

2m11.2823. 2

Université de Montréal

Clonage et expression hétérologue de la protéine Sap2 de *Candida albicans* chez
Saccharomyces cerevisiae

par

Nathalie Dubois

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

avril, 2000

© Nathalie Dubois, 2000



W
4
N58
2000
N.097

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Clonage et expression hétérologue de la protéine Sap2 de *Candida albicans* chez
Saccharomyces cerevisiae

présenté par:

Nathalie Dubois

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury:	Dr Marc Drolet
Directeur de recherche:	Dr Louis de Repentigny
Codirecteur:	Dr Pierre Belhumeur
Membre du jury:	Dr Martine Raymond

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

C. albicans représente le principal champignon pathogène opportuniste de l'homme. Ces dernières décennies, l'augmentation de l'incidence des candidoses est devenue un problème majeur auquel la médecine moderne doit faire face. La virulence de *C. albicans* est associée à différents facteurs qui agiraient de façon séquentielle et coopérative. Parmi ceux-ci, on retrouve les adhésines, le dimorphisme, le changement de phénotype, ainsi que l'activité protéolytique des protéases aspartiques sécrétées (Sap) et l'activité phospholipasique. Neuf gènes *SAP*, dont l'expression est régulée de façon différentielle selon le phénotype et les conditions environnantes, ont été identifiés chez *C. albicans*. L'ARNm de *SAP2* représente le transcrit principal de la famille des gènes *SAP* dans un milieu inducteur. Sap2p est exprimée à 25 °C, à 37 °C et par les deux types morphologiques de la souche WO-1. Les protéines Sap, et particulièrement la Sap2, joueraient un rôle important dans de nombreuses étapes de la pathogenèse de la candidose, telles que l'adhérence, l'invasion tissulaire et permettraient de contourner certains mécanismes du système immunitaire de l'hôte. Ces dernières considérations nous ont donc incité à étudier l'importance de la Sap2p dans l'établissement de l'infection.

Une des approches retenues par notre laboratoire consistait à exprimer le gène *SAP2* hors de son contexte, c'est-à-dire chez une souche de *S. cerevisiae*, espèce non pathogène qui ne produit pas de protéase Sap, et à étudier les transformants obtenus dans des modèles animaux de candidoses. À cette fin, le gène *SAP2* fut cloné par PCR et intégré dans le locus du gène *URA3* d'une souche de *S. cerevisiae*, sous le contrôle du promoteur constitutif de l'alcool déshydrogénase I. L'analyse par «Western blotting» des surnageants de culture démontra que la Sap2p était efficacement exprimée et sécrétée par les transformants stables de *S. cerevisiae*. Par ailleurs, seuls les transformants exprimant la Sap2p généraient une activité protéolytique dans les surnageants de culture et étaient capables d'utiliser la BSA comme seule source d'azote. En outre, la protéine Sap2 était sécrétée par les transformants sous trois formes distinctes, dont deux étaient possiblement le produit d'une auto-dégradation, d'un changement post-traductionnel ou d'une maturation

incorrecte. Testées dans deux modèles murins de candidose (oro-pharyngée et systémique), les souches de *S. cerevisiae* sécrétant la protéase Sap2, tout comme la souche parentale et le contrôle négatif, n'ont cependant pu établir d'infection.

Ces résultats valident l'hypothèse commune selon laquelle de nombreux facteurs contribuent à la virulence de *C. albicans*, sans qu'aucun ne soit vraiment dominant. Cependant, le choix des modèles animaux et/ou le déséquilibre physiologique potentiel des transformants causé par la surproduction de Sap2p peuvent également expliquer l'absence de persistance des transformants dans l'organisme des souris. Malgré tout, cette approche reste intéressante pour l'étude de facteurs de virulence. Elle permet notamment de contourner le problème de redondance de certains facteurs, rencontré dans les études utilisant des mutants nuls.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1. CANDIDA ALBICANS.....	2
1.1. Généralités.....	2
1.1.1 <i>Présentation du genre Candida.....</i>	2
1.1.2 <i>Aspects structurels et physiologiques de C. albicans.....</i>	3
1.1.3 <i>Génétique de C. albicans.....</i>	5
1.2. Aspect clinique des infections à C. albicans.....	7
1.2.1 <i>Les différents types de candidoses.....</i>	7
1.2.2 <i>Facteurs de risque généraux.....</i>	9
1.3. Pathogenèse et mécanismes de défense de l'hôte.....	12
2. LES FACTEURS DE VIRULENCE DE CANDIDA ALBICANS.....	17
2.1. L'adhérence.....	17
2.1.1 <i>Interactions protéine-protéine.....</i>	18
2.1.2 <i>Interactions protéine-sucre.....</i>	22
2.2. Le dimorphisme et le changement de phénotype.....	24
2.2.1 <i>Le dimorphisme.....</i>	24
2.2.2 <i>Le «phenotypic switching».....</i>	27
2.3. L'activité protéolytique.....	30
2.3.1 <i>Caractéristiques biochimiques des Sap de C. albicans.....</i>	31
2.3.2 <i>La famille des gènes SAP.....</i>	32
2.3.3 <i>Expression des SAP.....</i>	36

2.3.3.1. Expression différentielle.....	36
2.3.3.2. Inducteurs et sécrétion.....	40
2.3.4. <i>Rôle dans la virulence</i>	43
2.3.4.1. Les Sap et la virulence: vue d'ensemble.....	44
2.3.4.2. Relation entre les Sap et d'autres de virulence.....	50
2.4. Les phospholipases et autres facteurs de virulence.....	53
2.4.1. <i>Les phospholipases</i>	53
2.4.2. <i>La résistance aux agents antifongiques</i>	55
3. SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMME HÔTE D'EXPRESSION.....	59
ARTICLE.....	63
DISCUSSION.....	100
RÉFÉRENCES.....	109
REMERCIEMENTS.....	xii

LISTE DES TABLEAUX**Revue de la littérature:**

Tableau I: Gènes *SAP* de *C. albicans* identifiés à ce jour.....36

Article:

Tableau II: Yeast strains.....70

Tableau III: Comparative CFU of *C. albicans* parental strain and transformants recovered from kidneys at various times during disseminated infection of mice.....86

LISTE DES FIGURES

Revue de la littérature:

Figure 1: Schématisation des grandes étapes de la pathogenèse de *C. albicans* et indication des facteurs de virulence principaux impliqués dans chacune d'entre elles.....13

Figure 2: Structure primaire des Sap. Présence d'un prépropeptide qui serait clivé au niveau d'un site putatif Lys-Arg ou plus rarement Lys-Lys par un processus similaire au système Kex2 de *S. cerevisiae* (1 à 4 sites selon la Sap). Site actif divisé en deux domaines contenant chacun un Asp. Présence de Cys conservées pour le maintien de la structure secondaire.....33

Figure 3: Expression *in vitro* des gènes *SAP* de *C. albicans* selon la forme de la cellule (levure ou hyphe), son phénotype (normal et opaque pour WO-1), et les conditions de culture (température). L'expression est ici rapportée par la présence d'ARNm.....40

Article:

Figure 4: Western blot analysis of intra- and extracellular proteins of *S. cerevisiae* S86 and 6210 plasmidic transformants (with sense or antisense *SAP2* constructs) grown in CAT medium for 18 h at 30 °C, and probed with an anti-Sap2p monoclonal antibody. Loaded sample volumes were adjusted to equivalent mass cultures.....77

Figure 5: Southern blot analysis of wild-type and selected transformants of *S. cerevisiae* and *C. albicans*. Top, integration sites with probes indicated by thick lines. Bottom, *S. cerevisiae* and *C. albicans* genomic DNAs digested with *AvrII* and *KpnI*, respectively and probed with [³²P] *EcoRV-SmaI* (*S. cerevisiae*) or [³²P] *PstI-DraI SAP2* (*C. albicans*) DNA. Grey boxes represent the chromosomal copy of *URA3* and *SAP2* genes.....79

Figure 6: Kinetics of Sap2p secretion by *S. cerevisiae* positive transformants 884 and 885, negative control 894, and parental strain 754, grown in 0.5% CAT or YNB-BSA media at 37 °C. At the indicated times, culture samples were evaluated for growth, extracellular proteolytic activity and Sap2p expression in 885 (Western blot). Data are mean values of duplicate experiments.....81

Figure 7: Kinetics of Sap2p secretion by *C. albicans* positive transformants S1 and S2, negative controls N1 and N2, and parental strain CA14, grown in 1% CAT or YNB-BSA media, at 37 °C. At The indicated times, culture samples were evaluated for growth, extracellular proteolytic activity and Sap2p expression in S2 and N1 (Western blot). Data are mean values of duplicate experiments.....83

Figure 8: Survival of CD-1 mice infected intravenously with 5×10^5 cells of *C. albicans* transformants S1 (n=12), S2 (n=15), N1 (n=14), N2 (n=12) and parental strain SC5314 (n=14).....85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa: acide aminé

Arg: arginine

ARNm: acide ribonucléique messenger

Asp: acide aspartique

bp: paire de bases

BSA: albumine de sérum bovin

DAN: diazoacétylnorleucine méthyl ester

EPNP: 1,2-époxy-3-*p*-nitrophénoxy propane

Fc: fragment cristallisable

Ig: immunoglobuline

IgAs: Immunoglobuline A sécrétoire

kDa: kilodalton

Lys: lysine

N-terminal: amino-terminal

PCR: *polymerase chain reaction*

PMN: polymorphonucléaire

pI: point isoélectrique

Sap: protéase aspartique sécrétée

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SIDA: syndrome d'immunodéficience acquis

PA-SS: *periodic acid- silver stain*

RT-PCR: *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

UMP: uridine monophosphate

VIH: virus d'immunodéficience humain

A mes parents...

REVUE DE LA LITTÉRATURE

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. *CANDIDA ALBICANS*

1.1. Généralités

Candida albicans fait partie d'un groupe particulier de mycètes, les levures. Ce groupe contient des champignons unicellulaires (eucaryotes) se reproduisant par bourgeonnement ou par fission. Le genre *Candida* en particulier se trouverait dans la classe des deutéromycètes qui correspond à un groupe hétérogène où sont classées des espèces de mycètes dont la reproduction sexuée n'existe pas ou n'a pas encore été observée (Kurtz *et al.*, 1990; McCullough *et al.*, 1996).

1.1.1. Présentation du genre *Candida*

Le genre *Candida* regroupe toutes les levures sans stade sexuel connu (levures imparfaites). Il contient environ 200 espèces dont la reproduction se fait essentiellement par bourgeonnement (Kurtz *et al.*, 1990; McCullough *et al.*, 1996). Cependant, des formes sexuelles ont été décrites chez au moins six espèces depuis cette classification. Il s'agit des espèces *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. famata* et *C. norvegensis*. Les formes sexuées observées chez ces espèces étaient de type ascomycète (Odds, 1988). Le genre *Candida* comprend des espèces très variées quant à leurs formes cellulaires, leur capacité de former un mycélium et leurs propriétés physiologiques (assimilation et fermentation de différents composés). Les espèces pathogènes rencontrées le plus souvent (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* et *C. glabrata*) fermentent toutes le glucose et, à l'exception de *C. glabrata*, peuvent former des pseudohyphes. Par contre, seule *C. albicans*, l'espèce la plus virulente chez l'homme et que l'on isole le plus fréquemment, est capable de produire de vrais hyphes et des chlamydospores. Cette espèce continue d'être l'objet de recherches intensives car elle représente le principal champignon pathogène opportuniste chez l'homme (Kurtz *et*

al., 1990). Les espèces du genre *Candida* sont caractérisées et identifiées principalement par leur morphologie coloniale et leurs propriétés biochimiques (surtout assimilation des sucres). Par ailleurs, plusieurs techniques sont disponibles pour l'identification de sous-espèces à des fins épidémiologiques. Des tests sérologiques, par exemple, utilisant l'agglutination des levures à l'aide d'antisérums de lapin ont permis de définir deux sérotypes A et B chez *C. albicans* (Hasenclever et Mitchell, 1961). D'autres techniques utilisent la résistance à divers composés chimiques (résistogrammes) ou les propriétés biochimiques de différentes souches. Finalement, les méthodes génétiques, plus récentes, permettent de déterminer avec encore plus de précision les relations épidémiologiques possibles entre différentes souches de *C. albicans*. Ces techniques font appel à la digestion de l'ADN génomique par des endonucléases de restriction et à l'étude des fragments ainsi générés, après électrophorèse en gel d'agarose. Une autre technique utilise des sondes spécifiques de différents éléments d'ADN répétitifs présents chez *C. albicans*, comme Ca3, Ca24 et Ca7. Le patron d'hybridation de ces sondes à l'ADN génomique digéré sera spécifique de la souche utilisée (McCullough *et al.*, 1996).

1.1.2. Aspects structurels et physiologiques de *C. albicans*

C. albicans possède une membrane plasmique et des organites cellulaires typiques des cellules eucaryotes. La membrane est une bicouche phospholipidique composée majoritairement de protéines et de lipides, en particulier les phospholipides et les stérols (Marriott, 1975). C'est la cible principale de nombreux antifongiques. Les organites intracellulaires comprennent notamment un noyau à double membrane et avec pores, des ribosomes, un réticulum endoplasmique, des mitochondries et des vacuoles (Odds, 1988). Par ailleurs, les cellules de *C. albicans* sont entourées d'une paroi dont la fonction principale est le maintien de la forme cellulaire. Cependant, comme elle représente la surface de contact avec les cellules hôtes, d'autres fonctions très importantes lui sont attribuées telles que son implication dans les phénomènes d'adhésion. Ce point fera l'objet d'un chapitre particulier dans la section sur les facteurs de virulence de *C. albicans*. La paroi est une structure à couches multiples

(trois à six) composée surtout de glucanes et de mannanes, mais aussi de lipides et de protéines. Les couches externes sont principalement composées de mannanes et de mannoprotéines, tandis que la couche la plus interne est riche en chitine et en glucanes. Cette dernière a pour fonction principale le maintien de la rigidité de la paroi. (Odds, 1988). Dans certaines conditions (milieu à haute teneur en sucres), se forme une couche externe fibrillaire composée surtout de mannoprotéines. Elle serait responsable de l'adhésion des levures à l'épithélium (McCourtie et Douglas, 1984).

Fait intéressant, *C. albicans* peut exister sous deux formes: la forme levure et la forme hyphale. La première est la forme unicellulaire du champignon que l'on retrouve majoritairement lors des conditions de cultures *in vitro*. La deuxième est la forme pluricellulaire et peut être représentée par deux éléments: l'hyphe et le pseudohyphe. Les hyphes se forment à partir d'une blastoconidie (formation d'un tube germinatif) ou d'autres hyphes par embranchement latéral. La croissance continue du tube germinatif suivie régulièrement par des divisions cellulaires et la formation de cloisons donne naissance à un hyphe. *C. albicans* est la seule espèce du genre *Candida* capable de former de vrais hyphes. Les pseudohyphes ressemblent beaucoup aux hyphes mais possèdent un mode de formation différent. Ils proviennent d'une blastospore ou d'un hyphe par un phénomène de bourgeonnement particulier. En effet, chaque bourgeon reste attaché à la cellule mère et tend à prendre une forme allongée. Le pseudohyphe résultant est constitué de blastospores parfois très allongées et disposées les unes à la suite des autres (Odds, 1988). Dans la plupart des conditions *in vitro*, la croissance de *C. albicans* semble se faire sous la forme levure avec présence d'un faible pourcentage d'hyphes. Des changements bien précis dans les conditions de cultures (température, pH, stade de croissance, composition du milieu) peuvent favoriser la formation de ces derniers. Ainsi, des conditions de pH neutre, et de température entre 37 et 40 °C induisent la germination. Le sérum dans le milieu de culture accentue l'induction de la production hyphale (Odds, 1988). Finalement, nous pouvons mentionner une autre caractéristique unique à *C. albicans* parmi les espèces du même genre, c'est-à-dire sa capacité à former des chlamydozoospores lors de conditions défavorables. Ces spores seraient des formes

dormantes ou de stockage et seraient importantes pour la survie de *C. albicans* en dehors du corps humain (Kurtz *et al.*, 1990).

Ajoutons maintenant quelques mots sur le cycle cellulaire de *C. albicans*. La division cellulaire se fait par bourgeonnement près d'un pôle de la cellule. Au moment de la mitose, le noyau migre à la jonction entre la cellule mère et la cellule fille (bourgeon). Le noyau se divise et un septum est formé à la jonction, au niveau d'un site déterminé par un anneau de filament (Odds, 1988; Soll et Mitchell, 1983). Enfin, bien que l'on connaisse les étapes générales de la division cellulaire, les stades précis du cycle cellulaire n'ont pas encore été bien définis. Il est probable que ces stades soient similaires à ceux des autres cellules eucaryotes, c'est-à-dire les phases G1, S, G2, et M (Kurtz *et al.*, 1990). Cependant, des données récentes tendent à démontrer une absence de phase G2 (Chibana et Tanaka, 1996).

1.1.3. Génétique de *C. albicans*

Les travaux sur la génétique et la biologie moléculaire de *C. albicans* se sont multipliés ces dernières années. Certains d'entre eux se sont intéressés notamment à la question de la ploïdie de *C. albicans*. Ainsi, Whelan *et al.* (1980) démontrèrent que des isolats cliniques de *C. albicans* irradiés par de faibles doses d'U.V. donnaient naissance à des phénotypes auxotrophes récessifs. Les auteurs en conclurent que le traitement aux U.V. induisait des recombinaisons entraînant des mutations homozygotes et que *C. albicans* devait donc être diploïde. Des estimations de la quantité d'ADN présente dans des souches de *C. albicans* et leur comparaison avec des souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont également venues appuyer l'hypothèse de la diploïdie (Olaiya et Sogin, 1979). Finalement, les nombreuses études faites à ce jour tendent à démontrer que *C. albicans* est diploïde, est hétérozygote pour de nombreux gènes et possède plusieurs mutations récessives. L'hétérozygotie liée à la recombinaison homologe permettrait à cette espèce de générer et de maintenir une diversité génétique essentielle (Scherer et Magee, 1990).

D'autres recherches ont permis de déterminer le nombre de chromosomes présents chez *C. albicans* à l'aide du caryotype et de l'hybridation de «Southern blot»

avec des sondes spécifiques de gènes de *C. albicans*. Malgré les difficultés d'une telle estimation chez une souche diploïde et les nombreux résultats contradictoires, la communauté scientifique semble s'être mise d'accord sur le consensus de huit paires de chromosomes (Pla *et al.*, 1996). La difficulté dans ces études réside dans la grande variation caryotypique existant parmi les différentes souches de *C. albicans* et même au sein d'une même souche. En effet, des changements dans la taille du chromosome R, des recombinaisons homologues entre des chromosomes non homologues (possiblement par l'intermédiaire de séquences répétées), des translocations et des fluctuations dans la ploïdie (supérieur à 2n) sont des événements assez fréquents chez *C. albicans* et peuvent être parfois associés à des changements phénotypiques importants (Pla *et al.*, 1996; Wickes et Petter, 1996).

Finalement, nous pourrions faire un survol des stratégies utilisées pour isoler des gènes de *C. albicans* et de certains outils de biologie moléculaire disponibles pour l'étude de ce microorganisme. Tout d'abord, mentionnons que plusieurs gènes de *C. albicans* ont été isolés par l'intermédiaire de leur analogue chez *S. cerevisiae*. Les principales approches consistent en la complémentation de mutations chez d'autres microorganismes comme *S. cerevisiae* et *Escherichia coli*, l'homologie de séquence avec des gènes connus d'autres organismes et la capacité de certaines séquences de *C. albicans* à conférer de nouveaux phénotypes à des souches de *S. cerevisiae* (Pla *et al.*, 1996; Scherer et Magee, 1990). Le développement de systèmes de transformation chez *C. albicans* marque une étape importante dans l'étude de ce microorganisme. La procédure la plus courante, qui consiste en la formation de sphéroplastes, partage beaucoup de similarités avec celle utilisée pour *S. cerevisiae* (Kurtz *et al.*, 1986). Les premières transformations effectuées chez *C. albicans* étaient intégratives (Kurtz *et al.*, 1986). Ces systèmes sont particulièrement appréciés pour leur capacité à introduire des traits génétiques stables et pour l'élaboration de stratégies d'interruption de gène. Cependant, l'utilisation de *C. albicans* comme hôte lors de clonages de gènes nécessitait la mise au point d'un système de transformation autorépliquatif. Il a fallu pour cela identifier des séquences de *C. albicans* capables de promouvoir la répllication autonome de l'ADN transformant (ARS), car cet organisme ne semble pas posséder de plasmides naturels comme les plasmides 2 μ de *S.*

cerevisiae. La première séquence ARS fut isolée par Kurtz *et al.* (1987) qui établirent que les plasmides portant cette séquence avaient une fréquence de transformation augmentée et s'autorépliquaient dans la levure, souvent sous forme de multimères. D'autres séquences furent ensuite isolées dont ARS2 et ARS3 qui confèrent également la capacité d'autoréplication chez *S. cerevisiae* (Pla *et al.*, 1996). Enfin, tel que mentionné précédemment, la transformation intégrative chez *C. albicans* a permis la construction de mutants par disruption de gènes, processus qui évite les mutations additionnelles accompagnant la mutagenèse traditionnelle chimique ou physique. Parce que *C. albicans* est diploïde, les stratégies d'interruption de gènes sont assez compliquées. La méthode développée par Kelly *et al.* (1987) consistait en l'intégration d'un fragment linéarisé dans une copie du gène à interrompre (*URA3*) et en l'induction d'une recombinaison homologue par traitement aux rayons ultraviolets (U.V.), ce qui rendait la mutation homozygote. Une stratégie plus récente implique l'utilisation du gène *URA3* de *C. albicans* flanqué de deux gènes *hisG* de *Salmonella typhimurium* facilitant son excision. Cette technique plus puissante permet l'interruption de gènes en deux étapes sans utilisation des U.V. (Fonzi et Irwin, 1993).

