both the "a" or "alpha" information at the *MAT* locus and the presence of a specific sequence, the recombination enhancer (RE), located between *HML* and *MAT* [18]. It must be noted that mating-type switching occurs only once per cell-cycle, in G1, and that this is thought to be regulated through the control of the expression of *HO* [12], but experiments of overexpression of *HO* under the control of a galactose-inducible promoter have shown that the switch can be induced in any part of the cell cycle [19]. Intriguingly, there is no report of switching back and forth between the two mating-types in such overexpression experiments, leaving open the possibility that another mechanism than *HO* gene expression, is responsible for the "unswitchability" of newly (i.e., unreplicated) switched cells.

*C. glabrata* is an opportunistic pathogenic yeast, phylogenetically close to *S. cerevisiae* [20]. Its genome has retained the three-locus system, with homologs of *HML*, *MATa/alpha*, and *HMR*, called Mating-Type Like (*MTL*) loci (Fig 1). The three loci display a structure comparable to *S. cerevisiae*'s, the main difference being that *HMR* is located on a different chromosome from *HML* and *MAT* [20]. Despite these similarities, added to the fact that both *MATa* and *MATalpha* cells are found naturally and that they maintain some mating-type identity [21–23], *C. glabrata* is unable to switch mating-type spontaneously at an efficient level, even though rare signs of mating-type switching are observed in culture [24] and in populations [25]. We have previously shown that the expression of the *HO* gene from *S. cerevisiae* can trigger mating-type switching in *C. glabrata*, and that over 99% of *C. glabrata* cells are unable to survive the expression of *S. cerevisiae*'s Ho (ScHo) [26]. We have also observed gene conversion events at the *HML* locus in survivors, revealing that, unlike *S. cerevisiae*, *HML* is not protected from the Ho cut. We suggested that the lethality was due to multiple chromosomal DSBs, which would prevent homologous recombination with an intact template in most cells.

In this work, we investigate the reasons for the lethality associated with mating-type switching induced by ScHo. For this purpose, we constructed a series of inconvertible (*Inc*) *C. glabrata* strains, mutated precisely at the Ho recognition site, allowing us to control the number and position of DNA breaks during induction of ScHo, as well as to track which donor sequence is used as template. We analyzed two aspects: viability, that reflects both the efficiency of the cut and the success of repair; and molecular structure of repaired loci, in wild-type and mutant strains, in order to reveal which repair pathways were used. We now show that *HMR* is also cut by Ho in wild-type strains of *C. glabrata*. In addition, by mimicking *S. cerevisiae*'s situation, in which *HML* and *HMR* are protected from the cut, we unexpectedly find that one DSB at the *MAT* locus is sufficient to induce cell death, whereas one at *HML* or *HMR* is not. Finally, the use of the CRISPR-Cas9 technology enables us to show that mating-type switching can be induced independently of the Ho protein in *C. glabrata*, and that such switching is efficient and not lethal. Thus, we show for the first time that a chromosomal DSB is repaired by HR efficiently in *C. glabrata*, at *HML* and *HMR* (Ho-cut) and at *MAT* (Cas9-cut), indicating that, in principle, *MAT* switching could occur in this species. The fact that an Ho endonuclease, able to induce switching, also induces cell death may be evidence for degeneration of the three *MTL*s/Ho system in this species, in accordance with the observed asexuality.

## Results

### All three sites are cut by Ho in *C. glabrata*, including the one at *HMR*

We expressed *S. cerevisiae*'s *HO* gene (*ScHO*) using the *URA3* selectable plasmid p7.1 in which *ScHO* is under control of the inducible *MET3* promoter [26]. As previously described,

Table 1. Strains used in this work.

Strains	Parent	Genotype	Reference
<b><i>C. glabrata</i> strains with wild-type Ho sites</b>			
CBS138		<i>HMLalpha MATalpha HMRA</i>	[27]
BG2		<i>HMLalpha MATa HMRA</i>	[28]
BG14	BG2	<i>HMLalpha MATa HMRA ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	[28]
BG87	BG14	<i>HMLalpha MATa HMRA ura3::Neo<sup>R</sup> his3Δ</i>	[29]
HM100	CBS138	<i>HMLalpha MATalpha HMRA ura3Δ::KANMX</i>	[21]
HM100 <i>Δrad51</i>	HM100	<i>HMLalpha MATalpha HMRA Δrad51 ura3Δ::KANMX</i>	This work.
<b><i>C. glabrata</i> strains with mutated Ho sites</b>			
YL01	HM100	<i>HMLalpha MATalpha HMRA-inc ura3Δ::KANMX</i>	This work.
YL02	HM100	<i>HMLalpha-inc MATalpha HMRA ura3Δ::KANMX</i>	This work.
YL03-MATalpha	YL02	<i>HMLalpha-inc MATalpha HMRA-inc ura3Δ::KANMX</i>	This work.
YL03-MATa	YL03-MATalpha	<i>HMLalpha-inc MATa HMRA-inc ura3Δ::KANMX</i>	This work.
YL04	YL07	<i>HMLalpha MATalpha-inc HMRA ura3Δ::KANMX</i>	This work.
YL05	YL09	<i>HMLalpha MATa-inc HMRA-inc ura3Δ::KANMX</i>	This work.
YL07	YL02	<i>HMLalpha-inc MATalpha-inc HMRA ura3Δ::KANMX</i>	This work.
YL09	YL01	<i>HMLa-inc MATa-inc HMRA-inc ura3Δ::KANMX</i>	This work.
YL10	YL07	<i>HMLalpha-inc MATalpha-inc HMRalpha-inc ura3Δ::KANMX</i>	This work.
SL09	BG87	<i>HMLa-inc MATa-inc HMRA-inc ura3::Neo<sup>R</sup> his3Δ</i>	This work.
SL0A	YL01	<i>HMLalpha MATalpha-inc HMRA-inc ura3Δ::KANMX</i>	This work.
SL0B	YL04	<i>HMLa-inc MATalpha-inc HMRA ura3Δ::KANMX</i>	This work.
<b><i>C. glabrata</i> strains with mutated Ho sites and/or deletion(s) of <i>HML</i>, <i>MAT</i> or <i>HMR</i></b>			
CGM460	BG14	<i>Δhml MATalpha HMRA ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	[22]
CGM390	BG14	<i>HMLalpha Δmat HMRA ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	[22]
SL-CG1	CGM390	<i>HMLalpha Δmat Δhmr ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	This work.
CGM498	BG14	<i>Δhml Δmat HMRA ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	[22]
SL01	BG87	<i>HMLalpha MATa Δhmr ura3::Neo<sup>R</sup> his3Δ</i>	This work.
SL-CG8	SL01	<i>HMLalpha-inc MATa Δhmr ura3::Neo<sup>R</sup> his3Δ</i>	This work.
SL-CG9	CGM460	<i>Δhml MATa HMRalpha-inc ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	This work.
SL-CG10	SL01	<i>HMLa-inc MATa-inc Δhmr ura3::Neo<sup>R</sup> his3Δ</i>	This work.
SL-CG12	CGM390	<i>HMLalpha-inc Δmat HMRalpha-inc ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	This work.
SL-CG14	CGM460	<i>Δhml MATalpha-inc HMRalpha-inc ura3Δ::Tn903 G418<sup>R</sup></i>	This work.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.t001>

expression of *ScHO* in wild-type strains of *C. glabrata*, leads to the death of about 99.9% of cells and we found that both *MAT* and *HML* are efficiently cut [26]. We further analyzed surviving colonies of HM100 (*HMLalpha MATalpha HMRA*, Table 1) by determining the mating-type at each *MTL* locus by PCR and we found that nearly all present switching at *HMR*, indicative of cutting (Table 2).

In order to formally confirm that mating-type switching at each *MTL* depends on HR, we inactivated *RAD51* (*CAGL0I05544g*) in the wild-type strain HM100 (Table 1). Inducing the Ho DSB in this strain leads to an even higher lethality than in the wild-type strain (Fig 2), and no mating-type switching is detected at any *MTL* locus (Table 2), confirming that switching relies on HR in *C. glabrata*.

As we hypothesized in our previous work [26], Ho-induced lethality in *C. glabrata* could be due to concomitant induction of multiple DSBs, in contrast to the situation in *S. cerevisiae* where *HML* and *HMR* are protected from the cut. These unreparable cuts would lead to death by cell cycle arrest, or because cut and possibly degraded chromosomes segregating into daughter cells lack essential genes. Alternatively, we had mentioned the possibility that

Table 2. Molecular structure of *MTLs* in surviving colonies after ScHo induction.

Strain	Locus screened	PCR results	Percentage of switch
<b><i>C. glabrata</i> strains with wild-type Ho sites</b>			
HM100 wt ( <i>HMLalpha MATalpha HMRa</i> )	<i>HML</i>	25/34 mixed <i>HMLalpha/a</i> 9/34 pure <i>HMLalpha</i>	74 ± 6%
	<i>MAT</i>	26/34 mixed <i>MATalpha/a</i> 8/34 pure <i>MATalpha</i>	76 ± 6%
	<i>HMR</i>	30/34 mixed <i>HMRa/alpha</i> 2/34 pure <i>HMRalpha</i> 2/34 pure <i>HMRa</i>	94 ± 6%
HM100 $\Delta$ rad51 ( <i>HMLalpha MATalpha HMRa</i> )	<i>HML</i>	39/39 pure <i>HMLalpha</i>	0%
	<i>MAT</i>	39/39 pure <i>MATalpha</i>	0%
	<i>HMR</i>	39/39 pure <i>HMRa</i>	0%
<b><i>C. glabrata</i> strains in which <i>MAT</i> is protected from the Ho cut</b>			
YL05 ( <i>HMLalpha MATa-inc HMRa-inc</i> )	<i>HML</i>	60/60 pure <i>HMLa-inc</i>	100 ± 8%
YL07 ( <i>HMLalpha-inc MATalpha-inc HMRa</i> )	<i>HMR</i>	34/36 mixed <i>HMRa/alpha-inc</i> 2/36 pure <i>HMRalpha-inc</i>	100 ± 6%
<b><i>C. glabrata</i> strains in which <i>MAT</i> can undergo the Ho cut</b>			
SL-CG8 ( <i>HMLalpha-inc MATa <math>\Delta</math>hmr</i> )	<i>MAT</i>	36/36 pure <i>MATalpha-inc</i>	100 ± 6%
SL-CG9 ( <i><math>\Delta</math>hml MATa HMRalpha-inc</i> )	<i>MAT</i>	36/36 pure <i>MATalpha-inc</i>	100 ± 6%

Colonies surviving ScHo induction are screened by PCR at each locus that can be cut by ScHo. Percentage of switch is calculated as the ratio of the total number of pure and mixed colonies exhibiting mating-type switching divided by the total number of surviving colonies tested, expressed as percentage. The square root of the number of surviving colonies screened is used as standard error in last column.

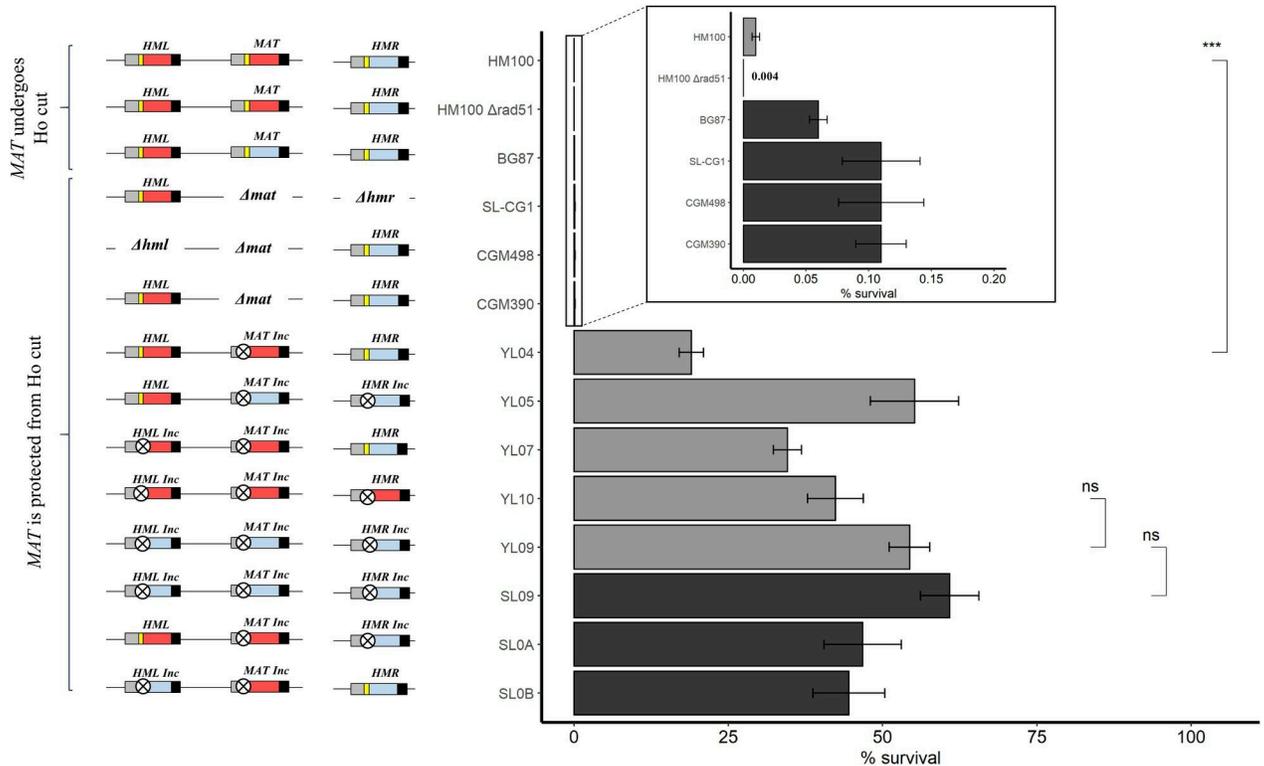
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.t002>

switching leads to the repair of the Ho-cut locus by an intact Ho-site containing locus would cause never-ending cycles of cutting and repair that could also lead to cell death in our conditions of continuous induction on plates. We had dismissed this eventuality as unlikely, since the percentage of lethality and switched survivors is highly reproducible in our experiments. Even though the situation is the same in *S. cerevisiae* when overexpressing Ho with a galactose-inducible promoter, and no switching back and forth between the two mating-types has been reported in *S. cerevisiae* [14,19], we had no experimental proof that this did not happen in *C. glabrata*, in our experimental conditions. We thus decided to design experiments which would address both the question of the number of cut loci, and the question of the number of cuts per locus. For this, as explained below, we have used strains containing inconvertible Ho sites (*Inc*) and/or deletions of *MTLs* and we have performed a time-course experiment of induction (see [Material and methods](#)).

### Cleavage at *HML* and *HMR* is not an important contributor to lethality

As soon as we started performing experiments using strains with inconvertible *MTLs*, we noticed difference of behavior between the *MAT* locus and *HML* and *HMR*. We first used strains YL05 (*HMLalpha MATa-inc HMRa-inc*) and YL07 (*HMLalpha-inc MATalpha-inc HMRa*), [Table 1](#)). In these strains, we mutated the Ho sites in the region known to be essential for Ho cutting in *S. cerevisiae* [30], yielding loci *MAT-inc*, *HML-inc*, *HMR-inc* ([S1 Fig](#)), in configurations where only either the *HML* or *HMR* locus can be cut and repaired by the two non-cleavable donors *MAT-inc*, and *HMR-inc* or *HML-inc*.

Upon Ho induction, cell viability drastically increases to 35 to 55%, depending on the strain ([Fig 2](#)). Survival does not reach 100% but is more than 2.700 times higher than in the wild-type isogenic strain, HM100 (HM100 vs YL05 P-value < 10<sup>-4</sup> and HM100 vs YL07 P-value < 10<sup>-9</sup>, Wilcoxon tests) ([Fig 2](#)). We then expressed *HO* in a strain in which only *MAT* is protected



**Fig 2. Survival to ScHo induction of strains bearing combinations of wild-type and/or mutated Ho sites.** On the left, diagram of *MTL* configuration of strains is shown with the corresponding survival histogram to ScHo induction on the right. The blue box represents the *Ya*, the red box *Yalpha*, the yellow bar wild-type Ho site and the crossed circle mutated Ho site (*Inc* loci) (not to scale). On the histogram, black bars are for strains from the BG87 background, grey bars are for strains from the HM100 background. Results for strains HM100 and BG87 are from (26). Values from, at least, four experiments were averaged, the SEM used as estimate of the error and the P-value was calculated using the Wilcoxon test. \*\*\*: P-value < 0.001. ns: non-significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.g002>

from the cut, while both *HML* and *HMR* can be cleaved by Ho (Strain YL04 *HMLalpha MATalpha-inc HMRA*, Table 1). In this strain, cell viability reaches ~20% which is 2.000 times higher than in the wild-type isogenic strain, HM100 (P-value < 0.001, Wilcoxon test) (Fig 2).

We analyzed the molecular structure of the *HML* and *HMR* loci in surviving colonies of strains YL05 and YL07 respectively, by PCR using primers specific of the mating-type carried by the *MTLs* (“alpha” or “a”, wt or inc, S1 Table and S2 Fig). This allows the distinction of the original *HML* or *HMR* locus from the repaired locus that has become resistant to cutting. We found that 100% of surviving colonies showed mating-type switching of *HML* or *HMR* (Table 2). As mating-type switching reflects the efficiency of the Ho-cut, this suggests that both *HML* and *HMR* are efficiently cut by ScHo and that, even though we found some mixed colonies for *HMR* in strain YL07, *MTLs* they are repaired by HR.

In order to confirm this, we induced expression of ScHo in strains in which either *HML* or *HMR* can be cut by Ho in absence of any repair template, the two other loci being completely deleted (strain SL-CG1, *HMLalpha Δamat Δhmr* and strain CGM498, *Δhml Δamat HMRA*, Table 1) (Fig 2). Upon Ho induction, we found that survival rate does not exceed 0.2% in both strains, suggesting that the Ho-cut is efficient at both *HML* and *HMR* and that the Ho-DSB at *HML* and *HMR* causes lethality when it cannot be repaired by HR. To explore this further, we induced ScHo in a strain in which both *HML* and *HMR* can be cut and *MAT* is deleted (strain CGM390 *HMLalpha Δamat HMRA*, Table 1) (Fig 2). Once again, survival does not exceed 0.2%, suggesting that *HML* and *HMR* are cut concomitantly and thus cannot serve as templates for

one another. This reinforces the hypothesis that simultaneous DSBs, happening in wild-type strains, participate in the high lethality observed.

Altogether, these results suggest that the efficient Ho-cut at *HML* and *HMR* is not an important contributor to lethality in all configurations where they can be repaired by HR. In the absence of HR, no other mechanism such as NHEJ is able to take over the repair of the Ho-cut, and thus cell survival remains low. Results also show that protecting the *MAT* locus from the Ho-cut significantly increases survival. This is also confirmed by the fact that strains containing no Ho-site at any *MTL* locus survive the Ho induction at around 50% (strains YL10, YL09 and SL09, [Table 1](#)) ([Fig 2](#)).

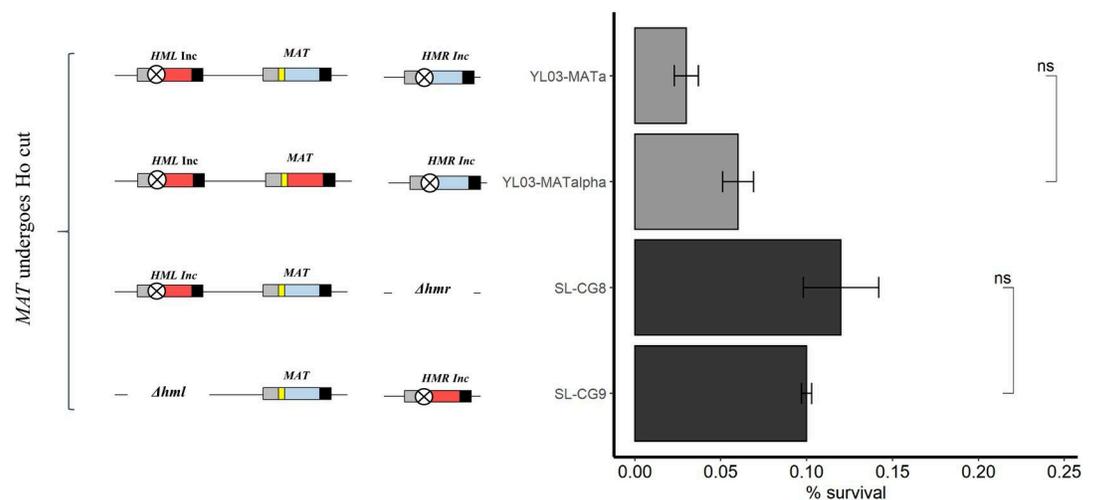
### A single ScHo-DSB at *MAT* is sufficient to induce cell death in *C. glabrata*

In order to measure the impact of the Ho cleavage at *MAT* on cell survival, we mimicked the situation in *S. cerevisiae*, where a single recipient of the Ho-induced DSB, the *MAT* locus, can be repaired by the two non-cleavable donors *HML* and *HMR*, i.e. strains YL03-MATalpha (*HMLalpha-inc MATalpha HMRa-inc*) and YL03-MATa (*HMLalpha-inc MATa HMRa-inc*) ([Table 1](#)). Expression of *ScHO* in those strains leads to a lethality similar to the one obtained in wild-type strains HM100 and BG87 ([Fig 3](#)) and all surviving colonies have switched, whatever the mating-type at *MAT* ([Table 2](#)).

Thus, a single Ho-induced DSB at *MAT*, whatever its mating-type, is sufficient to induce massive cell death in *C. glabrata*. Furthermore, this experiment allows us to reconsider the question of lethality due to never-ending cycles of cutting and repair. Indeed, if this was the reason for mortality of cells when cutting at *MAT*, then, since repairing with an *Inc* locus leads to an unswitchable locus, the mortality should be decreased in these strains upon induction.

### Lethality is not due to toxic recombinational repair intermediates

Since we know that the mating-type switching system in *C. glabrata* is not very efficient, it is legitimate to wonder whether the degeneration of the mating-type switching mechanism



**Fig 3. Survival to ScHo induction of strains in which only the *MAT* locus can be cut.** On the left, diagram of *MTL* configuration of strains is shown with the corresponding survival histogram to ScHo induction on the right. The blue box represents the Ya, the red box Yalpha, the yellow bar wild-type Ho site and the crossed circle mutated Ho site (*Inc* loci) (not to scale). On the histogram, black bars are for strains from the BG87 background, grey bars are for strains from the HM100 background. Values from, at least, four experiments were averaged, the SEM used as estimate of the error and the P-value was calculated using the Wilcoxon test. ns: non-significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.g003>

could lead to abnormal HR intermediates. We asked whether such repair intermediates could be toxic and cause death. For example, the two ends of the broken *MAT* locus could invade both *HML* and *HMR*, leading to non-resolvable structures. The fact that *HMR* is not on the same chromosome as *HML* and *MAT* could be an additional problem, if, for example, repair of *MAT* occurs principally with *HMR* and this leads to lethal rearrangements.

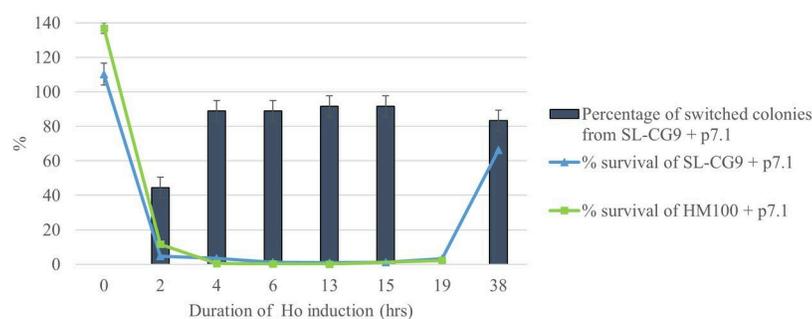
In order to test this, we constructed two strains in which *MAT* can be cut by Ho and can only be repaired either by *HML* or by *HMR* (SL-CG8, *HMLalpha-inc MATa Δhmr*, and SL-CG9, *Δhml MATa HMRalpha-inc*, respectively, Table 1). Expression of *ScHo* in both strains leads to a high lethality (Fig 3), similar to the ones of the wild-type or YL03 strains (*HMLalpha-inc MATalpha* or *MATa HMRa-inc*, Table 1). We analyzed the molecular structure in surviving colonies (Table 2). All have switched, whatever the location of the repair template (*HML* in strain SL-CG8 and *HMR* in strain SL-CG9).

Thus, forcing *MAT* to repair solely on *HML* or *HMR* results in the same lethality as in wild-type strains. From this, we conclude that the cut *MAT* locus DNA ends probably do not interact with both *HML* and *HMR* in such a way that it is toxic to cells, and that there is no specific problem due to the fact that *HMR* is on another chromosome than *MAT*. It, therefore, seems unlikely that lethality could be due to non-resolvable HR intermediates.

### Time course experiments reveal that growth arrest is quick and irreversible leading to cell death

In order to shed light on whether the toxic effect leading to cell death could be reversible and if not, whether the effect operates rapidly or not, we performed a time course experiment in which Ho is induced in liquid medium and its expression is repressed, at different time points, by plating cells on repressive medium. The survival can thus be calculated by the ratio of colonies obtained on repressive medium to the theoretical number of cells plated.

In order to easily follow events, we used again strain SL-CG9 (*Δhml MATa HMRalpha-inc*, Table 1), where only the *MAT* locus can be cut and a single inconvertible template for HR is present. This allows to follow a single Ho-cut and a single repair event at the *MAT* locus. We scored the survival along the time-course experiment as well as the percentage of survivors that have undergone switching. As shown on Fig 4, two hours upon induction of a single Ho-



**Fig 4. Time-course experiment of *ScHo* induction in liquid culture.** Strains SL-CG9 (blue curve) and HM100 (green curve) were followed during a time-course experiment of induction of *ScHo* in liquid culture. Survival is shown on the Y-axis as a curve and is calculated by comparing the number of colony-forming units on SC-Rep with the number of cells plated, as estimated by counting. This is normalized by dividing it by the survival rate of the control strain, i.e., the strain transformed by pYR32, grown in the same conditions. Values from four experiments were averaged and the SEM is used as an estimate of the error. Percentage of switched colonies is also shown for strain SL-CG9 as a histogram. This is expressed as a percentage of colonies showing switching by PCR at *MAT* on the total number of colonies screened (this was not performed at T = 19hrs). At each time-point, except T = 19hrs, 36 colonies over the four experiments were screened and the square root of 36 is used as an estimate of the error.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.g004>

DSB at *MAT*, survival drastically drops to less than 2%. From T = 4 hrs to T = 15 hrs, survival remains very low. Molecular analysis shows that mating-type switching in survivors reaches its maximum very rapidly after four hours of induction, at around 90%. All screened colonies display a pure genotype in PCR just as on solid medium (see [Table 2](#)). The last two points of our experiment, T = 19 hrs and T = 38 hrs show that survivors have invaded the liquid culture, thus giving rise to many colonies on repressive medium plates. These survivors thus consist of 90% of switched invertible clones, and around 10% of cells that have escaped Ho-induction probably by rearranging or mutating the plasmid. These results show that the toxic effect of inducing an Ho-cut at the *MAT* locus is irreversible even after only two hours in induction medium.

We next wanted to check whether mortality was as quick and as irreversible in wild-type strains. Induction in HM100 leads to the same pattern as SL-CG9 ([Fig 4](#)). This confirms that the lethality in HM100 is not due to never-ending cycles of cutting and repair since it cannot happen in SL-CG9 and the lethality occurs at the same rate.

### The lethality induced by the DSB at *MAT* is specific to ScHo

We wanted to investigate whether the lethality is caused by the DSB at *MAT* *per se* or by the specific combination of *MAT* with ScHo. Since we have previously shown that inducing other Ho endonucleases from the *Nakaseomyces*, including *C. glabrata*'s own gene, does not result in high lethality nor efficient mating-type switching [26], we decided to use the CRISPR-Cas9 system from [31]. This system relies on a unique *URA3* plasmid, pCGLM1, in which the *CAS9* gene is under the control of the inducible *MET3* promoter, as is the case for the *HO* gene in the p7.1 plasmid used in the experiments above. This allows us to induce a DSB at *MAT* with Cas9, in the same conditions as with ScHo.

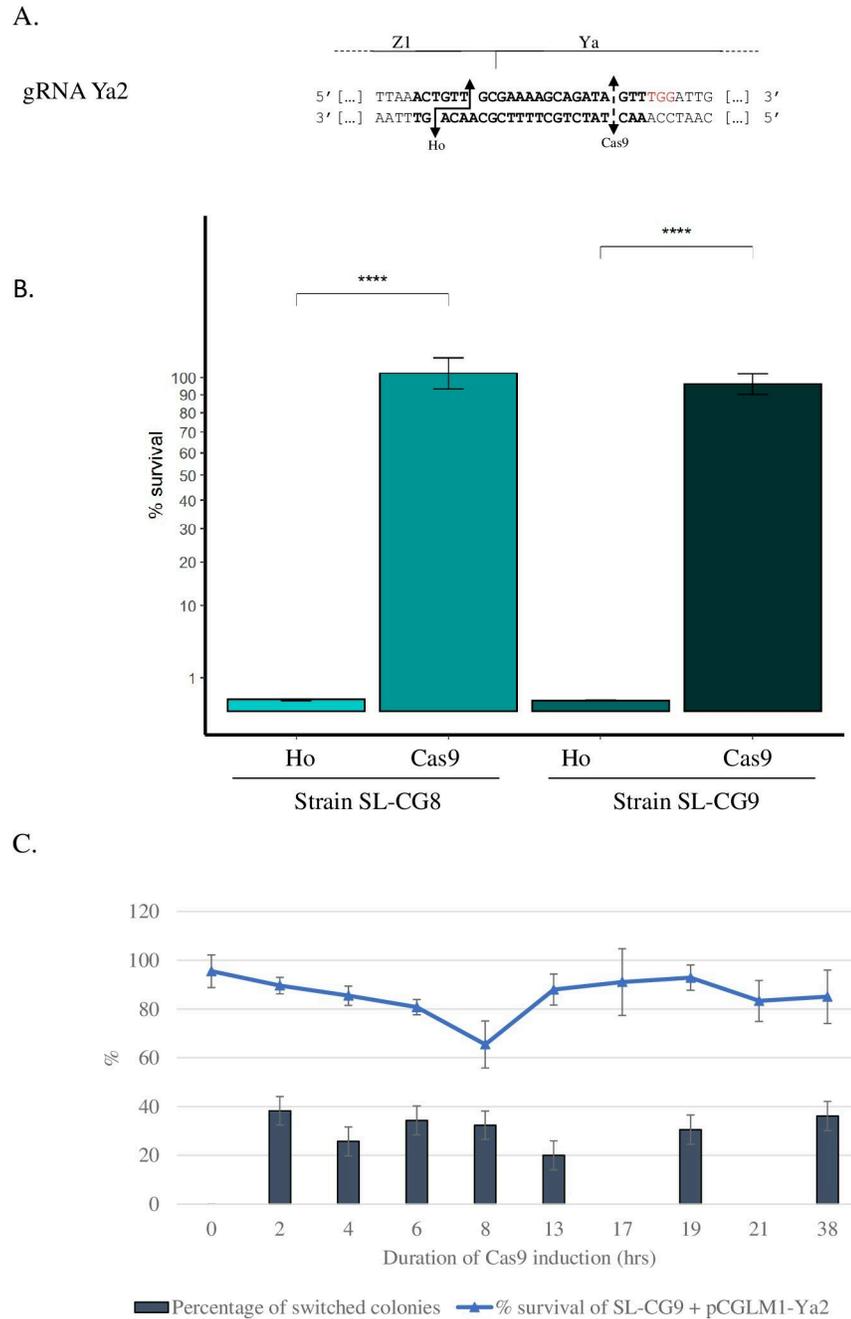
In order to allow a full comparison between ScHo and Cas9 induction, we wanted to generate a single DSB at the same locus, here *MAT*, whatever the endonuclease used. Indeed, the Ho site between *MTLa* and *MTLalpha* is very different while the Cas9-cut is directed with a specific gRNA, we used SL-CG8 and SL-CG9 (*HMLalpha-inc MATa Δhmr*, and *Δhml MATa HMRalpha-inc*, respectively, [Table 1](#)) with a gRNA that targets only the *MAT* locus, since it is directed to the Ya sequence ([Fig 5A](#)). This gRNA allows to target the Cas9-cut from 14 pb from the Ho cut ([Fig 5A](#)).

[Fig 5B](#) shows that induction of the Cas9-cut in both SL-CG8 and SL-CG9 does not lead to any lethality. We wondered whether Cas9 had indeed cut the *MAT* locus by screening mating-type switching of surviving colonies by PCR ([Table 3](#)).

Results show that the Cas9-induced DSB leads to mating-type switching as efficiently as the Ho protein ([Table 2](#) and [Table 3](#)). Indeed, 72 to 85% of the colonies tested presented “alpha-inc” information at *MAT*, confirming the cut of this locus by Cas9 and induction of mating-type switching ([Table 3](#)). This gRNA is adjacent to an optimal NGG PAM sequence and targets a site very close to the Ho site, 14 pb away from the Ho cut.

We then asked whether we could detect a transient lethality, reflecting the Cas9-cut. Indeed, previous experiments, using the same system for inducing a Cas9-cut, but at the unrelated *ADE2* locus, have shown that a transient lethality occurred in liquid culture in a time-course experiment, whereas no apparent lethality was detected on induction plates [31]. Thus, we performed a time-course experiment with Cas9 in strain SL-CG9. [Fig 5D](#) shows that Cas9 induction never leads to a sharp increase in lethality at any time point and survival remains between 65 and 92% for the whole experiment. Surprisingly, contrary to what we observe in induction on plates, screening of mating-type switching at *MAT* reveals that only ~20 to 36% of surviving colonies have switched mating-type (see [Discussion](#)).

These results show for the first time that mating-type switching can be induced without any lethality in *C. glabrata* using the CRISPR-Cas9 system. In conclusion, the fact that the *MAT*



**Fig 5. Survival upon Cas9 induction and gRNAs used.** (A) gRNA Ya2 targeting the *MATa* locus of *C. glabrata*. Sequence shown is a segment of the *MATa* locus of BG87, including the gRNA in bold and the PAM sequence in red. Plain double arrow indicates the Ho cleavage site and dashed double arrow the Cas9 cleavage site. (B) Survival of strains SL-CG8 and SL-CG9 upon Cas9-induced DSB at *MAT*. Induction is performed on solid medium. Results for strains SL-CG8 and SL-CG9 upon ScHo induction are from Fig 3. Values from four experiments were averaged, the SEM used as estimate of the error and the P-value was calculated using the Wilcoxon test. \*\*\*\*: P-value < 0.001. (C) Induction was performed in liquid during a time-course experiment for strain SL-CG9 expressing Cas9 (harboring pCGLM1-Ya2). The Y-axis represents both the survival (curve) expressed as a percentage, and the percentage of switched colonies (histogram). Survival is calculated by comparing the number of colony-forming units on SC-Rep with the number of cells plated, as estimated by counting; and is normalized by dividing it by the survival rate of the control strain, i.e., strain SL-CG9 transformed by pCGLM1 for Cas9 induction, grown in the same conditions. For survival rate, values from four experiments were averaged and the SEM is used as estimate of the error. For the percentage of switched colonies, the square root of the number of surviving colonies screened is used, i.e., sqrt of 36. For time-course experiments, at points T = 17 and T = 21 hrs, no PCR of surviving colonies was performed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.g005>

**Table 3. Molecular structure of the *MAT* locus in colonies after Cas9 induction.**

Strain	Locus screened	gRNA used	PCR results of surviving colonies	PCR results of sub-clones	Percentage of switch
SL-CG8 ( <i>HMLalpha-inc MATa Δhmr</i> )	<i>MAT</i>	Ya2	36/40 mixed <i>MATalpha-inc/a</i> 4/40 pure <i>MATalpha-inc</i>	40/48 <i>MATalpha-inc</i> 8/48 <i>MATa</i>	85%
SL-CG9 ( <i>Δhml MATa HMRalpha-inc</i> )	<i>MAT</i>	Ya2	32/45 mixed <i>MATalpha-inc/a</i> 7/45 pure <i>MATalpha-inc</i> 6/45 pure <i>MATa</i>	38/48 <i>MATalpha-inc</i> 10/48 <i>MATa</i>	72%

After Cas9 induction, colonies are screened by PCR at *MAT*. When PCR revealed mixed colonies, at least four individual colonies are sub-cloned in order to get the ratio of each mating-type; percentage of switch is calculated as follows: the ratio of the number of pure switched colonies on the total number is added to the ratio of the number of mixed colonies on the total number screened multiplied by the ratio of the number of pure switched sub-clones on the total number of sub-clones screened, expressed as percentage. An example for the molecular analysis of SL-CG8 using gRNA Ya2, is:  $(4/40 + (36/40 \times 40/48)) \times 100 = 85\%$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.t003>

locus can be cut and repaired by HR without any accompanying high lethality demonstrates that it is ScHo cutting specifically at the *MAT* locus that is highly lethal in *C. glabrata*.

### Choice of repair template reveals a complex interplay between the *MTL* loci

As the three *MTL*s are efficiently cut by ScHo and as the cut at *MAT* is the only one to lead to a high lethality, we decided to study these differences in *C. glabrata* by asking how each locus interacts with the two other templates.

In wild-type strains of *S. cerevisiae*, only the *MAT* locus is cut, and the mechanism of mating-type switching is productive thanks to control by the sexual identity of the cell. Indeed, the use of the donor locus of the opposite mating-type to repair the DSB at *MAT* is promoted (“donor preference”) [18]. Since it has been shown that sexual identity of cells is maintained in *C. glabrata*, at least in *MATa* cells (i.e., *MATa* cells express *MATa* identity, but *MATalpha* cells have no mating-type specific expression of key genes [21,22]), we asked whether this “donor preference” from *S. cerevisiae* is conserved in *C. glabrata* at the *MAT* locus, and also whether *HML* and *HMR* use a preferential template for repair. For this, we constructed strains that carry different and inconvertible mating-types in various combinations. First, for the *MAT* locus, we used strains YL03-*MATalpha* and YL03-*MATa* (*HMLalpha-inc MATalpha HMRa-inc* and *HMLalpha-inc MATa HMRa-inc*, respectively, Table 1). Analysis of surviving colonies from strain YL03-*MATa* shows that 78% display only the alpha-inc information at *MAT*, the remainder exhibiting various genotypes, pure a-inc for 3%, and mixed alpha-inc and a-inc for 19% (Table 4). The overwhelming percentage of pure colonies displaying only the alpha-inc information at *MAT* demonstrates that *HML* is the preferred template for repair of the *MATa* locus.

In strain YL03-*MATalpha*: 84% of tested surviving colonies display only the *MATalpha-inc* genotype, the others displaying various mixed or pure genotypes at *MAT* (Table 4). Thus, in contrast to *S. cerevisiae*, *HML* is preferentially used as template for repair in *C. glabrata*, whatever the mating-type at *MAT*.

In order to know by which template *HML* is preferentially repaired, we performed a molecular analysis of the *HML* locus, upon ScHo induction, in a strain that carries different and inconvertible mating-types at *MAT* and *HMR* (strain SLOA, *HMLalpha MATalpha-inc HMRa-inc*, Table 1). Analysis of surviving colonies shows that 47% display pure alpha-inc information, 40% are alpha-inc and a-inc in mixed colonies and 13% are pure a-inc (Table 4). This indicates that *HML* preferentially repairs the DSB using *MAT* over *HMR*.

In the same way, molecular analysis of the *HMR* locus was performed in strain SLOB (*HMLa-inc MATalpha-inc HMRa*, Table 1). Table 4 shows that, 9% of surviving colonies are pure a-inc and 84% display both a and a-inc information. We observe no repair event where

**Table 4. Analysis of template choice for repair of Ho cut at *MTL*s.**

Strain	Locus screened	PCR results	Use of each locus
YL03-MATa ( <i>HMLalpha-inc MATa HMRa-inc</i> )	<i>MAT</i>	25/32 pure <i>MATalpha-inc</i> 6/32 mixed <i>MATalpha-inc/a-inc</i> 1/32 pure <i>MATa-inc</i>	<i>HML</i> : 96% <i>HMR</i> : 4%
YL03-MATalpha ( <i>HMLalpha-inc MATalpha HMRa-inc</i> )	<i>MAT</i>	42/50 pure <i>MATalpha-inc</i> 5/50 mixed <i>MATalpha-inc/a-inc</i> 2/50 pure <i>MATa-inc</i> 1/50 pure <i>MATalpha</i>	<i>HML</i> : 95% <i>HMR</i> : 5%
SL0A ( <i>HMLalpha MATalpha-inc HMRa-inc</i> )	<i>HML</i>	33/69 pure <i>HMLalpha-inc</i> 20/69 mixed <i>HMLalpha-inc/a-inc</i> 9/69 pure <i>HMLa-inc</i> purs 7/69 mixed <i>HMLalpha/alpha-inc/a-inc</i>	<i>MAT</i> : 79% <i>HMR</i> : 21%
SL0B ( <i>HMLa-inc MATalpha-inc HMRa</i> )	<i>HMR</i>	38/45 mixed <i>HMRa/a-inc</i> 4/45 pure <i>HMRa-inc</i> 3/45 pure <i>HMRa</i>	<i>HML</i> : ~100% <i>MAT</i> : ~0%

In this experiment, strains are chosen so that template choice for ScHo-cut can be analyzed. As before, colonies are screened by PCR at the single locus that can be cut by ScHo. In the first three strains, since the percentage of pure colonies alone is sufficient to know which template is preferentially used for repair, the percentage of the use of each locus is calculated by only taking into account the number of pure switched surviving colonies (i.e., we did not sub-clone mixed colonies and we also omitted the pure unswitched colony obtained in strain YL03-MATalpha). The use of each locus is calculated as the ratio of the number of colonies showing the use of that locus on the total number of pure switched surviving colonies screened, expressed as percentage. In the case of strain SL0B, we fail to detect by PCR the use of *MATalpha-inc* to repair *HMR*, thus we estimate that in switched colonies, the use of *HML* is of the order of 100%.

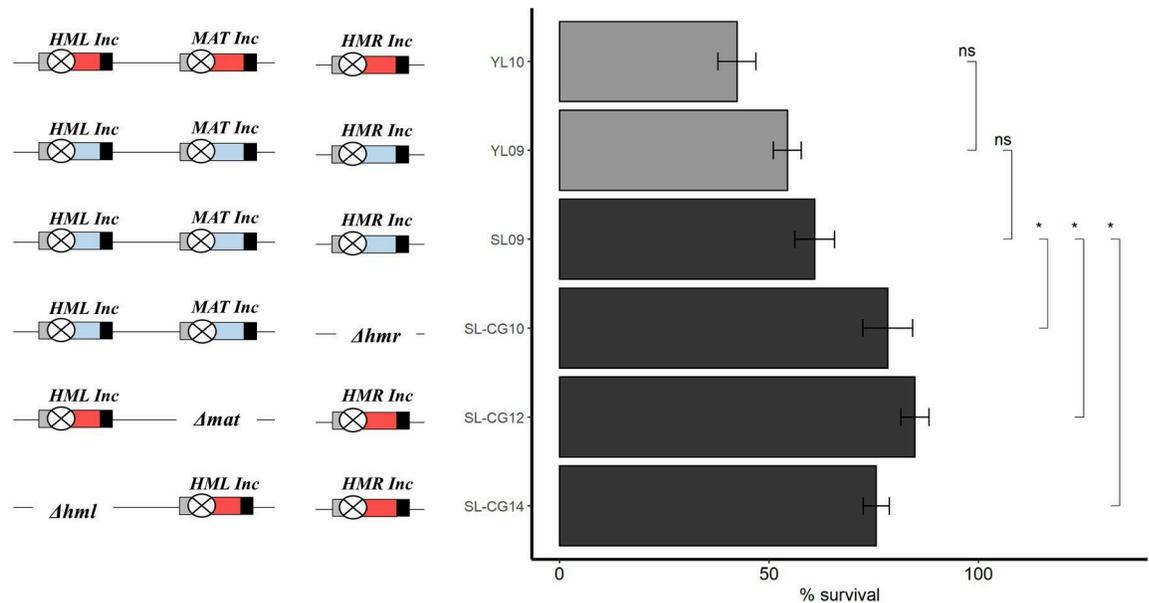
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.t004>

*MATalpha-inc* was used as template. *HML* is thus the preferred template for the repair of *HMR*.

Overall, these results show that *MAT* and *HML* preferentially repair on each other and that *HMR* is preferentially repaired by *HML*.

### Exploring the residual lethality in the absence of *MTL*-cuts

When cuts are non-repairable by HR; i.e., the three strains containing wild-type Ho sites: HM100  $\Delta rad51$  (*HMLalpha MATalpha HMRa*), SL-CG1 (*HMLalpha  $\Delta mat \Delta hmr$* ) and CGM498 ( *$\Delta hml \Delta mat HMRa$* ) and inexplicably, the YL03 strains (*HMLalpha-inc MATa or alpha HMRa-inc*) (Table 1), 99.9% of the cells die. As shown above, in other strains where the Ho-cut is repaired by HR (at *HML* and *HMR*) and in strains where there is no Ho cut (Y09, YL10 and SL09, Table 1) survival varies between 20% and 61%, never reaching 100%. This residual lethality can be explained by a general toxic effect of the expression of a heterologous protein in *C. glabrata* or by of the existence of (a) cryptic unrepairable Ho site(s) elsewhere in the genome. We thus decided to test this residual lethality in other strains where no cutting occurs. For this, we constructed strains where one *MTL* is deleted and two are inconvertible, SL-CG10 (*HMLa-inc MATa-inc  $\Delta hmr$* ), SL-CG12 (*HMLalpha-inc  $\Delta mat HMRalpha-inc$* ) and SL-CG14 ( *$\Delta hml MATalpha-inc HMRalpha-inc$* ) (Table 1). Upon Ho induction, survival in these three strains is around ~80%, whatever the *MTL* deleted (Fig 6). Comparing the survival of SL-CG10, SL-CG12 and SL-CG14 to SL09 (*HMLa-inc MATa-inc HMRa-inc*) (same genetic background and highest survival in our previous experiment, i.e., 60%) show that the increase in survival is significant (P-value < 0.05 in each pairwise combination of SL09 with SL-CG10, SL-CG12 and SL-CG14, Wilcoxon tests). If the residual lethality observed was due to a general toxic effect or to (an) extra Ho site(s), the lethality would be the same in those strains as in strains that are inconvertible for the three *MTL*s (YL10, YL09 and SL09) (Fig 3) since the constructions do not modify the context outside of the *MTL* loci.



**Fig 6. Survival of strains without wild-type Ho sites and containing deletion of one *MTL*.** Blue box represents *Ya*, red box *Yalpha* and crossed circle mutated Ho site (*Inc* loci) (not to scale). Histogram shows survival of strains with corresponding *MTL* configuration. Results for strains YL10, YL09 and SL09 are from Fig 2. Values from, at least, four experiments were averaged, the SEM used as estimate of the error and the P-value was calculated using the Wilcoxon test. \*: P-value < 0.05. ns: non-significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008627.g006>

Since the only difference between those strains is the number of inconvertible sites and thus potential binding sites for ScHo, we believe this may explain residual lethality by binding of ScHo (see Discussion).

## Discussion

Mating-type switching is a highly regulated mechanism that relies on a chromosomal DSB. DSBs are a major threat for genome integrity [32]. Repair of such damage is thus essential and can be achieved through Rad51-dependent HR which involves many steps in order to succeed: search for homology involving Rad51 and Rad52 in *S. cerevisiae*, copy on the donor locus and displacement and resolution of the double Holliday junction [33]. In *S. cerevisiae*, the DSB at the *MAT* locus is repaired by HR using *HMR* or *HML* as template, depending on the original mating-type of the cell. *C. glabrata* does not switch mating types spontaneously at high frequency [24]. We have previously shown that overexpression of *HO* genes from *C. glabrata* and related species fails to induce efficient mating-type switching and that switching can be efficiently induced by expressing *ScHO*, but that it is lethal to most cells [26]. Our previous work also showed that the *HML* locus is cut in *C. glabrata*; something that never happens in wild-type strains of *S. cerevisiae* [26]. In this work, we aimed at understanding the link between mating-type switching and cell death in *C. glabrata*. First, we show that *HMR* is also cut in wild-type strains of *C. glabrata*, overexpressing *ScHO*. Next, we constructed strains with mutated uncuttable Ho sites (inconvertible, *Inc*) and with deleted *MTL* loci, in order to examine survival to individual DSBs at the different *MTL* loci as well as knowing which *MTL* has been used as template for repair.

In *S. cerevisiae*, the donor preference mechanism ensures an efficient mating-type switching at *MAT* by promoting the use of the template from the opposite mating-type, in repair [18]. We found, in *C. glabrata*, that whatever the mating-type at *MAT*, *HML* is preferentially used as

template for repair. Thus, donor preference from *S. cerevisiae* seems not to be conserved in *C. glabrata*. In its absence, it also shows that the length of the sequence homology does not influence the use of the donor for repair. Indeed, the *Ya* and *Yalpha* segments, determining mating-type, share no homology and we observe that *MATa*, containing *Ya*, repairs preferentially using *HMLalpha*, containing *Yalpha*. We also demonstrate that *HML* is preferentially repaired using *MAT* and that *HMR* is preferentially repaired using *HML*, revealing a complex interplay between those different chromosomal segments. Loss of donor preference at *MAT*, along with the fact that the *C. glabrata* endogenous Ho protein fails to induce efficient mating-type switching [26], point to the possible degeneration of the mating-type switching system in *C. glabrata*. Thus, rules of DSB repair by HR observed in our inductions may reflect true preferences, independently of the *MAT*/Ho switching system. When the DSB can be repaired by HR using a template on the same chromosome or another chromosome, the intra-chromosomal template will be mostly chosen over the other (*HML* repairs preferentially with *MAT* and *vice versa*). When the DSB can only be repaired by an extra-chromosomal template, the sub-telomeric *HMR* was repaired preferentially using the sub-telomeric template *HML*. We can speculate that HR using a template on a same chromosome is preferred for DSB repair and in the absence of such a template, the sub-telomeric loci are repaired using other sub-telomeric loci.

In our previous work, we hypothesized that multiple DSBs at the *MTL* loci would be unrepairable and that this was the cause for lethality when mating-type switching is induced. As cited above, to mimic *S. cerevisiae*'s situation, in which *MAT* is the only recipient of the Ho cut, we mutated the Ho site at both *HML* and *HMR*. We are now able to demonstrate that one ScHo-DSB at the *MAT* locus is sufficient to induce cell death at a similar level to wild-type cells, thus invalidating our previous hypothesis. This means that, even in the presence of two intact homologous sequences, the *MAT* locus is not able to repair the break. More surprisingly, the DSB at *MAT* is only lethal when it is performed by the ScHo protein. We show, for the first time, that mating-type switching can be triggered efficiently by CRISPR-Cas9, thus independently of the Ho protein, in *C. glabrata*. This has been shown only recently in the model species *S. cerevisiae* [34]. No lethality is observed after a Cas9-DSB at *MAT* on plates. In liquid induction experiments, we observe a transient lethality of ~35% and a lower efficiency of switch (~30%). In both plate and liquid inductions, the Cas9 expression plasmid is constantly under selection pressure. We believe that observed discrepancies can be explained if induction is less efficient on individual cells in liquid medium than on plates, implying that cells in liquid medium can mutate the plasmid before switching (in the *CAS9* gene or its promoter in such way that *CAS9* is not expressed anymore, or in the gRNA sequence). These cells will never switch and can invade the culture. In contrast, some cells undergoing switching may not recover (~35% of lethality) but the ones that have survived the switch become "immune" to the Cas9-DSB, thus alleviating the need for mutating the Cas9 plasmid. Nonetheless, these cells may grow more slowly because of the maintenance of *CAS9*'s expression and are thus less likely to be in excess in the culture. Thus, these *MAT*-switched cells will be diluted and less represented on repressive plates.

To go back to the lethality induced by ScHo, unless the difference in the lethality with Cas9 is due to the 14 bp shift in cutting, which seems highly unlikely, these results suggest that the ScHo protein prevents DSB repair specifically at the *MAT* locus of *C. glabrata*, in such a way that 99.9% of the cells die. We have recently published that, in heterothallic strains of *N. delphensis*, overexpression of ScHo with the same plasmid as in this work leads to efficient switching, without lethality [35]. It is surprising that ScHo could have a deleterious effect in a locus- and species-specific manner. As in all three-loci-based mating-type switching systems, the three *MTL* loci of *C. glabrata* share identical sequences and only differ by the mating-type carried and/or their location in the genome [36]. We know that mating-type does not influence

lethality in any of our experiments. Thus, only the location of the *MAT* locus could explain the specificity of lethality induced by ScHo. The *MAT* locus is located in a central region on chromosome B whereas *HML* and *HMR* are positioned in sub-telomeric regions on chromosome B and E, respectively [36]. Thus, the ScHo specificity for *MAT* could only be achieved either through the structure of the chromatin or through the flanking sequences of the *MAT* locus. If the ScHo protein causes lethality by preventing repair at *MAT*, it is perhaps because it gets stuck at *MAT*, after performing the DSB, preventing recruitment of recombination proteins and thus repair of the locus. In *S. cerevisiae*, it is possible to follow the fate of repairable and non-repairable ScHo-cuts at *MAT* by Southern-blot analysis from a time-course experiment of the wild-type strains, overexpressing ScHo [37,38]. S3 Fig shows that, upon Ho induction, we are not able to visualize cut chromosomal arms at *MAT*. This could be explained if ScHo stays bound on the DNA end(s) and prevents HR at this locus: continuous resection will degrade DNA ends so that the probe cannot hybridize anymore. Indeed, in *S. cerevisiae*, unreparable ScHo-cuts are more extensively degraded than repairable ones [37]. Nonetheless, we can note that we clearly observe the parental uncut band before induction and that this band disappears completely as soon as we start the experiment, thus confirming that the *MAT* locus is efficiently cut in our system.

Outside of its role in inducing a lethal DSB at *MAT*, ScHo displays further toxicity in *C. glabrata*. Strains that are inconvertible for the three *MTL*s exhibit a survival of 61% at the most, and lethality is strongly reduced by the deletion of one *MTL*, whatever its position, *HML*, *MAT* or *HMR*. The difference between those two types of strains is the number of inconvertible (*Inc*) Ho sites present at the *MTL* loci. One explanation for this would be that the ScHo protein binds the *Inc* Ho sites and gets stuck there, in a way that is toxic for *C. glabrata* cells. ScHo probably has a high affinity for the *C. glabrata* Ho sites since we know that they are cut very efficiently and rapidly. In the case of an *Inc* site, the protein may be stuck there because the substrate is not transformed into a product. Indeed, we hypothesize that the cut releases the endonuclease and as we speculated above, this is prevented at the *MAT* locus, even after cutting, possibly by the chromatin structure. On the *Inc* sites, the binding of ScHo does not induce massive cell death but could, for example, physically hinder replication forks and thus disrupt DNA replication and cell division. Performing a ChIP-PCR on the Ho protein to examine its binding on the three *MTL* loci would allow us to better explore this aspect.

To put our results back into an evolutionary perspective and explore the link between switching and sexuality, we can turn to the other *Nakaseomyces* species. This group comprises *C. glabrata*, two other pathogens, *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* and three environmental species, *N. delphensis*, *Candida castelli*, *Nakaseomyces bacillisporus*. This clade contains species both varied in their lifestyle and in their lifecycle; all *Candida* species are described as asexual and haploid and in the two sexual species, *N. delphensis* is an obligate haploid while *N. bacillisporus* is a diploid [27]. *N. delphensis* undergoes natural Ho-induced mating-type switching, just like *S. cerevisiae* [35]. It is striking that none of the asexual species exhibit switching, thereby reinforcing the notion that switching is a mechanism that favours sexual reproduction. It is also remarkable, in such a case, that all asexual species have conserved the three *MTL* and a highly similar *HO* gene [25,36,39] while switching is supposed to be a mechanism that favours sexual reproduction. It is understandable that such a dangerous mechanism, involving a chromosomal DSB, would be lost if it is not essential. It has been hypothesized that *C. glabrata* sometimes undergoes switching [40,41]. These events could indeed be the result of very rare Ho-induced cuts or could also be fortuitous gene conversion events independent of the Ho protein (replication accident, repair of accidental DSBs etc). If we accept that this system is largely non-functional in *C. glabrata* and possibly other asexual species, the question of why they have kept both *HO* and the *MTL* remains open. In addition, it has been reported that the *HO* gene is

under purifying selection in the population of *C. glabrata* strains analysed [25]. This may suggest that both Ho and the *MTL*s have acquired another function in the asexual *Nakaseomyces*. In *S. cerevisiae*, the *MTL* loci are one of the very few structured regions of the genome [42] and there remains an intriguing possibility that the conserved function of these *MTL*s and the Ho protein would be in structuring the chromosomes bearing them. Further studies of the 3D structure of the *C. glabrata* nucleus would shed light on this point.

## Materials and methods

### Strains, cultures, and transformation

*C. glabrata* strains used in this study are listed in Table 1. Strains are grown in broth or on plates at 28°C in YDP (non-selective, 1% Yeast Extract, 1% Peptone, 2% glucose), in Synthetic Complete medium lacking uracil (SC-Ura, 0.34% Yeast Nitrogen Base without amino acids, 0.7% ammonium sulfate, 2% glucose, supplemented with adenine and all amino acids except uracil) or in Synthetic Complete medium lacking uracil, methionine, and cysteine (induction conditions for the *MET3* promoter, SC-Ind, 0.34% Yeast Nitrogen Base without amino acids, 0.7% ammonium sulfate, 2% glucose, supplemented with adenine and all amino acids except methionine and cysteine). For selection of transformants of the Ho plasmid or Cas9 plasmid and maintenance in repressive conditions for the *MET3* promoter, strains are grown in SC-Ind supplemented with 2 mM each of methionine and cysteine (SC-rep) and in YPD supplemented with 2 mM each of methionine and cysteine (YDP-Rep) when repression but no selection is needed. For SC-Rep, medium is buffered by 10 mL of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 M and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.95 M per liter. For *URA3* marker counter-selection, yeast strains are grown on 5-FOA medium (SC-Ura supplemented with 1 g/L of 5-fluoroorotic acid (5-FOA) and 50 mg/L of uracil).

Transformation is done according to the “one-step” lithium acetate transformation protocol from [43].

### Induction of mating-type switching by ScHo

The *HO* gene from *S. cerevisiae* is cloned into the pCU-*MET3* plasmid under the *MET3* promoter (p7.1, S2 Table) [44] and protocol for solid induction is detailed in [26]. For time-course of induction in liquid medium, transformants are grown overnight in liquid SC-Rep medium, counted, washed and resuspended in sterile water at 4.10<sup>7</sup> cells/mL. 100 µL is used to inoculate 40 mL of liquid SC-Ind medium and the culture is placed at 28°C with agitation. For each time point, a sample of the culture is counted under the microscope, diluted and plated on SC-Rep plates. Each strain that was analysed in a time-course, were also transformed with the plasmid that does not contain *ScHO*, pYR32 plasmid, cells were diluted, counted and plated, allowing the normalization of the survival in Ho induction.

### Induction of mating-type switching by CRISPR-Cas9

We used the inducible CRISPR-Cas9 system for *C. glabrata* from [31] using plasmid pCGLM1. We cloned into pCGLM1 a sequence corresponding to a guide RNA (gRNA) targeting the *Ya* sequence (S1 Table), giving rise to plasmids pCGLM1-*Ya*2.

Induction of Cas9-DSB was then performed as inductions of the *ScHO* gene done with p7.1 (see above).

### Cell viability estimation

Different dilutions of cultures, containing between 200 to 10<sup>6</sup> cells, are spread on both inductive and repressive media. When the survival rate is over 20%, cell viability is determined

directly as the ratio of the number of colonies counted on inductive medium to the number of colonies counted on repressive medium, for the same dilution. When the survival rate is under 1%, colonies are confluent on repressive medium at the same dilution where several colonies can be observed on induction medium. Thus, survival rate is measured by first comparing the number of colony-forming units (CFU) on inductive medium with the theoretical number of cells plated, as estimated by counting on a Thoma counting chamber. This is then corrected by the ratio of CFU to the number of cells counted, estimated by plating 200 cells on repressive medium. All the values were obtained from at least four independent transformants. Colonies number from a minimum of 2 to a maximum 746 was counted on plates. Numerical data used for drawing graphs is shown in [S3 Table](#).