1.2. Aspect clinique des infections à *C. albicans*

1.2.1. Les différents types de candidoses

Les infections causées par les espèces du genre *Candida* sont appelées candidoses. Elles peuvent être divisées en deux groupes principaux: les candidoses superficielles et les candidoses systémiques. La première catégorie regroupe les infections affectant la cavité orale, les organes génitaux, la peau et les ongles. Les candidoses orales sont les plus communes. Elles comprennent notamment le muguet oral que l'on associe à l'enfance (nouveau-nés) et aux personnes atteintes de maladies sérieuses telles que le diabète, les leucémies et le syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA), et les stomatites très souvent associées au port du dentier. La candidose génitale est dix fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme. Les principaux facteurs de prédisposition pour la candidose vulvo-vaginale

sont le diabète, la grossesse et possiblement la prise d'antibiotiques ou d'anovulants. Puisque la femme en santé peut développer ce type d'infection, il semble que des changements locaux au niveau du vagin (concentration en glycoène et en hormones sexuelles, pH, réponse locale des IgA) soient responsables du passage de *C. albicans* du statut commensal au statut pathogène. Finalement, les candidoses cutanées (peau et ongles) sont beaucoup moins fréquentes. Elles sont associées principalement à des facteurs sous-jacents et surtout à une humidité constante de la peau ou à une macération des tissus. La dernière forme d'infection superficielle est la candidose mucocutanée chronique. Celle-ci affecte simultanément divers sites superficiels, particulièrement la bouche, la peau du visage et les ongles, et ceci pendant des années. Cette forme est rare et est associée à des problèmes d'immunité cellulaire (Odds, 1988).

La deuxième catégorie de candidoses regroupe les infections affectant les organes profonds. Elles peuvent être soit localisées et ne concerner qu'un organe, soit disséminées et atteindre plusieurs organes par transmission des levures par le sang. Virtuellement, tous les organes peuvent être affectés par *C. albicans*. La candidose œsophagienne est relativement commune puisqu'on la retrouve chez 3 à 7 % des patients atteints de cancers (surtout les leucémiques) et environ 10 % des patients atteints du SIDA. De façon générale, les candidoses du tractus gastro-intestinal se développent chez des individus souffrant de cancer ou de toute autre maladie débilitante sous-jacente. Les candidoses rénales, celles des poumons et des bronches, et enfin du système nerveux central sont communes chez les patients atteints de candidoses disséminées mais sont rares ou même inexistantes en tant qu'infections primaires. Finalement, l'endocardite à *Candida* est une forme rare de candidose systémique mais très importante car elle est le plus souvent fatale (70 % de taux de mortalité). Elle se produit surtout chez des patients atteints d'une maladie cardiaque préexistante, en particulier ceux ayant subi une chirurgie à cœur ouvert, et chez les toxicomanes. Signalons en passant que la majorité de ces infections sont dues à l'espèce *C. albicans*. Enfin, la candidose disséminée, aussi appelée candidose généralisée, est en augmentation en raison du nombre important de patients immunodéprimés ou ayant subi une chirurgie majeure. Le plus grand nombre de cas

se retrouve chez les leucémiques et les personnes ayant subi une greffe. Deux portes d'entrées majeures semblent exister: le passage des levures de l'intestin au système sanguin et la contamination via les cathéters intraveineux.

1.2.2. Facteurs de risque généraux

C. albicans est une levure présente sous forme commensale dans de nombreuses parties du corps humain et d'autres animaux à sang chaud. Le tractus gastro-intestinal est le site le plus fréquemment colonisé chez l'homme et plus de 50 % des individus seraient porteurs de *C. albicans* à ce niveau. On retrouve également ce champignon dans la bouche de plus d'un tiers des individus et dans le vagin de 20 % des femmes (Odds, 1988). Malgré sa fréquente présence dans l'organisme humain, *C. albicans* est rarement la cause d'une maladie chez l'hôte dont les défenses immunitaires sont intactes. Cependant, l'équilibre entre les défenses de l'hôte et les caractéristiques pathogéniques de *C. albicans* peut parfois être affecté, ce qui permet l'invasion des tissus par le microorganisme et une infection subséquente. Les facteurs de risque susceptibles d'affecter l'équilibre hôte/*C. albicans* peuvent être regroupés en quatre grandes catégories (Odds, 1988):

naturels: maladies infectieuses, congénitales ou débilitantes (désordres endocriniens, déficience des mécanismes immunitaires, cancers); grossesse; très jeune enfance (nouveau-nés);

diététiques: excès ou carence en composés qui pourraient altérer la composition de la flore microbienne (diète riche en glucides, carence en vitamines);

mécaniques: brûlures, blessures, occlusions locales, macération des tissus;

iatrogéniques: traitements avec des drogues qui altèrent la composition de la flore microbienne ou les défenses de l'hôte (antibiotiques, corticostéroïdes, agents immunodépresseurs); procédures chirurgicales (transplantation d'organes, chirurgies à cœur ouvert, utilisation de cathéters intraveineux pour la nutrition parentérale).

Au cours des trois dernières décennies, l'incidence des infections produites par *C. albicans* a augmenté significativement. La raison principale semble résider dans les progrès de la science médicale elle-même. En effet, de nombreuses populations de patients très susceptibles aux infections bénéficient maintenant d'une survie prolongée. C'est le cas des individus atteints de cancers, d'immunodéficiences telles que le SIDA ou d'autres maladies chroniques sévères. Par ailleurs, le traitement de certains de ces patients exige l'utilisation d'immunodépresseurs ou d'immunomodulateurs (cancers, greffes), ce qui accentue le risque d'infections plus sérieuses telles que les candidoses disséminées. Les soins intensifs pour enfants prématurés constituent également un progrès de la médecine qui a fourni à *C. albicans* l'opportunité de passer du stade commensal au stade pathogène. L'emploi courant de cathéters intraveineux et la nutrition parentérale prolongée sont des procédures qui fourniraient des foyers d'infection locale ou systémique. Finalement, l'utilisation répandue d'antibiotiques à large spectre contribue à diminuer la flore bactérienne normale des patients et favoriserait le développement et la pathogénicité des levures telles que *C. albicans* (Kurtz *et al.*, 1990; Beck-Sagué *et al.*, 1993).

Approfondissons maintenant le sujet avec l'étude de certaines populations à risque. Au cours des dernières décennies, les infections fongiques ont vu leur fréquence augmenter considérablement chez les patients atteints de cancers. Ces infections sont une cause fréquente d'échec dans le traitement de ces patients et sont devenues un facteur majeur contribuant à la mortalité chez cette population d'individus. La candidose est certainement l'infection fongique la plus fréquente et est majoritairement causée par *C. albicans*. Signalons à ce propos que jusqu'à 30 % des patients atteints de leucémies aiguës et autres cancers hématologiques développent une candidose disséminée sous forme aiguë ou chronique (Odds, 1988; Anaissie, 1992). Un des plus importants facteurs responsable de l'augmentation de la fréquence des candidoses chez ces patients est sans aucun doute la neutropénie induite par certaines drogues cytotoxiques utilisées en chimiothérapie. En effet, les neutrophiles seraient la première ligne de défense de l'organisme contre l'infection par *C. albicans*.

Par ailleurs, la chimiothérapie peut également entraîner des ulcérations dans l'oropharynx et le tractus gastro-intestinal, ce qui fournirait à *C. albicans* des sites d'invasion menant potentiellement à la candidose disséminée (Anaissie, 1992).

Les individus atteints du SIDA forment une population grandissante de patients susceptibles de développer des infections à *C. albicans*. Généralement, ces patients présentent des candidoses superficielles, touchant principalement la cavité buccale, l'œsophage et la peau (candidoses mucocutanées), et habituellement contrôlées par l'immunité cellulaire (lymphocytes T). Plus de 90 % des sidéens vont développer un muguet oral. Parallèlement, le SIDA est devenu la cause majeure de l'augmentation du nombre de cas de candidoses mucocutanées (Diamond, 1991).

De façon générale, les infections nosocomiales, c'est-à-dire acquises à l'hôpital, contribuent pour une grande part à l'accroissement du taux de candidoses et autres infections fongiques observé au cours des décennies passées. En effet, un nombre grandissant de patients présentent un ou plusieurs facteurs de risques tels que mentionnés ci-dessus. Le problème est d'autant plus grave que ces infections fongiques nosocomiales sont souvent sévères, difficiles à diagnostiquer et réfractaires aux thérapies (Beck-Sagué *et al.*, 1993). Une étude effectuée dans 115 hôpitaux des Etats-Unis démontre que la proportion des infections nosocomiales dues à des pathogènes fongiques est passée de 6 % à 10,4 % entre 1980 et 1990 (Beck-Sagué *et al.*, 1993). Les sites principaux de ces infections étaient les plaies chirurgicales, les poumons, le tractus urinaire et surtout le sang (septicémies) où l'augmentation des infections fongiques était la plus importante. Il est intéressant de noter à ce propos que 78,3 % des infections fongiques nosocomiales étaient attribuées à des espèces du genre *Candida* et 59,7 % attribuées à la seule espèce *C. albicans*.

Les infections fongiques sont donc un problème grandissant dans notre société auquel la médecine moderne n'arrive pas toujours à faire face. En outre, *C. albicans* semble être l'espèce le plus souvent responsable des infections fongiques nosocomiales et il importe donc de comprendre les mécanismes de pathogenèse de ce champignon.

1.3. Pathogénèse et mécanismes de défense de l'hôte

Comme nous l'avons vu précédemment, le tractus gastro-intestinal est le site majeur colonisé chez l'homme. Chez l'hôte immunodéprimé, il devient la porte d'entrée principale aux candidoses disséminées. Le phénomène se caractérise par l'invasion de la muqueuse par *C. albicans* et par le passage du microorganisme dans le système sanguin où il pourra aller contaminer d'autres organes (Odds, 1988). Pour ces raisons, plusieurs groupes de recherche ont porté une attention particulière à ce site anatomique. L'un d'entre eux a établi que l'inoculation orale-intragastrique de *C. albicans* chez de très jeunes souris menait à l'invasion de la paroi intestinale par les blastoconidies (Cole *et al.*, 1988). Par ailleurs, d'autres études ont porté sur l'effet d'une immunodépression, induite par la cyclophosphamide et la cortisone, de souris présentant une colonisation persistante du tractus gastro-intestinal par *C. albicans*. Leurs résultats démontrèrent que l'immunodépression engendrait une augmentation considérable du nombre de levures dans l'estomac et l'intestin, l'invasion de la muqueuse intestinale et la dissémination systémique des levures (Cole *et al.*, 1989; de Repentigny *et al.*, 1992). Ce modèle est particulièrement intéressant puisqu'il imite la situation de nombreux patients présentant une colonisation gastro-intestinale et subissant des traitements immunodépresseurs pour un problème particulier. Finalement, des observations microscopiques ont démontré que l'invasion intracellulaire des cellules épithéliales de l'intestin était précédée par la digestion extracellulaire de la couche de mucine (glycoprotéine de masse moléculaire très élevée) et des microvillosités recouvrant l'épithélium intestinal (de Repentigny *et al.*, 1992; Cole *et al.*, 1988). La présence d'une activité mucinolytique pourrait donc être un atout majeur de *C. albicans* lui permettant de passer cette barrière et d'adhérer aux cellules épithéliales.

De façon générale, on peut diviser le processus pathogénique de *C. albicans* en différentes étapes auxquelles sont associés divers facteurs de virulence putatifs (Figure 1). Ces facteurs agiraient de manière séquentielle et coopérative pour établir l'infection. Parmi les principaux, on retrouve les adhésines qui permettent à *C.*

albicans d'adhérer aux tissus et les protéases aspartiques sécrétées (Sap), qui auraient un rôle dans l'adhérence aux muqueuses, dans la dégradation des immunoglobulines A sécrétoires (IgAs), et dans l'invasion des tissus par leur activité kératinolytique et collagénolytique. La sécrétion de phospholipases contribue également au pouvoir pathogénique de *C. albicans* en lui permettant d'endommager les membranes cellulaires, ce qui favoriserait la pénétration des tissus. Finalement, le dimorphisme conférerait au champignon la capacité de s'adapter à son environnement et participerait au processus d'invasion. Tous ces facteurs, ainsi que leur rôle dans la pathogénèse, seront décrits plus en détail dans la deuxième partie de

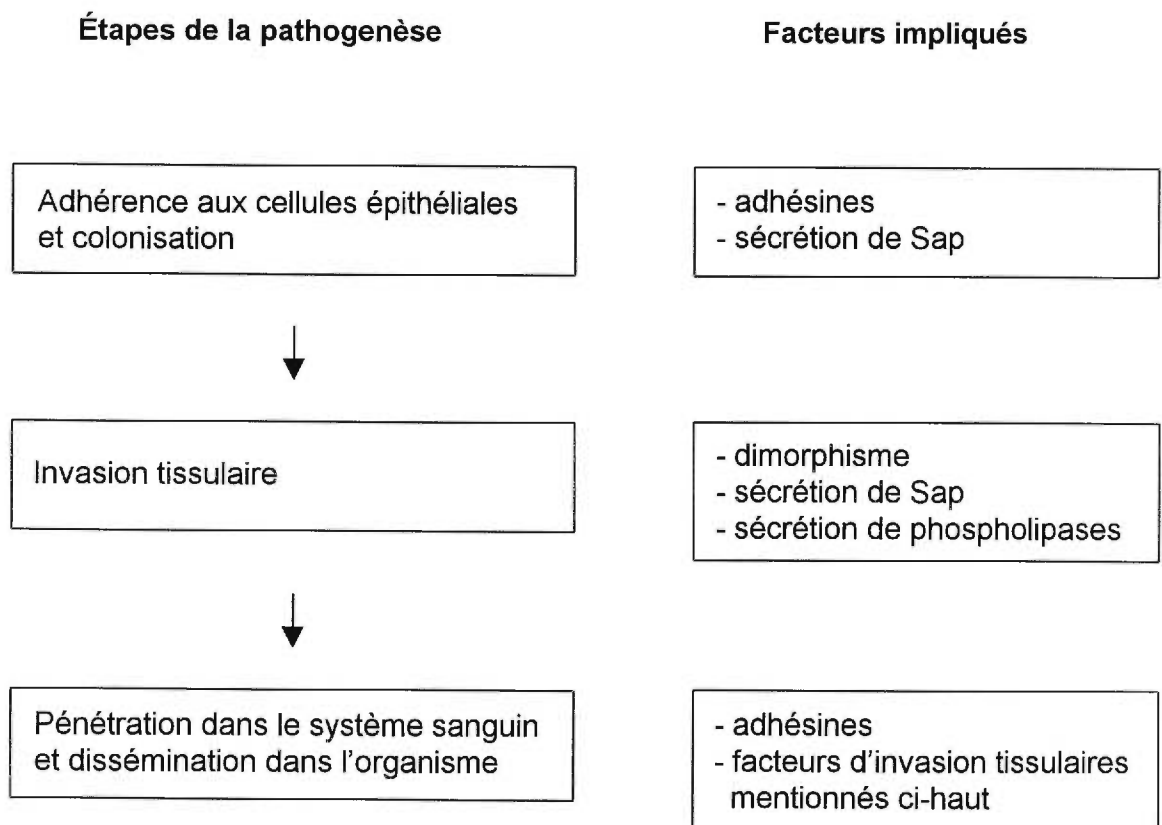


Figure 1: Schématisation des grandes étapes de la pathogénèse de *C. albicans* et indication des facteurs de virulence principaux impliqués dans chacune d'entre elles.

la revue de la littérature. Mentionnons également que ce chapitre traitera de deux autres propriétés importantes de *C. albicans*: le changement phénotypique, qui procure la diversité nécessaire pour l'adaptation aux différents environnements et situations que le champignon rencontre, et la résistance aux antibiotiques qui ne fait pas partie du processus de pathogénèse mais qui confère à *C. albicans* un avantage non négligeable. En terminant, il est essentiel de comprendre que malgré la présence de tous ces facteurs de virulence, *C. albicans* ne réussit à causer une infection que chez l'hôte immunodéprimé ou présentant certains facteurs de risque.

Les interactions entre les facteurs de virulence de *C. albicans* et les mécanismes de défense de l'individu vont déterminer l'issue de la relation champignon/hôte. Si les mécanismes de défense sont compromis, l'équilibre entre *C. albicans* et l'hôte peut ainsi être rompu en faveur du microorganisme. De façon générale, on peut classer ces mécanismes en trois grandes catégories: les barrières anatomiques, la flore endogène et les différentes composantes du système immunitaire. Le premier obstacle rencontré par *C. albicans* est sans aucun doute la peau et les muqueuses. Les facteurs compromettant l'intégrité de ces barrières (macération, cathéters, chimiothérapie entraînant des ulcérations) vont prédisposer l'hôte aux infections par des microorganismes (Ghannoum, 1988). La flore bactérienne endogène semble être également un mécanisme de défense important contre *C. albicans*. En effet, des expériences effectuées chez des souris ont permis d'établir que la diminution de la flore bactérienne dans le tractus gastro-intestinal, causée par l'utilisation d'antibiotiques, favorisait la croissance excessive et la dissémination de *C. albicans* (Kennedy et Volz, 1983). Par ailleurs, il semblerait que cette action inhibitrice de la flore bactérienne soit principalement due aux bactéries anaérobies strictes qui prédominent dans l'intestin (Kennedy et Volz, 1985a). Elle s'exercerait par la formation d'une couche de bactéries dans le mucus, compétitionnant ainsi avec *C. albicans* pour les sites d'adhésion, et par la production de substances inhibitrices (Kennedy et Volz, 1985b).

Les différentes composantes de l'immunité acquise, innée et du complément constituent des mécanismes de défenses majeurs contre les infections à *C. albicans*.

Lors d'une invasion des tissus par le champignon, les leucocytes polymorphonucléaires (PMN), puis les macrophages (monocytes phagocytaires), arrivent sur les lieux de l'inflammation. Ces cellules phagocytaires constituent la première ligne de défense, et possiblement la principale, contre *C. albicans*. De fait, il a été démontré que les PMN et les macrophages étaient capables d'ingérer et de tuer *C. albicans* (Kagaya et Fukasawa, 1981). En outre, plusieurs maladies comme la déficience en myéloperoxydase, les lymphomes et les leucémies, et certaines chimiothérapies intensives sont caractérisées par une diminution de la phagocytose et/ou de l'action létale des phagocytes. Or, ces maladies ou conditions sont toutes connues pour être des facteurs de risques prédisposant aux candidoses disséminées (Odds, 1988). D'autres études réalisées sur des modèles animaux viennent confirmer le rôle primordial des cellules phagocytaires dans la lutte contre *C. albicans*. L'une d'entre elles, par exemple, établit une corrélation entre un déficit en PMN induit chez la souris par la cyclophosphamide et une susceptibilité accrue à la candidose disséminée (Hurtrel *et al.*, 1980). Finalement, les PMN joueraient un rôle majeur dans la résistance contre la candidose et seraient plus efficaces que les macrophages, bien que ces derniers semblent avoir une contribution non négligeable (Hurtrel *et al.*, 1980; Kagaya et Fukasawa, 1981). Les deux types de cellules auraient des mécanismes similaires d'ingestion et d'élimination de *C. albicans*. Les principaux mécanismes d'élimination seraient le système de la myéloperoxydase et autres systèmes oxydatifs, et la production de peptides cationiques capables de tuer *C. albicans* (Odds, 1988).

Les antigènes de *C. albicans* peuvent stimuler la formation d'anticorps spécifiques. Cependant, les résultats contradictoires obtenus lors d'expériences d'immunisation passive ou active d'animaux contre *C. albicans* rendent l'évaluation du rôle de l'immunité humorale bien difficile (Odds, 1988). Certaines études, comme celle effectuée sur des souris déficientes en lymphocytes B (Maiti *et al.*, 1985), tendent quand même à démontrer une contribution des anticorps dans la protection contre la candidose disséminée. L'immunité cellulaire spécifique, quant à elle, aurait un rôle plus important à jouer dans la résistance aux candidoses. En effet, dans la candidose mucocutanée chronique, la pathologie cutanée sévère est le plus souvent associée à une immunité cellulaire faible. Les patients atteints du SIDA, qui possèdent une

immunité cellulaire défectueuse, développent très fréquemment des formes superficielles de candidoses. Les lymphocytes T contribueraient donc significativement à la résistance aux infections causées par *Candida*. Une expérience de transfert passif de lymphocytes T, provenant de souris immunisées, a permis de démontrer que l'immunité cellulaire serait requise dans les stades tardifs de l'infection disséminée, alors que les cellules phagocytaires joueraient un rôle dans les stades précoces (Miyake *et al.*, 1977). Cependant, d'autres résultats contradictoires ont été obtenus dans des recherches portant également sur l'immunité passive contre *C. albicans* (Odds, 1988). Plus récemment, des études effectuées sur des souris présentant une immunodéficiência combinée sévère (SCID), c'est-à-dire ne possédant pas de lymphocytes B et T fonctionnels, ont démontré un rôle de ces lymphocytes dans la résistance à la colonisation gastro-intestinale par *C. albicans*. Par contre, même en absence des lymphocytes B et T, la dissémination de l'infection à partir du tractus gastro-intestinal ne se produisait pas (Narayanan *et al.*, 1991), ni la dissémination à partir d'une inoculation intraveineuse de *C. albicans* (Mahanty *et al.*, 1988). D'autres mécanismes, probablement les cellules phagocytaires, contribueraient à la résistance contre la candidose disséminée d'origine localisée (tractus gastro-intestinal) ou systémique (inoculation intraveineuse).

La résistance de l'hôte à la candidose semble donc dépendre de divers mécanismes de défense. Les différentes composantes du système immunitaire agissent de façon séquentielle et/ou coopérative. Cependant, l'importance relative de chacune d'entre elles diffère beaucoup. En effet, la réponse immunitaire majeure serait constituée des phagocytes, qui conféreraient plus particulièrement la résistance de l'individu aux candidoses disséminées. Par contre, les lymphocytes T contribueraient à la résistance aux candidoses superficielles. Les lymphocytes B auraient un rôle plus mineur. Si la panoplie de ces mécanismes de défense est altérée, *C. albicans* peut alors causer une infection grâce à différents facteurs de virulence dont nous allons discuter dans le prochain chapitre.

2. LES FACTEURS DE VIRULENCE DE *CANDIDA ALBICANS*

De nombreux facteurs de virulence putatifs sont associés à la pathogénèse de *C. albicans*. Les principaux d'entre eux sont l'adhérence, le dimorphisme (transition levure/hyphes), les changements phénotypiques tels que la transition blanc/opaque, et la sécrétion d'enzymes lytiques telles que les Sap («secretory aspartyl proteinase») ou les phospholipases. Il est intéressant de noter que ces mêmes facteurs ne semblent pas pouvoir supplanter les défenses de l'hôte normal, mais permettent plutôt au champignon commensal de coloniser les muqueuses. Par contre, chez l'hôte immunosupprimé, l'équilibre dynamique entre les mécanismes de défense de l'hôte et le champignon tourne à la faveur de ce dernier, grâce à la présence de ces mêmes facteurs (Odds, 1988; Cutler, 1991).

2.1. L'adhérence

C. albicans est capable d'adhérer à toutes sortes de surfaces comme les épithéliums, l'endothélium vasculaire et les plastiques (Odds, 1988). L'adhésion aux cellules épithéliales est très importante puisqu'elle permet à *C. albicans* de s'implanter au niveau des muqueuses et éventuellement de les coloniser, ce qui correspond aux étapes les plus précoces de la candidose. Par ailleurs, si le champignon traverse les muqueuses, il se retrouvera éventuellement dans le système sanguin. Là, sa capacité d'adhérer à l'endothélium lui permettra d'infecter différents organes, engendrant ainsi une candidose disséminée.

Plusieurs études ont cherché à évaluer l'adhérence relative de différentes espèces de *Candida*. Leurs résultats démontrent que *C. albicans* est l'espèce qui adhère le plus aux épithéliums et à l'endothélium vasculaire. Ensuite, viennent *C. tropicalis*, qui possède une bonne adhérence, et les autres espèces comme *C. parapsilosis* dont l'adhérence est beaucoup plus faible (King *et al.*, 1980; Klotz *et al.*, 1983). Par ailleurs, le degré d'adhésion de différentes souches de *C. albicans* a été corrélé avec le niveau de virulence dans un modèle animal, ce qui confirme

l'importance de ce facteur dans la pathogénèse de la candidose (McCourtie et Douglas, 1984).

L'adhérence de *C. albicans* n'est pas un phénomène statique. De nombreux facteurs viennent l'influencer. Ainsi, les tubes germinatifs sont de façon générale plus adhérents que les blastoconidies (Sandin *et al.*, 1982), ce qui pourrait être expliqué par une synthèse «de novo» de glycoprotéines spécifiques à la forme hyphale (Calderone et Braun, 1991). Par ailleurs, le milieu de culture influence grandement la capacité d'adhésion des levures. Un groupe de chercheurs a ainsi remarqué que la présence de sucres à haute concentration (500 mM), tout comme la substitution du glucose par du galactose ou du sucrose, favorisent l'adhérence de *C. albicans* (Douglas *et al.*, 1981). D'autres facteurs tels que la souche étudiée ou le type de tissu ont également une incidence sur l'adhérence. Finalement, la capacité d'adhésion *in vivo* fait intervenir les facteurs suivants: les forces physiques (salive, contractions péristaltiques, flux sanguin et urinaire), les interactions hydrophobes entre *C. albicans* et les surfaces de l'hôte, le phénomène d'agrégation, les adhésines (pour la plupart des mannoprotéines) et d'autres facteurs comme les Sap dont le rôle sera discuté dans une partie distincte (Pendrak et Klotz, 1995). Parmi les facteurs propres à *C. albicans*, l'hydrophobicité et les adhésines ont été largement étudiés à cause de leur relative importance. Ainsi, Hazen *et al.* (1991) ont établi que les levures dont la surface est hydrophobe adhèrent mieux aux tissus que les hydrophiles. Cependant, le fait que des souches ayant le même niveau d'hydrophobicité n'adhèrent pas toutes de façon identique indique l'existence d'autres mécanismes d'adhésion. Les adhésines, relativement importantes, sont des récepteurs ou autres protéines qui établissent des interactions levure/cellule hôte de deux types: les interactions protéine-protéine et celles de type lectine ou protéine-sucre, dont nous allons discuter de façon plus approfondie.

2.1.1. Interactions protéine-protéine

L'adhérence à l'épithélium et à l'endothélium ferait intervenir des interactions entre les parties protéiques de différentes molécules des surfaces de *C. albicans* et de

l'hôte. Au niveau de l'épithélium, l'adhésine la plus étudiée est sans aucun doute l'analogue d'intégrine qui se lie au fragment iC3b du complément. Les intégrines, chez les mammifères, sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires exprimées à la surface d'une grande variété de cellules comme les cellules endothéliales, épithéliales et les leucocytes. Leurs ligands, dont font partie les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et la laminine, possèdent presque tous une séquence arginine-glycine-acide aspartique (RGD) qui semblerait être reconnue par les intégrines. Or, il a été établi qu'une protéine de la surface de *C. albicans* possède une homologie antigénique, fonctionnelle et structurelle avec les sous-unités α_M et α_X des intégrines CR3 et CR4 respectivement, dont le ligand commun est la molécule iC3b (Hostetter, 1994). Par ailleurs, une étude a démontré une corrélation entre l'expression de cet analogue d'intégrine à la surface de *C. albicans* et l'adhésion aux cellules épithéliales (Bendel *et al.*, 1995). Des études d'inhibition ont également confirmé que l'intégrine de *C. albicans* reconnaissait le site RGD de iC3b (molécule exprimée à la surface de nombreuses cellules épithéliales), occasionnant ainsi l'adhérence du champignon (Bendel et Hostetter, 1993). De plus, le récepteur de iC3b sur *C. albicans* semblerait également réduire la phagocytose du champignon par les leucocytes polymorphonucléaires, en raison de la compétition entre les deux cellules pour le site de liaison à iC3b du complément (court-circuitage des mécanismes d'opsonisation) (Gilmore *et al.*, 1988). Finalement, le gène *INT1* codant pour une intégrine putative a été récemment cloné à partir d'une banque d'ADN génomique de *C. albicans* et d'une sonde représentant une partie du domaine transmembranaire de α_M de l'intégrine humaine CR3. La protéine correspondante de 188 kDa possède plusieurs motifs des intégrines humaines dont le domaine de liaison à la séquence RGD. Fait intéressant, cette protéine de la surface cellulaire contiendrait également un motif RGD interne qui pourrait promouvoir l'agrégation des levures entre elles. Par ailleurs, l'expression hétérologue de ce gène chez *Saccharomyces cerevisiae* a induit la production de tubes germinatifs (Gale *et al.*, 1996) et l'adhésion aux cellules épithéliales de cette levure qui n'y adhère pas normalement (Gale *et al.*, 1998). Enfin, l'interruption du gène *INT1* chez *C. albicans* a entraîné une suppression

de la croissance hyphale, de l'adhésion aux cellules épithéliales et de la virulence *in vivo* de ce champignon (Gale *et al.*, 1998).

La fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire, est également présente à la surface des cellules épithéliales buccales et vaginales. Par ailleurs, il a été démontré que *C. albicans* avait une affinité pour la fibronectine *in vitro* et que l'adhésion du champignon aux cellules épithéliales était réduite par une préincubation avec cette même glycoprotéine (Skerl *et al.*, 1984). Cependant, les résultats obtenus à propos de l'éventuelle participation à l'adhésion épithéliale d'un récepteur de *C. albicans* spécifique de la fibronectine sont discordants. Par contre, la participation d'un tel récepteur à l'adhésion endothéliale est beaucoup plus certaine (Hostetter, 1994).

L'adhérence de *C. albicans* à l'endothélium a été observée *in vitro* et *in vivo*, et semble faire intervenir deux phénomènes: l'adhésion aux cellules endothéliales elles-mêmes et l'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire (membrane basale et tissu conjonctif) qui sont exposées au niveau des glomérules ou lors d'un traumatisme (Klotz, 1994). L'endothélium est composé d'une couche de cellules endothéliales qui expriment à leur surface différentes protéines dont la molécule iC3b. Sous les cellules épithéliales se retrouvent la membrane basale et ensuite le tissu conjonctif dont les glycoprotéines majeures sont la laminine et le collagène de type IV, et la fibronectine et le collagène de type I, respectivement. Notons que le plasma circulant dans les vaisseaux sanguins contient lui aussi des protéines de la matrice extracellulaire dont les principales sont la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène (Klotz, 1994).

Nous avons mentionné plus tôt que les cellules endothéliales exprimaient iC3b à leur surface. Par ailleurs, un récepteur de iC3b, analogue à la chaîne α des intégrines $\beta 2$ CR3 et CR4 est présent à la surface de *C. albicans*. On pourrait donc supposer un rôle pour cet analogue d'intégrine dans l'adhésion à l'endothélium. Cette hypothèse a été vérifiée par de nombreux auteurs dont Gustafson *et al.* (1991) qui ont établi que iC3b ou un anticorps anti-CR3 était capable d'inhiber l'adhésion de *C. albicans* aux cellules endothéliales.

Le deuxième type d'interaction, au niveau de l'adhérence à l'endothélium, fait intervenir les protéines de la matrice extracellulaire de la membrane basale et du tissu

conjonctif. En règle générale, *C. albicans* adhère de façon plus avide à la matrice extracellulaire qu'aux cellules endothéliales elles-mêmes (Klotz et Maca, 1988). Cette propriété semble d'une relative importance puisque certains agents de chimiothérapie et certaines endotoxines peuvent entraîner l'exposition de la matrice extracellulaire de l'endothélium (Orr *et al.*, 1986). Par ailleurs, la liaison spécifique de *C. albicans* à la fibronectine, la laminine et au fibrinogène a été observée (Skerl *et al.*, 1984; Bouchara *et al.*, 1990, Bouali *et al.*, 1987). Le récepteur de la fibronectine, bien étudié, semble prendre une part importante dans l'adhésion endothéliale. Tout d'abord, il a été démontré que la fibronectine et des peptides dérivés contenant la séquence RGD inhibaient l'adhésion de *Candida albicans* à la matrice extracellulaire sous l'endothélium (Klotz et Smith, 1991). Ensuite, un anticorps dirigé contre le récepteur humain de la fibronectine (intégrine de type $\beta 1$) a reconnu le récepteur de la fibronectine de *C. albicans* et a inhibé la liaison iC3b/*C. albicans*, causant une inhibition de l'adhérence du champignon aux cellules endothéliales. Cette dernière information nous laisserait penser que les récepteurs de iC3b et de la fibronectine seraient des intégrines similaires ou localisées à des sites adjacents à la surface de *C. albicans* (Klotz, 1994). La laminine, le collagène de type I et IV, et le fibrinogène, sont également des protéines auxquelles adhère *C. albicans* (Klotz, 1994). Il est intéressant de noter à ce propos que les protéines proposées comme récepteurs de la laminine et du fibrinogène ont la même masse moléculaire, c'est-à-dire 68 kDa et un doublet de 60-62 kDa. Par surcroît, Klotz *et al.* (1994) ont isolé de la surface cellulaire de *C. albicans* une protéine liant la fibronectine de 60 kDa. Il serait alors tentant de proposer un même récepteur pour ces trois protéines, mais les études d'inhibition contredisent cette hypothèse puisqu'elles semblent démontrer que ces trois ligands ne sont pas forcément interchangeables (Hostetter, 1994). Il serait pertinent de mentionner ici que les interactions entre les adhésines de *C. albicans* et les protéines de la matrice extracellulaire ont jusqu'à présent été considérées comme des interactions structurelles mettant en œuvre la reconnaissance de séquences RGD. Cependant, Masuoka *et al.* (1998) ont récemment constaté l'implication possible d'interactions hydrophobes dans l'attachement à ces protéines. Ces interactions se

produiraient entre un antigène hydrophobe de la paroi de *C. albicans* et la région hydrophobe entourant les sites RGD des protéines de la matrice extracellulaire.

En dernière analyse, nous pouvons conclure que les protéines de la matrice extracellulaire contenues dans la membrane basale et dans le tissu conjonctif (fibronectine, collagène, laminine) permettraient à *C. albicans* d'adhérer à l'endothélium. Par contre, les glycoprotéines solubilisées dans le plasma sanguin, dont font partie la fibronectine et le fibrinogène, auraient l'effet inverse du fait de l'occupation des sites de liaison pour les mêmes protéines présentes dans l'endothélium. Cette dernière affirmation pourrait être intéressante dans la recherche d'une thérapie. Ainsi, une étude *in vivo* a établi que l'injection à des lapins de peptides dérivés de la fibronectine permettait de réduire le nombre de levures présentes dans différents organes (Klotz *et al.*, 1992).

2.1.2. Interactions protéine-sucre

Le deuxième type d'interaction entre adhésines fait intervenir une composante saccharidique et une composante protéique. Ce type d'interaction a été impliqué dans des phénomènes d'adhérence aux cellules épithéliales seulement. Les premiers travaux portant sur le sujet ont établi que des composantes de la couche fibrillaire de glycoprotéines de la paroi de *C. albicans* (couche la plus externe) étaient capables d'inhiber l'adhérence des levures aux cellules épithéliales buccales (McCourtie et Douglas, 1985). Par ailleurs, le même groupe avait corrélé la production de cette couche fibrillaire externe (en milieux à haute teneur en sucres) à l'augmentation de l'adhérence et de la virulence de *C. albicans* (McCourtie et Douglas, 1984). La purification du matériel de la couche fibrillaire capable d'inhiber l'adhésion de *C. albicans* aux cellules épithéliales a apporté une meilleure compréhension des mécanismes d'adhésion qui lui sont reliés. Tout d'abord, la couche fibrillaire contient des mannoprotéines dont la partie protéique de 15,7 kDa est nécessaire pour l'adhésion (Critchley et Douglas, 1987a). Ensuite, selon la souche testée, ces mannoprotéines possèdent une activité lectine envers le L-fucose (plus fréquent) ou le N-acetyl-D-glucosamine (Critchley et Douglas, 1987b). Dans le cas d'une activité

lectine pour le fucose, la structure minimale requise pour l'attachement des levures est le disaccharide Fuc α 1-2Gal β qui correspond à l'antigène H du système sanguin ABO et qui est retrouvé au niveau des glycoprotéines et des glycolipides des cellules animales. Ce disaccharide servirait donc de récepteur pour *C. albicans* lors de son attachement aux cellules épithéliales (Brassart *et al.*, 1991).

Plus récemment, un deuxième type d'interaction protéine-sucre permettant l'adhésion de *C. albicans* aux cellules épithéliales a été étudié. Ce mécanisme d'adhérence ferait intervenir une mannoprotéine, entrant dans la composition des fimbriae de surface de *C. albicans*, et un récepteur spécifique sur les cellules épithéliales buccales, soit les glycosphingolipides. Les auteurs de cette étude ont démontré que la sous-unité structurelle principale des fimbriae était une glycoprotéine possédant une partie protéique de 8,6 kDa et qu'elle agissait comme adhésine en permettant l'attachement de *C. albicans* aux cellules épithéliales buccales (Yu *et al.*, 1994a). Par ailleurs, il semble que la structure reconnue par les fimbriae à la surface des cellules épithéliales soit le disaccharide β GalNAc(1-4) β Gal présent dans les glycosphingolipides (Yu *et al.*, 1994).

Une dernière adhésine, moins bien étudiée, permettrait à *C. albicans* de se lier spécifiquement aux macrophages de la rate. Fait intéressant, cette adhésine serait une mannoprotéine dont la partie glucidique, cette fois, serait impliquée dans l'attachement. Ainsi, le récepteur sur les macrophages aurait une activité lectine spécifique envers le β -1,2-tétramannose présent dans l'adhésine à la surface de *C. albicans* (Li et Cutler, 1993). Ce dernier mécanisme d'adhérence aurait une implication non négligeable dans la pathogenèse des candidoses disséminées.

Compte tenu de ces considérations, il apparaît que les mécanismes d'adhérence de *C. albicans* sont multiples et dépendent de nombreux facteurs tels que la souche et le type de cellules ciblées. Par ailleurs, les Sap semblent également prendre une part active dans le processus d'adhérence. Ce point sera discuté dans le chapitre consacré à ces protéines.

2.2. Le dimorphisme et le changement de phénotype

2.2.1. Le dimorphisme

Candida albicans peut prendre deux formes différentes: la forme levure (blastoconidie ou blastospore) et la forme hyphale. Ce dimorphisme est depuis longtemps considéré comme un atout majeur dans la pathogenèse de ce champignon. Cependant, la plupart des études se sont tournées vers les hyphes en particulier et non vers le phénomène général du dimorphisme. En effet, leurs auteurs considéraient la forme hyphale comme la forme virulente et la forme levure comme la forme commensale (Odds, 1988). De nombreuses observations viennent encore appuyer cette hypothèse. Tout d'abord, les hyphes semblent avoir une meilleure adhérence que les blastospores (Sandin *et al.*, 1982). Par ailleurs, les observations microscopiques tendent à démontrer une prédominance de la forme hyphale dans les phénomènes de pénétration tissulaire (Odds, 1988). Enfin, les hyphes sembleraient jouer un rôle important dans la résistance aux cellules phagocytaires. Ainsi, des levures phagocytées *in vitro* par des macrophages alvéolaires sont capables de proliférer, de former des tubes germinatifs et de s'échapper ainsi des macrophages qui sont alors détruits (Arai *et al.*, 1977). Une autre étude, cette fois effectuée *in vivo* grâce à un modèle de candidose rénale, a établi que les levures survivent à l'ingestion des cellules phagocytaires par leur conversion en hyphes dans les premières étapes de l'infection (Barnes *et al.*, 1983).

Malgré ces évidences, la littérature globale portant sur le sujet tend à démontrer qu'il n'y a pas vraiment de forme plus importante dans la virulence du champignon. En effet, les coupes d'organes infectés lors de candidoses disséminées présentent presque toujours une combinaison de levures et d'hyphes (Odds, 1988). Par ailleurs, Klotz *et al.* (1983) ont indiqué que la forme levure était capable d'adhérer et de traverser la surface endothéliale avant même toute production de tubes germinatifs. La supposition que seule la forme hyphale serait responsable de l'invasion tissulaire peut être alors remise en question. D'autres faits viennent corroborer l'hypothèse de l'importance des deux formes dans la virulence de *C.*

albicans. Comme nous l'avons vu plus tôt, la formation d'hyphes après ingestion permettrait au champignon d'échapper aux cellules phagocytaires. Cependant, la forme hyphale avant ingestion est tuée par dégranulation des neutrophiles (Lyman *et al.*, 1987). De plus la forme hyphale est tout aussi bien phagocytée par les leucocytes polymorphonucléaires que la forme levure et, une fois phagocytée, paraît même moins résistante aux mécanismes intracellulaires que la forme levure (Cockaine et Odds, 1984). Ceci peut expliquer le fait que l'inoculation d'hyphes préformés à des animaux dans des modèles de candidoses disséminées n'entraîne pas une virulence accrue par rapport à l'inoculation de levures (Odds, 1988).