### Determining the genotype at *MTL* loci

The genotype at each *MTL* locus is determined by PCR, when needed, directly on colonies [26] using specific primers: the forward primer is located upstream of the locus (ensuring specificity of the locus screened; *HML*, *MAT* or *HMR*) and a reverse primer located precisely on the Ho site (ensuring specificity of the information carried by the locus; alpha or a and wt or inc) ([S1 Table](#), [S2 Fig](#)). In most induction experiments, we did not check switching at *Inc* loci since preliminary experiments showed that there was no switching, indicating that the alpha-inc and a-inc Ho sites are not cut after Ho induction. This genotyping is performed on surviving colonies directly on induction plates (for solid induction) and on repression plates (for liquid induction). As previously shown, PCRs often reveal that most surviving colonies are mixed for genotypes at *MTLs* [26]. In the case of Ho inductions, we have already shown that sub-cloning of such mixed colonies yields more than 80% of switched pure clones [26]. Therefore, sub-cloning has not been done on any Ho induction in this work. In the case of Cas9 induction, since we had never used this system for switching *MTLs*, and we have decided to sub-clone mixed colonies in order to assess the true efficiency of mating-type switching.

### Construction of strains

We mutated the Ho sites in the region known to be essential for Ho cutting in *S. cerevisiae* [30], as shown on [S1 Fig](#), yielding loci *HML-inc*, *MAT-inc* and *HMR-inc*. Modification of *HML*, *MAT*, or *HMR* loci was realized either by marker selection (pop-in/pop-out) [45] or by mating-type switching upon *HO* gene expression or by use of CRISPR-Cas9. The three methods are detailed below. Primers and plasmids are listed in [S1](#) and [S2](#) Tables, respectively. Method used to construct each strain is listed in [S4 Table](#).

**Construction of PCR fragments and plasmids for pop-in.** In order to integrate the *URA3* marker at the targeted locus (pop-in), we amplified the *URA3* gene from *S. cerevisiae* under its own promoter by PCR using primers Sc-*URA3*-F and Sc-*URA3*-R and, YEp352 as template. The PCR fragment was cloned into the *EcoRV*-digested pBlueScript, giving rise to pURA ([S2 Table](#)).

To direct integration of the *URA3* marker at the targeted locus, here the *MTL* loci *HML*, *MAT* or *HMR*, the 5' and 3' flanking regions was added to the *URA3* marker in multiple steps.

First, the Z sequence, shared by the three *MTL* loci, was amplified by PCR using primers 68/70 and HM100 strain DNA as template ([S1 Table](#)). Primers 68 and 70 contain *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites, respectively, to allow cloning of the Z PCR fragment upstream of the *URA3* marker into pURA, giving rise to pZU ([S2 Table](#)).

Second, Ya and Yalpha sequences were amplified on strain HM100 by PCR, using primers 73/72 and 74/69 respectively ([S1 Table](#)). Primers 73 and 72 contain *Hind*III and *Sal*I restriction sites, respectively, in order to clone the Ya PCR fragment downstream of the *URA3* marker

into pZU, giving rise to pZUA (S2 Table). The *SalI* restriction site was added to primer 69 and no restriction site was added to primer 74 as the Yalpha PCR fragment already contains the *HindIII* restriction site 38 bp from the 5' of the fragment. Thus, the Yalpha PCR fragment, digested by both *SalI* and *HindIII*, was cloned downstream of the *URA3* marker into pZU to give rise to pZUAlpha (S2 Table).

Amplification by PCR, using universal primers M13F/M13R, on both pZUA and pZUAlpha plasmids, led to ZUA and ZUAlpha fragments, respectively. These fragments have been used for targeting *HML*, *MAT* or *HMR* loci (S2 Table) and Ura<sup>+</sup> transformants were selected on SC-Ura. Correct integration of the fragment was checked by PCR.

**Construction of plasmids and PCR fragments for pop-out.** The *URA3* marker is removed (pop-out) from the target locus by homologous recombination with a DNA fragment derived from the upstream and downstream sequences of that locus (S4 Table).

In order to replace the wild-type Ho site in the different *MTL* loci, by the inconvertible-mutated Ho site, we constructed two plasmids; pZA-inc and pZAlpha-inc (S2 Table). The pZA-inc plasmid (without *URA3* gene) results from double digestion of pZUA by *EcoRI* and *HindIII* and ligation after Klenow fill-in. The pZAlpha-inc plasmid (without the *URA3* gene) was constructed by cloning the *BamHI/EcoRI*-digested Z fragment and the *EcoRI/SalI*-digested Yalpha fragment into the pBlueScript double digested by *BamHI* and *SalI*. Amplification by PCR using primers M13F/M13R, from both pZA-inc and pZAlpha-inc plasmids, lead to the ZA-inc and ZAlpha-inc fragments that have been used for pop-out. The comparison of wild-type and inconvertible Ho sites is presented in S1 Fig.

In addition to the construction of *Inc* sites, we have also used strains with deletion of *MTLs* (Table 1). Strains with deletions of *MAT* and/or *HML* were directly obtained from [22] (Table 1) and *Inc* sites were introduced in those strains when needed (S4 Table). In addition, we constructed deletion of *HMR* in strains BG87 and CGM390. After pop-in of *URA3* at *HMR*, amplification of upstream and downstream sequences (500 bp each) of *HMR* was performed on strain BG87, using primers Up-HMR-F/Up-HMR-R and Down-HMR-F/ Down-HMR-R, respectively (S1 Table). Primer Up-HMR-R contains 40 bp of homology to the 5' end of the downstream PCR fragment. These two fragments were then combined by fusion PCR using primers Up-HMR-F and Down-HMR-R, giving rise to the  $\Delta hmr$  fragment (S4 Table).

As shown in S4 Table, other fragments for pop-out experiments were obtained by direct PCR on genomic DNA.

About 1  $\mu$ g of each pop-out fragment was used to transform Ura<sup>+</sup> strains, which were then plated onto YPD, grown for 24 hrs and replica-plated onto 5-FOA plates. Resulting 5-FOA<sup>R</sup> colonies were checked by PCR for correct removal of the *URA3* marker, and the locus sequenced.

**Strains obtained by mating-type switching.** When possible, we took advantage of the efficient mating-type switching induced by *SchO* to transpose the inc-Ho site mutation from one *MTL* to another, instead of doing pop-in/pop-out transformations as above. For example, an *HMLalpha-inc* locus can easily be used as template, during gene conversion, to repair either *MAT* wt or *HMR* wt. In addition, extra-chromosomal copies of either *MATa-inc* or *MATalpha-inc* were also used as templates for mating-type switching of *MTL* loci, in order to insert inc-Ho sites. These copies were introduced in the p7.1 plasmid, as follows. Plasmid p7.1 [26] was digested by *KpnI*, and *MATa-inc* and *MATalpha-inc* sequences were amplified by PCR using primers Up-Rec-MAT-F/Down-Rec-MAT-R on strains YL09 and YL07, respectively (Table 1 and S1 Table). Both primers share, respectively, 40 bp of homology to the ends of the *KpnI*-digested plasmid. This allows PCR fragment cloning in p7.1, at the *KpnI* restriction site, by homologous recombination in *E. coli* [46]. Correct assembly was confirmed by both analytic colony PCR and restriction digests.

Expression of Ho is induced in strains that are targeted for modification, either from the p7.1 plasmid, when a genomic *MTL* locus is used as template, or from p7.1-derived plasmids that contain a copy of *MATa-inc* or *MATalpha-inc*. Final loci are checked by PCR and sequencing.

### Southern-blot analysis

Genomic DNAs were prepared using the Qiagen genomic DNA kit, according to manufacturer's instructions. 2  $\mu$ g DNA was subjected to enzymatic digestions and protocol for Southern-blot is detailed in [26]. Primers used for probe PCR amplifications are given in [S1 Table](#).

### Construction of the $\Delta$ rad51 mutant using CRISPR-Cas9

The  $\Delta$ rad51 mutant of strain HM100 was constructed with the CRISPR-Cas9 system on plasmid pJH-2972 (kind donation from J. Haber, <https://protocolexchange.researchsquare.com/article/nprot-5791/v1>). We cloned a sequence corresponding to a gRNA targeting the *RAD51* gene into plasmid pJH-2972 ([S1 Table](#)), giving rise to plasmid pJH-RAD51.

We amplified upstream and downstream sequences (500 bp each) of the *RAD51* CDS (*CAGL0I05544g*) on strain HM100 by PCR using primers Up-Rad51-F/Up-Rad51-R and Down-Rad51-F/Down-Rad51-R, respectively ([S1 Table](#)). Primer Up-Rad51-R contains 40 bp of homology to the 5' end of the downstream PCR fragment. These two fragments are then combined by fusion PCR using primers Up-Rad51-F and Down-Rad51-R, giving rise to the  $\Delta$ rad51 fragment.

The strain was then co-transformed with both 1  $\mu$ g of pJH-RAD51 and 1  $\mu$ g of  $\Delta$ rad51 fragment. Ura<sup>+</sup> transformants were then selected on SC-Ura and checked for deletion at the *RAD51* locus by PCR. Deletion was confirmed by Southern blot analysis ([S4 Fig](#)) and by sequencing.

### Supporting information

**S1 Fig. Comparison of wild-type and mutated Ho sites of loci carrying Yalpha (A) or Ya information (B).** The wild-type Ho site is shown on top in blue letters, the mutated Ho site is shown below with mutated bp in red and deleted bp as dashes. Arrows indicate the Ho cleavage site.  
(TIF)

**S2 Fig. Mating-type screened by PCR at *MAT* in different strains.** All strains are analyzed with primer pairs that are specific to *MATa*, *MATalpha*, *MATa-inc* and *MATalpha-inc*, respectively GS01/123, GS01/121, GS01/122 and GS01/120. Top left panel: amplification obtained on BG87 (*MATa*); bottom left panel: amplification obtained on YL05 (*MATa-inc*); top right panel: amplification obtained on HM100 (*MATalpha*); bottom right panel: amplification obtained on YL07 (*MATalpha-inc*). MM: Molecular Marker, GeneRuler 1 kb (Thermo Fisher Scientific Inc).  
(TIF)

**S3 Fig. Southern-blot analysis of the DSB at the *MAT* locus in the wild-type HM100 strain.** Left panel: chemiluminescence image of blot of *PstI/XhoI* digestion hybridized with a probe corresponding to 484 bp located 262 bp away from the first nucleotide of the Ho site. Diagram of probe in top middle panel. The regions are represented with restriction sites and size of expected fragment. Right panel: chemiluminescence image of blot of *BglII/EcoRI* digestion hybridized with a probe corresponding to 1,013 bp located 2,119 bp away from the first

nucleotide of the Ho site. Diagram of probe is in lower middle panel.  
(TIF)

**S4 Fig. Molecular characterization of *Δrad51* mutations in HM100 by Southern blot hybridization.** Left panel: chemiluminescence image of blot of *HindIII* digestion. Right panel: chemiluminescence image of blot of *NdeI/EcoRI* digestion. The probe used is 1 kb long and is composed to the 500 bp upstream of the *RAD51* ORF fused to the 500 bp downstream of the *RAD51* ORF.

(TIF)

**S1 Table. Primers used in this work.** Fw: Forward; Rv: Reverse. The lowercase letters represent sequences with no homology to template DNA and reverse complete regions are indicated in uppercase.

(DOCX)

**S2 Table. Plasmids used in this work.**

(DOCX)

**S3 Table. Numerical data for figures.** Tables show percentage of survival calculated for each individual transformant in experiments represented as graphs. ND: Not done. SEM: Standard error of the mean. For Figs 4 and 5C number of colonies counted during time-course experiments is also shown.

(XLSX)

**S4 Table. Methods used for strain construction.**

(DOCX)

## Acknowledgments

We thank I. Castaño for providing strains CGM460, CGM390 and GM498. We thank members of our lab and the iGénolevures network ((IRN from the CNRS N°0814) for stimulating discussions, Gilles Fischer, Fabienne Malagnac, Pierre Grognet, and anonymous reviewers for critical reading. We are also grateful to Pierre Grognet for his technical help with the Southern-blot.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Laetitia Maroc, Youfang Zhou-Li, Stéphanie Boisnard, Cécile Fairhead.

**Formal analysis:** Laetitia Maroc.

**Investigation:** Laetitia Maroc, Youfang Zhou-Li, Stéphanie Boisnard.

**Methodology:** Youfang Zhou-Li.

**Supervision:** Cécile Fairhead.

**Writing – original draft:** Laetitia Maroc, Cécile Fairhead.

**Writing – review & editing:** Laetitia Maroc, Cécile Fairhead.

## References

1. Ni M, Feretzaki M, Sun S, Wang X, Heitman J. Sex in fungi. *Annu Rev Genet.* 2011; 45: 405–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132536> PMID: 21942368
2. Butler G. Fungal sex and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23: 140–159. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-09> PMID: 20065328

3. Heitman J, Carter DA, Dyer PS, Soll DR. Sexual reproduction of human fungal pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019281> PMID: 25085958
4. Bennett RJ, Johnson AD. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J*. 2003; 22: 2505–2515. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg235> PMID: 12743044
5. O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 2009; 457: 471–474. <https://doi.org/10.1038/nature07528> PMID: 19043401
6. Hanson SJ, Wolfe KH. An Evolutionary Perspective on Yeast Mating-Type Switching. *Genetics*. 2017; 206: 9–32. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.202036> PMID: 28476860
7. Egel R. Fission yeast mating-type switching: programmed damage and repair. *DNA Repair (Amst)*. 2005; 4: 525–536. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.11.004> PMID: 15811625
8. Maki T, Ogura N, Haber JE, Iwasaki H, Thon G. New insights into donor directionality of mating-type switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS Genet*. 2018; 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007424> PMID: 29852001
9. Barsoum E, Martinez P, Åström SU. Alpha3, a transposable element that promotes host sexual reproduction. *Genes Dev*. 2010; 24: 33–44. <https://doi.org/10.1101/gad.557310> PMID: 20008928
10. Rajaei N, Chiruvella KK, Lin F, Åström SU. Domesticated transposase Kat1 and its fossil imprints induce sexual differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111: 15491–15496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406027111> PMID: 25313032
11. Lee C-S, Haber JE. Mating-type Gene Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr*. 2015; 3: MDNA3-0013–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0013-2014> PMID: 26104712
12. Haber JE. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2012; 191: 33–64. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.134577> PMID: 22555442
13. Tomimatsu N, Mukherjee B, Harris JL, Boffo FL, Hardebeck MC, Potts PR, et al. DNA-damage-induced degradation of EXO1 exonuclease limits DNA end resection to ensure accurate DNA repair. *J Biol Chem*. 2017; 292: 10779–10790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.772475> PMID: 28515316
14. White CI, Haber JE. Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1990; 9: 663–673. PMID: 2178924
15. Loo S, Rine J. Silencers and domains of generalized repression. *Science*. 1994; 264: 1768–1771. <https://doi.org/10.1126/science.8209257> PMID: 8209257
16. Herskowitz I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 1988; 52: 536–553. PMID: 3070323
17. Nickoloff JA, Singer JD, Heffron F. In vivo analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* HO nuclease recognition site by site-directed mutagenesis. *Mol Cell Biol*. 1990; 10: 1174–1179. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.3.1174> PMID: 2406563
18. Wu X, Haber JE. A 700 bp cis-Acting Region Controls Mating-Type Dependent Recombination Along the Entire Left Arm of Yeast Chromosome III. *Cell*. 1996; 87: 277–285. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81345-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81345-8) PMID: 8861911
19. Connolly B, White CI, Haber JE. Physical monitoring of mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 1988; 8: 2342–2349. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.6.2342> PMID: 2841579
20. Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, et al. Genome evolution in yeasts. *Nature*. 2004; 430: 35–44. <https://doi.org/10.1038/nature02579> PMID: 15229592
21. Muller H, Hennequin C, Gallaud J, Dujon B, Fairhead C. The asexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct a and alpha haploid mating types. *Eukaryotic Cell*. 2008; 7: 848–858. <https://doi.org/10.1128/EC.00456-07> PMID: 18375614
22. Ramírez-Zavaleta CY, Salas-Delgado GE, De Las Peñas A, Castaño I. Subtelomeric silencing of the MTL3 locus of *Candida glabrata* requires yKu70, yKu80, and Rif1 proteins. *Eukaryotic Cell*. 2010; 9: 1602–1611. <https://doi.org/10.1128/EC.00129-10> PMID: 20675581
23. Robledo-Márquez K, Gutiérrez-Escobedo G, Yáñez-Carrillo P, Vidal-Aguaiar Y, Briones-Martín-Del-Campo M, Orta-Zavalza E, et al. *Candida glabrata* encodes a longer variant of the mating type (MAT) alpha2 gene in the mating type-like MTL3 locus, which can form homodimers. *FEMS Yeast Res*. 2016; 16. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow082> PMID: 27650705
24. Butler G, Kenny C, Fagan A, Kurischko C, Gaillardin C, Wolfe KH. Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 1632–1637. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304170101> PMID: 14745027
25. Carreté L, Ksiezopolska E, Pegueroles C, Gómez-Molero E, Saus E, Iraola-Guzmán S, et al. Patterns of Genomic Variation in the Opportunistic Pathogen *Candida glabrata* Suggest the Existence of Mating

- and a Secondary Association with Humans. *Curr Biol*. 2018; 28: 15–27. e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.027> PMID: 29249661
26. Boissard S, Zhou Li Y, Arnaise S, Sequeira G, Raffoux X, Enache-Angoulvant A, et al. Efficient Mating-Type Switching in *Candida glabrata* Induces Cell Death. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0140990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140990> PMID: 26491872
  27. Gabaldón T, Martin T, Marcet-Houben M, Durrens P, Bolotin-Fukuhara M, Lespinet O, et al. Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*. 2013; 14: 623. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-623> PMID: 24034898
  28. Fidel PL, Cutright JL, Tait L, Sobel JD. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis*. 1996; 173: 425–431. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.2.425> PMID: 8568305
  29. Cormack BP, Falkow S. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics*. 1999; 151: 979–987. PMID: 10049916
  30. Nickoloff JA, Chen EY, Heffron F. A 24-base-pair DNA sequence from the *MAT* locus stimulates intergenic recombination in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 7831–7835. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7831> PMID: 3020559
  31. Maroc L, Fairhead C. A new inducible CRISPR-Cas9 system useful for genome editing and study of double-strand break repair in *Candida glabrata*. *Yeast*. 2019. <https://doi.org/10.1002/yea.3440> PMID: 31423617
  32. Fairhead C, Dujon B. Consequences of unique double-stranded breaks in yeast chromosomes: death or homozygosis. *Molec Gen Genet*. 1993; 240: 170–180. <https://doi.org/10.1007/BF00277054> PMID: 8355651
  33. Haber JE. DNA repair: the search for homology. *Bioessays*. 2018; 40: e1700229. <https://doi.org/10.1002/bies.201700229> PMID: 29603285
  34. Xie Z-X, Mitchell LA, Liu H-M, Li B-Z, Liu D, Agmon N, et al. Rapid and Efficient CRISPR/Cas9-Based Mating-Type Switching of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)*. 2018; 8: 173–183. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300347> PMID: 29150593
  35. Zhou-Li Y, Boissard S, Enache-Angoulvant A, Fairhead C. The complete sexual cycle of *Nakaseomyces delphensis* and the role of Ho in ploidy. *Yeast*. 2020. <https://doi.org/10.1002/yea.3522>
  36. Muller H, Hennequin C, Dujon B, Fairhead C. *Ascomycetes: the Candida MAT Locus: Comparing MAT in the Genomes of Hemiascomycetous Yeasts*. 1st ed. Taylor JW, Kronstad JW, Heitman J, Casselton LA, editors *Sex in Fungi*. 1st ed. American Society for Microbiology; 2007. pp. 247–263.
  37. White CI, Haber JE. Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1990; 9: 663–673. PMID: 2178924
  38. Aylon Y, Liefshitz B, Bitan-Banin G, Kupiec M. Molecular dissection of mitotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 1403–1417. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.4.1403-1417.2003> PMID: 12556499
  39. Richard G-F, Kerrest A, Lafontaine I, Dujon B. Comparative genomics of hemiascomycete yeasts: genes involved in DNA replication, repair, and recombination. *Mol Biol Evol*. 2005; 22: 1011–1023. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi083> PMID: 15647519
  40. Lin C-Y, Chen Y-C, Lo H-J, Chen K-W, Li S-Y. Assessment of *Candida glabrata* Strain Relatedness by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 2452–2459. <https://doi.org/10.1128/JCM.00699-07> PMID: 17553975
  41. Brockert PJ, Lachke SA, Srikantha T, Pujol C, Galask R, Soll DR. Phenotypic Switching and Mating Type Switching of *Candida glabrata* at Sites of Colonization. *Infect Immun*. 2003; 71: 7109–7118. <https://doi.org/10.1128/iai.71.12.7109-7118.2003> PMID: 14638801
  42. Belton J-M, Lajoie BR, Audibert S, Cantaloube S, Lassadi I, Goiffon I, et al. The Conformation of Yeast Chromosome III Is Mating Type Dependent and Controlled by the Recombination Enhancer. *Cell Rep*. 2015; 13: 1855–1867. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.063> PMID: 26655901
  43. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. 1995; 11: 355–360. <https://doi.org/10.1002/yea.320110408> PMID: 7785336
  44. Zordan RE, Ren Y, Pan S-J, Rotondo G, De Las Peñas A, Iluore J, et al. Expression plasmids for use in *Candida glabrata*. *G3 (Bethesda)*. 2013; 3: 1675–1686. <https://doi.org/10.1534/g3.113.006908> PMID: 23934995
  45. Alani E, Cao L, Kleckner N. A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics*. 1987; 116: 541–545. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.541.test> PMID: 3305158
  46. Beyer HM, Gonschorek P, Samodelov SL, Meier M, Weber W, Zurbriggen MD. AQUA Cloning: A Versatile and Simple Enzyme-Free Cloning Approach. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0137652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137652> PMID: 26360249

### III.2.3 Résultats supplémentaires

#### **La létalité liée à la coupure double brin au locus *MAT*, par la protéine Ho de *S. cerevisiae*, est très précoce**

Dans la publication « *A single Ho-induced double-strand break at the MAT locus is lethal in Candida glabrata » , j'ai démontré que dès 2 H d'induction de ScHO dans une souche qui ne peut être coupée qu'à *MAT*, plus de 95 % des cellules mouraient. Cela témoigne de la précocité de la létalité liée à la CDB au locus *MAT*. Avant d'obtenir ce résultat, j'avais réalisé une autre expérience dans le but d'étudier si la létalité liée à l'induction du changement de type sexuel chez *C. glabrata* par ScHo survenait de manière précoce ou tardive. L'expérience qui avait été réalisée est la suivante : des cellules d'une souche sauvage pour les trois locus sexuels, la souche HM3a (*HMLa MATa HMRa*), et portant le plasmide p7.1 ont été isolées une à une, par micromanipulation, sur le milieu inducteur Sc-Ind. En parallèle, des cellules de la même souche HM3a ne portant aucun plasmide ont été isolées une à une sur un milieu SC-Ind supplémenté en uracile. Sous microscope optique, l'évolution du stade cellulaire de chaque cellule isolée a été suivie toutes les 24 H pendant 72 H (seulement à 24 H et à 72 H pour la souche ne portant pas le plasmide). Un résumé des résultats est présenté dans le Tableau 5.*

**Tableau 5. Résumé des résultats de l'expérience de micromanipulation des souches HM3a et HM3a + p7.1 en condition d'induction de *ScHO***

Stade cellulaire	Nombre de cellules observées	
	Endonucléase Ho de <i>S. cerevisiae</i>	
	Présente	Absente
< 12 cellules	39 (83 %)	12 (21 %)
Micro-colonie	8 (17 %)	0
Colonie « standard »	0	44 (79 %)
Total :	47	56

Le tableau résume le nombre de cellules bloquées au stade cellulaire décrit et observées après 72 H de croissance à 28 °C en présence (souche HM3a + p7.1) ou en absence (souche HM3a) de ScHo. Une micro-colonie correspond à une cellule isolée ayant donné plusieurs centaines de cellules (incomptables), visibles au microscope optique au grossissement x400, mais qui ne donnent jamais une colonie visible à l'œil nu ni qui puisse être repiquée, contrairement aux « colonies standard ».

Lorsque les cellules de la souche HM3a n'expriment pas *ScHO*, seulement 21 % des cellules ne forment pas de colonies, l'avortement de ces cellules étant probablement dû à la micromanipulation. Lorsque les cellules de la même souche expriment *ScHO*, 83 % ou 62 % en relatif au témoin négatif (HM3a sans plasmide), ne donnent aucune colonie et s'arrêtent, au maximum, au stade 12 cellules dès 24 H passées à 28°C. De plus, aucune cellule isolée ne donne de colonie « standard » contre 79 % des cellules isolées pour le témoin. Ce résultat confirme que la mort cellulaire induite par l'expression de *ScHO* est très précoce.

Ces résultats étaient des résultats préliminaires, cette expérience aurait dû être réalisée dans la souche sauvage HM100 avec le bon témoin expérimental, à savoir des cellules HM100 portant le plasmide pyr32 (plasmide vide ne contenant pas *ScHO*) et une centaine de cellules auraient dû être disséquées. Comme j'ai finalement réalisé l'expérience de cinétique de coupure dans la souche HM100 publiée dans l'article « *A single Ho-induced double-strand break at the MAT locus is lethal in Candida glabrata* »,

je n'ai pas réalisé de nouveau l'expérience de micromanipulation écrite ci-dessus avec les bons témoins.

### **Une coupure par Cas9 au locus *HMR* en absence de matrice de réparation ne semble pas létale**

J'avais également réalisé une expérience préliminaire afin de savoir si une CDB par Cas9 au locus *HMR* sans matrice de réparation était létale. A cette fin, j'avais induit une CDB par Cas9 au locus *HMRa* dans la souche CGM498 ( $\Delta hml \Delta mat HMRa$ ) en dirigeant la coupure par l'ARNg Ya2 utilisé dans les expériences d'induction de CDB par Cas9 à *MAT* et grâce auquel la coupure par Cas9 était très efficace, au moins au locus *MAT* (Maroc et al., 2020). Les résultats d'induction d'une CDB par Cas9 à *HMR* sont résumés Tableau 6.

**Tableau 6. Survie de la souche CGM498 à la suite d'une coupure par ScHo et Cas9.**

<b>Souche</b>	<b>Endonucléase</b>	<b>Survie (%)</b>
<b>CGM498</b> <b>(<math>\Delta hml \Delta mat HMRa</math>)</b>	ScHo	0,11 $\pm$ 0,03
	Cas9	94 $\pm$ 0

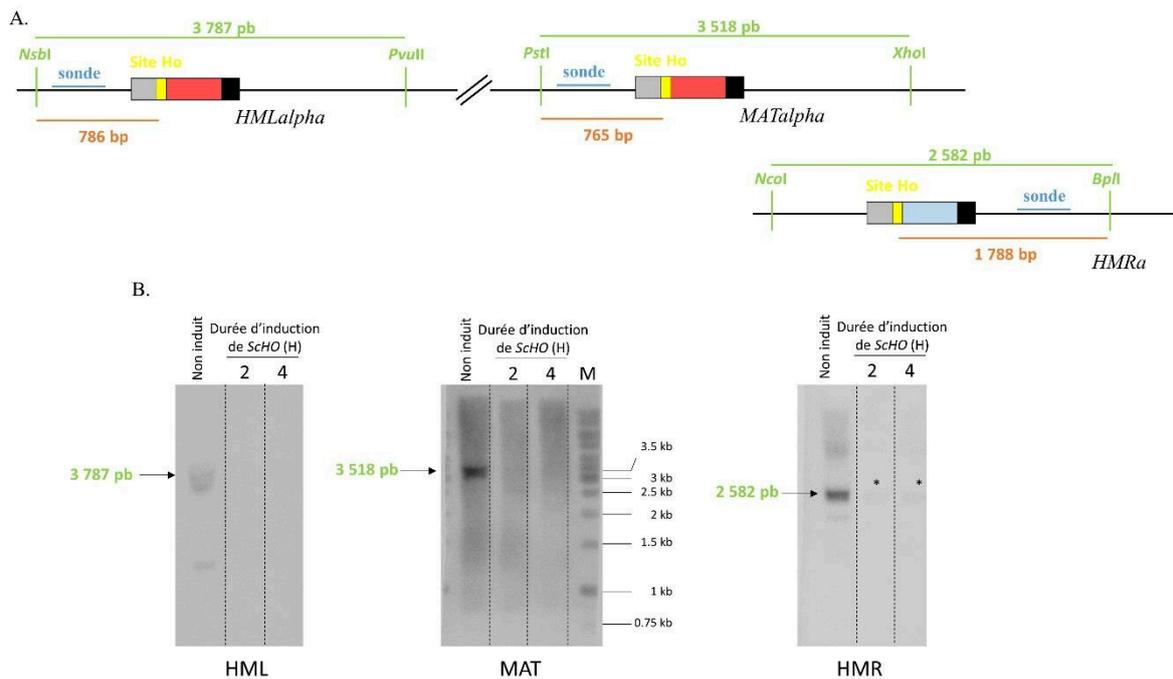
Le résultat de survie avec l'endonucléase ScHo est issu de (Maroc et al., 2020). La coupure par Cas9 a été dirigée au locus *HMRa* par l'ARNg Ya2. Pour le calcul de la survie à la suite de l'induction de *ScHO*, les valeurs de deux expériences ont été moyennées. Le SEM est utilisé pour estimer l'erreur.

Il semblerait donc qu'une CDB par Cas9 au locus *HMRa* en absence de matrice de réparation ne soit pas fortement létale chez *C. glabrata*. Ce résultat est à confirmer en répétant l'expérience au moins une nouvelle fois, et il faudrait s'assurer que la protéine Cas9 a bien coupé le locus *HMR*, par exemple par Southern-blot.