De nombreuses études portant sur des mutants morphologiques ont été effectuées. L'une d'entre elles a utilisé deux mutants naturels. L'un était incapable de former des tubes germinatifs, l'autre ne présentait que des pseudohyphes. Inoculés oralement à des rats, aucun des deux n'a réussi à induire une candidose orale (Martin *et al.*, 1984). Les auteurs en conclurent que la présence de vrais hyphes était indispensable au potentiel pathogène de *C. albicans*. Cependant, Sobel *et al.* (1984) ont montré qu'une souche incapable de former des tubes germinatifs à 37 °C était apte à coloniser la muqueuse vaginale et à engendrer une infection, mais de façon moins virulente que la souche parentale. Enfin, Shepherd *et al.* (1985) ont étudié, dans un modèle de candidose disséminée, la virulence de souches sauvages inoculées sous la forme hyphale ou levure et de mutants morphologiques (hyphes ou blastoconidies seulement) dérivés d'une de ces souches. Dans tous les cas, les formes levures et hyphales ont réussi à adhérer, envahir et proliférer chez l'hôte. Ces résultats intéressants permettent de supposer que chaque forme de *C. albicans* est potentiellement pathogène. Cependant, ils doivent être considérés avec précaution en raison du traitement à la nitrosoguanidine utilisé pour la production des mutants et la possibilité de mutations multiples qui en découle, et en raison d'un problème d'équivalence au niveau des inocula. Finalement, si aucune forme en particulier ne semble être responsable à elle seule de la pathogénèse de la candidose, il est probable que le fait même de pouvoir passer de la forme levure à la forme hyphale et vice versa soit un atout majeur pour *C. albicans* puisque cela lui permettrait de déjouer

certaines composantes du système de défense de l'hôte et de s'adapter à différentes microniches *in vivo* (Odds, 1988).

Récemment, Lo *et al.* (1997) ont démontré qu'un double mutant nul *cph1/cph1 efg1/efg1* de *C. albicans* est incapable de former des tubes germinatifs et des hyphes *in vitro*, ainsi que de s'évader des macrophages et est somme toute avirulent dans un modèle de candidose disséminée. Par contre, les mutants simples sont seulement partiellement défectueux dans la filamentation et conservent une virulence totale ou partielle. Les auteurs en conclurent que, tout comme chez *S. cerevisiae*, la morphogénèse chez *C. albicans* semblerait être contrôlée par deux mécanismes parallèles cumulatifs, l'un faisant intervenir la kinase *cph1p* de la cascade des MAPK (mitogen-activated protein kinase), l'autre, indépendant, faisant appel à la protéine *efg1p*. En outre, les mêmes auteurs émirent l'hypothèse que la capacité de *C. albicans* de changer de forme, et non l'une ou l'autre de ces formes en particulier, serait un facteur de virulence important (Lo *et al.*, 1997). Finalement, on peut noter que le dimorphisme est accompagné par une expression différentielle de plusieurs gènes, selon la forme du champignon. Cet aspect est sans aucun doute tout aussi important que le phénomène de changement morphologique en tant que tel. En effet, chacune des formes de *C. albicans* semble avoir des propriétés bien distinctes, ce qui favoriserait d'autant plus l'adaptation du champignon à des microniches environnementales chez l'hôte. Il a ainsi été établi que la forme hyphale exprimait les gènes *SAP5* et *SAP6* codant pour des membres de la famille des protéases aspartiques qui semble jouer un rôle important dans la virulence de *C. albicans*. La forme levure, quant à elle, exprime d'autres membres de la même famille. Cet aspect sera discuté ultérieurement dans le chapitre portant sur les protéases aspartiques. Par ailleurs, le gène *HWP1* codant pour une protéine de surface présente seulement sur les hyphes aurait un rôle dans l'adhérence aux cellules épithéliales (Staab et Sundstrom, 1998), ce qui pourrait expliquer l'adhérence accrue des hyphes par rapport aux blastospores.

Pour conclure, le dimorphisme est une propriété importante de *C. albicans*. Il lui permet de s'adapter à son environnement et est associé à une régulation différentielle de certains gènes, eux-mêmes impliqués dans la virulence du champignon. Enfin, si

la forme hyphale semble toujours être impliquée plus particulièrement dans les phénomènes de pénétration tissulaire, il apparaît cependant que les deux formes contribueraient à la pathogénicité.

2.2.2. Le «phenotypic switching»

Le «phenotypic switching» ou changement de phénotype est une propriété importante de *C. albicans* qui lui apporte un deuxième niveau de variation. Il est facilement identifiable par un changement de morphologie des colonies sur milieu solide. Le premier système de variation phénotypique bien étudié a été celui de la souche 3153A qui produit des colonies dont la morphologie peut varier entre huit phénotypes différents: un phénotype original (lisse) et sept phénotypes variants (étoile, anneau, irrégulièrement ridé, chapeau, pointillé, crépelé, lisse révertant). L'apparition spontanée des morphologies coloniales variantes se faisait à une fréquence faible d'environ $1,4 \times 10^{-4}$. Cependant, l'irradiation par une faible dose de rayons ultraviolets augmentait de 200 fois la fréquence. Après avoir atteint ce mode de variation phénotypique à haute fréquence, les cellules maintenaient cet état d'une manière héréditaire et continuaient de changer leur morphologie coloniale à la même fréquence, de façon interconvertible et réversible. (Slutsky *et al.*, 1985). Au cours de la même année, un autre système de variation phénotypique a été signalé. Il s'agissait de la souche 1001 de *C. albicans* dont les cellules pouvaient, à une fréquence d'environ 10^{-4} , donner naissance à des colonies rugueuses au lieu de la morphologie lisse habituelle (Pomes *et al.*, 1985). De nombreuses souches ont ensuite été caractérisées pour leur capacité à former des colonies avec une morphologie différente de l'originale. Parmi celles-ci, on retrouve des souches isolées de patientes souffrant de vaginite pouvant former des colonies entourées d'un halo de mycélium (Soll *et al.*, 1987), mais surtout la souche WO-1 dont le système de variation phénotypique bien particulier a été le plus étudié à ce jour. Cette souche provenant du sang d'un patient receveur d'une greffe de moelle osseuse peut alterner entre deux phénotypes (blanc et opaque) à une fréquence élevée (10^{-2}), de façon héréditaire et réversible. Le phénotype blanc représente le phénotype standard, tandis que l'opaque

représente une morphologie coloniale plus large, plus plate et grise. Trois autres phénotypes minoritaires peuvent être générés par cette souche (Slutsky *et al.*, 1987). A la suite de ces constatations, il apparaît que plusieurs systèmes de variation phénotypique existent chez *C. albicans*, et que ceux-ci diffèrent au niveau du répertoire qualitatif et quantitatif des phénotypes présents. Par ailleurs, chaque souche semble capable d'exprimer un seul de ces systèmes et le transmet de façon héréditaire (Soll, 1992).

Suite à ces observations, de nombreux chercheurs ont analysé l'aspect cellulaire relatif aux différentes morphologies coloniales. Pour la plupart des systèmes comme celui des souches 3153A et 1001, les différences morphologiques résultent de différences de proportion et de distribution des levures, hyphes et pseudohyphes dans les colonies (Soll, 1992). Cependant, lors de la transition blanc-opaque de la souche WO-1 la différence de morphologie coloniale reflète des changements physiologiques plus importants. En effet, la cellule de la phase opaque possède une forme allongée de haricot et un volume trois fois plus important que les cellules en phase blanche dont la morphologie cellulaire est semblable aux souches communes de laboratoire. En outre, les cellules en phase opaque ont un mécanisme de bourgeonnement altéré et souvent bipolaire (Slutsky *et al.*, 1987). Des études par microscopie électronique à balayage et à transmission des cellules dans les deux phases ont permis de constater que la surface des cellules en phase opaque possédait une structure unique avec des protubérances, desquelles émergeaient parfois des vésicules, et que ces mêmes cellules contenaient une très grosse vacuole non présente chez les cellules de la phase blanche (Anderson et Soll, 1987; Anderson *et al.*, 1990). Finalement, nous pouvons mentionner la relation particulière existante entre le dimorphisme et la transition blanc-opaque. En effet, il a été établi que des mécanismes de formation de bourgeons et de formation d'hyphes fonctionnaient de façon séquentielle lors de la croissance d'un bourgeon de la phase opaque (Anderson et Soll, 1987). Par ailleurs, alors que la transition d'un phénotype cellulaire opaque à un phénotype blanc se fait de façon directe, la transition inverse semblerait impliquer un intermédiaire pseudohyphal (Bergen *et al.*, 1990). Les deux mécanismes semblent donc reliés mais sont cependant distincts puisque les hyphes formés par les cellules de la phase

opaque sont semblables à ceux formés par les cellules de la phase blanche, puisqu'il existe des antigènes spécifiques (Anderson *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1990) et une transcription spécifique de certains gènes dans la forme levure de la phase opaque (Morrow *et al.*, 1992; Morrow *et al.*, 1993).

De récentes études ont porté sur le mécanisme même de la variation phénotypique chez la souche WO-1. Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, certains gènes sont spécifiquement transcrits lorsque cette souche est dans la phase opaque et sous la forme levure. Parmi ceux-ci, on retrouve le gène *SAP1* qui appartient à une famille de protéases possiblement impliquées dans la pathogenèse et le gène *OP4* dont la fonction est inconnue (Morrow *et al.*, 1992; Morrow *et al.*, 1993). La transcription des deux gènes semble être sous le contrôle strict de la variation phénotypique. Par ailleurs, l'identification du gène *WH11* transcrit spécifiquement dans la forme levure de la phase blanche (Srikantha et Soll, 1993) apporte une preuve supplémentaire de l'existence d'une expression différentielle de gènes lors d'une variation phénotypique. Fait intéressant, ces mêmes gènes étudiés dans la souche 3153A semblent également être régulés spécifiquement en fonction du changement phénotypique (Morrow *et al.*, 1994), ce qui permet de penser à un mécanisme général commun à tous les systèmes de «phenotypic switching». Finalement, une caractérisation fonctionnelle des promoteurs des gènes *WH11* (Srikantha *et al.*, 1995) et *OP4* (Soll, 1997) a mis en évidence la présence, en amont de chaque gène, de deux domaines d'activation de transcription spécifiques de la phase blanche (*WH11*) ou de la phase opaque (*OP4*). Toutes ces observations ont mené à l'élaboration d'un modèle général pour le mécanisme inhérent à la variation phénotypique chez la souche WO-1 et possiblement dans les autres systèmes de variation phénotypique. Dans ce modèle, l'événement primaire est un changement réversible de l'état hétérochromatique du locus «contrôle» de la variation phénotypique, ou une réorganisation réversible d'une séquence d'ADN au locus «contrôle». Suite à cet événement, se produiraient la désactivation de facteurs de transcription spécifiques de la phase initiale et l'activation de facteurs spécifiques de la phase finale (Soll, 1997).

Attardons-nous maintenant au rôle possible de la variation phénotypique dans la pathogenèse de *C. albicans*. Plusieurs observations telles que la présence au site

d'infection de souches avec des phénotypes multiples ou dans un mode de variation à haute fréquence (Soll *et al.*, 1987), ainsi qu'une fréquence spontanée de variation plus élevée chez les souches pathogènes que chez les souches commensales (Hellstein *et al.*, 1993), viennent valider l'hypothèse de la participation de ce phénomène à la pathogenèse du champignon. En fait, la variation phénotypique engendre des changements complexes dans le phénotype colonial mais aussi dans la morphologie cellulaire, la physiologie cellulaire et la virulence. Ainsi, il a été établi que la variation phénotypique chez les souches WO-1 et 3153A agissait sur les conditions d'induction des hyphes *in vitro* (Soll, 1994), sur l'adhérence des levures aux cellules épithéliales buccales (Kennedy *et al.*, 1988; Soll *et al.*, 1994)), sur la susceptibilité aux drogues antifongiques (Soll *et al.*, 1994), trois propriétés jouant un rôle putatif dans la virulence de *C. albicans*, et sur le contenu en stérols et en lipides (Soll *et al.*, 1994). En outre, l'expression des protéines Sap, autre facteur de virulence putatif, est également influencée par la variation phénotypique puisque le gène *SAP1* est transcrit seulement dans la phase opaque de la souche WO-1 (Morrow B *et al.*, 1992). Enfin, d'autres caractéristiques telles que l'antigénicité (Anderson *et al.*, 1989; 1990), la sensibilité aux neutrophiles et aux oxydants *in vitro* (Kolotila et Diamond, 1990), ainsi que la capacité d'assimiler certains sucres (Soll, 1990) varient selon la phase phénotypique de WO-1. Le «phenotypic switching» aurait donc comme rôle de donner à *C. albicans* la capacité d'envahir divers sites anatomiques, notamment par la modulation de l'expression de certains facteurs de virulence, à échapper au système immunitaire, notamment par un changement d'antigénicité, ou à changer sa résistance aux drogues antifongiques. Cette variation phénotypique lui apporterait la diversité nécessaire pour coloniser différentes niches environnementales et se superposerait à celle apportée par le dimorphisme (Soll, 1992)

2.3. L'activité protéolytique

Les endopeptidases peuvent être divisées en quatre grands groupes: les métalloprotéases, les sérine protéases, les cystéine protéases et les protéases aspartiques. C'est dans cette dernière classe d'enzymes que l'on retrouve les

protéases responsables de l'activité protéolytique généralement observée chez *C. albicans*. Les protéases aspartiques représentent un groupe d'enzymes dont le site actif contient deux acides aminés Asp (acide aspartique) essentiels à leur activité. Ces enzymes sont facilement identifiables par l'inhibition de leur activité en présence de pepstatine A, un hexapeptide naturel de *Streptomyces* (Cole, 1996). La pepsine, retrouvée dans l'estomac, est la première protéase de ce type à avoir été caractérisée.

L'activité protéolytique sécrétée par *C. albicans* a été observée pour la première fois par Staib en 1965. Attribuée à l'activité d'une protéase aspartique sécrétée (Sap) par Remold *et al.* en 1968, elle a ensuite été suggérée comme facteur de virulence potentiel par Staib en 1969.

2.3.1. Caractéristiques biochimiques des Sap de *C. albicans*

L'activité protéolytique de *C. albicans* a été étudiée par de nombreux groupes de recherche qui ont démontré récemment l'expression de non pas une mais plusieurs protéines Sap chez *C. albicans*. Cependant, les études antérieures portant sur la caractérisation biochimique de la Sap ont été majoritairement faites à partir de souches de *C. albicans* cultivées en milieu contenant une protéine comme seule source d'azote. Or, il semble que l'ARNm de *SAP2* soit le transcrit principal dans ces conditions. Il en résulte que les données sur la caractérisation des Sap reflètent probablement les propriétés biochimiques de la Sap2 (Hube, 1996).

De façon générale, les Sap ont une masse moléculaire entre 38 et 45 kDa, un pI de 4-5.7 et une activité optimale à un pH compris entre 2.5 et 3.9, selon l'enzyme et le substrat. De plus, elles subissent une dénaturation alcaline irréversible aux alentours de 8.0. Cette dénaturation est causée par une formation de dimères qui s'autodégradent (Ruchel, 1981; Ray et Payne, 1990; Smolenski *et al.*, 1997). Leurs substrats, *in vitro*, comprennent un nombre varié de protéines telles que l'albumine, l'hémoglobine, les IgA, la protéine α -2 macroglobuline (Rüchel et Böning, 1983), le collagène (Kaminishi *et al.*, 1986), la caséine, la kératine (Ray et Payne, 1990, Negi *et*

al., 1984), la cystatine A (Tsushima *et al.*, 1994), le fragment Fc des IgG, la protéine C3 du complément (Kaminishi *et al.*, 1995) et la mucine (Colina *et al.*, 1996).

Des investigations plus poussées ont permis de déterminer les substances inhibitrices de l'activité des Sap. Comme pour la plupart des protéases aspartiques, la pepstatine A est un très bon inhibiteur. Par contre, les inhibiteurs DAN et EPNP spécifiques des sites actifs des protéases aspartiques ne semblent avoir aucun effet sur les Sap de *C. albicans*. Il est intéressant de noter par contre, que l'EPNP est capable d'inhiber l'activité des Sap de *Candida tropicalis* (Rüchel, 1981; Rüchel *et al.*, 1983).

Des études récentes ont porté sur la caractérisation spécifique de trois Sap. Elles ont confirmé que les masses moléculaires apparentes des Sap2 et 3 sont relativement similaires (42 kDa), tandis que la Sap1 a une masse légèrement plus faible, soit environ 38-40 kDa. La Sap3 semble se distinguer des deux autres par son pI de 5.7, qui est plus élevé que toutes les autres Sap étudiées (4-4.5), et par une activité plus résistante à la chaleur. Par contre, le profil d'activité en fonction du pH semble le même pour toutes les trois (Smolenski *et al.*, 1997; White *et al.*, 1993). Finalement, la glycosylation de ces protéines serait peu probable, puisque Morrison *et al.* (1993a) ont démontré par une technique de coloration à l'argent modifiée à l'acide périodique (PA-SS) que la Sap2 n'était pas glycosylée. De plus, la Sap1 mature ne possède aucun site de glycosylation.

2.3.2. La famille des gènes SAP

La première approche pour cloner le gène responsable de l'activité protéolytique de *C. albicans* fut d'hybrider une banque génomique de *C. albicans* avec une sonde spécifique. Celle-ci provenait de l'amplification par PCR d'un gène SAP, grâce à des amorces dégénérées déduites à partir de la séquence en acides aminés de la protéine purifiée (Hube *et al.*, 1991). Le gène SAP1 ainsi cloné a un cadre de lecture ouvert de 1173 bp correspondant à une protéine de 391 acides aminés. L'analyse N-terminale de la séquence met en évidence la présence d'un peptide signal (18 acides aminés) suivi d'un propeptide (32 acides aminés) dont le clivage permettrait l'activation ou

maturation de l'enzyme. Ce propeptide est séparé de la protéine mature par un dipeptide lysine-arginine (Lys-Arg ou KR) qui serait un site putatif de clivage pour la maturation, similaire à ceux que l'on retrouve dans les protéines de *S. cerevisiae* et qui sont reconnus par la protéase régulatrice Kex2 (Julius, 1984). Par ailleurs, on note la présence d'un deuxième site de clivage putatif Lys-Arg en amont du précédent (Tableau I). Ce deuxième site ne serait pas utilisé lors de la maturation normale de la protéine mais pourrait être impliqué dans un processus alternatif, lorsque le site normal de clivage n'est plus fonctionnel (Togni *et al.*, 1996). Enfin, la protéine présente un site actif séparé en deux domaines contenant chacun un acide aspartique, domaines conservés chez toutes les protéases aspartiques. La Figure 2 résume les caractéristiques conservées dans la structure primaire des Sap.

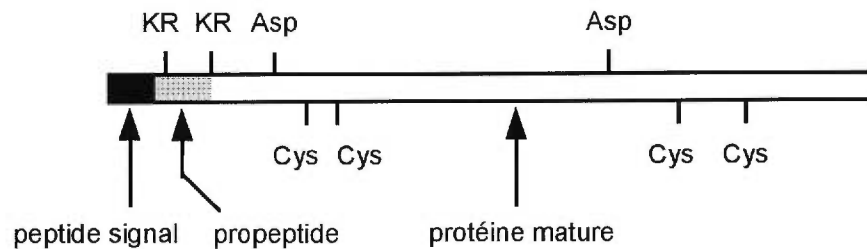


Figure 2: Structure primaire des Sap. Présence d'un prépropeptide qui serait clivé au niveau d'un site putatif Lys-Arg ou plus rarement Lys-Lys par un processus similaire au système Kex2 de *S. cerevisiae* (1 à 4 sites selon la Sap). Site actif divisé en deux domaines contenant chacun un Asp. Présence de Cys conservées pour le maintien de la structure secondaire. (figure inspirée de White *et al.*, 1995 et Hube, 1996)

Le gène *SAP2* fut cloné grâce à la même approche (Wright, 1992). La protéine Sap2, tout comme la Sap1, est traduite sous forme de prépropeptide avec un peptide

signal de 18 acides aminés, un propeptide de 38 acides aminés et une enzyme mature de 342 acides aminés. De même, on retrouve les deux sites de clivage putatifs Lys-Arg, ainsi que les domaines du site actif hautement conservés (Figure 2, Tableau I). Les deux protéines sont donc très reliées comme l'indique d'ailleurs le pourcentage élevé d'homologie (67%) au niveau de leur séquence en acides aminés (Monod *et al.*, 1998). Il ne s'agit pourtant pas de la même protéine dont l'absence de similarité proviendrait d'une différence de souche. En effet, des analyses d'hybridation génomiques avec deux sondes spécifiques aux deux enzymes ont démontré que les deux gènes étaient présents dans les souches de *C. albicans* étudiées (Wright, 1992). Ceci fut confirmé, d'ailleurs, par Magee *et al.* (1993) qui démontrèrent que le gène *SAP1* se trouvait sur le chromosome 6, alors que le gène *SAP2* était localisé sur le chromosome R.