### **III.4 Mise en évidence des coupures de ScHo aux locus *HML*, *MAT* et *HMR* chez *C. glabrata* par Southern-blot**

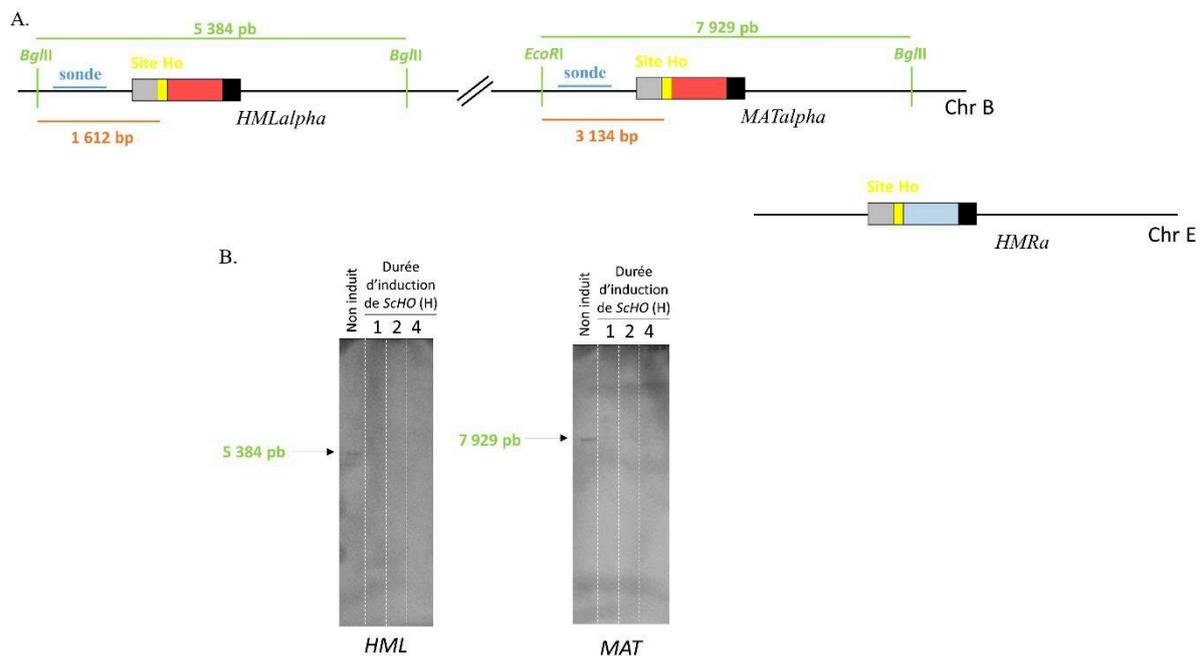
#### **III.4.1 Mise en évidence de la coupure de la protéine Ho de *S. cerevisiae* par Southern-blot dans une souche sauvage**

Chez *S. cerevisiae*, il est possible de suivre l'évolution de la CDB par ScHo au locus *MAT*, ainsi que sa réparation, par Southern-blot d'une cinétique de coupure dans des souches sauvages surexprimant *ScHO* (White and Haber, 1990; Aylon et al., 2003). J'ai voulu suivre l'évolution d'une CDB par ScHo chez *C. glabrata* à chacun des trois locus sexuels, *HML*, *MAT* (Maroc et al., 2020) et *HMR*. Dans ce but, j'ai réalisé une cinétique de coupure dans la souche sauvage HM100 (*HMLalpha MATalpha HMRa*) (Figure 19), en milieu liquide inducteur, au cours de laquelle j'ai prélevé un échantillon de culture cellulaire à 2H, 4H et 6H d'induction de *ScHO*. L'ADNg a été extrait et digéré par des enzymes de restriction coupant de part et d'autre de chaque locus sexuel (Figure 19A). Les résultats de ce Southern-blot sont présentés Figure 19B.



**Figure 19. Analyse par Southern-blot de la CDB par ScHo aux locus *HML*, *MAT* et *HMR* dans la souche sauvage HM100. A. Schéma des locus sexuels de la souche HM100, des sondes d'ADN utilisées et des tailles de fragments attendus.** Le rectangle bleu représente la séquence Ya, le rectangle rouge la séquence Yalpha, les rectangles gris et noirs les séquences identiques partagées par les trois locus sexuels, la barre jaune le site Ho sauvage (pas à l'échelle). Les régions des locus *HMLalpha*, *MATalpha* et *HMRa* sont représentées avec les sites de restriction et les tailles de fragments attendus (avec ou sans coupure ScHo). **B. Photographie par chimiluminescence du Southern-blot.** Pour *HML*, l'ADNg a été digéré par *Nsbl/PvuII* et hybridé avec une sonde correspondant à 409 pb d'une séquence localisée en amont du locus *HML* et localisée à 361 pb du premier nucléotide du site Ho ; pour *MAT*, l'ADNg a été digéré par *PstI/XhoI*, hybridé avec une sonde correspondant à 484 pb d'une séquence localisée en amont du locus *MAT* et localisée à 262 pb du premier nucléotide du site Ho ; pour *HMR*, l'ADNg a été digéré par *NcoI/BpI*, hybridé avec une sonde correspondant à 617 pb d'une séquence localisée en aval du locus *HMR* et localisée à 1 241 pb du dernier nucléotide du site Ho. Le résultat du Southern-blot de cinétique de coupure à *MAT* est issu de (Maroc et al., 2020). L'ADNg digéré du puit « Non induit » correspond à l'ADNg extrait de la souche HM100 portant le plasmide p7.1, cultivée en milieu SC-Rep sur une nuit entière et à partir de laquelle l'induction liquide utilisée pour le reste du Southern-blot a été réalisée.

À la suite de l'induction de *ScHO* et qu'importe la durée de celle-ci ou le locus sexuel étudié, aucune bande correspondant au locus coupé n'est visualisable. Toutefois, lorsqu'il n'y pas d'induction de *ScHo*, une bande correspondant au locus intact est visible et disparaît dès 2H d'induction de *ScHo* pour *HML* et *MAT*, ce qui confirmerait que la coupure aux trois locus sexuels par *ScHo* soit très efficace. Concernant le locus *HMR*, une bande correspondant au locus intact reste visible jusqu'à 6H d'induction. J'ai démontré dans l'article (Maroc et al., 2020) que dans une souche sauvage, des coupures simultanées aux trois locus sexuels peuvent apparaître et entraîner une absence de matrice pour réparer la coupure de *ScHo*. Il est possible que si la CDB à un *MTL* ne peut être réparée, la résection dégraderait les extrémités ADN de la CDB de telle sorte que la sonde d'ADN ne pourrait plus s'y hybrider. En effet, il a été montré chez *S. cerevisiae* que les extrémités d'une CDB par *ScHo* qui ne peut être réparée étaient plus dégradées que des extrémités d'une cassure réparable (White and Haber, 1990). J'ai donc de nouveau réalisé un Southern-blot d'une cinétique de coupure dans la souche HM100 en choisissant des enzymes de restrictions et une sonde qui permettraient d'étendre la longueur entre le site de coupure de *Ho* et le site de restriction le plus proche et ce à chacun des trois locus sexuels (Figure 20A). J'ai obtenu exactement le même résultat que précédemment (Figure 20B). Faute de temps, je n'ai pas pu réaliser un nouveau Southern-blot de cinétique de coupure à *HMR*.

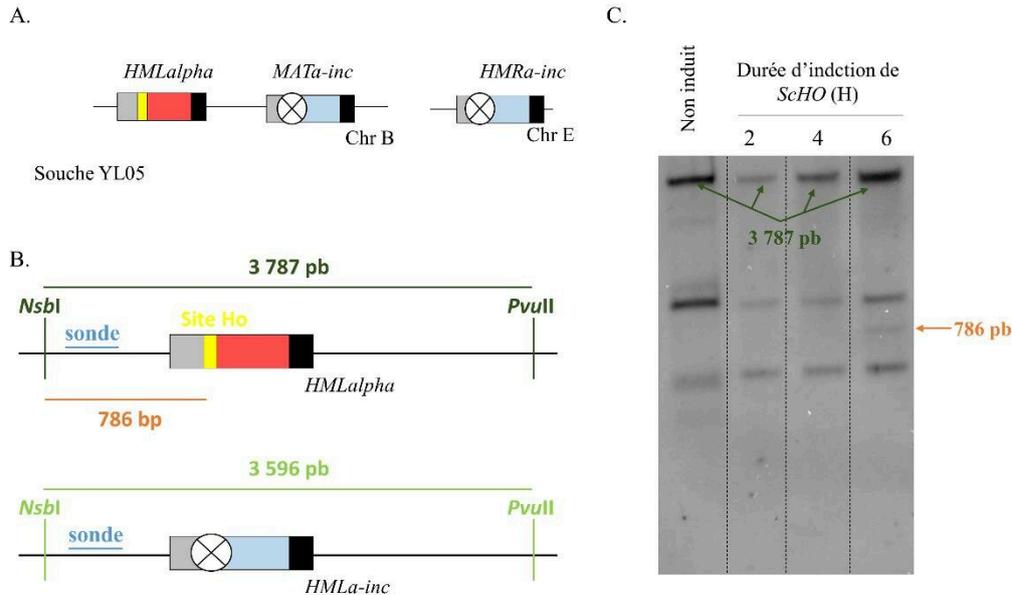


**Figure 20. Analyse par Southern-blot de la coupure double brin par ScHo aux locus *HML* et *MAT* dans la souche sauvage HM100. A. Schéma des locus sexuels de la souche HM100, des sondes d'ADN utilisées et des tailles de fragments attendus.** Le rectangle bleu représente la séquence Ya, le rectangle rouge la séquence Yalpha, les rectangles gris et noirs les séquences identiques partagées par les trois locus sexuels, la barre jaune le site Ho sauvage (pas à l'échelle). Les régions des locus *HMLalpha* et *MATalpha* sont représentées avec les sites de restriction et les tailles de fragments attendus (avec ou sans coupure ScHo).

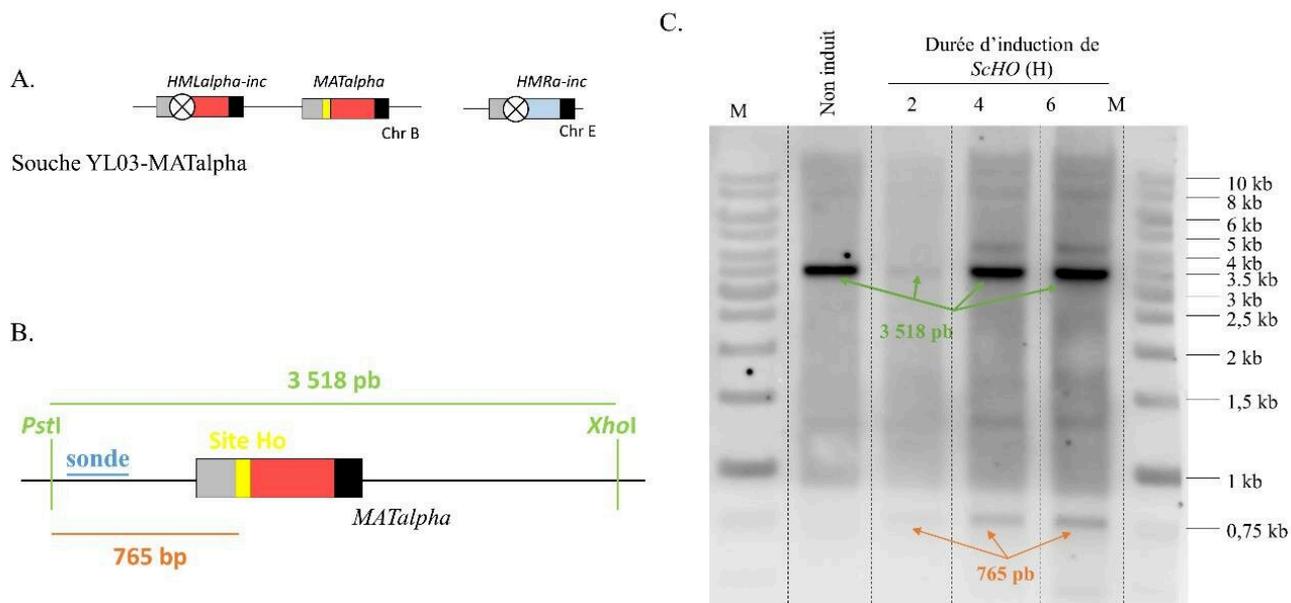
**B. Photographie par chimiluminescence du Southern-blot.** Pour *HML*, l'ADNg a été digéré par *Bgl*II/*Bgl*II et hybridé avec une sonde correspondant à 542 pb d'une séquence localisée en amont du locus *HML* et localisée à 1 119 pb du premier nucléotide du site Ho ; pour *MAT*, l'ADNg a été digéré par *Eco*RI/*Bgl*II, hybridé avec une sonde correspondant à 1 013 pb d'une séquence localisée en amont du locus *MAT* et localisée à 2 111 pb du premier nucléotide du site Ho. Le résultat du Southern-blot de cinétique de coupure à *MAT* est issu de (Maroc et al., 2020). L'ADNg digéré du puit « Non induit » correspond à l'ADNg extrait de la souche HM100 portant le plasmide p7.1, cultivée en milieu SC-Rep sur une nuit entière et à partir de laquelle l'induction liquide utilisée pour le reste du Southern-blot a été réalisée.

### III.4.2 Mise en évidence de la coupure de ScHo aux locus *HML* et *MAT* par Southern-blot dans des souches portant des locus sexuels sauvages et inconvertibles

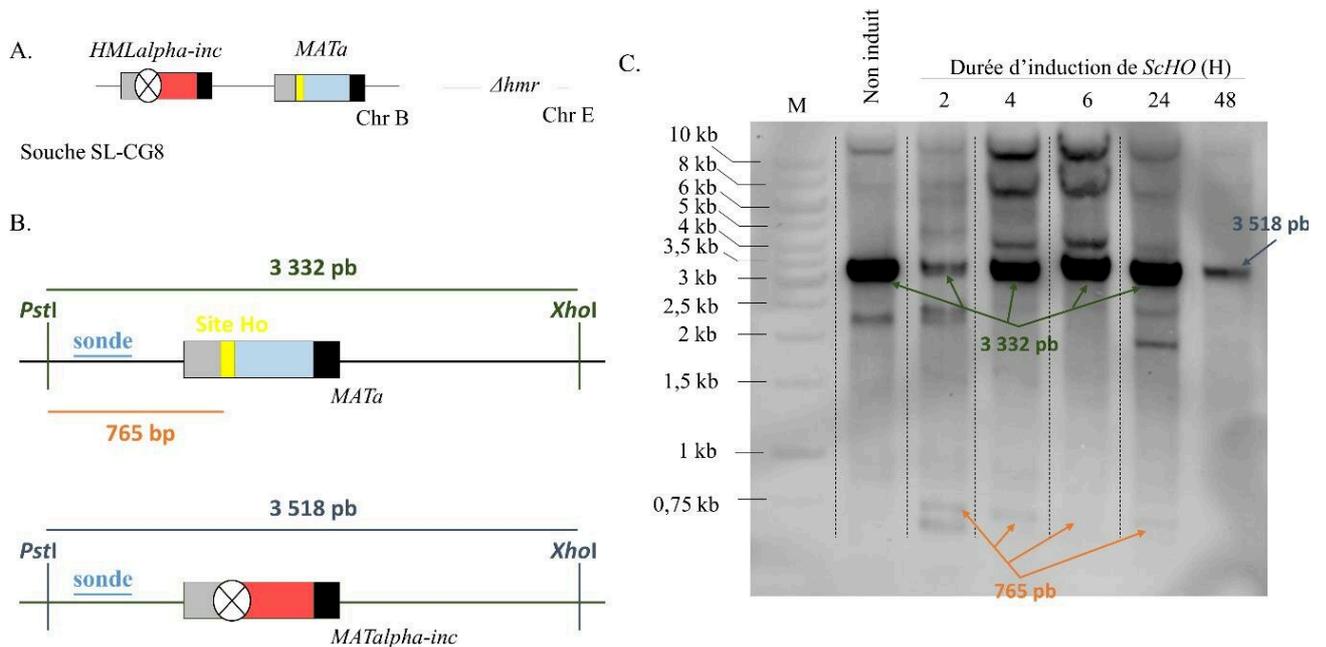
Dans une souche sauvage, deux problèmes peuvent se combiner et jouer sur la réparation de la CDB au locus : la CDB par ScHo au locus *MAT* ainsi que les coupures simultanées aux trois locus sexuels entraînant une absence de matrice de réparation énoncées précédemment. Dans le but de m'affranchir de ce dernier problème et du premier lorsque je me suis intéressée à la coupure au locus *HML* et *HMR*, j'ai finalement réalisé un Southern-blot de la cinétique de coupure dans des souches dans lesquelles seul un locus peut être coupé par ScHo, *HML* ou *MAT*, et être réparé par une ou deux matrices de réparation inconvertibles présentes aux autres locus (YL05, *HMLalpha MATa-inc HMRa-inc* ; YL03-*MATalpha, HMLalpha-inc MATalpha HMRa-inc* et SL-CG8, *HMLalpha-inc MATa Δhmr*). Faute de temps, je n'ai pas pu réaliser le Southern-blot de cinétique de coupure à *HMR*. Les résultats sont présentés Figures 21, 22 et 23.



**Figure 21. Analyse par Southern-blot de la coupure double brin par ScHo au locus HML dans la souche YL05. A. Schéma des locus sexuels de la souche YL05.** Le rectangle bleu représente la séquence Ya, le rectangle rouge la séquence Yalpha, les rectangles gris et noirs les séquences identiques partagées par les trois locus sexuels, la barre jaune le site Ho sauvage et la croix le site Ho muté (locus *Inc*) (pas à l'échelle). **B. Schéma de la sonde d'ADN utilisée et des tailles de fragments attendus.** Les régions du locus *HMLalpha* sont représentées avec les sites de restriction et les tailles de fragments attendus (avec ou sans coupure *ScHo*). **C. Photographie par chimiluminescence du Southern-blot.** L'ADNg a été digéré par *NsiI*/*PvuII* et hybridé avec une sonde correspondant à 409 pb d'une séquence localisée en amont du locus *HML* et localisée à 361 pb du premier nucléotide du site Ho. L'ADNg digéré du puit « Non induit » correspond à l'ADNg extrait de la souche YL05 portant le plasmide p7.1, cultivée en milieu SC-Rep sur une nuit entière et à partir de laquelle l'induction liquide utilisée pour le reste du Southern-blot a été réalisée.



**Figure 22. Analyse par Southern-blot de la coupure double brin par ScHo au locus *MAT* dans la souche YL03-MATalpha.** **A. Schéma des locus sexuels de la souche YL03-MATalpha.** Le rectangle bleu représente la séquence Ya, le rectangle rouge la séquence Yalpha, les rectangles gris et noirs les séquences identiques partagées par les trois locus sexuels, la barre jaune le site Ho sauvage et la croix le site Ho muté (locus *Inc*) (pas à l'échelle). **B. Schéma de la sonde d'ADN utilisée et des tailles de fragments attendus.** Les régions du locus *MATalpha* sont représentées avec les sites de restriction et les tailles de fragments attendus (avec ou sans coupure ScHo). **C. Photographie par chimiluminescence du Southern-blot.** L'ADNg a été digéré par *PstI/XhoI* et hybridé avec une sonde correspondant à 484 pb d'une séquence localisée en amont du locus *MAT* et localisée à 262 pb du premier nucléotide du site Ho. L'ADNg digéré du puit « Non induit » correspond à l'ADNg extrait de la souche YL03 portant le plasmide p7.1, cultivée en milieu SC-Rep sur une nuit entière et à partir de laquelle l'induction liquide utilisée pour le reste du Southern-blot a été réalisée. Après précipitation de l'ADNg digéré, moins d'ADN que pour les autres conditions avait été récupéré pour le temps T = 2 H. M : marqueur moléculaire, GeneRuler 1 kb (Thermo Fisher Scientific Inc).



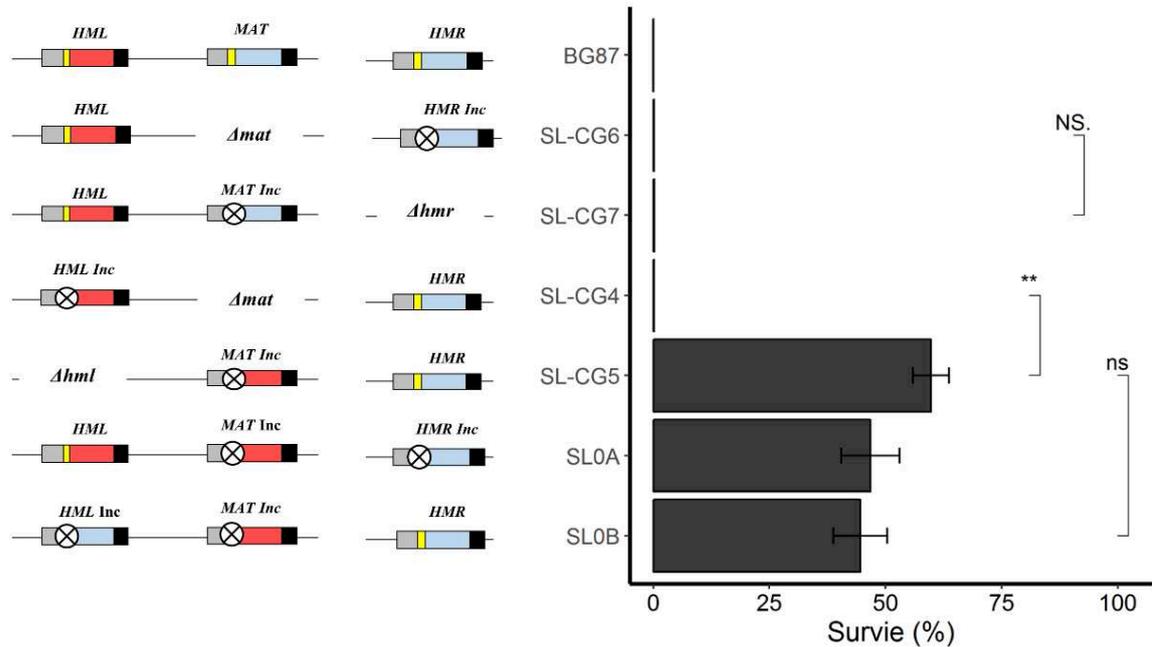
**Figure 23. Analyse par Southern-blot de la coupure double brin par ScHo au locus *MAT* dans la souche SL-CG8.** **A. Schéma des locus sexuels de la souche SL-CG8.** Le rectangle bleu représente la séquence *Ya*, le rectangle rouge la séquence *Yalpha*, les rectangles gris et noirs les séquences identiques partagées par les trois locus sexuels, la barre jaune le site Ho sauvage et la croix le site Ho muté (locus *Inc*) (pas à l'échelle). **B. Schéma de la sonde d'ADN utilisée et des tailles de fragments attendus.** Les régions du locus *MATalpha* sont représentées avec les sites de restriction et les tailles de fragments attendus (avec ou sans coupure ScHo). **C. Photographie par chimiluminescence du Southern-blot.** L'ADNg a été digéré par *PstI/XhoI* et hybridé avec une sonde correspondant à 484 pb d'une séquence localisée en amont du locus *MAT* et localisée à 725 pb du premier nucléotide du site Ho. L'ADNg digéré du puits « Non induit » correspond à l'ADNg extrait de la souche SL-CG8 portant le plasmide p7.1, cultivée en milieu SC-Rep sur une nuit entière et à partir de laquelle l'induction liquide utilisée pour le reste du Southern-blot a été réalisée. M : marqueur moléculaire, GeneRuler 1 kb (Thermo Fisher Scientific Inc).

Une bande correspondant au locus *HML* coupé est visible après 6 H d'induction de *ScHO* alors qu'une bande correspondant au locus *MAT* coupé est visible à seulement 2 H d'induction de *ScHO*, et ce dans les deux souches de contexte génétique différent (souches YL03-MATalpha et SL-CG8). Concernant le Southern-blot réalisé dans la souche SL-CG8, la coupure au locus *MAT* est visible jusqu'à 24 H d'induction et disparaît complètement à 48h d'induction. Toutefois, la bande correspondant au locus *MAT* intact ne disparaît pas avant 48 H d'induction de *ScHO*.

### **III.5 La communication entre les locus sexuels *HML*, *MAT* et *HMR* chez *C. glabrata* est complexe**

Cette partie de ma thèse concerne l'étude de la communication des locus *HML* et *HMR* entre eux-mêmes ainsi qu'avec le locus *MAT*. J'ai cherché à savoir quelle interaction (au cours de la RH) existe-t-il entre le locus *HML* et les locus *MAT* et *HMR* et entre le locus *HMR* et les locus *HML* et *MAT* ? J'ai démontré dans l'article « *A single Ho-induced double-strand break at the MAT locus is lethal in Candida glabrata* » que la CDB par *ScHo* aux locus *HML* et *HMR* n'était pas un contributeur important à la forte létalité observée à la suite de l'expression de *ScHO* dans une souche sauvage (Maroc et al., 2020). En effet, tant qu'une matrice de réparation inconvertible est présente dans la cellule, une CDB à *HML* ou *HMR* n'est pas fortement létale (Maroc et al., 2020). Etant donné que les locus *HML* et *HMR* ont besoin d'une matrice de réparation intacte pour être réparés, j'ai cherché à savoir si son utilisation dépendait de sa localisation. J'ai déjà montré dans l'article « *A single Ho-induced double-strand break at the MAT locus is lethal in Candida glabrata* » que le locus *HML* répare préférentiellement avec le locus *MAT* alors que le locus *HMR* répare préférentiellement avec le locus *HML* (Maroc et al., 2020). Toutefois, j'ai voulu savoir plus précisément, est-ce que le locus *HML* était capable de réparer correctement la CDB s'il n'y a qu'une seule matrice de réparation disponible au locus *HMR* et non *MAT* ? A l'inverse, est-ce que le locus *HMR* était capable de réparer correctement la CDB s'il n'y a qu'une seule matrice de réparation disponible au locus *MAT* et non *HML* ?

Dans ce but, j'ai construit des souches dans lesquelles le locus *HML* peut être coupé par ScHo en présence d'une seule matrice de réparation intacte localisée soit à *MAT* soit à *HMR* et *vice versa* (Souches SL-CG4 (*HMLalpha-inc Δmat HMRa*), SL-CG5 (*Δhml MAT-alpha-inc HMRa*), SL-CG6 (*HMLalpha Δmat HMRa-inc*) et SL-CG7 (*HMLalpha MATa-inc Δhmr*)). Les résultats de survie de ces souches à la suite de l'induction de *ScHO* sont présentés Figure 23 et l'analyse moléculaire des survivants est présentée Tableau 7.



**Figure 23. Survie à la suite de l'induction de *ScHO* de souches sauvages ou ne pouvant être coupées qu'à *HML* ou *HMR*.** Sur le gauche, un schéma des locus sexuels de chaque souche est montré avec la survie, à la suite de l'induction de *ScHO*, correspondante à droite. Le rectangle bleu représente la séquence *Ya*, le rectangle rouge la séquence *Yalpha*, les rectangles gris et noirs les séquences identiques partagées par les trois locus sexuels, la barre jaune le site *Ho* sauvage et la croix le site *Ho* muté (locus *Inc*) (pas à l'échelle). Le résultat de survie de la souche BG87 est tiré de (Boisnard et al., 2015) et les résultats de survie des souches SL0A et SL0B sont tirés de (Maroc et al., 2020). Les valeurs d'au moins quatre expériences ont été moyennées, le SEM a été utilisé afin d'estimer l'erreur et la P-value a été calculée en utilisant un test de Wilcoxon. \*\*: P-value<0.01. ns ou NS.: non significatif.

**Table 7. Structure moléculaire des locus *HML* et *HMR* à la suite de l'induction de *ScHO***

Souche	Locus criblé	Résultats de PCR des colonies survivantes	Résultats de PCR des sous clones	Pourcentage de changement de type sexuel
SL-CG6 ( <i>HMLalpha Δmat HMRa-inc</i> )	<i>HML</i>	65/81 mixtes <i>HMLalpha/a-inc</i> 16/81 pures <i>HMLa-inc</i>	42/60 <i>HMLa-inc</i> 18/60 <i>HMLalpha</i>	76 %
SL-CG7 ( <i>HMLalpha MATa-inc Δhmr</i> )	<i>HML</i>	30/43 mixtes <i>HMLalpha/a-inc</i> 13/43 pures <i>HMLa-inc</i>	13/16 <i>HMLalpha-inc</i> 3/16 <i>HMLalpha</i>	87 %
SL-CG4 ( <i>HMLalpha-inc Δmat HMRa</i> )	<i>HMR</i>	70/70 <i>HMRa/alpha-inc</i>	103/124 <i>HMRa</i> 18/124 <i>HMRalpha-inc</i> 3/124 <i>HMRa/alpha-inc</i>	15 %
SL-CG5 ( <i>Δhml MAT-alpha-inc HMRa</i> )	<i>HMR</i>	65/65 <i>HMRa/alpha-inc</i>	121/131 <i>HMRa</i> 9/131 <i>HMRalpha-inc</i> 1/131 <i>HMRa/alpha-inc</i>	7 %

Après l'induction de *ScHO* en milieu solide, les colonies survivantes sont criblées par PCR pour le locus sexuel qui peut être coupé par *ScHo*. Quand la PCR révèle des colonies mixtes, au moins quatre colonies sont sous-clonées afin d'obtenir le pourcentage de changement de type sexuel qui est calculé comme ceci : le ratio du nombre de colonies survivantes pures qui ont changé de type sexuel sur le nombre total de colonies criblées est additionné au ratio du nombre de colonies survivantes mixtes sur le nombre total de colonies criblées multiplié par le ratio du nombre de sous-clones purs sur le nombre total de sous-clones criblés. Un exemple pour l'analyse moléculaire de SL-CG6 est :  $16/81 + (65/81) \times (42/60) \times 100 = 76 \%$ .

### Etude à *HML*

Quelle que soit la localisation de la matrice intacte, la survie dans les souches SL-CG6 (*HMLalpha Δmat HMRa-inc*) et SL-CG7 (*HMLalpha MAT-alpha-inc Δhmr*) ne dépasse pas 0,2 % à la suite de l'induction de *ScHo* (Figure 23). Il semblerait donc que le locus *HML* ait besoin que les deux locus *MAT* et *HMR* soient présents dans la même cellule pour qu'il puisse être réparé. L'analyse moléculaire montre que les survivants ont majoritairement été coupés et réparés avec la matrice intacte présente dans la souche, *MAT* ou *HMR* (Tableau 7). Toutefois, lorsque la matrice est localisée à *HML*, deux fois plus de cellules ont changé de type sexuel.

## Etude à *HMR*

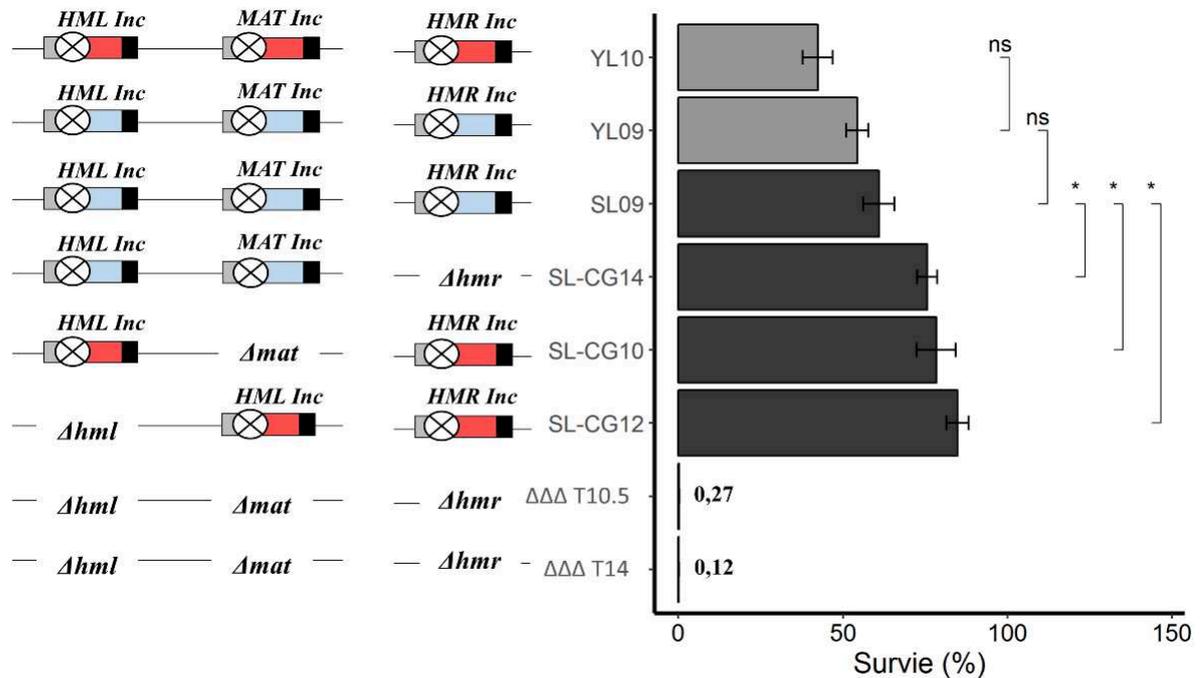
À la suite de l'induction de *ScHO*, seule la souche qui porte la matrice de réparation au locus *MAT* survit de manière considérable contrairement à la souche qui porte la matrice intacte au locus *HML* (Figure 23). Ceci semble être contradictoire avec les résultats obtenus dans la souche SLOB (*HMLa-inc MATalpha-inc HMRa*), pour lesquels le locus *HMR* répareit uniquement avec le locus *HML* (aucun survivant réparé avec *MAT* comme matrice n'avait été obtenu) (Maroc et al., 2020). De plus, quel que soit la localisation de la matrice, très peu de survivants ont changé de type sexuel (Tableau 7).

### III.3 Létalité liée à la présence de *ScHo* en dehors des coupures aux locus sexuels chez *C. glabrata*

Les résultats présentés dans les paragraphes [III.3.1](#) et [III.3.2](#) (à l'exception de celui concernant les souches  $\Delta\Delta\Delta$ ) sont publiés dans l'article « *A single Ho-induced double-strand break at the MAT locus is lethal in Candida glabrata* » (Maroc et al., 2020). Toutefois, j'ai voulu les rappeler pour une meilleure compréhension des résultats non publiés présentés dans le dernier sous-paragraphe.

### III.3.1 L'expression de *ScHO* chez *C. glabrata* est associée à une létalité non liée aux coupures aux locus sexuels

En utilisant le plasmide p7.1, l'expression de *ScHO* a été induite dans des souches inconvertisibles aux trois locus sexuels *HML*, *MAT* et *HMR*, de contexte génétique différent ou non et types sexuels identiques ou différentes (Figure 24).



**Figure 24. Survie à la suite de l'induction de *ScHO* de souches ne portant aucun site *Ho* sauvage et pouvant contenir une délétion d'un ou des trois *MTLs*.** Sur le gauche, un schéma des locus sexuels de chaque souche est montré avec la survie, à la suite de l'induction de *ScHO*, correspondante à droite. Le rectangle bleu représente la séquence *Ya*, le rectangle rouge la séquence *Yalpha*, les rectangles gris et noirs les séquences identiques partagées par les trois locus sexuels et la croix le site *Ho* muté (locus *Inc*) (pas à l'échelle). Sur l'histogramme, les barres noires sont pour les souches de contexte génétique BG14 et les barres grises pour les souches de contexte génétique HM100. A l'exception des résultats de survie des souches  $\Delta\Delta\Delta$ , les résultats de survie des souches sont tirés de (Maroc et al., 2020). Les valeurs d'au moins deux expériences ont été moyennées, le SEM a été utilisé afin d'estimer l'erreur et la P-value a été calculé en utilisant un test de Wilcoxon. \*: P-value < 0.05. ns : non significatif.

Lorsque les trois locus sexuels sont protégés de la coupure par la protéine Ho, la survie n'atteint jamais 100 % de survie mais au maximum 61 % pour la souche SL09 (*HMLa-inc MATa-inc HMRA-inc*) (Maroc et al., 2020). Quel que soit le contexte génétique (HM100 ou BG14) ou le type sexuel porté par les locus (« alpha-inc » ou « a-inc »), il n'y pas de différence significative de survie entre les souches triples inconvertibles YL10, YL09 et SL09 (Figure 24). Cela suggère une toxicité de ScHo en dehors de son rôle de coupure aux trois locus sexuels chez *C. glabrata*. Il est possible que la fixation de ScHo aux locus sexuels (même inconvertibles) entraîne une toxicité pour les cellules de *C. glabrata*. Même si les mutations introduites au site Ho des locus inconvertibles empêchent la protéine Ho de couper ces locus, il n'est pas impossible que la protéine Ho puisse toujours fixer ces locus.

Le résultat suivant n'a pas été publié. De manière surprenante, lorsque *ScHO* est induit dans une souche ne contenant aucun type sexuel (Souches  $\Delta\Delta\Delta$ ) et comparé à une souche triple inconvertible, la survie chute drastiquement jusqu'à ~0,5 %. Ce résultat a été obtenu dans les deux souches  $\Delta\Delta\Delta$ , souche  $\Delta\Delta\Delta$  T14 et souche  $\Delta\Delta\Delta$  T10.5, qui ont été construites à partir de souches parentales différentes et par des techniques de clonages différentes. De plus, elles ont été vérifiées par PCR, par séquençage aux locus délétés et par Southern-blot (Annexe I). L'ensemble de ces vérifications montrent que les trois locus sexuels sont bien délétés à leur site sauvage et qu'il n'existe pas de locus sexuel supplémentaire ailleurs dans le génome.

### **III.3.2 L'interaction entre les locus sexuels et la protéine Ho de *S. cerevisiae* semble toxique chez *C. glabrata***

Afin de tester l'hypothèse de la toxicité de la fixation de ScHo aux locus sexuels chez *C. glabrata*, la survie, à la suite de l'expression de *ScHO*, a été étudiée dans des souches dans lesquelles un des locus sexuels est délété et les deux restant étant inconvertibles (souches SL-CG14 ( $\Delta hml$  *MATalpha-inc HMRAalpha-inc*), SL-CG12 (*HMLalpha-inc*  $\Delta mat$  *HMRalpha-inc*) et SL-CG10 (*HMLa-inc MATa-inc*  $\Delta hmr$ )) (Figure 24). La délétion d'un locus sexuel, quel qu'il soit, *HML*, *MAT* ou *HMR*, augmente

significativement la survie des souches, comparé aux souches triple inconvertibles. Cela va donc dans le sens d'une toxicité de la fixation de ScHo aux locus sexuels chez *C. glabrata*. J'ai ensuite voulu étudier cette fixation directement par une expérience de CHIP-PCR qui permet notamment d'étudier la fixation de protéines fixées à l'ADN. Je n'ai pas eu le temps de réaliser cette expérience de CHIP, mais j'ai réalisé les expériences préliminaires nécessaires à sa réalisation.

### **III.3.3 Expériences préliminaires réalisées en vue d'étudier la fixation de ScHo aux locus sexuels sauvages ou inconvertibles chez *C. glabrata* par CHIP-PCR**

Une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine consiste à immunoprécipiter une protéine dont on aura préalablement fixé les liaisons à l'ADN, et à identifier l'ADN lié à cette protéine par PCR (CHIP-PCR), puce à ADN (CHIP-on-chip) ou séquençage (CHIP-seq). En vue de réaliser une expérience de CHIP-PCR sur la protéine ScHo chez *C. glabrata*, plusieurs expérimentations préliminaires ont été réalisées.

#### **Vérification que la protéine ScHo taguée GFP est fonctionnelle**

Lors d'un CHIP, la protéine liée à l'ADN est précipitée à l'aide d'un anticorps. A ce jour, il n'existe toujours pas d'anticorps dirigé contre la protéine ScHo ni contre n'importe quelle autre protéine Ho. Très peu d'études biochimiques ont été réalisées sur ScHo car sa purification est très difficile et seuls deux articles rapportent ce type d'étude (Jin et al., 1997; Kostriken and Heffron, 1984). J'ai donc choisi d'utiliser une protéine ScHo taguée avec la GFP (ScHo-GFP) qui peut être reconnue avec un anticorps dirigé contre la GFP. J'ai cherché à savoir si la protéine ScHo-GFP était fonctionnelle malgré la présence du tag GFP. J'ai choisi de réaliser ces expériences dans la souche HM100 (souche sauvage, *HMLalpha MATalpha HMRa*) afin d'étudier cette fixation dans un contexte sauvage ainsi que dans la souche YL05 (*HMLalpha MATa-inc HMRa-inc*) afin d'étudier cette fixation sur des locus sexuels sauvages et inconvertibles au sein d'une même souche donc au sein d'une même expérience. J'ai tout d'abord réalisé des

expériences d'induction de *ScHO-GFP* (codant ScHo-GFP) en milieu solide dans ces souches. Les résultats sont résumés Tableau 8.

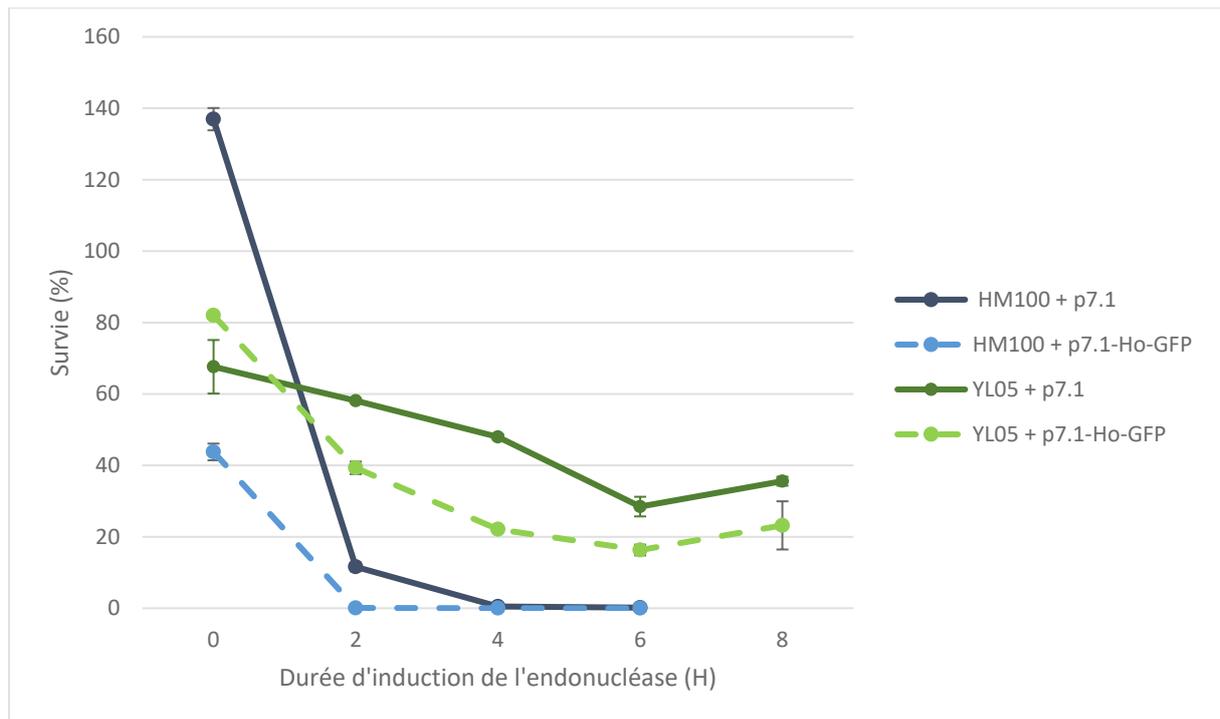
**Tableau 8. Survie et structure moléculaire des locus *MTLs* après induction de *ScHO* et *ScHO-GFP* dans la souche sauvage HM100 et YL05.**

Souche	Endonucléase	Survie (%)	Locus criblé	Résultats de PCR des colonies survivantes	Pourcentage de changement de type sexuel
HM100 ( <i>HMLalpha</i> <i>MATalpha</i> <i>HMRa</i> )	ScHo	0,013 ± 0,003	<i>HML</i>	25/34 <i>HMLalpha/a</i> 9/34 <i>HMLalpha</i>	74 ± 6 %
			<i>MAT</i>	26/34 <i>MATalpha/a</i> 8/34 <i>MATalpha</i>	76 ± 6 %
			<i>HMR</i>	30/34 <i>HMRa/alpha</i> 2/34 <i>HMRalpha</i> 2/34 <i>HMRa</i>	94 ± 6 %
	ScHo-GFP	0,001 ± 0,0003	<i>HML</i>	12/20 <i>HMLalpha</i> 8/20 <i>HMLalpha/a</i>	40 ± 4 %
			<i>MAT</i>	10/20 <i>MATalpha/a</i> 10/20 <i>MATalpha</i>	50 ± 4 %
			<i>HMR</i>	20/20 <i>HMRalpha/a</i>	100 ± 4 %
YL05 ( <i>HMLalpha</i> <i>MATalpha-inc</i> <i>HMRalpha-inc</i> )	ScHo	55 ± 7	<i>HML</i>	60/60 <i>HMLa-inc</i>	100 ± 8 %
	ScHo-GFP	0,11 ± 0,3	<i>HML</i>	NR	-

Pour le calcul de la survie cellulaire, les valeurs d'au moins quatre expériences (deux expériences pour YL05 avec ScHo-GFP) ont été moyennées et le SEM est utilisé pour estimer l'erreur. Les colonies survivantes à l'induction de *ScHO-GFP* ou *ScHO* sont criblées par PCR aux locus qui peuvent être coupés par ScHo(-GFP). Le pourcentage de changement de type sexuel est calculé comme le ratio du nombre total de colonies montrant un changement de type sexuel sur le nombre total de colonies suivantes criblées, exprimé en pourcentage. La racine carrée du nombre de colonies survivantes criblées est utilisée comme erreur standard dans la dernière colonne. Les résultats de survie et d'analyse moléculaire des souches HM100 et YL05 avec l'endonucléase ScHo sont issus de (Maroc et al., 2020). NR : non réalisé.

La protéine ScHo-GFP induit une létalité significativement supérieure à la protéine ScHo dans les deux souches HM100 et YL05 (HM100 + ScHo vs HM100 + ScHo-GFP P-value <  $10^{-2}$  et YL05 + ScHo vs YL05 + ScHo-GFP P-value < 0,05, tests Wilcoxon). La version taguée de ScHo est donc plus toxique que la version non taguée. Il est possible que si la fixation de ScHo est toxique pour les cellules de *C. glabrata*, comme énoncé précédemment, sa version taguée le soit encore plus, la protéine étant rendue plus affine pour le site de fixation par la présence de la GFP. L'analyse moléculaire des colonies survivantes à l'induction de *ScHO-GFP* montre que ScHo-GFP est capable d'induire le changement de type sexuel dans la souche HM100, même si son efficacité semble diminuée par rapport à la version de la protéine non taguée.

J'ai ensuite voulu déterminer au bout de combien de temps d'induction de *ScHO-GFP*, les cellules devaient être récoltées afin d'avoir un maximum de chances de détecter cette fixation par le CHIP. Pour cela, j'ai réalisé des cinétiques d'induction liquide de *ScHO* ainsi que de *ScHO-GFP* dans les souches HM100 et YL05 pour lesquelles j'ai déterminé la survie après différentes durées d'induction des gènes codant les endonucléases. Les résultats sont présentés Figure 25.



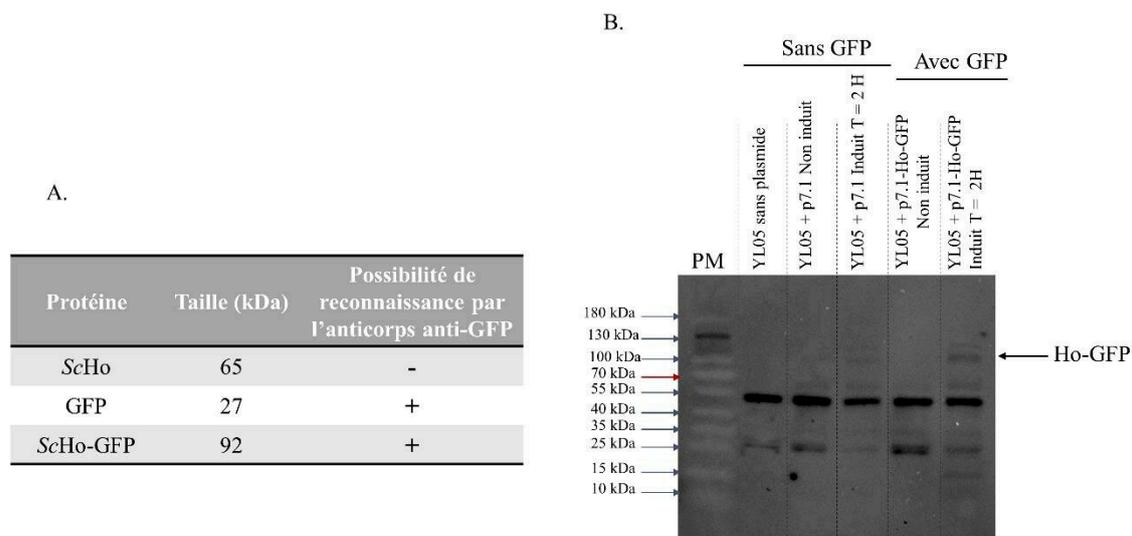
**Figure 25. Cinétique d'induction liquide de *ScHO* et *ScHO-GFP* dans les souches HM100 et YL05.** Les souches HM100 (courbes bleues) et YL05 (courbes vertes) ont été suivies durant une expérience de cinétique d'induction de *ScHO* (courbes au trait plein) ou de *ScHO-GFP* (courbes au trait pointillé) en milieu inducteur liquide. La survie est montrée sur l'axe Y et est calculée en divisant le nombre de colonies formées sur SC-Rep (CFU pour *Colony forming unit*) par le nombre théorique de cellule étalées sur SC-Rep, estimé par comptage. Cette survie est ensuite normalisée en la divisant par la survie de la souche contrôle, la souche transformée avec le plasmide pYR32, cultivée dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus avec la souche HM100 + p7.1 sont issus de (Maroc et al., 2020). Les valeurs d'au moins trois expériences pour la souche HM100 et deux expériences pour la souche YL05 ont été moyennés et le SEM a été utilisé afin d'estimer l'erreur.

Avec les cinétiques d'induction de coupure par *ScHo* présentées dans l'article « *A single Ho-induced double-strand break at the MAT locus is lethal in Candida glabrata* », ce sont les premières cinétiques d'induction de *ScHO* réalisées chez *C. glabrata*. Dès T = 2 H d'induction, la survie de la souche HM100 chute drastiquement à 11 % lorsque la souche exprime *ScHO* et chute encore plus brutalement à 0,08 % lorsque la souche exprime *ScHO-GFP*. De T = 4 H à T = 6 H la survie reste très basse à moins de 0,5 % et ce quel que soit le gène exprimé. La survie de la souche YL05 baisse lentement dès T

= 2 H d'induction et ce que jusqu'à 6 H, pour atteindre un minimum de 28 % lorsqu'elle exprime *ScHO* et 16 % lorsqu'elle exprime *ScHO-GFP*. Quel que soit le gène exprimé, la survie remonte ensuite à partir de T = 6 H. Ainsi, que ce soit pour la souche HM100 ou YL05, l'expression de *ScHO-GFP* permet bien une diminution de la survie qui semble plus importante que la diminution observée à la suite de l'expression de gène non tagué avec la GFP, *ScHO*.

### **Vérification que la protéine ScHo-GFP est reconnue par un anticorps anti-GFP**

J'ai vérifié que la protéine ScHo-GFP était bien reconnue par l'anticorps anti-GFP que j'allais utiliser dans l'expérience de CHIP-PCR. Pour cela, j'ai réalisé un western-blot anti GFP sur un extrait protéique de la souche YL05 qui a exprimé le gène codant ScHo-GFP pendant 2H et avec différents témoins. Les résultats sont présentés Figure 26.



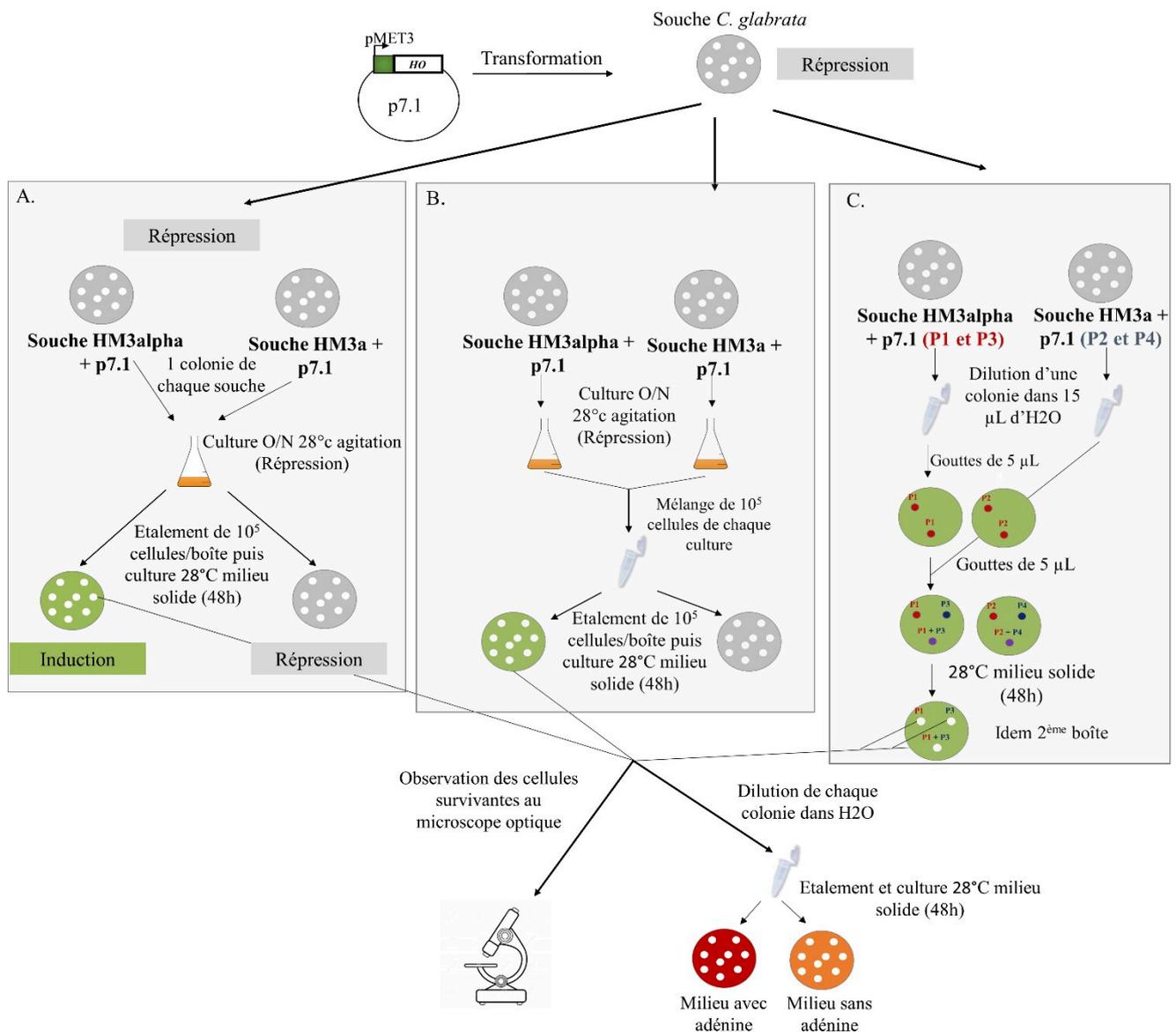
**Figure 26. Vérification par western-blot de la reconnaissance de la protéine ScHo-GFP par un anticorps anti-GFP. A. Tableau récapitulatif de la taille attendue des protéines ScHo, GFP et ScHo-GFP ainsi que leur possibilité de reconnaissance par l'anticorps anti GFP. B. Photographie par chimiluminescence du western-blot.** Les extraits protéiques des puits des souches « Non induit » correspondent à des extraits protéiques de souches portant le plasmide p7.1 ou p7.1-Ho-GFP, cultivées en milieu SC-Rep sur une nuit entière. Ces cultures ont été utilisées les lendemains pour les induction liquides dont sont issus les extraits protéiques « Induit T = 2 H ». PM : Poids moléculaire PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc).

Une bande correspondant environ à la taille attendue de la protéine ScHo-GFP est uniquement visualisable dans la souche exprimant le plasmide p7.1-Ho-GFP après T = 2 H d'induction (dernier puit). Cette même bande n'est pas visualisable dans la même souche portant le même plasmide mais cultivée en condition de répression. Il semblerait donc que la protéine ScHo-GFP soit bien reconnue par un anticorps anti-GFP.

### III.5 Recherche d'une reproduction sexuée chez *C. glabrata*

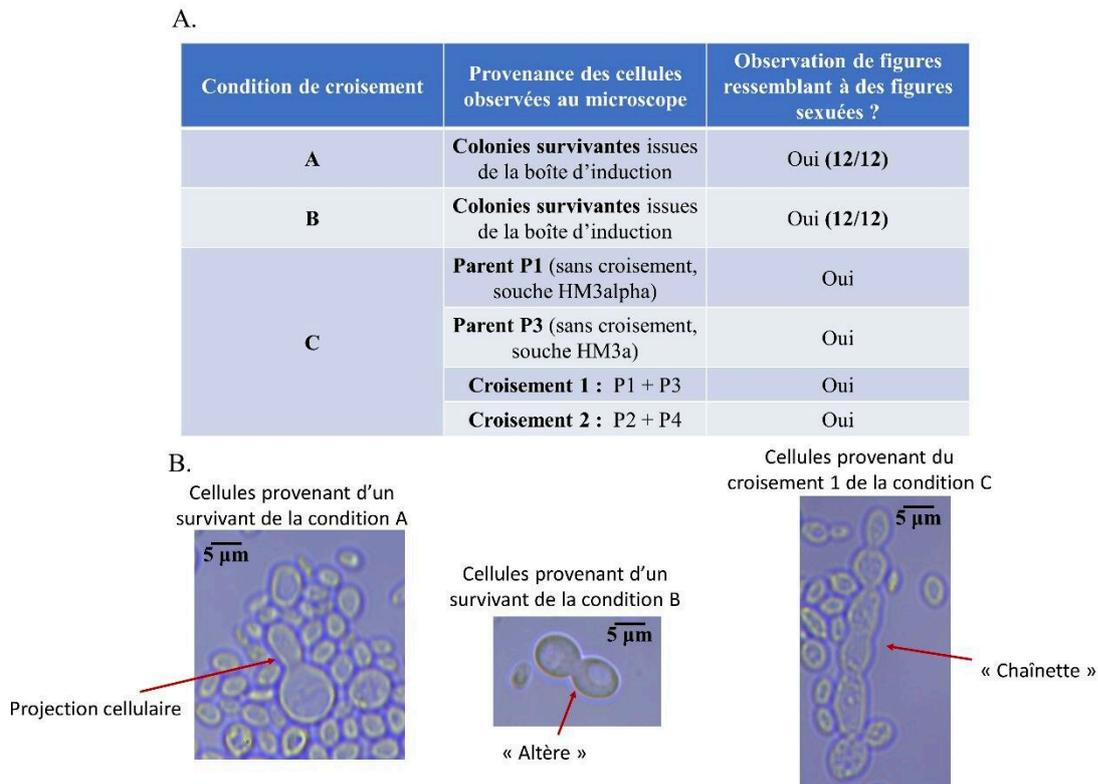
Alors que j'observais au microscope optique des cellules de la souche CGM498 ( $\Delta hml \Delta mat HMRa$ ) survivantes à l'induction de *ScHO*, j'ai pu observer plusieurs formes cellulaires qui ressemblaient à des figures sexuées de *S. cerevisiae*. Nous nous sommes

demandé si l'expression de *ScHO* pouvait induire la reproduction sexuée chez *C. glabrata*. Pour cela, j'ai réalisé des expériences préliminaires de tests de croisement sur milieu inducteur. Des souches HM3alpha *ade2*- et HM3a *ade1*- ont été construites par une mutation ponctuelle des locus *ADE2* et *ADE1* respectivement, par Youfang Zhou-Li, au laboratoire. Ces locus ont été choisis en raison de leur mutation qui donne un phénotype de colonie rouge. Il est ainsi facile, visuellement, de différencier les cellules parentales, de phénotype rouge, des cellules diploïdes et de certaines cellules recombinées (*ade1*+ *ade2*+), de phénotype blanc. Le schéma expérimental utilisé pour les tests de croisements utilisés est montré Figure 27.