Le concept de l'existence d'une famille de gènes a ensuite rapidement été accepté avec la découverte de sept autres gènes *SAP*. Le gène *SAP3*, situé sur le chromosome 3, fut isolé par hybridation à basse stringence d'une banque génomique avec une sonde spécifique à *SAP1* (White *et al.*, 1993). Il possède les mêmes caractéristiques que *SAP1* et *SAP2* excepté que son propeptide ne contient qu'un seul dipeptide KR qui est situé juste avant la protéine mature (Tableau I). La protéine Sap3 présente une homologie d'environ 69%, au niveau de la séquence en acides aminés, avec Sap2p et Sap3p (Monod *et al.*, 1998). Le gène *SAP4* fut identifié lors d'une étude de la région non codante en amont du gène *SAP1* (Miyasaki, 1994). En effet, ce gène se situe en tandem, en amont de *SAP1*, sur le chromosome 6. Tout comme les gènes *SAP1-3*, la région des deux domaines du site actif est extrêmement conservée. Cependant, la protéine codée par ce gène est plus longue de 24 acides aminés, en raison d'une insertion dans le propeptide. La conséquence la plus importante de cette insertion est la présence de quatre dipeptides Lys-Arg, au lieu de deux, dans le propeptide (Tableau I). Le gène *SAP4* semble être plus éloigné de *SAP1* que les deux autres. Ainsi, la protéine Sap4 montre environ 55% d'homologie, au niveau de la séquence en acides aminés, avec Sap1p, Sap2p et Sap3p (Monod *et al.*, 1998). Trois autres gènes ont été identifiés grâce à la même approche d'hybridation à basse stringence (Monod *et al.*, 1994). Les gènes *SAP5* et *SAP6* sont

très rapprochés de *SAP4* (80% d'homologie au niveau de la séquence en acides aminés) (Monod *et al.*, 1998). Comme pour ce dernier, on note la présence d'un prépropeptide plus long avec 4 Lys-Arg. Tous ces gènes sont localisés sur le chromosome 6 (Tableau I). Le gène *SAP7*, situé sur le chromosome 1, est beaucoup plus divergent. En effet, la protéine Sap7 présente 20 à 26% d'homologie (séquence en acides aminés) avec les autres protéines (Monod *et al.*, 1998). En plus d'une région N-terminale plus longue, il présente trois insertions dans la région codant pour la protéine mature. Par ailleurs, la région du propeptide ne contient aucun site Lys-Arg mais plutôt un site Lys-Lys juste avant la protéine mature. Ce site serait également un site putatif de clivage par une protéase d'un système homologue au système Kex2 (Tableau I). Récemment, deux autres gènes ont été clonés et séquencés (Monod *et al.*, 1998). Les gènes *SAP8* et *SAP9*, tous deux sur le chromosome 3, présentent les mêmes caractéristiques que les autres gènes de la famille (Tableau I). La protéine Sap8 montre environ 50% d'homologie avec le groupe Sap1-3p, 42% avec le groupe Sap4-6p et 25% avec Sap7p et Sap9p. La protéine Sap9, quant à elle, semble plus divergente avec des pourcentages d'homologie inférieurs à 30% avec toutes les autres protéines de la famille. Finalement, une théorie évolutionniste propose que les gènes *SAP1-3* aient divergé d'un même ancêtre à peu près à la même époque, et que les gènes *SAP4-6* aient divergé d'un autre ancêtre commun. Ces deux ancêtres auraient eux-mêmes une origine commune antérieure. Les gènes *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* appartiendraient chacun à des branches distinctes des groupes *SAP1-3* et *SAP4-6* et remonteraient à un ancêtre encore plus éloigné dans le temps (Hube, 1996; Monod *et al.*, 1998).

Tableau I: Gènes *SAP* de *C. albicans* identifiés à ce jour. (modifié de Hube, 1996)

Gènes	ORF	Pré- propeptide	Protéine mature	Sites KR ou KK dans le propeptide	Localisation (chromosome)
<i>SAP1</i>	1173 bp	50 aa	341 aa	2 KR	6
<i>SAP2</i>	1194 bp	56 aa	342 aa	2 KR	R
<i>SAP3</i>	1194 bp	58 aa	340 aa	1 KR	3
<i>SAP4</i>	1251 bp	75 aa	342 aa	4 KR	6
<i>SAP5</i>	1254 bp	76 aa	342 aa	4 KR	6
<i>SAP6</i>	1254 bp	76 aa	342 aa	4 KR	6
<i>SAP7</i>	1764 bp	211 aa	377 aa	1 KK	1
<i>SAP8</i>	1215 bp	73 aa	332 aa	2 KR	3
<i>SAP9</i>	1632 bp	50 aa	494 aa	1 KR	3

2.3.3. Expression des *SAP*

2.3.3.1. Expression différentielle

La première évidence de l'existence d'une régulation différentielle pour certains gènes *SAP* est venue de l'étude par Morrow *et al.* (1992) du phénomène du changement de phénotype chez certaines souches de *C. albicans*. Ces derniers démontrèrent que le gène *SAP1* était régulé avec la transition blanc-opaque (W/O) de la souche WO-1. En effet, l'ARNm de *SAP1* n'est présent que dans les cellules O de la souche WO-1 et n'est pas détecté dans les cellules W ni dans les autres souches testées ne possédant pas le caractère de changement de phénotype, même si le gène est présent dans toutes ces souches. De plus, l'expression de *SAP1* ne semble pas, comme celle de *SAP2*, dépendre d'un milieu inducteur puisque l'ARNm tout comme l'activité protéolytique est détectée dans un milieu non inducteur, c'est-à-dire sans protéine (Morrow *et al.*, 1992; White *et al.*, 1993). L'expression de *SAP1* débute en phase exponentielle et diminue rapidement en phase stationnaire. De plus, elle semble être réprimée par la présence d'acides aminés dans le milieu de culture (Hube *et al.*, 1994). Ainsi, la régulation de l'expression de *SAP1* dépend non seulement du

changement de phénotype mais aussi de facteurs environnementaux comme le milieu et la phase de croissance.

Le gène *SAP2* est exprimé à 25 °C comme à 37 °C dans un milieu inducteur contenant une protéine comme source d'azote. L'ARNm de *SAP2* est le transcrit le plus abondant des gènes *SAP* dans la forme «levure» de *C. albicans*. C'est donc l'expression de ce gène qui a été le plus étudiée. Toutes les souches testées, même les souches capables de changement phénotypique comme WO-1 et 3153A, expriment la Sap2p dans un milieu inducteur (Hube *et al.*, 1994, White et Agabian, 1995). Tout comme *SAP1*, l'expression est maximale pendant la phase logarithmique (log) et diminue rapidement dans la phase stationnaire. Elle nécessite une source de carbone métabolisable et est réprimée par une source d'azote de faible masse moléculaire comme des sels d'ammonium, des acides aminés ou des petits peptides (moins de huit aa) et par un pH neutre (Hube *et al.*, 1994; Lerner et Goldman, 1993). Cependant, l'expression du gène *SAP2* ne dépend pas du pH puisque qu'avec une culture à pH constant, l'ARNm n'est détecté encore que pendant la phase logarithmique (Hube *et al.*, 1994). Le pH semblerait avoir plutôt un rôle indirect sur la disponibilité de l'inducteur. L'étude de l'effet de la pepstatine A sur l'expression de *SAP2* a permis de mettre en évidence que l'activité de la Sap2p sécrétée par *C. albicans* était nécessaire pour l'induction de l'expression du gène. En effet, en présence de cet inhibiteur, l'expression du gène était de beaucoup diminuée quoique encore présente (Hube *et al.*, 1994; Lerner et Goldman, 1993). Ces deux dernières expériences permettent de formuler l'hypothèse que l'expression du gène *SAP2* est régulée par un système de rétrocontrôle positif. Un niveau basal d'expression constitutive de Sap2p permettrait la dégradation de la protéine du milieu. Les peptides relargués seraient transportés dans la cellule et agiraient comme inducteurs de l'expression du gène *SAP2*, suivant un système de rétrocontrôle positif. Le pH aurait un effet indirect en rendant possible ou impossible la dégradation de la protéine du milieu, puisque la Sap2p a une activité maximale à pH acide. De plus, la pepstatine A bloquerait l'activité de la Sap2p d'où le relargage de peptides inducteurs (Hube, 1996).

Le gène *SAP3* est exprimé surtout par la forme opaque de la souche WO-1. On retrouve également son expression chez la forme blanche de WO-1 et quelques-unes

unes des autres souches testées, mais seulement dans les conditions où le gène *SAP2* est hautement exprimé. Comme pour *SAP1* et *SAP2*, l'expression de *SAP3* est inhibée par les acides aminés. Par contre la transcription du gène ne semble pas être diminuée au cours de la phase stationnaire, comme c'est le cas pour les deux autres gènes. La régulation de ce gène semble donc être différente de celle de *SAP1* et de celle de *SAP2* (Hube *et al.*, 1994; White et Agabian, 1995)

Les premières études d'expression des gènes *SAP4* à *SAP6* ont été réalisées avec une sonde d'ADN spécifique à ces trois gènes mais non discriminatoire. C'est pourquoi on parle des gènes *SAP4-6*. Alors que les gènes *SAP1* à *SAP3* sont exprimés dans les formes «levure» des souches de *C. albicans*, les gènes *SAP4-6* par contre semblent être exprimés seulement dans la forme hyphale de ces mêmes souches. Cependant, les souches testées jusqu'à présent ne sont pas toutes capables d'exprimer ces gènes même si elles ont formé des hyphes. La souche WO-1 en est un exemple. De plus leur expression ne nécessite pas de source de carbone métabolisable comme pour *SAP2* et n'est pas réprimée par l'ajout d'acides aminés dans le milieu. Par ailleurs, le pH du milieu est un facteur déterminant sur l'induction de l'expression. En effet, seuls des pH supérieurs à 6.0 permettent une détection des ARNm de ces gènes. Cependant, il est intéressant de noter que le taux d'obtention d'hyphes est très réduit à des pH inférieurs à 6.0, ce qui pourrait expliquer l'absence d'expression des gènes *SAP4* à *SAP6* (Hube *et al.*, 1994). Une étude plus récente a permis d'analyser la différence d'expression entre ces trois gènes très homologues et a généré des résultats très intéressants. Cette expérience de Northern blot couplée à l'utilisation de la nucléase S1 a démontré que le gène *SAP6* était le transcrit majeur dans la forme hyphale, tandis que *SAP5* était exprimé de façon moins importante. Enfin, l'ARNm de *SAP4* n'a pas pu être détecté (White et Agabian, 1995). Les protéines Sap4, Sap5 et Sap6, quant à elles, n'ont jamais été détectées dans aucun milieu de culture sous toutes les conditions testées. Finalement, Borg-von Zepelin *et al.* ont récemment réussi à exprimer les protéases Sap4, Sap5 et Sap6 de *C. albicans* chez *Pichia pastoris*. Grâce à un essai d'infection, utilisant des macrophages péritonéaux de souris, et à la technique d'immunofluorescence, ils ont également établi que les protéines Sap4, Sap5 et Sap6 étaient seulement produites après

phagocytose de *C. albicans* par les macrophages. Les auteurs conclurent que la synthèse de Sap4-6p chez *C. albicans* serait possiblement activée par un ou plusieurs facteurs intracellulaires inconnus des macrophages (Borg-von Zepelin *et al.*, 1998).

Parmi les trois autres gènes restants, *SAP8* est celui dont on possède le plus d'informations. La régulation de l'expression de ce gène semble dépendre de la température du milieu puisqu'il est exprimé de façon préférentielle à 25 °C dans un milieu inducteur. Une quantité plus faible d'ARNm est détectée dans des cellules ayant poussé à 37 °C. L'expression du gène *SAP8* se fait surtout pendant la phase exponentielle précoce et diminue de façon drastique par la suite. Elle a été observée dans plusieurs souches de *C. albicans* incluant la souche WO-1. Relativement à cette dernière, l'expression de *SAP8* était abondante dans les cellules «O» mais faible dans les cellules «W». Cependant, comme les cellules opaques s'obtiennent à 25 °C et les cellules blanches à 37 °C, cette différence d'expression paraît être la conséquence de la température et non du changement de phénotype (Morrison *et al.*, 1993b; Hube *et al.*, 1997a; Monod *et al.*, 1998). L'expression du gène *SAP9*, dans un milieu inducteur, semble être plus faible que celle de *SAP8*. Elle se produirait presque exclusivement à 25 °C et durant la phase stationnaire (Monod *et al.*, 1998). Par ailleurs, selon l'analyse de la séquence putative en acides aminés, la protéine Sap9 serait possiblement une protéase aspartique ancrée au niveau du glycophosphatidylinositol (GPI) (Monod *et al.*, 1998). Finalement, l'expression du gène *SAP7* n'a jamais pu être observée, que ce soit au niveau de la protéine ou même de l'ARNm, dans toutes les conditions testées.

En conclusion, les gènes *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP8* et *SAP9* sont exprimés par la forme levure de *C. albicans*, expression observée au niveau des ARNm et des protéines. *SAP1* est spécifique des cellules «O» de la souche WO-1 et *SAP2* est le gène transcrit majoritairement dans les conditions d'induction. *SAP3* («W», «O», et autres) et *SAP8* (25 °C) semblent être exprimés plus faiblement. Les gènes *SAP5* et *SAP6* sont exprimés (ARNm) par la forme hyphale, mais aucune protéine n'a encore été détectée. L'expression en ARNm de *SAP4* et *SAP7* n'a encore jamais été observée, ni les protéines auxquelles ils correspondent (Figure 3).

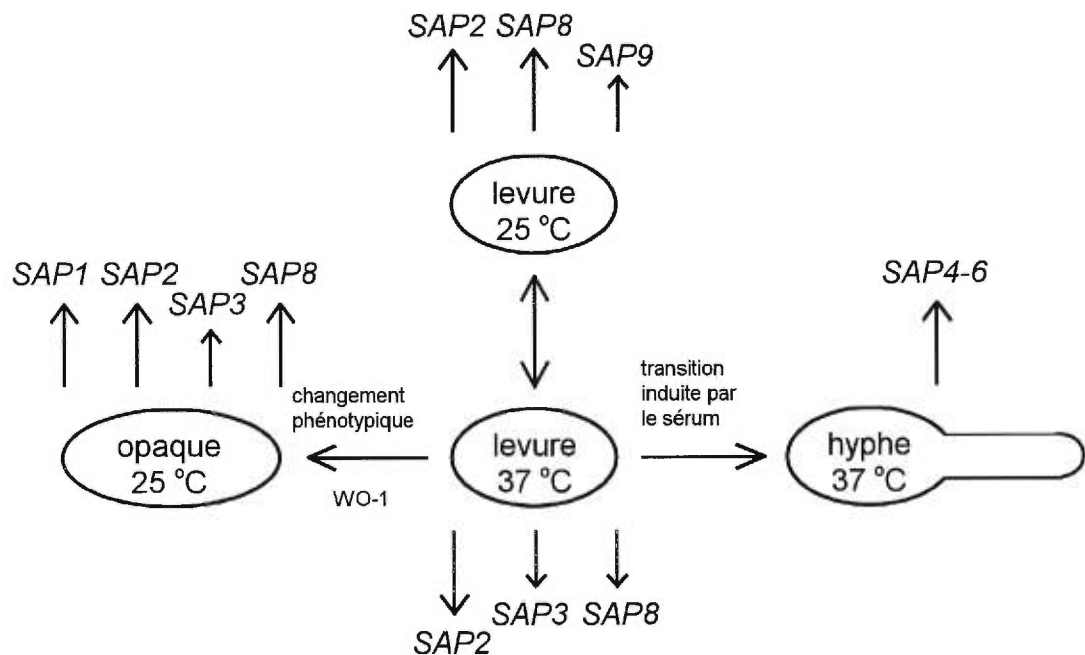


Figure 3: Expression *in vitro* des gènes SAP de *C. albicans* selon la forme de la cellule (levure ou hyphe), son phénotype (normal et opaque pour WO-1), et les conditions de culture (température). L'expression est ici rapportée par la présence d'ARNm. (Hube *et al.*, 1997a; Monod *et al.*, 1998)

2.3.3.2. Inducteurs et sécrétion

Les études sur l'induction tout comme sur les propriétés biochimiques des protéines Sap ont été faites dans des conditions d'expression de la Sap2. Par conséquent, les informations obtenues lors de ces analyses se rapportent plus particulièrement à cette protéine.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité protéolytique de la Sap2p génère des peptides qui induiraient à leur tour l'expression du gène *SAP2*. De plus, la Sap2 est capable de digérer un vaste éventail de substrats. Il serait donc intéressant de savoir si tous les peptides provenant de la digestion d'une protéine sont susceptibles d'induire l'expression de la même façon. Les premières études portant

sur le sujet ont établi que l'albumine bovine (BSA) ainsi que l'hémoglobine sont de bons inducteurs de la sécrétion de l'activité protéolytique. De plus, cette induction est bien meilleure à 27 °C plutôt qu'à 37 °C (Rüchel, 1981; Crandall et Edwards, 1987). Ray et Payne (1990) ont également démontré que la kératine, la caséine et le collagène sont capables d'induire l'expression de la Sap2. De plus, de façon générale, les peptides de huit acides aminés et plus sont inducteurs (Lerner et Goldman, 1993), ce qui justifie l'hypothèse qu'une protéine entière n'est pas nécessaire pour l'induction. Seuls les peptides dérivés de sa digestion seraient importants. A ce jour, très peu d'études ont comparé les différents niveaux d'induction par ces mêmes composés. L'une d'entre elles indique par exemple que la BSA, l'hémoglobine et l'ovalbumine sont de meilleurs inducteurs que les mélanges complexes de peptides comme les histones, tryptones et peptones. De plus, alors que l'hémoglobine est le substrat le mieux dégradé parmi ces composés, il semble que l'induction qu'elle engendre ne soit pas la plus importante, en comparaison avec l'ovalbumine (Banerjee *et al.*, 1991). Tous les peptides n'auraient donc pas la même capacité d'induction. Une étude plus récente a comparé l'induction de l'expression de la Sap2p par des peptides venant de la digestion de la BSA par différentes enzymes. Les protéases en question étaient la chymotrypsine, la protéinase K, des protéases aspartiques des champignons du genre *Aspergillus* et des protéases sécrétées par le genre *Rhizopus*. Les résultats furent très intéressants. En effet, seuls les peptides provenant de la digestion de la BSA par les protéases aspartiques d'*Aspergillus* et par les protéases de *Rhizopus* furent aptes à induire l'expression du gène *SAP2*. Par conséquent, certains peptides mais pas tous peuvent agir comme inducteur (Hube *et al.*, 1997a).

Les processus de maturation et de sécrétion des protéines Sap ont été étudiés au cours des dix dernières années seulement. La première information pertinente est venue de Banerjee *et al.* (1991) qui ont établi que l'expression et la sécrétion étaient des processus couplés, et qu'il n'y avait donc pas d'accumulation intracellulaire de protéines. Par ailleurs, plusieurs expériences de radiomarquage et d'immunoprécipitation ont démontré qu'il existait au moins deux formes intracellulaires de Sap. Ces études ayant été menées dans les conditions d'expression de la Sap2p, il s'agirait encore là des résultats concernant plus particulièrement cette protéine. Une

des deux formes correspond en tout point à la protéine mature et serait localisée dans une structure membranaire. Cependant, elle ne semble pas y être fermement ancrée, ce qui confirmerait l'hypothèse que cette forme serait l'enzyme mature située dans les vésicules de sécrétion. L'autre forme, de masse moléculaire supérieure de deux kilodaltons, serait également localisée dans une structure membranaire tout en y étant, cette fois, fortement attachée (Homma *et al.*, 1992). Cette dernière, située dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, correspondrait bien à un précurseur de la protéine mature, comme cela a été démontré par une expérience de marquage métabolique (Homma *et al.*, 1993). Récemment, une étude poussée effectuée sur la protéine Sapt1 de *Candida tropicalis* a permis d'élaborer un modèle de sécrétion général pour les Sap (Togni *et al.*, 1996). Dans ce modèle, la protéine nouvellement traduite se retrouve dans le réticulum endoplasmique grâce à son peptide signal. Ce dernier est clivé et la protéine poursuit sa course à travers le réticulum endoplasmique. C'est là que la protéine est éventuellement glycosylée (dans la prorégion), comme c'est le cas pour la Sapt1. La protéine se retrouve ensuite dans l'appareil de Golgi où elle subit sa maturation, c'est-à-dire le clivage de la prorégion. Ce clivage se fait par une endopeptidase similaire à Kex2 de *S. cerevisiae*, au niveau du dipeptide Lys-Arg juste en amont de la protéine mature. La protéine est ensuite dirigée vers les vésicules sécrétoires pour permettre sa sécrétion. L'intérêt de cette étude vient du fait que la sécrétion de Sapt1 a été suivie chez *Saccharomyces cerevisiae* (expression hétérologue du gène *SAPT1* sous le contrôle d'un promoteur inductible) et *in vivo*, chez *C. tropicalis*. Elle a démontré que les processus post-transcriptionnels, la maturation et la sécrétion de la sapt1 de *C. tropicalis* étaient réalisés de façon correcte chez *S. cerevisiae*. Par ailleurs, elle a établi que la maturation s'effectuait bien au niveau du deuxième site Lys-Arg (Figure 2) par une endopeptidase similaire à Kex2. Enfin, elle a indiqué qu'un peptide signal correctement clivé n'était pas nécessaire pour la sécrétion, mais que par contre, la maturation de l'enzyme par le retrait de la prorégion l'était. Finalement, un des résultats les plus intrigants fut la découverte d'un deuxième processus de maturation. En effet, lorsque le gène *SAPT1*, exprimé de façon hétérologue chez *S. cerevisiae*, était muté au niveau du site de clivage de Kex2, une maturation alternative par clivage

au niveau du premier site Lys-Arg suivi d'un autoclivage générerait une enzyme active, plus grande de quatre acides aminés par rapport à la protéine native. Que les deux processus puissent permettre la maturation d'une même enzyme est un cas unique jusqu'à ce jour. Ces résultats ont été corroborés par une étude plus récente effectuée chez *C. albicans*. Les auteurs y réalisèrent le clonage de l'homologue de *kex2* chez *C. albicans* et y démontrèrent que la sécrétion de la protéinase Sap2 implique un clivage par cette enzyme. Par ailleurs, ils établirent également l'existence d'un processus alternatif de maturation, prenant place chez *C. albicans* en l'absence de l'homologue de *kex2*, qui génère une Sap2p active plus longue d'un acide aminé du côté N-terminal (Newport et Agabian, 1997).