**Figure 27. Plan d'expérimentations des tests de croisement chez *C. glabrata*.** Les souches utilisées, HM3alpha et HM3a, sont *ade2-* et *ade1-* respectivement. Il est à noter que les milieux inducteur (boîte verte) et répresseur (boîte grise) contiennent de l'adénine. Dans les conditions A, B et C, les points blancs représentent des colonies (quel que soit leur phénotype) sur boîte près 48H de croissance à 48°C. Dans la condition C, les points rouges, bleus et violets représentent des gouttes de 5 µL de cellules diluées dans de l'H<sub>2</sub>O. Plus particulièrement le point violet correspond à une goutte de P1 superposée à une goutte de P2 sur la boîte de gauche et à une goutte de P2 superposée à une goutte de P4 sur la boîte de droite. P1 : Parent 1, P2 : Parent 2, P3 : Parent 3, P4 : Parent 4.

Les cellules issues des différentes colonies (milieu inducteur ou répresseur, et parent isolé ou parents mélangés) ont été observées au microscope optique après 48H de croissance à 28°C sur milieu inducteur. Les résultats d'observation sont présentés Figure 28.



**Figure 28. Résultats d'observations des essais de croisement chez *C. glabrata*. (A)**

Les conditions de croisement A à C citées réfèrent à celles-décrites Figure 27. Dans les conditions A et B, les cellules issues de 12 colonies survivantes ont été observées au microscope optique au grossissement x1000. Dans la condition C, parent P1 et P3 correspondent à des cellules issues d'une goutte ne contenant qu'une seule souche, HM3alpha et HM3a respectivement, ayant donné une colonie. **(B)** Un type de figure cellulaire est montré par condition de croisement mais toutes ces figures (projection cellulaire, « altère » et « chaînette ») sont retrouvées dans toutes les conditions de croisement. Toutes les photographies sont issues d'observations faites au microscope optique au grossissement x1000.

Quelle que soit la condition de croisement et que les souches HM3alpha et HM3a aient été mélangées ensemble ou non, j'ai pu observer de nombreuses figures ressemblant à des figures de reproduction sexuée qui ressemblaient à des shmoos (projection cellulaire), ou des zygotes (forme « Altère »), ou encore des formes cellulaires anormales comme les « chaînettes ». Nous avons ensuite voulu savoir si nous pouvions isoler des cellules diploïdes, ou certaines cellules haploïdes recombinées (ade1+ ade2+), par leur phénotype qui devrait être prototrophe pour l'adénine (phénotype de colonie blanc). Pour cela, j'ai dilué et étalé (sous-clonage) des cellules issues des colonies survivantes des différents croisements sur différents milieux avec ou sans adénine. Les résultats sont résumés Tableau 9.

**Tableau 9. Récapitulatifs des résultats des tests de croisement chez *C. glabrata*.**

1 <sup>er</sup> essai					
Condition de croisement/Temps de culture à 28°C	Milieux				
	YPGlu	W0 + his + leu + met			
		+ ura		- ura	
	2 jours	2 jours	10 jours	2 jours	10 jours
<b>A</b>	NC [rouge]	0	1	0	0
<b>B</b>	NC [rouge]	0	0	0	0
<b>C (parents)</b>	NC [rouge]	0	0	0	0
<b>C (croisements)</b>	NC [rouge]	0	0	0	0
2 <sup>ème</sup> essai					
Condition de croisement/Temps de culture à 28°C	Milieux				
	SC-Ade		Sc-Ade -Ura		
	2 jours	6 jours	2 jours	6 jours	
<b>A</b>	0	0	0	0	
<b>B</b>	0	0	0	0	
<b>C (croisements)</b>	0	5	0	0	

Les conditions de croisement A, B et C sont détaillés Figure 27. Dans chaque condition, deux colonies survivantes ont été sous-clonées sur les différents milieux et les résultats ont été groupés dans ce tableau. Lors du premier essai et pour chaque colonie sous-clonée et issue des conditions de croisement A et B, 300 cellules ont été étalées sur milieu YPGlu et 2 000 cellules sur les autres milieux (W0 + his + leu + met + ura et W0 + his + leu + met - ura), pour chaque colonie sous-clonée issus des conditions de croisement C, 500 cellules ont été étalées sur milieu YPGlu et 5 000 cellules sur les autres milieux. Lors du deuxième essai et pour toutes les conditions, chaque colonie survivante choisie (deux par condition) a été diluée dans 200 µL d'H<sub>2</sub>O et 100 µL ont été étalés sur les deux milieux, SC-Ade et SC-Ade-Ura. NC : non compté. [rouge] : phénotype de colonie rouge.

Les six colonies obtenues (une après 10 jours de croissance dans le premier essai et cinq après six jours de croissance dans le deuxième essai) ont toutes été criblées aux locus sexuels par PCR. Par ce crible, j'ai tenté d'identifier des cellules diploïdes hétérozygotes et/ou des cellules recombinées pour les locus sexuels, en cas de croisement. Une colonie n'a pas répondu en PCR et les cinq autres n'ont uniquement répondu que pour le type sexuel alpha aux trois locus sexuels (Résultats non montrés). Il aurait été envisageable que *ScHO* puisse induire une fécondation entre HM3alpha, ce qui aurait concordé avec les résultats de PCR. Toutefois, étant donné le très faible nombre de colonies Ade+ obtenues, il semble plus probable que ces colonies soient issues de cellules révertantes de la souche parentale HM3alpha.

## IV. Discussion

Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai développé et construit le premier système CRISPR-Cas9 inductible chez *C. glabrata* permettant une édition efficace de son génome. Mes travaux ont également permis une meilleure caractérisation de la réparation des CDBs chez *C. glabrata*. J'ai aussi démontré, pour la première fois, que le changement de type sexuel peut être induit avec CRISPR-Cas9 et sans létalité chez cette espèce. Aussi, cette étude aura permis de mieux caractériser la létalité liée au changement de type sexuel chez *C. glabrata* ainsi que la létalité liée à l'expression de *ScHO* en dehors des coupures aux locus *MTLs* chez cette espèce. Finalement, ces travaux ont permis une meilleure compréhension de l'évolution du changement de type sexuel chez *C. glabrata*.

### **Un nouvel outil efficace d'édition du génome construit chez *C. glabrata* : un système CRISPR-Cas9 inductible**

Du fait de la proximité phylogénétique entre *C. glabrata* et *S. cerevisiae*, (Dujon *et al.*, 2004), certains outils moléculaires et constructions géniques peuvent être transférés de *S. cerevisiae* à *C. glabrata* tels des marqueurs de sélection comme *kanMX* (Wach *et al.*, 1994) et des « Autonomous Replication Sequences » (ARS) (Muller *et al.*, 2008). Toutefois, certains systèmes spécifiques à *C. glabrata* doivent être mis en place dans certains cas. En particulier, le développement d'outils efficaces d'édition des génomes est nécessaire afin de faciliter l'étude de cette levure. En effet, chez *C. glabrata*, en dehors du changement de type sexuel qui est un mécanisme très particulier, la RH est peu efficace, ce qui rend la construction génétique de mutants difficile. De plus, les études de la fonction des gènes sont également limitées par le fait que, comme énoncé lors de l'introduction, *C. glabrata* ne montre pas de cycle sexué. La méthode la plus efficace qui permet d'identifier les gènes essentiels chez *S. cerevisiae* repose sur la construction de mutants hétérozygotes dans une souche diploïde et la réalisation de l'analyse de tétrade de ce diploïde après sporulation. Cette

technique repose donc sur la reproduction sexuée et elle ne peut, par conséquent, être appliquée chez *C. glabrata*. Un outil puissant d'édition des génomes, encore peu développé chez *C. glabrata*, est le système CRISPR-Cas9 qui permet d'induire une CDB par Cas9 dans le génome à un endroit dicté par la complémentarité de séquence entre un locus ciblé et un ARNg. Au cours de ma thèse, j'ai développé et construit le premier système CRISPR-Cas9 inductible chez *C. glabrata* (Maroc and Fairhead, 2019). Ce système repose sur un plasmide unique autorépliquatif, avec le gène de sélection *URA3*, dans lequel le gène *cas9* de *S. pyogenes* est cloné sous contrôle du promoteur inductible *MET3* et dans lequel l'ARNg peut être cloné sous contrôle d'un promoteur constitutif. Comme énoncé précédemment, le promoteur *MET3* est activé en absence de méthionine et cystéine et il est réprimé en présence de forte concentration de ces deux acides aminés. L'avantage d'utiliser un marqueur d'auxotrophie et un promoteur inductible qui ne repose pas sur une drogue est que cela est non toxique pour les cellules et très peu cher contrairement aux gènes marqueurs conférant une résistance aux antibiotiques ou à d'autres composants toxiques (Pronk, 2002). Ce système inductible permet la sélection des transformants ayant reçu le plasmide CRISPR avant l'induction de la CDB et sa réparation, permettant ainsi la séparation de ces deux étapes. Il est ainsi possible de réaliser une analyse contrôlée de l'apparition des colonies avec une perte de fonction génique. Cela veut aussi dire que des collections de souches mutantes peuvent être gardées et stockées de manière stable. De plus, les cellules peuvent être curées du plasmide facilement, permettant au marqueur de sélection *URA3* d'être de nouveau utilisé pour de nouvelles expériences.

J'ai démontré que la coupure par Cas9 était efficace dans mon système et qu'il était possible de construire des mutants rapidement et efficacement par NHEJ en absence d'ADN donneur et par RH en présence d'une séquence homologue. Avec ce système CRISPR-Cas9 le remplacement d'un gène est très efficacement réalisé par RH à la suite de l'induction d'une CDB par Cas9. En effet, j'ai obtenu plus de 50 % de cellules ayant bien recombinaison au locus ciblé lorsque la même construction, avec 500 pb homologues de chaque côté du fragment d'ADN donneur, en absence d'une CDB, ne

mène qu'à un maximum de 3 % de cellules ayant bien recombinaison au locus ciblé dans mes expériences. Alors lorsque des expériences sont menées sur des gènes cibles qui ne confèrent pas un phénotype quantifiable lorsqu'ils sont mutés, comme *ADE2*, la transformation avec ce plasmide CRISPR-Cas9 ainsi que 2 µg d'ADN donneur devrait mener à un transformant sur deux de correct (transformant ayant intégré le fragment d'ADN donneur au locus ciblé). Etant donnée l'efficacité de ce système, l'absence de transformants corrects devrait être un meilleur indicateur pour l'essentialité d'un gène que l'absence de transformants corrects dans une expérimentation classique de remplacement ciblé de gène (sans CDB).

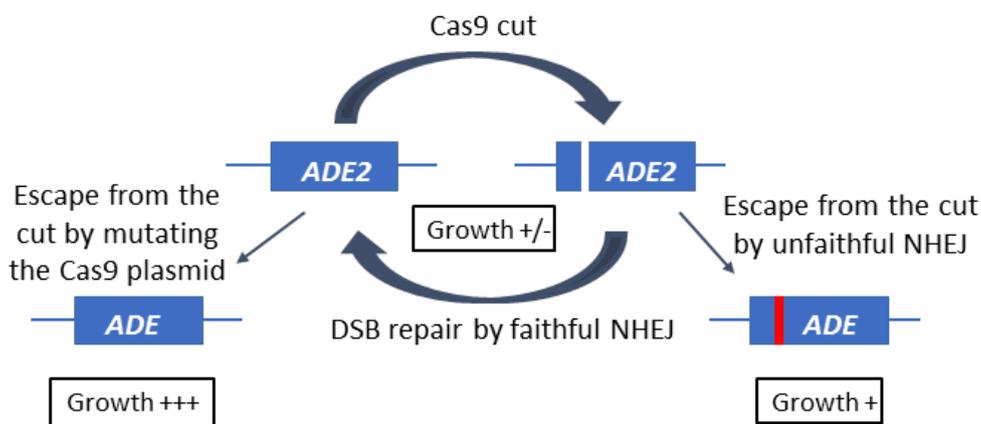
Pour conclure, ce système permet une édition facile et rapide du génome de *C. glabrata*. De plus, le protocole permet un meilleur contrôle de l'étape de CDB de telle façon qu'il peut être utilisé afin d'étudier la réparation de CDB de la même façon que cela a été fait chez *S. cerevisiae* (Lemos et al., 2018).

## **Une meilleure compréhension de la réparation des CDB chez *C. glabrata***

Comme énoncé lors de l'introduction, les CDBs font partie des lésions de l'ADN les plus dangereuses pour la cellule et doivent être réparées afin d'assurer le maintien de l'intégrité génomique et ainsi la viabilité cellulaire. Une CDB persistante peut causer la mort d'une cellule, au moins chez *S. cerevisiae* (Fairhead and Dujon, 1993; Moore and Haber, 1996; Yarrington et al., 2018). Très peu de recherches portent sur la réparation des CDBs chez *C. glabrata* (Cormack and Falkow, 1999; Richard et al., 2005; Corrigan et al., 2013; Cen et al., 2015; Enkler et al., 2016) mais il est couramment admis que *C. glabrata* est moins efficace que *S. cerevisiae* pour la RH. Par le développement du système CRISPR-Cas9 inducible ainsi que l'étude du changement de type sexuel, les travaux de ma thèse m'ont permis d'apporter une meilleure compréhension de la réparation des CDBs chez *C. glabrata*.

J'ai notamment utilisé mon système CRISPR-Cas9 inducible afin d'étudier la réparation de CDBs par NHEJ, en absence d'ADN donneur, en condition d'induction de

Cas9 en milieu liquide et solide (Maroc and Fairhead, 2019). J'ai ainsi pu montrer que, de manière étonnante, il n'y avait pas de létalité significative observable sur milieu solide après induction d'une CDB sans ADN donneur dans le gène *ADE2*. A l'inverse, lorsque la même coupure est induite lors d'une cinétique d'induction en milieu liquide, une très forte létalité de 95 % est observée après T = 2 H d'induction de *cas9*. Cette différence de survie entre milieu liquide et solide est surprenante mais pourrait résulter d'un mécanisme de NHEJ efficace et fidèle dans les cellules ainsi que de points de contrôle du cycle cellulaire qui ne seraient pas limitants et qui laisseraient les cellules se diviser au moins une fois malgré la présence d'une CDB persistante chez *C. glabrata*. En effet, même si nous n'avons pas trouvé dans la littérature une étude similaire chez *S. cerevisiae* où la survie est mesurée à la suite d'une coupure par Cas9 dans les mêmes conditions que les travaux que nous avons réalisés, l'induction de CDBs dans cette espèce, en milieu solide ou liquide et en absence d'homologie, mène à la mort des cellules. Ceci est vrai quelle que soit l'endonucléase utilisée, Ho, I-Sce I ou Cas9 (Fairhead and Dujon, 1993; Moore and Haber, 1996; Yarrington et al., 2018). La forte survie observée sur milieu solide chez *C. glabrata*, en absence d'ADN donneur, pourrait alors être due à un mécanisme de NHEJ plus efficace que chez *S. cerevisiae*, comme cela a déjà été décrit (Cormack and Falkow, 1999; Richard et al., 2005; Cen et al., 2015). Les colonies observées sur milieu solide, à la suite d'une coupure par Cas9 dans *ADE2*, ne sont pas pures rouges comme le seraient des colonies dont toutes les cellules seraient Ade2- mais sont sectorisées rouges et blanches. Cela veut dire que la plupart des événements de NHEJ doivent être fidèles pour recréer le gène *ADE2* de façon intacte et ainsi expliquer ces secteurs blancs parmi les rouges. Cela induirait ainsi un cycle futile de coupure/réparation fidèle pour lequel les cellules ne pourraient en sortir que par réparation de la CDB au locus *ADE2* par NHEJ infidèle ou par mutation du plasmide CRISPR-Cas9, comme c'est illustré Figure 29.



**Figure 29. Modèle pour la réparation de la CDB réalisée par Cas9 au locus *ADE2* chez *C. glabrata* (d'après (Maroc and Fairhead, 2019)).**

Au moins jusqu'à deux heures d'induction de cas9, les cellules de *C. glabrata* sont coincées dans un cycle futile de coupure/ligation fidèle qui empêche la division cellulaire. Après deux heures, certaines cellules échappent à ce cycle, soit NHEJ infidèle donc mutagénique au locus *ADE2* soit par mutation de plasmide Cas9.

Il est peu probable que les cellules échappent au cycle futile de coupure/réparation fidèle dès la première division cellulaire étant donné que : i) aucune colonie pure rouge n'est obtenue sur milieu inducteur solide, ii) la cinétique de coupure montre que 5 % des cellules survivent à la coupure par Cas9 à deux heures d'induction (sachant que le temps moyen de division cellulaire de *C. glabrata* est de ~30 min (Résultats non publiés), deux heures d'induction et donc de croissance correspondent à ~4 générations soit ~4 divisions cellulaires). Il pourrait être argumenté que 5 % des cellules ne subissent jamais la CDB et que les colonies observées sur boîtes (100 % de survie) résultent de celles-ci. Toutefois, afin d'obtenir une colonie survivante, une micro-colonie d'au moins :  $5\% \times A = 100\% \rightarrow A = 100/5 = 20$  cellules doit s'être développée avant que la CDB n'ait lieu or la cinétique de coupure montre que la plus haute létalité apparaît à deux heures d'induction soit à environ 16 cellules d'une colonie qui se développe. De plus, le fait que les colonies sectorisées soient obtenues sur boîtes

montrent que le plasmide CRISPR-Cas9 n'est pas muté dès le début de l'expérience. Par conséquent, nous privilégions l'hypothèse d'un NHEJ fidèle suivi de nouveau d'une coupure par Cas9 pour expliquer la différence de survie entre milieu inducteur solide et liquide. Ce cycle futile doit autoriser certaines cellules à se diviser, peut-être par des points de contrôle du cycle cellulaire moins limitants que chez *S. cerevisiae*, de telle façon que ces cellules échappent ensuite à d'éventuelles coupures ultérieures, par mutation du site de coupure à *ADE2* ou du plasmide CRISPR-Cas9. Sur milieu solide, cela autorise la formation de colonies et en milieu liquide, cela explique l'augmentation de la survie jusqu'à 73 % à T = 36 H, après le minimum observé à T = 2 H.

Le fait que l'on observe beaucoup moins de colonies rouges en étalant des cellules de l'induction liquide sur boîtes, même après 12 heures d'induction de *cas9*, qu'en étalant les cellules directement sur milieu solide inducteur peut être dû à une croissance plus lente des cellules Ade- que des cellules Ade+. Les cellules Ade+ qui échappent de façon définitive à la coupure par Cas9 peuvent alors envahir la culture liquide de façon que les cellules Ade- soient trop diluées pour être observées en grande quantité en les étalant sur boîtes.

Ainsi, j'ai montré par ces travaux que le NHEJ fidèle pouvait être un mécanisme de réparation des CDBs majeur chez *C. glabrata*, au moins au locus *ADE2* (Maroc and Fairhead, 2019).

Néanmoins, le NHEJ ne semble pas être le mécanisme de réparation majeur aux locus *HML* et *HMR* chez *C. glabrata*, même en absence de matrice de réparation, après une coupure par ScHo. La coupure par ScHo au locus *HML* et *HMR* en présence d'au moins une matrice de réparation intacte, par exemple au locus *MAT*, est réparée par RH (Maroc et al., 2020). Cela montre également que, pour la première fois, le locus *MAT* chez *C. glabrata* peut parfaitement servir de matrice de réparation aux deux locus, *HML* et *HMR*. Ceci n'est pas possible dans une souche sauvage de *S. cerevisiae* étant donné que le locus *MAT* est l'unique receveur de la CDB de la protéine Ho mais cela a également été observé, de façon rare, dans des souches mutantes de protéines Sir et

dans lesquelles le locus *MAT* avait été protégé de la coupure par mutation du site Ho (Haber et al., 1980). Le fait que les trois locus sexuels chez *C. glabrata* soient coupés par ScHo et réparés par RH en présence d'une matrice intacte m'a permis d'étudier si une préférence de matrice utilisée pour la réparation existait et ce à chaque locus sexuel. Chez *S. cerevisiae*, le mécanisme de préférence du donneur assure un changement de type sexuel à *MAT* en favorisant l'utilisation de la matrice de type sexuel opposé lors de la réparation (Wu and Haber, 1996). J'ai démontré que chez *C. glabrata*, quel que soit le type sexuel à *MAT*, *HML* était préférentiellement utilisé comme matrice de réparation. Ainsi, la préférence du donneur de *S. cerevisiae* n'est pas conservée chez *C. glabrata*. En son absence, cela veut aussi dire que la longueur des séquences d'homologies partagées par les locus n'influence par le choix d'utilisation de la matrice. En effet, les séquences Ya et Yalpha, déterminant le type sexuel, ne partagent pas d'homologie et j'ai pu observer que *MATa* contenant Ya, répare préférentiellement en utilisant *HMLalpha*, contenant Yalpha. J'ai également démontré que *HML* utilisait préférentiellement *MAT* et que *HMR* est préférentiellement réparé en utilisant *HML*, révélant ainsi une interaction complexe entre ces trois locus. Le fait qu'il n'y ait pas de préférence du donneur à *MAT* et que la protéine Ho endogène de *C. glabrata* ne réussisse pas à induire un changement de type sexuel efficace (Boisnard et al., 2015) suggère une possible dégénérescence du système de changement de type sexuel chez *C. glabrata*. Alors les règles de réparation des CDBs par RH observées lors de mes inductions de *ScHO* peuvent refléter les vraies préférences de réparation, indépendamment du système de changement de type sexuel *MAT*/Ho. Lorsqu'une CDB peut être réparée par RH en utilisant une matrice sur le même chromosome ou sur un autre chromosome, la copie intra-chromosomique sera le plus souvent choisie par rapport à l'autre (*HML* répare préférentiellement avec *MAT* et *vice versa*). Lorsque la CDB ne peut seulement être réparée par une matrice extra-chromosomique, *HMR* qui est sub-télomérique répare préférentiellement en utilisant la matrice sub-télomérique *HML*. On peut donc supposer que la HR utilisant une matrice sur le même chromosome

est préférée pour réparer une CDB et qu'en absence d'une telle matrice, les locus sub-télomériques réparent avec d'autres locus sub-télomériques.

Toutefois, la communication entre le locus *HML* ou *HMR* avec le locus *MAT* et le locus *HMR* ou *HML* semble encore plus complexe que présenté au-dessus. En effet, j'ai démontré que lorsqu'une CDB par ScHo est induite à *HML* en présence d'une seule matrice de réparation, et peu importe que la matrice soit localisée à *MAT* ou à *HMR*, cela est fortement létale pour les cellules de *C. glabrata* alors que cela n'est pas le cas lorsque deux matrices de réparation à *MAT* et *HMR* sont présentes (Maroc et al., 2020). Il semblerait donc que le locus *HML* ait besoin que les deux locus *MAT* et *HMR* soient présents afin qu'il puisse réparer correctement la CDB par RH. Toutefois, le changement de type sexuel est deux fois plus efficace si la matrice de réparation est localisée à *MAT* plutôt qu'à *HMR*, ce qui concorde avec les résultats précédents qui démontraient que *HML* réparait préférentiellement avec *MAT* (Maroc et al., 2020). A l'inverse, lorsqu'une coupure par ScHo est induite à *HMR* en présence d'une seule matrice de réparation, seule la souche qui porte la matrice à *MAT* survit considérablement (~60 %) contrairement à la souche qui porte la matrice de réparation à *HML* (Maroc et al., 2020). Etant donné qu'il n'y a aucune raison pour que ScHo ne coupe pas aussi efficacement dans la deuxième souche que dans la première, il semblerait donc que *HMR* ne puisse pas réparer la CDB par ScHo si le locus *MAT* n'est pas présent dans la cellule. Ceci est en contradiction avec le fait que j'ai précédemment démontré que lorsque le locus *HMR* a la choix pour la matrice de réparation à utiliser, il ne répare qu'exclusivement avec *HML*.

Enfin, chez *C. glabrata*, lorsque les deux locus *HML* et *HMR* sont coupés par ScHo en absence de matrice de réparation intacte, la survie chute drastiquement à ~0,1 % (Maroc et al., 2020). Cela suggère que les locus *HML* et *HMR* ne peuvent être réparés en absence de matrice intacte pour la RH. Par conséquent, aucun autre mécanisme de réparation, comme par exemple le NHEJ, n'agit sur ces locus. Toutefois, mes expériences préliminaires semblent montrer qu'une CDB par Cas9 au locus *HMR* en

absence de matrice de réparation n'est pas fortement létale contrairement à une CDB par ScHo dans les mêmes conditions. Si ces résultats se confirment et que la coupure par Cas9 est vérifiée au locus *HMRa*, cela suggérerait fortement que la coupure par Cas9 à *HMR* est réparée par NHEJ et que cette réparation est empêchée par la protéine ScHo lorsque celle-ci réalise la cassure.

Ainsi, la régulation de ces mécanismes complexes de réparation reste donc incomprise pour l'instant.

## **Le changement de type sexuel peut être induit par CRISPR-Cas9 chez *C. glabrata* et sans létalité**

Jusqu'à présent, il avait seulement été démontré par le laboratoire que le changement de type sexuel pouvait être induit, chez *C. glabrata*, par l'expression de *ScHO* (Boisnard et al., 2015). Au cours de ma thèse, j'ai démontré, pour la première fois, que le changement de type sexuel pouvait être induit chez *C. glabrata* de manière efficace et indépendamment de la protéine Ho, par le système CRISPR-Cas9. Cela a seulement été démontré récemment chez l'espèce modèle *S. cerevisiae* (Xie et al., 2018). De plus, ce changement de type sexuel n'est pas fortement létal contrairement à celui induit par ScHo et c'est donc également la première fois qu'il est possible d'induire le changement de type sexuel chez *C. glabrata* sans mort cellulaire importante. Aucune létalité n'est observée après une induction d'une CDB par Cas9 à *MAT* sur milieu inducteur solide. Il n'y a donc pas de problème de réparation d'une CDB, *per se*, au locus *MAT* chez *C. glabrata*. Dans les expériences d'induction liquide, une létalité transitoire de ~35 % et un changement de type sexuel moins efficace, d'environ ~30 %, sont observés. Dans les deux types d'induction, solide et liquide, le plasmide d'expression CRISPR-Cas9 est sous pression de sélection. Il est possible que ces différences observées soient dues à une induction moins efficace sur des cellules individuelles en milieu liquide que sur boîte, en supposant que les cellules en milieu liquide peuvent muter le plasmide avant d'avoir changé de type sexuel (en mutant le

gène *cas9* ou son promoteur de telle façon que *cas9* ne soit plus exprimé, ou en mutant la séquence codant l'ARNg). Cela implique également que ces cellules, du fait de ne plus exprimer *cas9* et/ou ne subissant plus de CDBs, croient plus vite que les autres cellules. Ces cellules mutées pour le plasmide ne changeraient donc jamais de type sexuel et pourraient envahir la culture. A l'inverse, certaines cellules subissant un changement de type sexuel pourraient ne pas s'en sortir (~20 % de létalité) mais celles qui survivent deviennent immunisées contre la CDB par Cas9, réduisant ainsi la nécessité de muter le plasmide CRISPR-Cas9. Toutefois, ces cellules, exprimant toujours *cas9*, pourraient croître moins rapidement que les autres et auraient ainsi moins de chance d'être en excès dans la culture. De cette façon, les cellules qui ont changé de type sexuel sont diluées et moins représentées sur boîtes après étalement de cellules de la culture liquide.

### **La CDB au locus *MAT* chez *C. glabrata* n'est létale que lorsqu'elle est réalisée par ScHo**

En mimant la situation de *S. cerevisiae*, à savoir une coupure au locus *MAT* en présence de deux matrices de réparation à *HML* et *HMR*, nous avons démontré qu'il suffit d'une seule CDB par ScHo au locus *MAT* pour entraîner une très forte létalité chez *C. glabrata*, similaire à celle d'une souche sauvage (Maroc et al., 2020). Cela démontre également que la létalité n'est pas due à des cycles sans fin de coupure et réparation. En effet, si c'était la raison de la forte létalité à la suite d'une CDB à *MAT*, comme réparé avec un locus inconvertible (*Inc*) mène à un locus *MAT* qui ne peut plus changer de type sexuel, la létalité à la suite d'une CDB à *MAT* devrait décroître dans cette souche par rapport à une souche sauvage. Cela veut dire que même en présence de deux matrices de réparation intactes, le locus *MAT* est incapable de réparer la coupure. Comme énoncé dans le sous-chapitre précédent, une coupure à *MAT* par Cas9 ne mène pas à une forte létalité. A moins que cette différence de létalité ne soit due au décalage de 14 pb entre les deux coupures des endonucléases ScHo et Cas9, ce qui semble peu probable, cela suggère fortement que la très forte létalité observée à la suite d'une

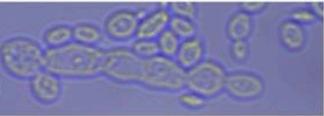
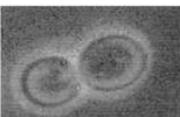
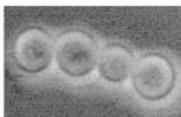
CDB à *MAT* est spécifique de *ScHo*. Ainsi, la protéine *ScHo* empêcherait le locus *MAT* de réparer la CDB, de telle sorte que 99,9 % des cellules meurent. Le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse a récemment publié que des souches hétérothalliques de *N. delphensis* surexprimant *ScHO*, exactement dans les mêmes conditions que chez *C. glabrata* avec le même plasmide, ne mourraient pas (Li et al.). Il est alors surprenant que *ScHo* puisse avoir un effet délétère qui soit spécifique d'un locus, *MAT*, et d'une espèce, *C. glabrata*. Comme dans les systèmes de changement de type sexuel à trois locus sexuels, les trois locus *MTLs* de *C. glabrata* partagent des séquences identiques et ne diffèrent que par le type sexuel porté soit la séquence *Ya* ou *Yalpha* et/ou leur localisation dans le génome (Muller H, Hennequin C, Dujon B, Fairhead C., 2007). Le type sexuel porté par *MAT* n'influence pas la létalité puisque une coupure à *MAT* dans la souche HM100 (*MATalpha*) ou BG87 (*MATa*) mène à une très forte létalité quel que soit la souche (Boisnard et al., 2015). Par conséquent, seule la localisation de *MAT* peut expliquer la spécificité de la létalité induite *ScHo*. Le locus *MAT* est localisé dans une région centrale du chromosome B alors que *HML* et *HMR* sont positionnés dans des régions sub-télomériques des chromosomes B et E, respectivement (Muller H, Hennequin C, Dujon B, Fairhead C., 2007). Ainsi, la spécificité de *ScHo* pour *MAT* ne peut s'expliquer que par la structure de la chromatine ou par les régions entourant le locus *MAT*. Si la protéine *ScHo* provoque une létalité en empêchant la réparation au locus *MAT*, c'est peut-être parce que cette endonucléase reste collée à *MAT*, après avoir réalisé la CDB, et empêche ainsi le recrutement des protéines de recombinaison et par conséquent la réparation.

Même si je n'ai pas pu déterminer avec précision la cause de la létalité induite par la coupure spécifiquement faite par *ScHo* au locus *MAT*, j'ai pu mieux caractériser celle-ci.

J'ai démontré que celle-ci n'était pas due à la localisation du locus *HMR* sur un autre chromosome et que l'arrêt cellulaire menant à celle-ci était irréversible et précoce. Par les expériences préliminaires de micromanipulation, j'ai pu démontrer que la plupart des cellules induites par *ScHO* s'arrêtaient au cours de leur division cellulaire à 12

cellules soit seulement après ~3-4 générations. Ce résultat correspond parfaitement au résultat de cinétique d'induction liquide de *ScHO* qui montre que la très grosse majorité des cellules ne survivent pas à la CDB dès 2H d'induction de *ScHO* soit après ~4 générations.

J'ai également démontré que l'expression de *ScHO* mène à un phénotype de morphologie cellulaire anormale. Ces formes cellulaires ressemblent fortement aux formes observées chez des cellules de double mutants *lyt1-cdc15* chez *S. cerevisiae* (Figure 30).

Espèce	Contexte d'observation	Formes cellulaires observées		
<i>C. glabrata</i>	Souches HM3alpha et HM3a induites avec <i>ScHO</i>			
<i>S. cerevisiae</i>	Mutants <i>lyt1-cdc15</i> après culture à la température restrictive			

**Figure 30. Comparaison de formes cellulaires similaires entre *C. glabrata* induite par *ScHO* et *S. cerevisiae* muté pour *LYT1* et *CDC15*.** Les photographies de *C. glabrata* sont issues des observations microscopiques des essais de croisement chez *C. glabrata* (microscope optique, grossissement x1000) dont certaines proviennent de la Figure 28. Les photographies de *S. cerevisiae* sont issues de (Jiménez et al., 1998).

Chez *S. cerevisiae*, le gène *LYT1* est un gène essentiel, notamment impliqué dans la morphogénèse de la cellule, dont la mutation entraîne une lyse des cellules. Le gène *CDC15* code la protéine kinase Cdc15 nécessaire à la réalisation de la phase M du cycle cellulaire. Toujours chez *S. cerevisiae*, il a été démontré que *CDC15* était un suppresseur de *LYT1* permettant de lever l'arrêt du cycle cellulaire imposés par la mutation seule de *LYT1* mais que cela conduit à des cellules de morphologies anormales (Jiménez et al., 1998), montrées Figure 30. Pour revenir à *C. glabrata*, il est ainsi possible que les formes

cellulaires observées à la suite de l'expression de *ScHO* soient des cellules en train de mourir (on sait que *ScHo* induit une létalité de 99,99% dans des souches sauvages) mais qui peuvent encore faire des divisions cellulaires grâce à des points de contrôle du cycle cellulaire moins restrictifs que chez *S. cerevisiae*. Cela concorderait avec notre hypothèse énoncée plus haut concernant les résultats d'induction de *cas9* et qui est que certaines cellules de *C. glabrata* portant une CDB peuvent quand même se diviser en raison de points de contrôle du cycle cellulaire moins restrictifs chez *C. glabrata* que chez *S. cerevisiae*.

Chez *S. cerevisiae*, il est possible de suivre le sort des coupures réparables et non réparables à *MAT* et réalisées par *ScHo* par une analyse de Southern-blot d'une cinétique d'induction sur des souches sauvages surexprimant *ScHO* (White and Haber, 1990) (Aylon et al., 2003). Jusqu'à présent, la coupure par *ScHo* chez *C. glabrata* n'avait été étudiée qu'indirectement par observation de la létalité ou du changement de type sexuel résultant de celle-ci. Au cours de ma thèse, et pour la première fois, j'ai directement mis en évidence la CDB réalisée par *ScHo* à *HML* et *MAT* chez *C. glabrata* par Southern-blot d'une cinétique de coupure. Ainsi, j'ai pu démontrer que le locus *MAT* était coupé par *ScHo* dès deux heures d'induction du gène codant cette endonucléase et ce au moins jusqu'à 24 H d'induction. Cette coupure a été démontrée aux locus *MAT* des deux type sexuels, *MATalpha* et *MATa*, et dans des souches des deux contextes génétiques avec lesquels j'ai travaillé au cours de ma thèse, CBS138 et BG2. Il est intéressant de relever que, au moins pour la souche SL-CG8 (*HMLalpha-inc MATa Δhmr*) la bande correspondant au locus *MATa* intact persiste elle aussi jusqu'à 24 H d'induction de *ScHO*. Ce résultat est en contradiction avec le Southern-blot de cinétique de coupure de *ScHo* dans la souche sauvage HM100 (*HMLalpha MATalpha HMRA*) pour lequel on peut observer une disparition de la bande correspondant au locus *MATalpha* intact dès deux heures d'induction. De plus, la cinétique liquide d'induction de *ScHO* dans la souche SL-CG8, utilisée pour le Southern-blot, montre que la survie chute brutalement à ~6 % à T = 2 H d'induction et même jusqu'à 0,87 % à T = 4 H d'induction, suggérant une forte efficacité de la coupure par *ScHo* à *MAT* (Annexe

II). Il est possible que l'ADN du peu de cellules ne subissant pas la CDB par ScHo soit plus facile à hybrider et donc soit plus facilement visualisable, notamment dans la souche SL-CG8. A l'inverse, l'ADN des cellules subissant cette cassure peut être dégradé empêchant la sonde de s'hybrider, rendant la CDB difficile à mettre en évidence lors de Southern-blot. La coupure par ScHo à *HML* est quant à elle visible à T = 6 H d'induction de *ScHO* dans la souche YL05 (*HMLalpha MATa-inc HMRA-inc*). Ainsi, le locus *HML* est coupé plus tardivement que le locus *MAT* (à 6 H et 2 H d'induction, respectivement). Ceci ne semble pas jouer sur l'efficacité du changement de type sexuel à ces deux locus car nous savons que, quel que soit la souche et donc le locus coupé, *HML* ou *MAT*, YL05 ou SL-CG8, 100 % des survivants de ces souches, après induction de *ScHO* sur milieu solide, montrent un changement de type sexuel (Maroc et al., 2020). La bande observée correspondant au locus intact *HMLalpha* de la souche YL05 persiste jusqu'à 6 H d'induction. Il est attendu que celle-ci finisse par disparaître puisque sur milieu solide inducteur, comme énoncé ci-dessus 100 % des survivants de la souche YL05, après induction de *ScHO*, montrent un changement de type sexuel (Maroc et al., 2020), suggérant que 100 % de ces survivants sont coupés par ScHo. Il sera intéressant de confirmer cela en réalisant de nouveau ce Southern-blot de cinétique d'induction de coupure par ScHo à *HML* sur un temps plus long.

Dans une souche sauvage HM100, je n'ai pas réussi à mettre en évidence la CDB aux trois locus sexuels *HML*, *MAT* et *HMR*. Dans la souche sauvage, deux problèmes peuvent se combiner à la suite de l'expression de *ScHO*, la létalité liée à la coupure par ScHo à *MAT* et des coupures simultanées aux trois locus sexuels entraînant une absence de matrice de réparation. Comme énoncé dans le chapitre [Résultats](#), il est possible que puisque quasiment aucun des locus sexuels ne peut réparer la CDB (la survie étant inférieure à 0,1 %), la résection continue dégrade les extrémités des brins d'ADN de la CDB de telle façon que la sonde ADN utilisée pour le Southern-blot ne puisse plus s'hybrider. En effet, chez *S. cerevisiae*, les extrémités de CDB réalisées par ScHo qui ne peuvent pas être réparées subissent la dégradation plus forte que les extrémités d'une CDB qui peut être réparée (White and Haber, 1990). Dans le premier Southern-blot que

j'ai réalisé sur la souche sauvage HM100, j'ai utilisé pour *HML* et *MAT* une sonde qui s'hybridait à une séquence en amont de ces locus alors que pour le locus *HMR*, j'ai utilisé une sonde qui s'hybride en aval de ce locus. Pourtant, quel que soit le locus étudié, aucune bande correspondant au locus coupé n'est visualisable. Ceci suggère que la forte dégradation des extrémités des CDBs par ScHo aux trois locus sexuels se fait dans les deux sens, de 5'→3' et de 3'→5'.

## **La fixation de ScHo aux locus sexuels chez *C. glabrata* semble être toxique**

En dehors de son rôle de coupures à *MAT* qui sont fortement létales, ScHo induit une autre toxicité chez *C. glabrata*. Des souches qui sont inconvertibles aux trois *MTLs* montrent une survie d'au plus 61 %, après expression de *ScHO*, et la létalité est fortement réduite par la délétion totale d'un *MTL*, quelle que soit sa position, *HML*, *MAT* ou *HMR*. Ainsi, la différence entre ces souches est le nombre de locus inconvertibles et donc de site Ho *Inc* présent aux locus *MTLs*. Une explication pour expliquer ce phénomène est que la protéine ScHo se fixe sur les sites Ho *Inc* et reste fixée, de telle façon que ce soit toxique pour les cellules de *C. glabrata*. ScHo a probablement une forte affinité pour les sites Ho de *C. glabrata* étant donné que cette endonucléase est capable de les couper rapidement et efficacement. Dans le cas des sites Ho *Inc*, ScHo pourrait rester fixée car le substrat n'est pas transformé en produit. En effet, nous avons émis l'hypothèse que la coupure relâche l'endonucléase et que comme supposé dans le sous-chapitre ci-dessus, cela est empêché à *MAT*, même après sa coupure, possiblement en raison de la structure de la chromatine. Sur le site Ho *Inc*, la fixation de ScHo n'induit pas de mort cellulaire massive mais pourrait, par exemple, bloquer la fourche de réplication et ainsi interrompre la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Afin d'explorer cet aspect, je devais réaliser un ChIP-PCR sur ScHo afin d'étudier la fixation de cette protéine aux *MTLs* chez *C. glabrata* mais faute de temps, je n'ai pas pu le réaliser. Toutefois, j'ai pu réaliser les expériences préliminaires

indispensables à sa réalisation. Aucun anticorps n'existant à ce jour contre ScHo, il fallait que j'utilise une protéine ScHo taguée et tag pour lequel il existait un anticorps dirigé contre. J'avais choisi d'utiliser une ScHo taguée avec la GFP car cette version taguée était déjà clonée, au laboratoire, dans le même plasmide que j'utilisais dans toutes mes expériences d'induction de *ScHO*. J'ai démontré que la protéine ScHo-GFP était capable d'induire le changement de type sexuel et qu'elle induisait même une létalité légèrement supérieure à celle induite par ScHo. Il est possible que du fait de son tag, la protéine ScHo-GFP ne se détache pas du site Ho après sa fixation et/ou sa coupure et que cela empêche la cellule de se répliquer, par exemple. Toutefois, cela ne devrait pas avoir d'influence sur la qualité du CHIP-PCR. Afin d'avoir un maximum de chance d'observer la fixation de ScHo-GFP aux locus *MTLs*, il faudrait prélever les cellules induites à un temps d'induction auquel la protéine ScHo-GFP est en pleine action. Lors de la cinétique d'induction liquide de ScHo-GFP dans la souche HM100, j'ai pu déterminer que le maximum de létalité était atteint à T = 4 H d'induction de *ScHO* (les létalités de 99,90 % et 99,92 % observées à T= 4 H et T = 6 H, respectivement, n'étant pas significativement différentes). Ceci signifie que ScHo-GFP agit en majorité entre T = 0 et T = 4 H donc j'avais choisi de récolter les cellules induites à T = 1 H et T = 2 H afin de réaliser le CHIP-PCR. J'ai ensuite démontré, par western-blot, que la protéine ScHo-GFP était bien reconnue par un anticorps anti-GFP et ce d'un extrait protéique provenant de cellules récoltées à T = 2 H d'induction de *ScHO-GFP*.

Pour revenir à la létalité induite par ScHo, en dehors de son rôle de coupure aux *MTLs*, un résultat surprenant est celui de la létalité de 99,5 % observée à la suite de l'expression de *ScHO* dans une souche  $\Delta\Delta\Delta$ . Ce résultat a été observé dans deux souches  $\Delta\Delta\Delta$  issues de transformations de délétion indépendantes. Il est en contradiction avec l'hypothèse émise ci-dessus car si la létalité résiduelle entraînée par l'expression de *ScHO* était due à la fixation de ScHo aux sites Ho des *MTLs*, celle-ci devrait totalement disparaître dans une souche ne contenant plus aucun *MTL*. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène :

- Il peut exister au moins un site Ho, en dehors des *MTLs*, dans le génome de *C. glabrata* dont la coupure n'entraîne pas de forte létalité tant qu'il y avait au moins une matrice de réparation présente dans la cellule, à savoir au moins un *MTL*. Toutefois, par une analyse *in silico*, aucun site Ho n'avait été trouvé dans le génome de *C. glabrata*, même s'il est vrai que des sites Ho plus dégénérés puissent exister. De plus, cette hypothèse de site Ho supplémentaire semble peu plausible étant donné que pour pouvoir utiliser un *MTL* comme matrice de réparation, il faudrait que ce site Ho supplémentaire soit entouré des deux côtés par des séquences identiques au *MTL* servant de matrice. Or j'ai réalisé un Southern-blot sur les deux souches  $\Delta\Delta\Delta$  en utilisant comme sonde ADN une séquence correspondant à une partie de Yalpha et une autre sonde ADN correspondant à une partie de Ya, la région Y juxtaposant tout de suite le site Ho des *MTLs*, en aval de celui-ci, et aucune bande n'a été révélée avec ces sondes (Annexe I).

- Il est possible que les protéines Alpha1 et Alpha2 ou a1 soient nécessaires pour contrer une action toxique de ScHo dans les cellules de *C. glabrata*, et que ces protéines peuvent être produites à partir des locus *HML* et *HMR*. Il a déjà été démontré que dans une souche sauvage de *C. glabrata*, le locus *HMR* était transcriptionnellement actif (Muller et al., 2008).

## **Le changement de type sexuel semble être en train de dégénérer chez *C. glabrata***

Afin de replacer mes résultats dans une perspective évolutive et explorer le lien qui existe entre changement de type sexuel et reproductions sexuée, nous pouvons regarder le clade des *Nakaseomyces*. Comme énoncé lors de l'introduction, ce groupe contient *C. glabrata*, deux autres pathogènes opportunistes, *C. nivariensis* et *C. bracarensis* et trois espèces environnementales *N. delphensis*, *C. castelli*, *N. bacillisporus*. Il contient ainsi des espèces qui montrent des cycles de vie différents : tous les *Candida* sont décrits comme asexués et haploïdes et dans les deux espèces sexuées, *N. delphensis* est haploïde lorsque *N. bacillisporus* est diploïde (Gabaldón et

al., 2013). *N. delphensis* montre un changement de type sexuel spontané et efficace, induit par Ho, tout comme *S. cerevisiae* (Li et al.). Il est remarquable qu'aucune des espèces asexuées ne montre de changement de type sexuel, ce qui, de ce fait, renforce la notion qui est que le changement de type sexuel est un mécanisme qui favorise la reproduction sexuée. Il est ainsi étonnant que dans un tel cas, toutes les espèces asexuées aient gardé les trois locus *MTLs* ainsi qu'un gène *HO* fortement conservé (Richard et al., 2005; Muller et al., 2008; Carreté et al., 2018). Il serait compréhensible qu'un tel mécanisme dangereux, impliquant une CDB chromosomique, soit perdu s'il n'était pas essentiel. Il a été suggéré que *C. glabrata* change de type sexuel très rarement (Lin et al., 2007) (Brockert et al., 2003). Ces événements pourraient être le résultat de cassures par Ho très rares ou pourraient aussi être du changement de type sexuel fortuit indépendant de la protéine Ho (accident de réplication, réparation de CDBs accidentelles etc). Si on accepte que le changement de type sexuel chez *C. glabrata* est globalement non fonctionnel et également qu'il l'est dans les autres espèces asexuées, la question de pourquoi est-ce que ces espèces ont conservé à la fois le gène *HO* et les locus *MTLs* reste ouverte. De plus, il a été rapporté que le gène *HO* est sous sélection purifiante dans des populations de *C. glabrata* analysées (Carreté et al., 2018). Cela peut suggérer que la protéine Ho et les locus *MTLs* ont acquis d'autres fonctions chez les *Nakaseomyces* asexués. Chez *S. cerevisiae*, les locus *MTLs* font partie des seules régions structurées du génome et il reste ainsi une possibilité intrigante qui serait que la fonction conservée des locus *MTLs* et de la protéine Ho pourrait être celle de la structuration des chromosomes les portant. Les locus sexuels restent structurés dans des souches mutées pour la protéine Ho dans des cellules de *S. cerevisiae*, mais il est tout à fait possible que cette mutation empêche le changement de type sexuel mais pas un éventuel autre rôle. Il est possible qu'il en soit de même chez *C. glabrata* ; de futures études de la structure 3D du génome de *C. glabrata* devrait nous éclairer sur ce point. De plus, un nouveau rôle pour un élément du changement de type sexuel a déjà été découvert, assez récemment, chez *S. cerevisiae*. Alors que le RE chez *S. cerevisiae* n'était seulement connu pour son rôle dans le changement de type efficace,

il a récemment été démontré qu'il pouvait agir comme un modificateur de la dynamique de l'hétérochromatine à *HML* dans les cellules *MATa* de *S. cerevisiae* (Dodson and Rine, 2016). Chez *N. delphensis*, le laboratoire a récemment démontré que les diploïdes  $\Delta ho/\Delta ho$  montraient un profil en cytométrie de flux qui est intermédiaire entre 1C et 2C, qui pourrait être dû à un taux élevé d'aneuploïdie ou à un mécanisme de réplication déficient non identifié (Li et al.). Même si la nature moléculaire de ce phénomène n'est pas encore élucidée, cela suggère que la protéine Ho est impliquée dans la stabilité des chromosomes chez les diploïdes ou dans le contrôle de la mitose chez *N. delphensis* (Li et al.).

Ainsi, alors même que le changement de type sexuel chez *S. cerevisiae* est un sujet d'étude depuis plusieurs dizaines d'années et qu'il a permis la découverte de processus cellulaires fondamentaux, c'est toujours un sujet actif qui n'est pas encore complètement élucidé chez cette espèce et son étude chez les autres espèces ayant conservé les éléments du changement de type sexuel pourraient permettre de découvrir un nouveau rôle pour ces derniers.



## Bibliographie

Abraham, J., Nasmyth, K.A., Strathern, J.N., Klar, A.J., and Hicks, J.B. (1984). Regulation of mating-type information in yeast. Negative control requiring sequences both 5' and 3' to the regulated region. *Journal of Molecular Biology* 176, 307–331.

Alby, K., Schaefer, D., and Bennett, R.J. (2009). Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature* 460, 890–893.

Angoulvant, A., Guitard, J., and Hennequin, C. (2015). Old and new pathogenic *Nakaseomyces* species: epidemiology, biology, identification, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Yeast Research* 14.

Arcangioli, B., and de Lahondès, R. (2000). Fission yeast switches mating type by a replication-recombination coupled process. *EMBO J* 19, 1389–1396.

Aström, S.U., Kegel, A., Sjöstrand, J.O., and Rine, J. (2000). *Kluyveromyces lactis* Sir2p regulates cation sensitivity and maintains a specialized chromatin structure at the cryptic alpha-locus. *Genetics* 156, 81–91.

Aylon, Y., and Kupiec, M. (2004). DSB repair: the yeast paradigm. *DNA Repair (Amst)* 3, 797–815.

Aylon, Y., Liefshitz, B., Bitan-Banin, G., and Kupiec, M. (2003). Molecular dissection of mitotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1403–1417.

Aylon, Y., Liefshitz, B., and Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J* 23, 4868–4875.

Bakhrat, A., Jurica, M.S., Stoddard, B.L., and Raveh, D. (2004). Homology Modeling and Mutational Analysis of Ho Endonuclease of Yeast. *Genetics* 166, 721–728.

Barsoum, E., Martinez, P., and Åström, S.U. (2010).  $\alpha 3$ , a transposable element that promotes host sexual reproduction. *Genes & Development* 24, 33.

Beach, D.H., and Klar, A.J. (1984). Rearrangements of the transposable mating-type cassettes of fission yeast. *EMBO J* 3, 603–610.

Bellaïche, Y., Mogila, V., and Perrimon, N. (1999). I-SceI endonuclease, a new tool for studying DNA double-strand break repair mechanisms in *Drosophila*. *Genetics* 152, 1037–1044.

Bennett, R.J., and Johnson, A.D. (2003). Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J.* 22, 2505–2515.

Bennett, R.J., and Turgeon, B.G. (2016). *Fungal Sex: The Ascomycota*. *Microbiology Spectrum* 4.

- Bertin, A., and Mangenot, S. (2008). Structure et dynamique de la particule cœur de nucléosome. *Med Sci (Paris)* 24, 715–719.
- Billiard, S., López-Villavicencio, M., Devier, B., Hood, M.E., Fairhead, C., and Giraud, T. (2011). Having sex, yes, but with whom? Inferences from fungi on the evolution of anisogamy and mating types. *Biol Rev Camb Philos Soc* 86, 421–442.
- Blander, G., and Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73, 417–435.
- Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H., and Nasmyth, K. (1996). Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* 84, 699–709.
- Boisnard, S., Zhou Li, Y., Arnaise, S., Sequeira, G., Raffoux, X., Enache-Angoulvant, A., Bolotin-Fukuhara, M., and Fairhead, C. (2015). Efficient Mating-Type Switching in *Candida glabrata* Induces Cell Death. *PLoS ONE* 10, e0140990.
- Brand, A.H., Breeden, L., Abraham, J., Sternglanz, R., and Nasmyth, K. (1985). Characterization of a “silencer” in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell* 41, 41–48.
- Bressan, D.A., Baxter, B.K., and Petrini, J.H.J. (1999). The Mre11-Rad50-Xrs2 Protein Complex Facilitates Homologous Recombination-Based Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7681–7687.
- Brisse, S., Pannier, C., Angoulvant, A., de Meeus, T., Diancourt, L., Faure, O., Muller, H., Peman, J., Viviani, M.A., Grillot, R., et al. (2009). Uneven Distribution of Mating Types among Genotypes of *Candida glabrata* Isolates from Clinical Samples. *Eukaryot Cell* 8, 287–295.
- Briza, P., Breitenbach, M., Ellinger, A., and Segall, J. (1990). Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 4, 1775–1789.
- Brockert, P.J., Lachke, S.A., Srikantha, T., Pujol, C., Galask, R., and Soll, D.R. (2003). Phenotypic Switching and Mating Type Switching of *Candida glabrata* at Sites of Colonization. *Infect Immun* 71, 7109–7118.
- Brothers, M., and Rine, J. (2019). Mutations in the PCNA DNA Polymerase Clamp of *Saccharomyces cerevisiae* Reveal Complexities of the Cell Cycle and Ploidy on Heterochromatin Assembly. *Genetics* 213, 449–463.
- Burt, A., and Koufopanou, V. (2004). Homing endonuclease genes: the rise and fall and rise again of a selfish element. *Curr Opin Genet Dev* 14, 609–615.
- Butler, G. (2010). Fungal sex and pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 140–159.
- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C., and Wolfe, K.H. (2004a). Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1632–1637.

- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C., and Wolfe, K.H. (2004b). Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1632–1637.
- Carreté, L., Ksiezopolska, E., Pegueroles, C., Gómez-Molero, E., Saus, E., Iraola-Guzmán, S., Loska, D., Bader, O., Fairhead, C., and Gabaldón, T. (2018). Patterns of Genomic Variation in the Opportunistic Pathogen *Candida glabrata* Suggest the Existence of Mating and a Secondary Association with Humans. *Current Biology* *28*, 15.
- Cen, Y., Fiori, A., and Van Dijck, P. (2015). Deletion of the DNA Ligase IV Gene in *Candida glabrata* Significantly Increases Gene-Targeting Efficiency. *Eukaryot Cell* *14*, 783–791.
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., and Lieber, M.R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* *18*, 495–506.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2001). Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell* *8*, 1105–1115.
- Chen, X., Bracht, J.R., Goldman, A.D., Dolzhenko, E., Clay, D.M., Swart, E.C., Perlman, D.H., Doak, T.G., Stuart, A., Amemiya, C.T., et al. (2014). The Architecture of a Scrambled Genome Reveals Massive Levels of Genomic Rearrangement during Development. *Cell* *158*, 1187–1198.
- Chevalier, B.S., and Stoddard, B.L. (2001). Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res* *29*, 3757–3774.
- Chiruvella, K.K., Liang, Z., and Wilson, T.E. (2013). Repair of Double-Strand Breaks by End Joining. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*.
- Coïc, E., Sun, K., Wu, C., and Haber, J.E. (2006). Cell cycle-dependent regulation of *Saccharomyces cerevisiae* donor preference during mating-type switching by SBF (Swi4/Swi6) and Fkh1. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5470–5480.
- Coluccio, A.E., Rodriguez, R.K., Kernan, M.J., and Neiman, A.M. (2008). The Yeast Spore Wall Enables Spores to Survive Passage through the Digestive Tract of *Drosophila*. *PLoS One* *3*.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S., and Picard, M. (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev* *61*, 411–428.
- Cormack, B.P., and Falkow, S. (1999). Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* *151*, 979–987.
- Corrigan, M.W., Kerwin-Iosue, C.L., Kuczmariski, A.S., Amin, K.B., and Wykoff, D.D. (2013). The fate of linear DNA in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida glabrata*: the role of homologous and non-homologous end joining. *PLoS One* *8*, e69628.

- Covitz, P.A., Herskowitz, I., and Mitchell, A.P. (1991). The yeast RME1 gene encodes a putative zinc finger protein that is directly repressed by a1-alpha 2. *Genes Dev* 5, 1982–1989.
- Daley, J.M., Palmbo, P.L., Wu, D., and Wilson, T.E. (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* 39, 431–451.
- Dalgaard, J.Z., and Klar, A.J. (2001). A DNA replication-arrest site RTS1 regulates imprinting by determining the direction of replication at mat1 in *S. pombe*. *Genes Dev* 15, 2060–2068.
- DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., and Church, G.M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 41, 4336–4343.
- Dodson, A.E., and Rine, J. (2016). Donor Preference Meets Heterochromatin: Moonlighting Activities of a Recombinational Enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 204, 1065–1074.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., et al. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35–44.
- Edskes, H.K., and Wickner, R.B. (2013). The [URE3] Prion in *Candida*. *Eukaryotic Cell* 12, 551–558.
- Emerson, C.H., and Bertuch, A.A. (2016). Consider the workhorse: Nonhomologous end joining in budding yeast. *Biochem Cell Biol* 94, 396–406.
- Enkler, L., Richer, D., Marchand, A.L., Ferrandon, D., and Jossinet, F. (2016). Genome engineering in the yeast pathogen *Candida glabrata* using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep* 6, 35766.
- Fabre, F. (1978). Induced intragenic recombination in yeast can occur during the G1 mitotic phase. *Nature* 272, 795–798.
- Fabre, E., Muller, H., Therizols, P., Lafontaine, I., Dujon, B., and Fairhead, C. (2005). Comparative genomics in hemiascomycete yeasts: evolution of sex, silencing, and subtelomeres. *Mol Biol Evol* 22, 856–873.
- Fairhead, C., and Dujon, B. (1993). Consequences of unique double-stranded breaks in yeast chromosomes: death or homozygosis. *Molec. Gen. Genet.* 240, 170–180.
- Fidel, P.L., Cutright, J.L., Tait, L., and Sobel, J.D. (1996). A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J. Infect. Dis.* 173, 425–431.
- Fogel, S., and Hurst, D.D. (1967). Meiotic Gene Conversion in Yeast Tetrads and the Theory of Recombination. *Genetics* 57, 455–481.
- Fogel, S., Mortimer, R., Lusnak, K., and Tavares, F. (1979). Meiotic gene conversion: a signal of the basic recombination event in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43 Pt 2, 1325–1341.

- Frank-Vaillant, M., and Marcand, S. (2001). NHEJ regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the Ligase IV pathway. *Genes Dev.* *15*, 3005–3012.
- Fung, J.C., Marshall, W.F., Dernburg, A., Agard, D.A., and Sedat, J.W. (1998). Homologous Chromosome Pairing in *Drosophila melanogaster* Proceeds through Multiple Independent Initiations. *J Cell Biol* *141*, 5–20.
- Gabaldón, T., Martin, T., Marcet-Houben, M., Durrens, P., Bolotin-Fukuhara, M., Lespinet, O., Arnaise, S., Boissard, S., Aguilera, G., Atanasova, R., et al. (2013). Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics* *14*, 623.
- Giraud, T., Yockteng, R., López-Villavicencio, M., Refrégier, G., and Hood, M.E. (2008). Mating System of the Anther Smut Fungus *Microbotryum violaceum*: Selfing under Heterothallism. *Eukaryot Cell* *7*, 765–775.
- Gordon, J.L., Armisén, D., Proux-Wéra, E., ÓhÉigeartaigh, S.S., Byrne, K.P., and Wolfe, K.H. (2011). Evolutionary erosion of yeast sex chromosomes by mating-type switching accidents. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20024–20029.
- Gouyon (1999). Sex: a pluralist approach includes species selection. (One step beyond and it's good.). *J Evolution Biol* *12*, 1029–1030.
- Guarente, L. (2007). Sirtuins in aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *72*, 483–488.
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin. Microbiol. Infect.* *20 Suppl 6*, 5–10.
- Haber, J.E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *191*, 33–64.
- Haber, J.E., and George, J.P. (1979). A mutation that permits the expression of normally silent copies of mating-type information in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *93*, 13–35.
- Haber, J.E., Mascioli, D.W., and Rogers, D.T. (1980). Illegal transposition of mating-type genes in yeast. *Cell* *20*, 519–528.
- Hanson, S.J., and Wolfe, K.H. (2017). An Evolutionary Perspective on Yeast Mating-Type Switching. *Genetics* *206*, 9–32.
- Hanson, S.J., Byrne, K.P., and Wolfe, K.H. (2014). Mating-type switching by chromosomal inversion in methylotrophic yeasts suggests an origin for the three-locus *Saccharomyces cerevisiae* system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, E4851–E4858.
- Heitman, J., Carter, D.A., Dyer, P.S., and Soll, D.R. (2014). Sexual reproduction of human fungal pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med* *4*.
- Hentges, P., Ahnesorg, P., Pitcher, R.S., Bruce, C.K., Kysela, B., Green, A.J., Bianchi, J., Wilson, T.E., Jackson, S.P., and Doherty, A.J. (2006). Evolutionary and functional conservation

of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J Biol Chem* 281, 37517–37526.