2.3.4. Rôle dans la virulence

Les espèces de *Candida* les plus virulentes pour l'homme sont, dans l'ordre: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, suivies de nombreuses autres espèces de moindre importance (Rüchel *et al.*, 1992). Parmi les nombreuses espèces de *Candida* testées, beaucoup sont capables de produire des protéases aspartiques. Or, la sécrétion d'activité protéolytique due à la production de Sap, suit la même hiérarchie que leur virulence (Rüchel *et al.*, 1983). Par ailleurs, les Sap produites par les différentes espèces mentionnées plus haut ne semblent pas avoir les mêmes propriétés. Ainsi, *C. albicans* sécrète une Sap (probablement Sap2) qui subit 50 % de dénaturation alcaline à pH 7.25. Par contre, les protéases sécrétées par *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* sont moins résistantes (Wagner *et al.*, 1995). Le fait que la Sap2 soit encore active à pH neutre rend possible une action de cette protéase pendant l'infection, et ceci, même à un site éloigné. De façon plus générale, les Sap pourraient agir dans des microenvironnements acides présents naturellement à la surface des tissus (plaque dentaire) ou engendrés par les levures elles-mêmes. Ces protéines pourraient donc avoir un rôle important dans la pathogenèse de la candidose. De nombreuses preuves indirectes corroborant cette hypothèse ont été établies à ce jour.

2.3.4.1. Les Sap et la virulence: vue d'ensemble

L'implication des protéines Sap dans la pathogenèse nécessite la sécrétion de ces protéines lors de l'infection. La première évidence de la présence *in vivo* d'une Sap fut la détection d'anticorps spécifiques dans le sérum de patients atteints de candidose. Dans la même étude, les auteurs démontrent par immunofluorescence la présence de Sap autour des levures dans des reins de souris infectées par *C. albicans* (Macdonald et Odds, 1980). Les protéases aspartiques ont également été retrouvées *in vivo* dans des lésions nécrotiques de la peau (Rüchel, 1983a), dans le fluide vaginal de femmes atteintes de vaginites (De Bernardis *et al.*, 1990) et au niveau de nombreux organes tels que le système nerveux central, les poumons, le cœur, le pancréas et les reins de patients morts de candidose disséminée (Rüchel *et al.*, 1991). Les Sap, observées par immunofluorescence, étaient localisées surtout au niveau de la paroi des levures et des hyphes de *C. albicans*. Dans les reins, on pouvait également remarquer un dépôt de protéases en forme d'anneau autour des colonies (Rüchel *et al.*, 1991). De nombreuses expérimentations *in vitro* ont aussi permis de vérifier la présence des protéases aspartiques au cours des infections à *C. albicans*. L'une d'entre elles, présentant un modèle d'infection de la muqueuse orale élaboré à partir de cellules non kératinisées de l'épithélium buccal humain, confirma la sécrétion des Sap par les levures et les hyphes envahissant les cellules épithéliales (Borg et Rüchel, 1988).

D'autres preuves indirectes de l'implication des Sap dans la virulence sont venues de l'étude de divers mutants déficients en activité protéolytique qui présentaient une virulence significativement plus faible que les souches parentales. Cependant la plupart de ces mutants possédaient une activité persistante et avaient un taux de réversion important (Macdonald et Odds, 1983; Kwon-chung *et al.*, 1985; Crandall et Edwards Jr, 1987). De façon générale, ces mutants étaient produits par mutagenèse non dirigée induite par des agents chimiques ou par des radiations ultraviolettes. Il est donc possible que d'autres mutations non détectées se soient produites dans le génome, ce qui remet en question les résultats obtenus. Par exemple, le mutant de Ross *et al.* (1990) produit par mutagenèse chimique semblait

plus stable que les autres puisqu'il ne démontrait aucun taux de réversion. Mais la croissance de ce mutant en milieu riche était plus faible que celle de la souche parentale, indiquant la présence possible d'une mutation inconnue. La construction récente de mutants nuls par interruption de gènes, grâce au protocole «ura-blaster», a permis d'éliminer les problèmes de la mutagenèse non dirigée. En effet, les mutants *sap1*, *sap2* et *sap3* (Hube *et al.*, 1997b), et le mutant triple *sap4-6* (Sanglard *et al.*, 1997a) ainsi générés sont beaucoup moins susceptibles de posséder une mutation non désirée. Par ailleurs, ces mutations dirigées ont ciblé une ou plusieurs Sap de façon spécifique, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de chacune des protéases. Fait intéressant, l'utilisation de ces souches mutées dans des modèles animaux de candidose disséminée a mis en évidence une atténuation significative de la virulence pour chacune d'entre elles. Ce dernier point confirme donc l'hypothèse d'un rôle important de ces protéines dans la pathogenèse de *C. albicans*. Finalement, l'observation d'un effet protecteur de la pepstatine A, inoculée avant et après l'infection de souris par *C. albicans*, vient également appuyer cette hypothèse (Rüchel *et al.*, 1990; Fallon *et al.*, 1997).

Les premières étapes de la pathogenèse de *C. albicans* sont l'adhérence, la colonisation et l'invasion des tissus. De nombreuses observations ont permis d'établir des liens possibles entre chacune de ces étapes et l'activité des protéases aspartiques. L'étape la plus précoce de l'infection est sans aucun doute l'adhérence du champignon aux cellules de l'hôte. Cette propriété, considérée comme un facteur de virulence important de *C. albicans*, a été corrélée avec l'activité protéolytique des Sap. Nous en discuterons plus en détails dans le prochain chapitre. Une des principales barrières contre l'adhésion des microorganismes aux cellules épithéliales est le recouvrement des épithéliums par une couche de mucus. Ce dernier est constitué majoritairement de glycoprotéines de masse moléculaire très élevée appelées mucines. Hautement glycosylées (80 % de sucres), les mucines forment un réseau très complexe dont les liens internes ne seraient pas tous permanents (Silberberg, 1989). Il en résulte une couche de mucus dont la texture de gelée lui confère de nombreuses propriétés. L'une d'entre elles, est la capacité d'immobiliser

les microorganismes et d'empêcher ainsi leur attachement aux cellules épithéliales. Or, une étude récente a démontré que la protéine Sap2 était capable de dégrader la mucine gastro-intestinale. Cette propriété permettrait de rendre accessible la surface des cellules épithéliales et favoriserait donc l'adhérence et la colonisation du champignon (Colina *et al.*, 1996). Par ailleurs, les IgA sécrétoires (IgAs), facteur important de la défense de l'hôte contre les microorganismes, sont également dégradés par la Sap2 (Rüchel *et al.*, 1986). Ces immunoglobulines représentent une barrière importante de la colonisation des muqueuses grâce à leur capacité d'inhiber l'adhérence microbienne et la colonisation, et grâce à leur habileté à neutraliser diverses toxines et enzymes bactériennes. De plus, les IgA potentialiseraient l'action de certains facteurs antimicrobiens comme la lactoferrine et la lactoperoxydase, et faciliteraient l'action du mucus (Kilian *et al.*, 1988). La dégradation de ces immunoglobulines semble donc être un atout majeur pour *C. albicans*. L'activité protéolytique des Sap contre de nombreuses protéines salivaires a également été établie (Germaine *et al.*, 1978). Même si cette activité n'était exercée qu'à pH acide et que le pH de la salive *in vivo* est plus proche de la neutralité, cette propriété ne semble pas sans intérêt. En effet, le pH de la salive varie beaucoup tout au long de la journée et selon le type de nourriture ingérée (Cutler, 1991). Par ailleurs, il semblerait que la protéine Sap2 soit encore active à un pH avoisinant la neutralité (Wagner *et al.*, 1995). De plus, les gènes *SAP5* et *SAP6* sont exprimés à pH neutre (White et Agabian, 1995). Enfin, l'activité des Sap pourrait s'effectuer dans des microenvironnements acides présents dans la bouche. En conséquence, les protéases aspartiques constitueraient un facteur de virulence potentiel qui favoriserait l'implantation et la colonisation de *C. albicans* en l'aidant à contourner les barrières spécifiques et non spécifiques du système de défense de l'hôte.

Une fois l'implantation et la colonisation établies, le champignon peut entreprendre l'invasion de l'épithélium et du tissu conjonctif. Les épithéliums sont constitués de cellules épithéliales qui produisent de la kératine, un filament intermédiaire très résistant à la protéolyse et composé de protéines fibreuses. L'épithélium épidermique représente un cas extrême de kératinisation au niveau des couches supérieures. Le tissu conjonctif est situé plus en profondeur, sous

l'épithélium. Ce tissu est constitué d'une matrice extracellulaire très abondante dans laquelle baignent les cellules. Le collagène, protéine fibreuse sécrétée par les cellules du tissu conjonctif, représente la protéine majeure de la matrice extracellulaire. Or, fait intéressant, *C. albicans* est capable de produire une activité kératinolytique et collagénolytique si on le cultive en présence de ces deux composés. Cette activité serait due à une protéase aspartique, et plus particulièrement la Sap2 puisque les conditions de croissance favorisaient l'expression de cette dernière et que les propriétés physico-chimiques des enzymes étaient similaires à celles de la Sap2 (Negi *et al.*, 1984; Kaminishi *et al.*, 1986). Cette propriété de *C. albicans* représente un facteur important dans pathogénèse de la candidose. En effet, la dégradation de ces deux protéines fibreuses entraîne non seulement des dommages aux tissus épithéliaux et conjonctifs, mais aussi permet à *C. albicans* de les envahir et d'atteindre le système sanguin. D'autres études ont porté plus particulièrement sur l'infection de la peau. L'une d'entre elles établit une corrélation entre la production de Sap par les espèces de *Candida* et leur capacité à envahir l'épiderme (tissu épithélial kératinisé) et le derme (tissu conjonctif). Ainsi, les espèces produisant une grande quantité de protéase aspartique comme *C. albicans* et *C. tropicalis* sont les seules à pouvoir envahir l'épiderme et le derme (Ray et Payne, 1990). Une autre étude a permis d'établir une corrélation entre l'activité protéolytique de différentes souches de *C. albicans* et leur virulence pour la souris dans un modèle de candidose disséminée (Louie *et al.*, 1994). Les protéines Sap et surtout la Sap2 auraient donc un rôle important à jouer au niveau de la colonisation mais aussi de l'invasion des tissus de l'hôte.

L'invasion des muqueuses par *C. albicans* va engendrer une réponse inflammatoire. A ce moment intervient la première ligne de défense constituée par une prédominance de cellules phagocytaires. Cependant, la sécrétion de Sap semblerait augmenter la résistance de *C. albicans* à l'ingestion et la destruction par les macrophages. En effet, un mutant déficient en activité protéolytique est plus rapidement phagocyté et tué par les macrophages (Macdonald et Odds, 1983). Par ailleurs, Rùchel *et al.* (1986) ont montré la présence de Sap dans des macrophages ayant ingéré des blastoconidies de *C. albicans*, tandis qu'elle était absente dans des

macrophages infectés par *C. parapsilosis*, espèce beaucoup moins virulente. Plus récemment, Borg-von Zepelin *et al.* (1998) ont établi, grâce à un essai d'infection avec des macrophages péritonéaux de souris et la technique d'immunofluorescence, que les protéines Sap4, Sap5 et Sap6 étaient exprimées seulement par les blastoconidies et les hyphes de *C. albicans* présents dans les macrophages, après phagocytose. Les trois autres Sap étudiées (Sap1 à 3) étaient exprimées par toutes les cellules de *C. albicans*, qu'elles soient phagocytées ou non. Les auteurs conclurent qu'un ou plusieurs facteurs intracellulaires des macrophages activeraient la synthèse des Sap4-6p, dont la cible possible serait le métabolisme oxydatif des macrophages. Finalement, la triple délétion des gènes *SAP4-SAP6* entraînait une diminution de moitié de la survie des cellules de *C. albicans* mises en contact avec les macrophages, ce qui confirmait le rôle possible de ces trois isoenzymes dans la destruction des macrophages et donc dans la pathogenèse de la candidose. Outre la résistance aux macrophages, la Sap2 dégrade de nombreuses protéines impliquées dans le système immunitaire comme les fragments Fc des IgG et la protéine C3 du complément. La conséquence majeure d'une telle propriété est une diminution de l'activité opsonique des IgG, d'où de la phagocytose, et une diminution de la fonction bactéricide du complément (Kaminishi *et al.*, 1995). Il a également été établi que la Sap2 n'était pas inhibée par l'inhibiteur de protéase α_2 -macroglobuline retrouvé dans le plasma (Rüchel et Böning, 1983), et qu'elle était capable de le digérer (Kaminishi *et al.*, 1995) ainsi que la cystatine A, un autre inhibiteur de protéase impliqué dans le maintien de l'homéostasie et dans la défense contre les organismes pathogènes (Tsushima *et al.*, 1994). Finalement, la Sap2 peut activer la cascade de la coagulation par l'activation du facteur X (Rüchel, 1983b), et augmenter la perméabilité vasculaire par l'activation du système kallikréine-kinine aboutissant au relâchement de bradykinine (Kaminishi *et al.*, 1990). Ces propriétés auraient pour conséquence un accroissement de la quantité de Sap active dans le sang, ce qui entraînerait de sérieux effets chez l'hôte (Hube, 1996).

Certains aspects cliniques viennent s'ajouter à la longue liste des arguments en faveur d'une implication particulière des Sap dans la virulence. Mentionnons par

exemple le cas des infections vaginales. Une étude portant sur les femmes atteintes de vaginites et sur les femmes porteuses a établi que les isolats cliniques de *C. albicans* venant du premier groupe de femmes avaient une activité protéolytique supérieure à ceux provenant du deuxième groupe (Cassone *et al.*, 1987). Par ailleurs, la présence de Sap a été détectée dans le fluide vaginal de toutes les femmes chez qui on a isolé *C. albicans*. Fait remarquable, la concentration en Sap était plus importante dans le fluide vaginal des femmes avec vaginites que dans celui des porteuses saines (De Bernardis *et al.*, 1990). Plus récemment, des analyses par «Northern blot» ont permis de mettre en évidence l'expression *in vivo* du gène *SAP2* (De Bernardis *et al.*, 1995). La Sap2 est donc sécrétée lors de candidoses vaginales et semble être impliquée directement dans la virulence du champignon. Des modèles expérimentaux de vaginites chez des rates ont produit des résultats venant renforcer cette hypothèse. Ils ont permis d'établir la présence d'une immunité locale T-dépendante qui protégerait la muqueuse vaginale d'une infection à *C. albicans*. Lors de cette étude, des expériences d'immunisation passive ont démontré l'effet protecteur d'anticorps dirigés contre la protéine Sap2. De plus, l'immunisation active par application locale de Sap2p protégeait également les rates contre une infection ultérieure (De Bernardis *et al.*, 1997). Enfin, une autre étude portant sur la virulence relative de différents mutants nuls *sap1* à *sap6* dans un modèle de candidose vaginale chez le rat, a démontré que les mutants *sap1*, *sap3* et surtout *sap2* possédaient une virulence atténuée par rapport à la souche parentale. Par contre, les mutants *sap4*, *sap5* et *sap6* démontraient peu ou pas de différence. Par ailleurs, l'analyse de l'activité protéolytique présente dans les fluides vaginaux des rates infectées par les différents mutants *sap*, établit que la très grande majorité de l'activité enzymatique Sap était attribuable à l'expression du gène *SAP2*, même si les gènes *SAP1* et *SAP3* étaient exprimés. Ces résultats semblent confirmer l'importance de l'expression des protéines Sap, et surtout de la Sap2p, dans les vaginites à *C. albicans* (De Bernardis *et al.*, 1999).

Diverses études, portant cette fois sur les candidoses orales chez les patients infectés par le virus d'immunodéficience humaine (VIH), ont fourni des arguments supplémentaires confirmant le rôle important des Sap dans la virulence de *C. albicans*.

L'une d'entre elles établit que la production d'activité protéolytique par des isolats de *C. albicans* prélevés chez des patients infectés par le VIH est supérieure à celle produite par les isolats provenant de patients non infectés. En outre, l'augmentation de production de protéase semblait dépendre du stade de l'infection par le VIH, puisque les stades III (symptomatique) et IV (SIDA) présentaient des isolats significativement plus protéolytiques que les stades II (asymptomatique) et les patients non infectés (De Bernardis *et al.*, 1992). Les auteurs émettent alors l'hypothèse qu'une sélection de biotypes de *C. albicans* plus protéolytiques se produirait au cours de la progression de l'infection par le VIH. Cette hypothèse fut confirmée par Ollert *et al.* (1995) qui démontra, par contre, que la sélection des souches «super-sécrétrices» de Sap serait une conséquence du phénotype HIV+ de l'hôte et ne dépendrait pas des différents stades de la maladie. Enfin, ces isolats «super-sécréteurs», étudiés dans des modèles animaux de candidose systémique, ont présenté une virulence accrue par rapport aux isolats moins sécréteurs des patients non infectés par le VIH (De Bernardis *et al.*, 1996). Tous ces résultats semblent conférer aux Sap un rôle de premier plan dans la pathogenèse de la candidose.

2.3.4.2. Relation entre les Sap et d'autres facteurs de virulence

Outre la sécrétion des Sap, d'autres caractéristiques importantes de *Candida albicans* sont considérées comme des facteurs de virulence. Or, certains d'entre eux ont été associés à l'activité protéolytique des Sap et même parfois à une expression différentielle des gènes codant pour ces mêmes protéines. L'adhérence de *C. albicans* aux muqueuses, le dimorphisme et le changement phénotypique en sont des exemples bien étudiés.

L'adhérence de *C. albicans* est un phénomène multifactoriel complexe faisant intervenir notamment des interactions hydrophobes et des adhésines . De nombreuses études ont également établi une corrélation entre la sécrétion de Sap et l'adhérence du champignon à différents tissus. Une preuve indirecte de cette corrélation est sans doute la hiérarchie relative à l'adhérence, existant parmi les différentes espèces de *Candida*, qui est identique à celle relative à la production de

Sap par ces espèces (Rüchel *et al.*, 1992; Klotz *et al.*, 1983; Ollert *et al.*, 1993). De plus, Ghannoum *et al.* (1986) ont obtenu des résultats qui confirmaient l'existence d'une corrélation entre l'activité protéolytique de différentes souches de *C. albicans* et leur adhérence à des cellules épithéliales buccales. Chbani-Rima *et al.* (1993) ont également établi une corrélation entre l'activité protéolytique de différentes souches de *C. albicans* et leur adhérence à des cellules épithéliales vaginales ainsi que leur virulence en modèle animal de candidose disséminée. D'autres études réalisées avec la pepstatine A, un inhibiteur des Sap, sont venues appuyer l'hypothèse de l'implication de ces protéases dans l'adhérence de *C. albicans*. En effet, la présence de pepstatine dans des modèles d'adhérence diminue de façon drastique l'adhésion de *C. albicans* aux cellules épithéliales buccales (Borg et Rüchel, 1988) et aux kératinocytes épidermiques humains (Ollert *et al.*, 1993). En outre, la présence des Sap a été observée au niveau des blastoconidies et des hyphes de *C. albicans* adhérant aux cellules épithéliales (Borg et Rüchel, 1988). Certaines observations provenant d'un modèle d'adhérence à l'épiderme de souris ont permis également d'impliquer les Sap dans les étapes précoces de la colonisation (Ray et Payne, 1988). Dans ce modèle, les blastoconidies et les hyphes, après avoir adhérents aux cellules de la couche cornée, semblaient s'enfouir dans la surface des cellules, formant ainsi des dépressions à la surface des cornéocytes. Or, ce phénomène de cavitation, précédant l'invasion, était complètement absent lorsque la pepstatine A était ajoutée ou lorsque les levures étaient préalablement tuées. L'invasion subséquente était aussi totalement inhibée. La cavitation apparaît donc comme un processus actif faisant intervenir une ou plusieurs Sap. Tous ces arguments ne font que confirmer l'implication probable des Sap dans le processus d'adhésion de *C. albicans* et dans la colonisation subséquente.

Deux traits de virulence de *C. albicans* ont été associés à une expression différentielle des gènes *SAP*. Le premier appelé dimorphisme correspond à la capacité de *C. albicans* à prendre une forme hyphale qui jouerait un rôle dans la pénétration des tissus (Odds, 1988). Or, la présence de protéine Sap a été observée sur les hyphes adhérant aux cellules épithéliales (Borg et Rüchel, 1988). Par ailleurs, une expression différentielle des gènes *SAP5* et *SAP6* semble être associée à cette forme de *C. albicans* (Hube *et al.*, 1994; White et Agabian, 1995). Les Sap détectées autour

des hyphes seraient probablement les produits de ces deux gènes. Le changement phénotypique, conférant à *C. albicans* une capacité d'adaptation à des environnements variables (Soll, 1992), est un deuxième trait de virulence associé à une expression différentielle des gènes *SAP*. En effet le gène *SAP1* est seulement exprimé durant un changement phénotypique, dans les cellules n'ayant plus le phénotype «normal». Cependant, l'importance de ces phénotypes particuliers *in vivo* semble être remise en question depuis l'observation de l'instabilité des cellules opaques de la souche WO-1 cultivées à 37 °C. Dans ces conditions de culture, les cellules opaques reviennent toutes à leur phénotype original (White et Agabian, 1995). La même observation a été faite après injection par voie intraveineuse des cellules opaques à des souris (Ray *et al.*, 1989).

Comme nous l'avons vu, les Sap et plus particulièrement la Sap2 seraient impliquées dans de nombreuses étapes de la pathogenèse de la candidose et permettraient de contourner certains aspects essentiels du système immunitaire de l'hôte. De nombreuses preuves indirectes comprenant des études cliniques confirment l'importance de ces protéines dans la virulence du champignon. De plus, l'expression de ces protéines serait associée à d'autres facteurs de virulence très importants. La plupart des études, cependant, ont étudié le rôle des Sap de façon générale et ont utilisé des anticorps non discriminatoires. Il en résulte que la participation de chacune d'entre elle dans la pathogenèse n'est pas encore bien comprise. Seule la Sap2 a été plus spécifiquement étudiée, parce qu'elle correspond au transcrit majeur de la forme levure. Aussi, la plupart des études mettant en évidence l'implication d'une Sap dans la dégradation de différentes composantes du système immunitaire et des protéines fibreuses des tissus, et par extrapolation, dans l'adhérence et la colonisation de la forme levure, refléteraient plus particulièrement l'activité de la Sap2. En outre, l'expression de *SAP2* comme celle de la *SAP1* a été démontrée *in vivo* (De Bernardis *et al.*, 1995). Cependant, il reste à déterminer le niveau d'expression des autres gènes et leur participation *in vivo* dans chaque étape de la candidose. L'existence d'une famille de gènes dont l'expression est régulée différemment, selon le phénotype de la cellule et les conditions environnantes, serait un atout majeur pour la survie du

champignon dans son environnement naturel et pour sa pathogénicité. Selon le stade et le site de l'infection, *C. albicans* serait capable d'exprimer différents Sap ou groupes de Sap qui auraient chacun un rôle bien spécifique dans l'évolution de la maladie.

2.4. Les phospholipases et autres facteurs de virulence

Outre celles mentionnées ci-dessus, de nombreuses autres propriétés de *C. albicans* sont considérées comme des facteurs de virulence putatifs. Parmi celles-ci, nous retrouvons l'expression et la sécrétion de phospholipases, la résistance aux drogues antifongiques, l'imitation moléculaire de récepteurs de cellules de mammifères comme les récepteurs CR3 et CR2 dont il a déjà été question dans la partie sur l'adhérence, et la présence possible de différentes toxines (Ghannoum et Abu-Elteen, 1990; Odds, 1988). J'aborderai seulement les deux premiers facteurs qui retiennent de plus en plus l'attention de nombreux chercheurs.

2.4.1. Les phospholipases

Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides, constituants importants des membranes cellulaires. Elles joueraient un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires chez les cellules eucaryotes, comme la transduction intracellulaire de signal (Bennett *et al.*, 1998). *C. albicans* exprime différents types de phospholipases: les phospholipases A (Pugh et Cawson, 1975), B (Banno *et al.*, 1985), C (Bennett *et al.*, 1998), et D (McLain et Dolan, 1997), une lysophospholipase (Pugh et Cawson, 1975; Banno *et al.*, 1985), et deux formes de lysophospholipase-transacétylase (Takahashi *et al.*, 1991). Par ailleurs, la sécrétion extracellulaire de la plupart d'entre elles (A, B, C, lysophospholipase et lysophospholipase-transacétylase) a été observée chez de nombreuses souches de *C. albicans* (Pugh et Cawson, 1975; Banno *et al.*, 1985).

Les phospholipases seraient considérées comme des facteurs de virulence chez diverses bactéries telles que *Clostridium perfringens* et *Listeria monocytogenes*.

Elles permettraient d'endommager et d'envahir les cellules hôtes par l'action sur la membrane des sous-produits générés par l'hydrolyse des phospholipides (Ibrahim *et al.*, 1995). Ainsi, la sécrétion de certaines phospholipases par *C. albicans* pourrait possiblement être impliquée dans la pathogenèse de la candidose. De nombreuses études sont venues appuyer cette hypothèse. Tout d'abord, cette activité phospholipasique extracellulaire semble être limitée à l'espèce *C. albicans*, la plus virulente, et n'a pas été observée chez d'autres espèces du genre *Candida* (Samaranayake *et al.*, 1984). Ensuite, dans un modèle d'infection de la membrane chorio-allantoïque, l'activité phospholipasique était très importante chez la majorité des blastoconidies qui finissaient par s'autolyser, causant des dommages à cette membrane. Par contre, les hyphes en cours de pénétration de la membrane présentaient une activité phospholipasique extracellulaire seulement à leur extrémité, au niveau de la pointe de l'hyphe (Pugh et Cawson, 1977). Ces observations confirmeraient donc le rôle des phospholipases dans le processus de pénétration des tissus. Deux études comparatives ont également étayé l'hypothèse de l'implication des phospholipases dans la virulence. La première démontra une corrélation entre l'activité phospholipasique extracellulaire, l'adhérence aux cellules buccales épithéliales et la virulence, dans un modèle de candidose systémique chez la souris, de différentes souches de *C. albicans* (Barrett-Bee *et al.*, 1985). La deuxième indiqua que des isolats cliniques provenant du sang de patients atteints de candidose présentaient une activité phospholipasique extracellulaire plus élevée que des isolats commensaux oraux. Dans la même étude, les auteurs examinèrent différents facteurs de virulence (sécrétion de Sap et de phospholipases, taux de transformation hyphale, adhérence) de neuf isolats sanguins. Seule l'activité phospholipasique extracellulaire corrélait avec la virulence de ces mêmes souches dans un modèle de candidose systémique chez la souris. Finalement, une étude plus récente a établi qu'un mutant nul pour le gène de la phospholipase B (interruption de gène par «ura-blaster») était avirulent dans un modèle de candidose systémique en souris, tandis que la souche parentale était virulente (Ghannoum, 1998). Compte tenu de toutes ces observations, il semble raisonnable de penser que les phospholipases aient un rôle important à jouer dans la virulence de *C. albicans*.

2.4.2. La résistance aux agents antifongiques

Les agents antifongiques sont des drogues qui ont un effet fongicide ou fongistatique sur les champignons (levures, moisissures) et que l'on a regroupé en plusieurs grandes familles selon leur mode d'action. Les polyènes (amphotéricine B, nystatine) agissent sur la perméabilité de la membrane plasmique de par leur grande affinité avec l'ergostérol, le stérol majeur des membranes des champignons. Ces composés auraient un effet fongistatique dû aux changements dans la perméabilité membranaire et un effet fongicide dû à des dommages oxydatifs qu'ils entraînent. D'autres classes d'inhibiteurs agissent au niveau de différentes étapes de la biosynthèse de l'ergostérol à partir du squalène. Les allylamines et les thiocarbamates inhibent la squalène époxydase, les composés azolés (ketoconazole, fluconazole) agissent sur la lanostérol déméthylase (ou 14 α -déméthylase) et les morpholines sur deux enzymes situées plus en aval dans la chaîne enzymatique de la biosynthèse de l'ergostérol. Enfin, on pourra mentionner la flucytosine (5-fluorocytosine ou 5-FC) qui possède un mode d'action complètement différent. En effet, cet agent, une fois dans la cellule, est désaminé en 5-fluorouracile (5-FU) qui est lui-même éventuellement converti en deux composés possibles, le 5-fluoro-désoxyuridine monophosphate (5-FdUMP) et le 5-fluoro-uridine triphosphate (5-FUTP). Le premier inhibera la synthèse d'ADN et le deuxième sera incorporé dans l'ARN, ce qui entraînera une inhibition de la synthèse protéique (White *et al.*, 1998; Vanden Bossche *et al.*, 1994a).

La résistance à la plupart de ces agents antifongiques (polyènes, 5-FC, composés azolés) a été déjà observée chez des isolats cliniques ou chez des souches de laboratoire de *C. albicans* (White *et al.*, 1998; Vanden Bossche *et al.*, 1994a). Il importe ici de faire la distinction entre deux types de résistance. La résistance primaire est celle présente naturellement chez une espèce ou un genre donné. Par contre, la résistance secondaire, celle qui nous intéresse le plus, est acquise par une souche normalement sensible à l'agent antifongique en question. L'augmentation de la résistance secondaire, ces dernières années, est devenu un problème majeur chez les patients immunodéprimés de plus en plus nombreux (SIDA, chimiothérapie, greffes) qui développent très souvent des infections aux champignons.

Pour *C. albicans*, la résistance la plus problématique est certainement celle aux produits azolés. En effet, ces drogues antifongiques sont très largement utilisées contre des infections au niveau des muqueuses (candidoses oropharyngée, vaginale...) du fait de leur mode d'administration par voie orale et sont même utilisées en prévention chez des patients atteints du SIDA, qui développent fréquemment des candidoses oropharyngées (White *et al.*, 1998; Vanden Bossche *et al.*, 1994a).

Les mécanismes cellulaires de la résistance aux drogues antifongiques sont nombreux: résistance primaire, remplacement d'une souche sensible par une souche (ou une espèce) plus résistante, développement de la résistance par des mécanismes particuliers comme une altération génétique ou une expression transitoire d'un phénotype résistant. Ce dernier phénomène est le plus courant après une première exposition à un agent antifongique (White *et al.*, 1998). Une attention particulière a été consacrée à l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance chez *C. albicans*. De façon générale, ces mécanismes peuvent résulter en une diminution de l'import de la drogue antifongique dans la cellule, une modification de la drogue, une augmentation de la quantité de l'enzyme ciblée par la drogue ou un changement de son affinité, ou enfin une augmentation de l'export de la drogue. La résistance de *C. albicans* à la 5-FC est principalement due à une diminution de l'activité de la 5-UMP-pyrophosphorylase qui est impliquée dans la transformation de la drogue en composés inhibiteurs de la synthèse protéique et de la synthèse d'ADN. En outre, il a été établi que le gène codant pour cette enzyme était hétérozygote chez 35 à 40 % des isolats cliniques de *C. albicans* (Kerridge *et al.*, 1988; Fasoli et Kerridge, 1988), ce qui expliquerait le haut taux de résistance envers cet agent antifongique. La résistance aux polyènes est beaucoup plus rare. Elle est observée surtout au niveau d'isolats prélevés chez des patients très sévèrement immunodéprimés atteints du cancer. La plupart de ces isolats avaient un contenu en ergostérol très diminué dans leur membrane (Dick *et al.*, 1980; Sokol-Anderson *et al.*, 1988). Enfin, la résistance aux composés azolés chez *C. albicans* a été associée à différents mécanismes. Plusieurs d'entre eux se rapportent à l'enzyme cible des azolés, la lanostérol déméthylase. Ainsi, White (1997) a constaté qu'un isolat de *C. albicans* prélevé d'un patient atteint d'infection au VIH possédait une lanostérol déméthylase moins sensible au

fluconazole. Une étude plus poussée confirma que les deux allèles du gène codant pour cette enzyme avaient une mutation ponctuelle entraînant la substitution d'un acide aminé arginine par une lysine dans la protéine. La présence de cette mutation sur un des allèles du gène de la lanostérol déméthylase et la perte de variation allélique dans cette région, possiblement due à une recombinaison homologue, seraient probablement responsables de la résistance de cette souche au fluconazole. Certains autres mécanismes bien connus de résistance consistent à augmenter la quantité de l'enzyme en question. Ceci peut se faire par surexpression du gène, par amplification du gène ou par une augmentation de la stabilité de l'ARNm. La surexpression du gène codant pour la lanostérol déméthylase a déjà été observée chez des isolats cliniques de *C. albicans* résistants à divers composés azolés. Cependant, cette surexpression était peu importante, ne corrélait pas toujours avec la résistance, et était accompagnée d'autres mécanismes de résistance comme la surexpression d'une pompe à efflux (Sanglard *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'amplification du gène de la lanostérol déméthylase n'a jamais été signalée chez *C. albicans*. Cependant, chez un isolat clinique de *C. glabrata*, la résistance au fluconazole, à l'itraconazole et au kétoconazole fut notamment associée à une augmentation de la quantité de lanostérol déméthylase dans les cellules (Vanden Bossche *et al.*, 1992), elle-même liée à une amplification du gène *ERG11* codant pour cette enzyme (Vanden Bossche *et al.*, 1994b). D'autres mécanismes reliés à la résistance aux composés azolés ont été signalés. L'un d'entre eux consistait en une mutation dans le gène *ERG3* codant pour une enzyme de la chaîne de biosynthèse de l'ergostérol, située en aval de l'enzyme cible des azolés, empêchant ainsi l'accumulation de 14 α -méthylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol qui semble corrélérer avec l'arrêt de la croissance dans les souches traitées avec des composés azolés (Kelly *et al.*, 1997; White *et al.*, 1998). Finalement, il existe un autre important mécanisme de résistance chez *C. albicans* et les autres cellules eucaryotes, soit l'augmentation de l'export des drogues par différentes pompes à efflux. Il existe deux types de pompes impliquées jusqu'à présent dans la résistance à différentes drogues: les «ATP binding cassette transporters» (ABCT) et les «major facilitators» (MF). Ainsi, dans une étude de souches de *C. albicans* isolées de patients atteints du SIDA, l'augmentation de la

résistance aux composés azolés a été associée à une diminution drastique de l'accumulation de fluconazole dans les cellules, phénomène qui semblait être énergie-dépendent. Par ailleurs, la même étude établit que le taux d'ARNm du gène *CDR1*, codant pour une pompe à export de type ABCT, était augmenté jusqu'à dix fois chez trois des quatre souches résistantes. L'autre souche présentait un taux plus élevé d'ARNm du gène *MDR1* (ou *BEN'*), codant pour une pompe de type MF. Enfin, les auteurs démontrèrent par des études de complémentation, chez une souche de *S. cerevisiae* déficiente en un transporteur spécifique de drogues, que la protéine *cdr1* était impliquée dans l'export de différents composés azolés, tandis que la protéine *ben'* était spécifique au fluconazole et autres drogues non azolées (Sanglard *et al.*, 1995). Le gène *MDR1* avait auparavant été cloné pour sa capacité à rendre une souche de *S. cerevisiae* résistante au benomyl et au méthotrexate (*C. albicans* est naturellement résistant à ces deux drogues), et avait été impliqué dans la résistance à divers autres produits tels que la cycloheximide (Fling *et al.*, 1991; Ben-Yaacov *et al.*, 1994). Cependant, la délétion du gène *MDR1* chez *C. albicans* semble ne pas avoir d'effet sur la sensibilité au fluconazole (Sanglard *et al.*, 1996) ni au benomyl (Goldway *et al.*, 1995). Plus récemment, une étude démontra le rôle important et assez fréquent de la surexpression du gène *MDR1* dans la résistance au fluconazole. Cette résistance se développerait graduellement, lors d'une thérapie, par de multiples mécanismes moléculaires dont la surexpression du gène *MDR1*. De plus, les auteurs précisèrent que le gène *MDR1* n'est pas exprimé dans les souches sensibles au fluconazole, ce qui explique pourquoi les mutants nuls *mdr1* ne présentent aucune hypersensibilité (Franz *et al.*, 1998). L'activation du promoteur du gène se ferait par mutation dans un facteur trans-régulateur (Wirsching *et al.*, 2000). Par ailleurs, une autre étude démontra que la délétion du gène *CDR1* chez *C. albicans* entraînait une hypersensibilité aux composés azolés tels que le fluconazole, l'itraconazole et le kétoconazole (Sanglard *et al.*, 1996), confirmant le rôle de cette pompe dans l'export de ces agents antifongiques. Récemment, un deuxième gène de *C. albicans* codant pour un ABCT, *CDR2*, fut cloné par complémentation d'une souche de *S. cerevisiae* hypersensible aux drogues. Ce gène conférait la résistance à divers composés azolés ainsi qu'à d'autres drogues et était surexprimé chez différentes souches de *C.*

albicans résistantes à ces drogues. Cependant, sa délétion chez *C. albicans* n'eut aucun effet sur la sensibilité à ces agents antifongiques (Sanglard *et al.*, 1997b). Mais, tout comme le gène *MDR1*, le gène *CDR2* ne semble pas être exprimé dans les cellules sensibles. Cela expliquerait l'absence d'effet de sa délétion (Sanglard *et al.*, 1997b).

A la suite de ces observations, il apparaît que la résistance de souches de *C. albicans* à différents agents antifongiques peut être le résultat de nombreux mécanismes moléculaires qui pourraient se développer graduellement sous la pression sélective des agents. Plusieurs de ces mécanismes semblent souvent être présents chez une même souche résistante, ce qui complique beaucoup la recherche de nouveaux agents antifongiques.

3. SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMME HÔTE D'EXPRESSION

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la pathogénicité de *C. albicans* est associée à différents facteurs de virulence putatifs qui agiraient de façon séquentielle et/ou coopérative. Les Sap, et plus particulièrement la Sap2, seraient impliquées dans différentes étapes de la pathogenèse telles que l'adhérence et l'invasion tissulaire et permettraient d'enrayer certains mécanismes du système immunitaire de l'hôte. Plusieurs évidences expérimentales, viennent appuyer l'implication toute particulière de la Sap2p dans la virulence de *C. albicans*. Tout d'abord, l'ARNm de *SAP2* est le transcrit principal (le plus abondant) dans la forme levure, et ce, dans une grande variété de conditions et dans toutes les souches testées (Hube *et al.*, 1994; White et Agabian, 1995). Par ailleurs, cette protéase est capable de dégrader la mucine gastro-intestinale, ce qui lui permettrait de briser la barrière formée par le mucus et donc faciliterait l'adhésion des levures aux cellules épithéliales sous-jacentes (Colina *et al.*, 1996). La protéine Sap2 aurait donc un rôle majeur dans les étapes précoces de la pathogenèse. De plus, les IgA sécrétoires, qui sont une barrière importante à la colonisation des muqueuses, sont également dégradés par la protéine Sap2 (Rüchel *et al.*, 1986), tout comme la kératine et le

collagène (Negi *et al.*, 1984; Kaminishi *et al.*, 1986). Ces deux dernières activités protéolytiques permettraient à *C. albicans* de créer des dommages aux tissus épithéliaux et conjonctifs, et favoriseraient l'invasion tissulaire et l'accès au système sanguin. La Sap2p est également capable de dégrader de nombreuses protéines impliquées dans le système immunitaire, telles que les fragments Fc des IgG et la protéine C3 du complément (Kaminishi *et al.*, 1995). Finalement, rappelons que l'expression *in vivo* du gène *SAP2* a été démontrée au cours de candidoses vaginales expérimentales (De Bernardis *et al.*, 1995). En outre, l'immunisation passive par des anticorps dirigés contre la Sap2p et l'immunisation active par application locale de Sap2p protégeaient les rates contre des infections vaginales (De Bernardis *et al.*, 1997). Enfin, une étude portant sur la virulence relative de mutants nuls *sap1* à *sap6* dans un modèle de candidose vaginale chez le rat a démontré que seuls les mutants *sap1*, *sap3*, mais surtout *sap2* possédaient une virulence atténuée par rapport à la souche parentale. Par ailleurs, la très grande majorité de l'activité enzymatique Sap présente dans les fluides vaginaux des rates infectées par les différents mutants était attribuable à l'expression du gène *SAP2* (De Bernardis *et al.*, 1999). Compte tenu de toutes ces considérations, il semble pertinent d'étudier plus particulièrement cette protéase et d'essayer d'évaluer son importance dans l'établissement de l'infection. Deux approches ont été retenues par notre laboratoire. La première consistait à surexprimer le gène *SAP2* dans une souche de *C. albicans* et d'évaluer l'effet d'une telle surexpression dans des modèles animaux de candidose. La deuxième, objet du présent mémoire, proposait d'exprimer le même gène hors de son contexte, c'est-à-dire dans une souche de l'espèce non pathogène *Saccharomyces cerevisiae*, espèce qui ne produit pas de Sap, et d'évaluer l'effet de cette expression hétérologue dans les mêmes modèles animaux. Ces approches diffèrent des nombreuses études sur les protéases Sap réalisées à ce jour qui consistent pour la plupart à rendre inactif un ou plusieurs gènes correspondants (mutagenèse, interruption de gènes). Dans l'une d'entre elles, notamment, des mutants nuls *Sap1*, *Sap2*, et *Sap3* (Hube *et al.*, 1997b) ont chacun démontré une activité protéolytique *in vitro* réduite par rapport à la souche sauvage et causé une virulence atténuée dans des modèles animaux de candidose disséminée, mais sans corrélation directe possible entre ces deux paramètres. Ce

résultat peut s'expliquer entre autre par la redondance de plusieurs membres de la famille des protéines Sap et/ou par l'interdépendance des activités de certaines Sap. Nos deux approches (surexpression et expression hétérologue de *SAP2*) permettent ici d'éviter ces problèmes causés par la redondance des autres facteurs de virulence et des autres protéines Sap.