Herman, P.K., and Rine, J. (1997). Yeast spore germination: a requirement for Ras protein activity during re-entry into the cell cycle. *EMBO J* 16, 6171–6181.

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

Hickman, M.A., Zeng, G., Forche, A., Hirakawa, M.P., Abbey, D., Harrison, B.D., Wang, Y.-M., Su, C., Bennett, R.J., Wang, Y., et al. (2013). The ‘obligate diploid’ *Candida albicans* forms mating-competent haploids. *Nature* 494, 55–59.

Hicks, W.M., Kim, M., and Haber, J.E. (2010). Increased mutagenesis and unique mutation signature associated with mitotic gene conversion. *Science* 329, 82–85.

Hofstatter, P.G., and Lahr, D.J.G. (2019). All Eukaryotes Are Sexual, unless Proven Otherwise. *BioEssays* 41, 1800246.

Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetics Research* 5, 282–304.

Holmes, A.M., Kaykov, A., and Arcangioli, B. (2005). Molecular and Cellular Dissection of Mating-Type Switching Steps in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 25, 303–311.

Hull, C.M., and Heitman, J. (2002). Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu. Rev. Genet.* 36, 557–615.

Imai, S., Armstrong, C.M., Kaerberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800.

Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., and Haber, J.E. (2003). Srs2 and Sgs1–Top3 Suppress Crossovers during Double-Strand Break Repair in Yeast. *Cell* 115, 401–411.

Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M., et al. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431, 1011–1017.

Ivanov, E.L., and Haber, J.E. (1995). RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2245–2251.

Ivanov, E.L., Sugawara, N., White, C.I., Fabre, F., and Haber, J.E. (1994). Mutations in XRS2 and RAD50 delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14, 3414–3425.

Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., and Haber, J.E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 693–704.

- Jacquier, A., and Dujon, B. (1985). An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* *41*, 383–394.
- Jakočiūnas, T., Holm, L.R., Verhein-Hansen, J., Trusina, A., and Thon, G. (2013). Two portable recombination enhancers direct donor choice in fission yeast heterochromatin. *PLoS Genetics* *9*, e1003762.
- Jasin, M., and Rothstein, R. (2013). Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*.
- Jia, S., Yamada, T., and Grewal, S.I.S. (2004). Heterochromatin regulates cell type-specific long-range chromatin interactions essential for directed recombination. *Cell* *119*, 469–480.
- Jiménez, J., Cid, V.J., Cenamor, R., Yuste, M., Molero, G., Nombela, C., and Sánchez, M. (1998). Morphogenesis beyond Cytokinetic Arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *143*, 1617–1634.
- Jin, Y., Binkowski, G., Simon, L.D., and Norris, D. (1997). Ho endonuclease cleaves MAT DNA in vitro by an inefficient stoichiometric reaction mechanism. *J Biol Chem* *272*, 7352–7359.
- Kaplun, L., Ivantsiv, Y., Kornitzer, D., and Raveh, D. (2000). Functions of the DNA damage response pathway target Ho endonuclease of yeast for degradation via the ubiquitin-26S proteasome system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 10077–10082.
- Keeling, P.J., and Roger, A.J. (1995). The selfish pursuit of sex. *Nature* *375*, 283.
- Kegel, A., Sjöstrand, J.O.O., and Åström, S.U. (2001). Nej1p, a cell type-specific regulator of nonhomologous end joining in yeast. *Current Biology* *11*, 1611–1617.
- Kett, D.H., Azoulay, E., Echeverria, P.M., Vincent, J.-L., and Extended Prevalence of Infection in ICU Study (EPIC II) Group of Investigators (2011). Candida bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med* *39*, 665–670.
- Klar, A.J.S. (2007). Lessons learned from studies of fission yeast mating-type switching and silencing. *Annu Rev Genet* *41*, 213–236.
- Klar, A.J., Hicks, J.B., and Strathern, J.N. (1982). Directionality of yeast mating-type interconversion. *Cell* *28*, 551–561.
- Klar, A.J.S., Ishikawa, K., and Moore, S. (2014). A Unique DNA Recombination Mechanism of the Mating/Cell-type Switching of Fission Yeasts: a Review. *Microbiology Spectrum* *2*.
- Kostriken, R., and Heffron, F. (1984). The product of the HO gene is a nuclease: purification and characterization of the enzyme. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *49*, 89–96.
- Kothe, E. (1996). Tetrapolar fungal mating types: sexes by the thousands. *FEMS Microbiol Rev* *18*, 65–87.

- Kramer, K.M., Brock, J.A., Bloom, K., Moore, J.K., and Haber, J.E. (1994). Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar RAD52-independent, nonhomologous recombination events. *Molecular and Cellular Biology* *14*, 1293–1301.
- Ksiezopolska, E., and Gabaldón, T. (2018). Evolutionary Emergence of Drug Resistance in *Candida* Opportunistic Pathogens. *Genes* *9*, 461.
- Kwon-Chung, K.J., and Chang, Y.C. (2012). Aneuploidy and Drug Resistance in Pathogenic Fungi. *PLOS Pathogens* *8*, e1003022.
- Labarere, J., and Noel, T. (1992). Mating Type Switching in the Tetrapolar Basidiomycete *Agrocybe Aegerita*. *Genetics* *131*, 307–319.
- Lacy, E., Roberts, S., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D., and Costantini, F.D. (1983). A foreign beta-globin gene in transgenic mice: integration at abnormal chromosomal positions and expression in inappropriate tissues. *Cell* *34*, 343–358.
- Lee, C.-S., and Haber, J.E. (2015). Mating-type Gene Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Spectrum* *3*.
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., and Heitman, J. (2010). The Evolution of Sex: a Perspective from the Fungal Kingdom. *Microbiol Mol Biol Rev* *74*, 298–340.
- Lemos, B.R., Kaplan, A.C., Bae, J.E., Ferrazzoli, A.E., Kuo, J., Anand, R.P., Waterman, D.P., and Haber, J.E. (2018). CRISPR/Cas9 cleavages in budding yeast reveal templated insertions and strand-specific insertion/deletion profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, E2040–E2047.
- Li, X., and Heyer, W.-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research* *18*, 99–113.
- Li, Y.Z., Boissard, S., Enache-Angoulvant, A., and Fairhead, C. Genome editing in the yeast *Nakaseomyces delphensis* and description of its complete sexual cycle. *Yeast* *n/a*.
- Liang, F., Romanienko, P.J., Weaver, D.T., Jeggo, P.A., and Jasin, M. (1996). Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 8929–8933.
- Lin, C.-Y., Chen, Y.-C., Lo, H.-J., Chen, K.-W., and Li, S.-Y. (2007). Assessment of *Candida glabrata* Strain Relatedness by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* *45*, 2452–2459.
- Lin, F.L., Sperle, K., and Sternberg, N. (1984). Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol* *4*, 1020–1034.
- Lin, X., Hull, C.M., and Heitman, J. (2005). Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature* *434*, 1017–1021.

- Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA Damage Response: Spatiotemporal Relationships among Checkpoint and Repair Proteins. *Cell* *118*, 699–713.
- Llorente, B., Smith, C.E., and Symington, L.S. (2008). Break-induced replication: what is it and what is it for? *Cell Cycle* *7*, 859–864.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., and Jansen, R.P. (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* *277*, 383–387.
- Loo, S., and Rine, J. (1994). Silencers and domains of generalized repression. *Science* *264*, 1768–1771.
- Mahoney, D.J., and Broach, J.R. (1989). The HML mating-type cassette of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by two separate but functionally equivalent silencers. *Molecular and Cellular Biology* *9*, 4621–4630.
- Malkova, A., and Haber, J.E. (2012). Mutations arising during repair of chromosome breaks. *Annu Rev Genet* *46*, 455–473.
- Malkova, A., Ivanov, E.L., and Haber, J.E. (1996). Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 7131–7136.
- Malkova, A., Signon, L., Schaefer, C.B., Naylor, M.L., Theis, J.F., Newlon, C.S., and Haber, J.E. (2001). RAD51-independent break-induced replication to repair a broken chromosome depends on a distant enhancer site. *Genes Dev* *15*, 1055–1060.
- Maroc, L., and Fairhead, C. (2019). A new inducible CRISPR-Cas9 system useful for genome editing and study of double-strand break repair in *Candida glabrata*. *Yeast* *36*, 723–731.
- Maroc, L., Zhou-Li, Y., Boisnard, S., and Fairhead, C. (2020). A single Ho-induced double-strand break at the MAT locus is lethal in *Candida glabrata*. *PLOS Genetics* *16*, e1008627.
- Mézard, C., Pompon, D., and Nicolas, A. (1992). Recombination between similar but not identical DNA sequences during yeast transformation occurs within short stretches of identity. *Cell* *70*, 659–670.
- MICHAN, S., and SINCLAIR, D. (2007). Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* *404*, 1–13.
- Moazed, D., Kistler, A., Axelrod, A., Rine, J., and Johnson, A.D. (1997). Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 2186–2191.
- Moore, J.K., and Haber, J.E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *16*, 2164–2173.

- Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., and Rothstein, R. (1996). DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10729–10734.
- Muller, H., Hennequin, C., Gallaud, J., Dujon, B., and Fairhead, C. (2008). The Asexual Yeast *Candida glabrata* Maintains Distinct  $a$  and  $\alpha$  Haploid Mating Types. *Eukaryot Cell* 7, 848–858.
- Muller H, Hennequin C, Dujon B, Fairhead C. (2007). Ascomycetes: the *Candida* MAT Locus: Comparing MAT in the Genomes of Hemiascomycetous Yeasts. In Taylor JW, Kronstad JW, Heitman J, Casselton LA, Editors. *Sex in Fungi*, (American Society for Microbiology), pp. 247–263.
- Nasmyth, K. (1987). The determination of mother cell-specific mating type of switching in yeast by a specific regulator of HO transcription. *EMBO J* 6, 243–248.
- Nasmyth, K. (1993). Regulating the HO endonuclease in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 286–294.
- Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., and Heitman, J. (2011). *Sex in Fungi*. *Annu Rev Genet* 45, 405–430.
- Nickoloff, J.A., Chen, E.Y., and Heffron, F. (1986). A 24-base-pair DNA sequence from the MAT locus stimulates intergenic recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 7831–7835.
- Niu, H., Chung, W.-H., Zhu, Z., Kwon, Y., Zhao, W., Chi, P., Prakash, R., Seong, C., Liu, D., Lu, L., et al. (2010). Mechanism of the ATP-dependent DNA End Resection Machinery from *S. cerevisiae*. *Nature* 467, 108–111.
- O’Gorman, C.M., Fuller, H.T., and Dyer, P.S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457, 471–474.
- Ooi, S.L., Shoemaker, D.D., and Boeke, J.D. (2001). A DNA Microarray-Based Genetic Screen for Nonhomologous End-Joining Mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 294, 2552–2556.
- Oppikofer, M., Kueng, S., Martino, F., Soeroes, S., Hancock, S.M., Chin, J.W., Fischle, W., and Gasser, S.M. (2011). A dual role of H4K16 acetylation in the establishment of yeast silent chromatin. *EMBO J.* 30, 2610–2621.
- Orr-Weaver, T.L., and Szostak, J.W. (1983). Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4417–4421.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., and Rothstein, R.J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6354–6358.
- Pannunzio, N.R., Watanabe, G., and Lieber, M.R. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 293, 10512–10523.
- Pâques, F., and Haber, J.E. (1999). Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 349–404.

- Park, E.C., and Szostak, J.W. (1990). Point mutations in the yeast histone H4 gene prevent silencing of the silent mating type locus HML. *Mol Cell Biol* *10*, 4932–4934.
- Ponder, R.G., Fonville, N.C., and Rosenberg, S.M. (2005). A switch from high-fidelity to error-prone DNA double-strand break repair underlies stress-induced mutation. *Mol Cell* *19*, 791–804.
- Poulain, D. (2015). *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* *41*, 208–217.
- Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., Krejci, L., Klein, H., Haber, J.E., Sung, P., et al. (2009). Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes Dev* *23*, 67–79.
- Pronk, J.T. (2002). Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. *Appl Environ Microbiol* *68*, 2095–2100.
- Puchta, H., Dujon, B., and Hohn, B. (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res* *21*, 5034–5040.
- Rajaei, N., Chiruvella, K.K., Lin, F., and Åström, S.U. (2014). Domesticated transposase Kat1 and its fossil imprints induce sexual differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 15491–15496.
- Ramírez-Zavaleta, C.Y., Salas-Delgado, G.E., De Las Peñas, A., and Castaño, I. (2010). Subtelomeric silencing of the MTL3 locus of *Candida glabrata* requires yKu70, yKu80, and Rif1 proteins. *Eukaryotic Cell* *9*, 1602–1611.
- Ravindra, A., Weiss, K., and Simpson, R.T. (1999). High-Resolution Structural Analysis of Chromatin at Specific Loci: *Saccharomyces cerevisiae* Silent Mating-Type Locus HMRA. *Mol Cell Biol* *19*, 7944–7950.
- Richard, G.-F., Kerrest, A., Lafontaine, I., and Dujon, B. (2005). Comparative genomics of hemiascomycete yeasts: genes involved in DNA replication, repair, and recombination. *Mol Biol Evol* *22*, 1011–1023.
- Robbins, N., Caplan, T., and Cowen, L.E. (2017). Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* *71*, 753–775.
- Rodgers, K., and McVey, M. (2016). Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J Cell Physiol* *231*, 15–24.
- Rodrigues, C.F., Silva, S., and Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *33*, 673–688.
- Roman, H. (1956). Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *21*, 175–185.

- Roth, D.B. (2014). V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. *Microbiology Spectrum* 2.
- Roth, D.B., Nakajima, P.B., Menetski, J.P., Bosma, M.J., and Gellert, M. (1992). V(D)J recombination in mouse thymocytes: double-strand breaks near T cell receptor delta rearrangement signals. *Cell* 69, 41–53.
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., and Löbrich, M. (2003). Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Mol Cell Biol* 23, 5706–5715.
- Rouet, P., Smih, F., and Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* 14, 8096–8106.
- Rudin, N., and Haber, J.E. (1988). Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in *Saccharomyces cerevisiae* by recombination between flanking homologous sequences. *Mol Cell Biol* 8, 3918–3928.
- Russell, D.W., Jensen, R., Zoller, M.J., Burke, J., Errede, B., Smith, M., and Herskowitz, I. (1986). Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* HO gene and analysis of its upstream regulatory region. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4281–4294.
- Saini, N., Ramakrishnan, S., Elango, R., Ayyar, S., Zhang, Y., Deem, A., Ira, G., Haber, J.E., Lobachev, K.S., and Malkova, A. (2013). Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature* 502, 389–392.
- Selmecki, A.M., Dulmage, K., Cowen, L.E., Anderson, J.B., and Berman, J. (2009). Acquisition of Aneuploidy Provides Increased Fitness during the Evolution of Antifungal Drug Resistance. *PLOS Genetics* 5, e1000705.
- Seol, J.-H., Shim, E.Y., and Lee, S.E. (2018). Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutat Res* 809, 81–87.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* 18, 134–147.
- Sil, A., and Herskowitz, I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* 84, 711–722.
- Smith, C.E., Llorente, B., and Symington, L.S. (2007). Template switching during break-induced replication. *Nature* 447, 102–105.
- Smithies, O., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Koralewski, M.A., and Kucherlapati, R.S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317, 230–234.
- Stark, J.M., and Jasin, M. (2003). Extensive Loss of Heterozygosity Is Suppressed during Homologous Repair of Chromosomal Breaks. *Mol Cell Biol* 23, 733–743.
- Stoddard, B.L. (2014). Homing endonucleases from mobile group I introns: discovery to genome engineering. *Mobile DNA* 5, 7.

- Strathern, J.N., Klar, A.J., Hicks, J.B., Abraham, J.A., Ivy, J.M., Nasmyth, K.A., and McGill, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell* 31, 183–192.
- Sugawara, N., and Haber, J.E. (1992). Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol Cell Biol* 12, 563–575.
- Sugawara, N., Ira, G., and Haber, J.E. (2000). DNA Length Dependence of the Single-Strand Annealing Pathway and the Role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in Double-Strand Break Repair. *Mol Cell Biol* 20, 5300–5309.
- Sugawara, N., Wang, X., and Haber, J.E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol. Cell* 12, 209–219.
- Symington, L.S. (2002). Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 630–670.
- Symington, L.S., Rothstein, R., and Lisby, M. (2014). Mechanisms and Regulation of Mitotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 198, 795–835.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25–35.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I., and Vale, R.D. (1997). Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* 389, 90–93.
- Tekaia, F., and Latgé, J.-P. (2005). *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol* 8, 385–392.
- Thompson, J.S., Ling, X., and Grunstein, M. (1994). Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* 369, 245–247.
- Thon, G., Maki, T., Haber, J.E., and Iwasaki, H. (2019). Mating-type switching by homology-directed recombinational repair: a matter of choice. *Curr Genet* 65, 351–362.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Harris, J.L., Boffo, F.L., Hardebeck, M.C., Potts, P.R., Khanna, K.K., and Burma, S. (2017). DNA-damage-induced degradation of EXO1 exonuclease limits DNA end resection to ensure accurate DNA repair. *J Biol Chem* 292, 10779–10790.
- Toone, W.M., Johnson, A.L., Banks, G.R., Toyn, J.H., Stuart, D., Wittenberg, C., and Johnston, L.H. (1995). Rme1, a negative regulator of meiosis, is also a positive activator of G1 cyclin gene expression. *EMBO J* 14, 5824–5832.
- Tsubouchi, H., and Ogawa, H. (1998). A Novel mre11 Mutation Impairs Processing of Double-Strand Breaks of DNA during Both Mitosis and Meiosis. *Mol Cell Biol* 18, 260–268.
- Vengrova, S., and Dalgaard, J.Z. (2004). RNase-sensitive DNA modification(s) initiates *S. pombe* mating-type switching. *Genes Dev* 18, 794–804.

- Voss, A., Hollis, R.J., Pfaller, M.A., Wenzel, R.P., and Doebbeling, B.N. (1994). Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J Clin Microbiol* 32, 975–980.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793–1808.
- Wake, C.T., Gudewicz, T., Porter, T., White, A., and Wilson, J.H. (1984). How damaged is the biologically active subpopulation of transfected DNA? *Mol Cell Biol* 4, 387–398.
- Weiler, K.S., and Broach, J.R. (1992). Donor locus selection during *Saccharomyces cerevisiae* mating type interconversion responds to distant regulatory signals. *Genetics* 132, 929–942.
- Weiss, K., and Simpson, R.T. (1997). Cell type-specific chromatin organization of the region that governs directionality of yeast mating type switching. *The EMBO Journal* 16, 4352–4360.
- Weiss, K., and Simpson, R.T. (1998). High-resolution structural analysis of chromatin at specific loci: *Saccharomyces cerevisiae* silent mating type locus HML $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* 18, 5392–5403.
- White, C.I., and Haber, J.E. (1990). Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 9, 663–673.
- Whiteway, M., Freedman, R., Van Arsdell, S., Szostak, J.W., and Thorner, J. (1987). The yeast ARD1 gene product is required for repression of cryptic mating-type information at the HML locus. *Molecular and Cellular Biology* 7, 3713–3722.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., et al. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews. Genetics* 8, 973–982.
- Wolner, B., van Komen, S., Sung, P., and Peterson, C.L. (2003). Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol. Cell* 12, 221–232.
- Wu, X., and Haber, J.E. (1995). MAT $\alpha$  donor preference in yeast mating-type switching: activation of a large chromosomal region for recombination. *Genes Dev.* 9, 1922–1932.
- Wu, X., and Haber, J.E. (1996). A 700 bp cis-Acting Region Controls Mating-Type Dependent Recombination Along the Entire Left Arm of Yeast Chromosome III. *Cell* 87, 277–285.
- Wu, C., Weiss, K., Yang, C., Harris, M.A., Tye, B.K., Newlon, C.S., Simpson, R.T., and Haber, J.E. (1998). Mcm1 regulates donor preference controlled by the recombination enhancer in *Saccharomyces* mating-type switching. *Genes Dev.* 12, 1726–1737.
- Xie, Z.-X., Mitchell, L.A., Liu, H.-M., Li, B.-Z., Liu, D., Agmon, N., Wu, Y., Li, X., Zhou, X., Li, B., et al. (2018). Rapid and Efficient CRISPR/Cas9-Based Mating-Type Switching of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)* 8, 173–183.

Yarrington, R.M., Verma, S., Schwartz, S., Trautman, J.K., and Carroll, D. (2018). Nucleosomes inhibit target cleavage by CRISPR-Cas9 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, 9351–9358.

Yu, C., Bonaduce, M.J., and Klar, A.J.S. (2012). Going in the Right Direction: Mating-Type Switching of *Schizosaccharomyces pombe* Is Controlled by Judicious Expression of Two Different *swi2* Transcripts. *Genetics* *190*, 977–987.

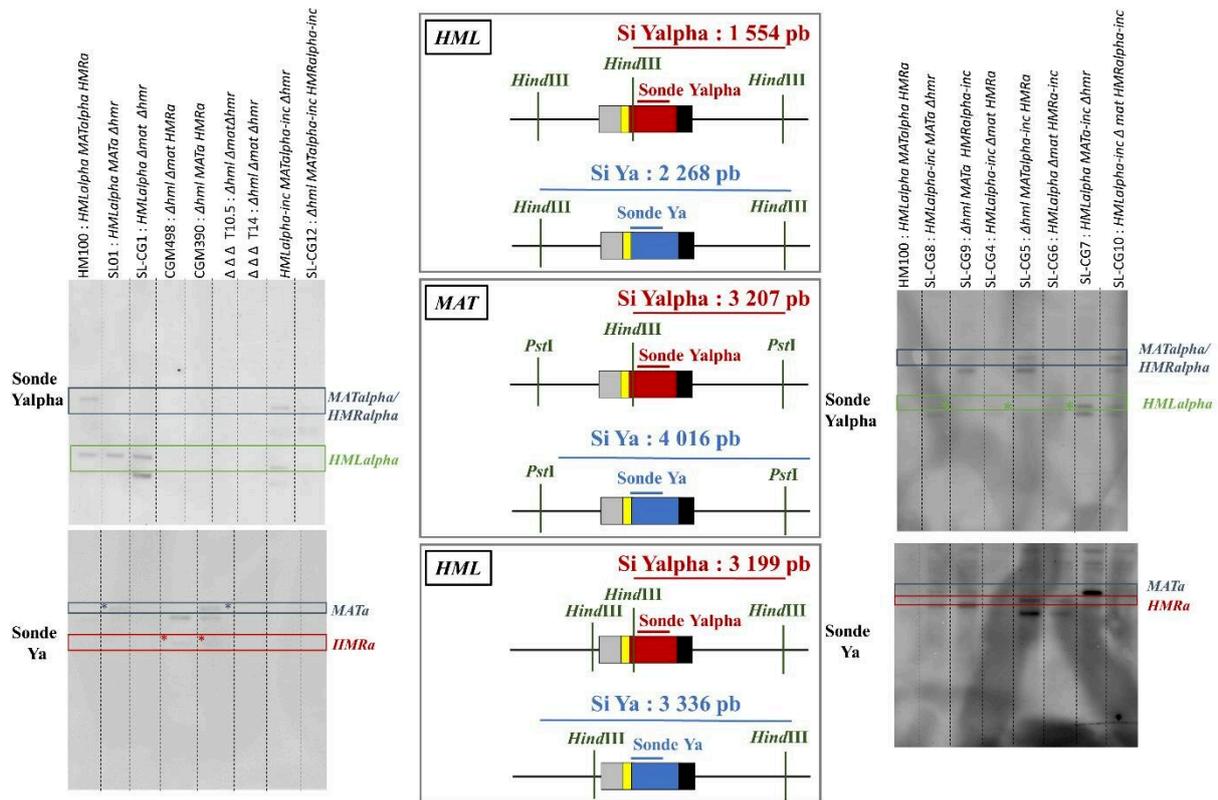
Zordan, R.E., Ren, Y., Pan, S.-J., Rotondo, G., De Las Peñas, A., Iluore, J., and Cormack, B.P. (2013). Expression plasmids for use in *Candida glabrata*. *G3 (Bethesda)* *3*, 1675–1686.

Zufall, R.A., Robinson, T., and Katz, L.A. (2005). Evolution of developmentally regulated genome rearrangements in eukaryotes. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* *304*, 448–455.



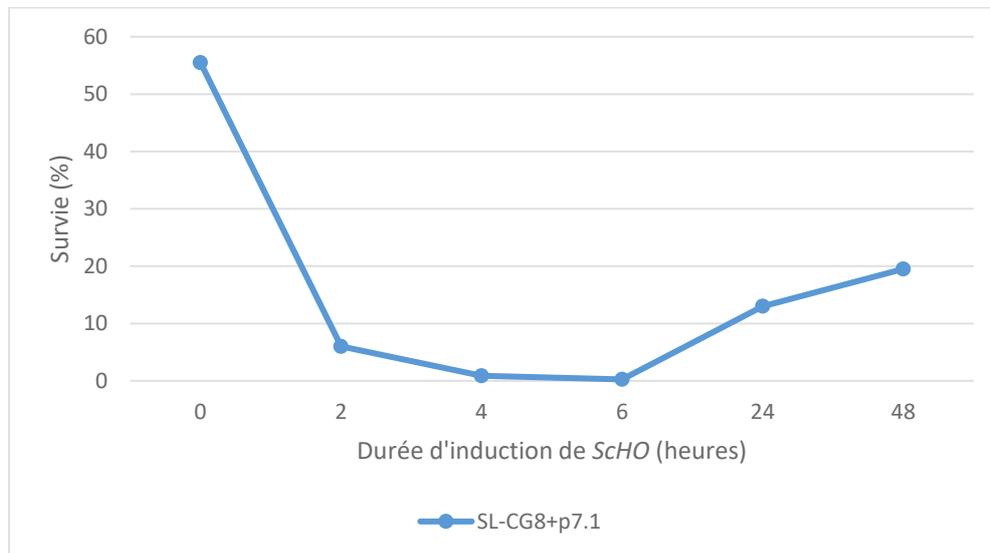
# Annexes

## Annexe 1. Analyse des locus sexuels de différentes souches de *C. glabrata* construites par Southern-blot.



Le rectangle bleu représente la séquence Ya, le rectangle rouge la séquence Yalpha, les rectangles gris et noirs les séquences identiques partagées par les trois locus sexuels, la barre jaune le site Ho sauvage (pas à l'échelle). Les régions des locus *HMLalpha/a*, *MATalpha/a* et *HMRa/a* sont représentées avec les sites de restriction et les tailles de fragments attendus. L'ADNg de toutes les souches a été digéré par *HindIII/PstI*. L'ADNg a été hybridé avec une sonde localisée correspondant à 548 pb de la séquence Ya ou avec une sonde correspondant à 647 pb de la séquence Yalpha.

## Annexe 2. Cinétique d'induction du transformant SL-CG8 + p7.1 ayant servi au Southern-blot de visualisation de la CDB dans la souche SL-CG8.



L'expérience de cinétique d'induction de *ScHO* a été réalisée en milieu liquide inducteur. La survie est montrée sur l'axe Y et est calculée en divisant le nombre de colonies formées sur SC-Rep (CFU pour *Colony forming unit*) par le nombre théorique de cellule étalées sur SC-Rep, estimé par comptage.

**Titre :** Etude sur le changement de type sexuel et les cassures chromosomiques chez *C. glabrata*

**Mots clés :** Changement de type sexuel, *Candida*, cassure chromosomique, Ho, Cas9, levure

**Résumé :** Le changement de type sexuel est une des stratégies développées par les champignons afin de favoriser la reproduction sexuée. Ce mécanisme permet à une cellule haploïde de donner naissance à une cellule de type sexuel opposé de façon qu'elles puissent se féconder. Cela a particulièrement été bien étudié chez la levure sexuée *Saccharomyces cerevisiae* mais la raison pour laquelle les éléments du changement de type sexuel ont été conservés dans des espèces comme *Candida glabrata* chez qui ni reproduction sexuée, ni changement de type sexuel n'a lieu, n'est toujours pas connue. Nous avons montré précédemment que le changement de type sexuel peut être induit chez *C. glabrata* en exprimant l'endonucléase responsable de ce mécanisme chez *S. cerevisiae* et que cela était lié à une très forte létalité cellulaire. Dans ce travail, nous avons étudié le lien qui existe entre changement de type sexuel et forte létalité chez *C. glabrata*.

**Title :** Study of mating-type switching and chromosomal breaks in *C. glabrata*

**Keywords :** Mating-type switching, *Candida*, chromosomal break, Ho, Cas9, yeast

**Abstract :** Mating-type switching is one of the strategies developed by fungi to promote sexual reproduction and propagation. This mechanism enables one haploid cell to give rise to a cell of the opposite mating-type so that they can mate. It has been extensively studied in the sexual yeast *Saccharomyces cerevisiae* but little is known about why the mating-type switching components have been conserved in species like *Candida glabrata*, in which neither sexual reproduction nor mating-type switching is observed. We have previously shown that mating-type switching can be triggered, in *C. glabrata*, by expression of the endonuclease responsible of this mechanism in *S. cerevisiae*, but this leads to massive cell death. In this work, we studied the link existing between mating-type switching and cell death in *C. glabrata*.