S. cerevisiae est une levure très largement utilisée comme outil biomoléculaire dans l'étude de la structure, la fonction et la régulation de gènes (Tuite, 1992). Son mode de reproduction est le bourgeonnement et son génome haploïde est réparti sur seize chromosomes. *S. cerevisiae* présente un cycle sexuel bien défini. Ainsi, lors de conditions de privation bien spécifiques, la cellule diploïde subit une méiose et donne naissance à quatre spores (ascospores). Deux spores de type sexuel différent (a et α) peuvent ensuite fusionner et former une cellule diploïde. Lorsque les conditions sont favorables, la reproduction est essentiellement asexuée. Finalement, le cycle cellulaire de *S. cerevisiae* est analogue à celui des cellules eucaryotes en général et est composé des quatre phases G1, S, G2, et M (Pringle *et al.*, 1997). Il serait opportun maintenant de décrire brièvement le processus de sécrétion des protéines chez *S. cerevisiae*, puisque la base de notre projet était fondée sur l'expression hétérologue de la Sap2p de *C. albicans* chez ce microorganisme. De façon générale, ce processus est similaire à celui des autres cellules eucaryotes. Grâce à un peptide signal, les protéines devant être sécrétées sont acheminées au réticulum endoplasmique où elles acquièrent une conformation fonctionnelle, notamment par le clivage du peptide signal à l'aide d'une peptidase et par l'addition éventuelle de sucres et de ponts disulfure. Par la suite, les protéines sont dirigées vers l'appareil de Golgi par l'entremise de vésicules. Les protéines reçoivent alors des modifications séquentielles éventuelles dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi. Parmi celles-ci, on retrouve le clivage de divers propeptides menant à la maturation finale de certaines protéines (enzyme active), comme le clivage du propeptide du facteur α par la protéase Kex2 dans le compartiment trans de l'appareil de Golgi. Des mannosyltransférases présentes dans les compartiment cis et médian du Golgi sont également impliquées dans la maturation de certaines protéines. Les protéines

solubles sont alors empaquetées dans des vésicules de sécrétion qui se dirigeront vers la membrane plasmique pour exocytose (Kaiser *et al.*, 1997).

Compte tenu du propos de notre projet, le promoteur de l'alcool déshydrogénase I (ADHI), promoteur fort et considéré constitutif (Schneider et Guarente, 1991), semblait fort approprié pour exprimer en grandes quantités la Sap2p chez *S. cerevisiae*. Ce promoteur est largement utilisé pour l'expression à haut niveau de gènes de levures clonés (Schneider et Guarente, 1991). Le choix d'un promoteur inductible nous paraissait moins pertinent puisque la souche de *S. cerevisiae* exprimant la Sap2p devait être utilisée dans des modèles animaux. Par ailleurs, la conservation du peptide signal et du propeptide propres à la Sap2p semblait une décision pertinente. En effet, divers signaux de sécrétion hétérologues et homologues ont été utilisés avec succès pour diriger des protéines dans le processus de sécrétion de *S. cerevisiae* et d'autres levures (Moir et Davidow, 1991). En outre, une étude récente démontra que la maturation correcte de la Sap2p était effectuée chez *C. albicans* par un homologue de l'endopeptidase Kex2 de *S. cerevisiae* (Newport et Agabian, 1997). Finalement, lors de l'expression hétérologue de la protéine Sapt1 de *C. tropicalis* chez *S. cerevisiae*, les processus post-traductionnels, la maturation (par Kex2) et la sécrétion de la protéine étaient effectués de façon correcte (Togni *et al.*, 1996). Les problèmes de reconnaissance du peptide signal original, de maturation et de sécrétion semblaient donc peu probables lors d'une expression hétérologue de la Sap2p chez *S. cerevisiae*.

Certaines autres difficultés pouvaient survenir lors de l'expression de la Sap2p. En effet, plusieurs protéases présentes dans la levure peuvent générer des artefacts touchant l'activité, la structure ou la localisation intracellulaire des protéines exprimées. Parmi les protéases cellulaires, celles présentes dans la lumière de la vacuole des levures représentent la source majeure des problèmes rencontrés (Jones, 1991). La vacuole de *S. cerevisiae* a plusieurs fonctions. Elle sert au transport et au stockage d'ions et autres molécules; elle intervient dans la rotation ou «turnover» des protéines en réponse à des conditions environnementales particulières; et elle contribue à l'autophagie, particulièrement importante en conditions de privation de carbone, d'azote ou de soufre (Jones *et al.*, 1997). Parmi les hydrolases vacuolaires solubles,

on retrouve l'endoprotéinase aspartique (PrA), l'endoprotéinase sérine (PrB), la carboxypeptidase sérine (CpY) et la métallocarboxypeptidase (Cps). Les deux premières sont des enzymes clé pour la vacuole puisqu'elles permettent l'activation des autres hydrolases vacuolaires. Elles participent également à la dégradation des protéines. PrB, plus particulièrement, serait une enzyme clé durant l'autophagie. CpY et CpS, quant à elles, seraient impliquées dans le métabolisme des peptides (Jones *et al.*, 1997). Pour éviter des difficultés de production de protéines, il est parfois nécessaire d'éliminer l'activité de PrB et de certaines des autres protéases vacuolaires. Compte tenu de ces considérations, le choix de l'hôte pour l'expression de la protéase Sap2 s'est porté sur la souche clABYS86 de *S. cerevisiae*, qui est déficiente en PrA, PrB, CpY et CpS.

En terminant, l'existence de souches pathogènes de *S. cerevisiae* est un fait intéressant qu'il faut mentionner (Clemons *et al.*, 1993; Nyirjesy *et al.*, 1995). En effet, la possibilité qu'un seul caractère, tel que la sécrétion de la Sap2p de *C. albicans*, puisse conférer une certaine virulence à *S. cerevisiae* est ainsi plus plausible. L'hypothèse d'exprimer la protéine Sap2 de *C. albicans* chez *S. cerevisiae* en vue d'évaluer son rôle dans la virulence en devient alors plus pertinente.

ARTICLE

Veillez noter que l'article qui suit a été publié dans la revue scientifique *Microbiology* en 1998 (volume 144, pages 2299-2310). Pour des fins de compréhension et d'homogénéisation, la pagination et la numérotation des figures ainsi que des tableaux ont été modifiées et diffèrent donc de celles retrouvées dans l'article publié.

Le clonage du gène *SAP2* ainsi que toute la partie portant sur la construction de transformants de *S. cerevisiae* et leur étude *in vivo* font l'objet du présent mémoire. Par contre, l'approche de la surexpression de *SAP2* chez *C. albicans* n'en fait pas l'objet.

Overexpression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase 2 and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* do not augment virulence in mice.

Nathalie Dubois, Ana Rosa Colina, Francine Aumont, Pierre Belhumeur
and Louis de Repentigny*

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine.
University of Montreal and Sainte-Justine Hospital, Montreal, Quebec H3T 1C5,
Canada

Running title: Expression of *C. albicans* Sap2p and virulence

Keywords: Candidiasis, *Candida albicans*, aspartyl proteinase, *Saccharomyces cerevisiae*

Subject category: Pathogenicity and Medical Microbiology.

Author for correspondence: Dr. Louis de Repentigny

Department of Microbiology and Immunology
Sainte-Justine Hospital
3175 Côte Sainte-Catherine
Montreal, Quebec H3T 1C5
Canada.
Telephone: (514) 345-4643
Fax: (514) 345-4860
e-mail: louisr@globale.net

SUMMARY

In order to elucidate the implications of secreted aspartyl proteinase (Sap)2p in the pathogenesis of *Candida* infections, we have expressed the *SAP2* gene in *S. cerevisiae* and overexpressed it in *C. albicans*. The coding region of *SAP2* including its signal sequence and propeptide was amplified by PCR and cloned downstream of the *S. cerevisiae* or *C. albicans ADH1* promoter. Plasmidic expression of *SAP2* in *S. cerevisiae* showed that the signal peptide was functional. Integrative transformation of *S. cerevisiae* and *C. albicans* was accomplished by homologous recombination within the *URA3* locus for *S. cerevisiae* and *SAP2* locus for *C. albicans*. Negative control transformants carried either plasmids without *SAP2* insert or with mutated *sap2*. *S. cerevisiae* and *C. albicans* transformants showed similar growth rates to their parental strains or negative controls, when grown in media containing amino acids. However, in medium with BSA as sole nitrogen source, constitutive expression of *SAP2* enabled *S. cerevisiae* to grow and increased the growth rate of *C. albicans*. In both media, only *S. cerevisiae* transformants harbouring *SAP2* secreted the enzyme, as confirmed by proteinase activity assays and immunoblotting. When *C. albicans* was grown in amino acids medium, the enzyme was detected exclusively in transformants constitutively expressing *SAP2*. However, in BSA medium, these strains secreted earlier and higher amounts of enzyme and total proteinase activity. In pathogenicity studies in intact mice, expression of Sap2p as a sole putative virulence factor did not cause *S. cerevisiae* to become virulent, and constitutive overexpression of *SAP2* did not augment virulence of *C. albicans* in experimental oral or systemic infection.

INTRODUCTION

Candida albicans is an important opportunistic pathogen causing local or systemic infection in immunocompromised patients (Odds, 1988). Several virulence factors have been proposed in pathogenicity: adhesion, dimorphism, phenotypic switching, molecular mimicry of mammalian integrins, and secretion of phospholipases and aspartyl proteinases (Cutler, 1991; White *et al.*, 1995). The secreted aspartyl proteinases (Saps) have been studied extensively, and are encoded by at least eight genes which are expressed and regulated differentially (Hube, 1996). Northern (RNA) analysis has shown that *SAP1* and *SAP3* are regulated during phenotypic switching between the white and opaque forms of strain WO-1, while *SAP2* was found to be the dominant transcript in budding cells grown in media containing protein as the sole nitrogen source. The expression of *SAP4* to *6* is detected at neutral pH during serum-induced yeast to hyphal transition, but the expression of the *SAP7* gene has not been detected (Hube *et al.*, 1994; White & Agabian, 1995).

In clinical and laboratory strains grown as the yeast form *in vitro*, Sap2p is the predominant expressed proteinase. Evidence has also been provided that Saps are secreted by *C. albicans* *in vivo* during the course of mucosal and deep tissue infections (Borg & Ruchel, 1988; De Bernardis *et al.*, 1995). The most commonly used approach to define the role of Saps as virulence attributes has been to compare lethality of mice infected intravenously with parental strains or proteinase-deficient mutants. The mutants, isolated by chemical mutagenesis techniques or UV-irradiation, have been shown to be less virulent than their parental strains. However, definitive proof of the role of Saps in virulence of *C. albicans* was lacking, either because (i) the mutants had high levels of reversion, (ii) they still produced detectable proteinase activity *in vitro*, (iii) the nature of the mutation was undefined, or (iv) they may harbour multiple, independent and unknown lesions (Macdonald & Odds, 1983; Kwon-Chung *et al.*, 1985; Crandall & Edwards, 1987; Ross *et al.*, 1990).

Recently, *C. albicans* strains harbouring targeted disruptions of *SAP* genes have been constructed using the ura-blaster protocol (Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997). When tested in a murine model of systemic candidiasis, the virulence of *C.*

albicans *sap1*, *sap2* and *sap3* mutants was modestly attenuated (Hube *et al.*, 1997). However, the extent of attenuation of virulence did not correlate directly with the reduction of proteolytic activity *in vitro*. Similarly, mice infected with a *C. albicans* *sap4,5,6* triple homozygous null mutant had survival times significantly longer than that of control animals (Sanglard *et al.*, 1997). In *C. tropicalis*, disruption of the *SAPT* gene was also achieved by co-transformation with a linear DNA fragment carrying a deletion in *SAPT* (Sanglard *et al.*, 1992). Surprisingly, the virulence of the *SAPT*-null mutant and the proteinase-positive strain did not differ significantly after intravenous infection in mice (Togni *et al.*, 1994). These results suggested that the Sap of *C. tropicalis* does not contribute significantly to fungal virulence in systemic infections. Alternately, potentially decreased virulence may have been masked by the redundancy of members of a putative multigene Sap family in *C. tropicalis* (Monod *et al.*, 1994) and/or the redundancy of other virulence attributes of *Candida*.

Selective expression/overexpression of genes coding for putative virulence attributes is an attractive strategy to overcome redundancy problems and clarify the contribution of each isoenzyme to virulence. This approach would allow the study of virulence-enhancing genes in already virulent strains (homologous overexpression) and in nonpathogenic but closely related strains (heterologous expression). The rationale for this approach is also based on clinical studies which have shown that the Sap activity of *C. albicans* isolates from patients with vaginitis (Cassone *et al.*, 1987) or HIV-infection (Ollert *et al.*, 1995) was significantly higher than that of isolates from asymptomatic carriers. In the present study, we describe the construction of stable *S. cerevisiae* and *C. albicans* strains that constitutively secrete Sap2p. Sap2p expression by *S. cerevisiae* allowed it to hydrolyse and use BSA as nitrogen source, while Sap2p overexpression in *C. albicans* resulted in early and high proteinase secretion. The virulence of these genetically engineered strains was evaluated in murine models of oral or systemic infections.

(This work was presented in part at the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, Miami Beach, FL., 4-8 May, 1997).

METHODS

Strains and culture conditions

Yeast strains used in this work are listed in Table II. *Escherichia coli* DH10B (Gibco BRL) was routinely used as a plasmid host for cloning procedures. Bacterial and yeast media were prepared as described (Rose *et al.*, 1990; Sambrook *et al.*, 1989). Yeast parental strains were grown in YPD medium containing 1% (w/v) yeast extract (Difco), 2% (w/v) bacto peptone (Difco) and 2% (w/v) dextrose. Uracil/uridine independence selection was performed by using CAT medium [0.67% (w/v) Yeast Nitrogen Base (YNB) without amino acids (Difco), 0.5% or 1% (w/v) casaminoacids, 0.008% (w/v) adenine, 0.002% (w/v) tryptophan] supplemented with 2% (w/v) dextrose. The medium to regenerate *C. albicans* spheroplasts was supplemented with 1 M sorbitol. Induction of Sap2p was done in YNB-BSA medium containing 0.17% (w/v) YNB without amino acids and ammonium sulfate (Difco), supplemented with 2% (w/v) dextrose and 0.2% (w/v) BSA (fraction V, Sigma Chemical). Media were supplemented with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ uracil/uridine as required. All yeast cultures were incubated at 30 °C, except for experiments on the kinetics of Sap2p secretion by *S. cerevisiae* and *C. albicans* which were conducted at 37 °C. Growth rates were monitored by measuring the absorbance at 600nm (OD_{600}). Media were solidified with 2% (w/v) agar. Germ tube formation was evaluated by incubating in 5% (v/v) newborn calf serum (Gibco BRL), for 3 h at 37 °C.

Table II: Yeast strains

Strain	Genotype	Source or reference
<i>S. cerevisiae</i>		
CIABYS86	<i>MATα. leu2 ura3-52 his3 pra1 prb2 prc1 cps</i>	A. H. Bussey
PUB754	<i>MATα. ura3-52 pra1 prb2 prc1 cps</i>	This study
SEY6210	<i>MATα. leu2-3,112 ura3-52 his3Δ200 lys2-801 trp1Δ901 suc2Δ9</i>	Robinson <i>et al.</i> , 1988
Y55	(Laboratory isolate), <i>HO</i>	Clemons <i>et al.</i> , 1994
YJM128	(clinical isolate)	Clemons <i>et al.</i> , 1994
YJM273	(clinical isolate)	Clemons <i>et al.</i> , 1994
<i>C. albicans</i>		
CAI4	<i>Δura3::imm434/Δura3::imm434</i>	Fonzi <i>et al.</i> , 1993
LAM-1	(clinical isolate)	Lacasse <i>et al.</i> , 1990
SC5314	(clinical isolate)	Gillum <i>et al.</i> , 1984

PCR amplification of *SAP2* gene

Genomic DNA from *C. albicans* strain LAM-1, obtained as described by Magee *et al.* (1987), was used as template for PCR amplification of the *SAP2* gene. The two primers used were : 5'CGGGATATCAACAACCCACTAGACATCACCC3' and 5'CTGGAGCTCCACCCCTTCATCTTAGGTCAA3'. These primers flank the *SAP2* coding sequence with its own signal peptide. The underlined sequences indicate *EcoRV* and *SacI* restriction sites, respectively. The 100 μ l-PCR reaction contained 1 μ g of genomic DNA template, 1 μ g each of the two primers, 400 μ M each of dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 μ l DMSO, 2 U Vent DNA polymerase (New England Biolabs) and 1X Vent buffer. The PCR program was 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 72 °C for 2 min, for 30 cycles. A 1244 bp PCR product was gel purified and cloned into pBluescript KS II⁺ (Stratagene), after digestion with *EcoRV* and *SacI*. The PCR product

sequence was verified by double strand sequencing with universal and internal primers (Sanger *et al.*, 1977).

Plasmid constructions

Recombinant DNA manipulations were done by standard methods (Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid pVTU-SAP2 was constructed by inserting the SAP2 PCR product, digested by *EcoRV* and *Ecl136II*, into the *Ecl136II* site of *S. cerevisiae* shuttle vector pVT102-U (Vernet *et al.*, 1987). A negative control, pVTU-aSAP2, carried SAP2 in antisense orientation. pVT102-U is a 2 μ -based plasmid bearing the *ADH1* promoter (*ADH1p*), its terminator region and the *URA3* marker gene. From pVTU-SAP2, a 2 kb *SphI* fragment containing SAP2 downstream of *ADH1p*, was blunt-ended with T4 DNA polymerase and inserted in the *SmaI* site of pRS306, a *S. cerevisiae* integrative plasmid containing the *URA3* marker gene (Sikorski & Hieter, 1989). This plasmid was named pRS-SAP2. Finally, the *C. albicans* vector containing *C. albicans ADH1p* and *URA3* marker, YPB-ADHpL (kindly provided by A. J. P. Brown, University of Aberdeen, U.K.), was used to insert the 1244 bp *EcoRV-Ecl136II* SAP2 fragment into *EcoRV* site, under the control of the *C. albicans ADH1p*. This construct was named pYPB-SAP2. A negative control plasmid, pYPB-mSAP2, was generated by inserting a mutated *sap2*. The mutation was introduced by cleavage of the SAP2 gene with *BamHI*, filled-in with klenow enzyme and religated. This introduced a frameshift (verified by sequencing) after the 77th amino acid and a premature stop codon 3 amino acids further.

Yeast transformation

S. cerevisiae strains grown overnight in YPD medium at 30 °C, were transformed using the LiAc/SS-DNA/PEG procedure described by Schiestl *et al.* (1993). Strains clABYS86 (S86), PUB754 (754) and SEY6210 (6210) were transformed with pVTU-SAP2. PUB754, a his⁺ leu⁺ derivative of S86, was obtained by two separate "one step gene replacement" transformations with *HIS3* and *LEU2* DNA fragments (Rothstein, 1983). Integration of SAP2 in *S. cerevisiae URA3* locus was done by transforming the 754 strain with pRS-SAP2, linearized by *NcoI* in *URA3* gene.

Negative controls were also constructed by transforming the 754 strain with *Nco*I-linearized pRS306 plasmid.

Transformation of *C. albicans* CA14 was done by the spheroplast method as described by Rose *et al.* (1990), with minor modifications. Briefly, CA14 yeast cells grown overnight in YPD were diluted in YNB-BSA medium (supplemented with uridine), to an OD₆₀₀ of 0.2. Then, exponentially growing cells (OD₆₀₀ of 0.5) were used to prepare the spheroplasts. pYPB-SAP2 and pYPB-mSAP2 plasmids were linearized by cutting at the *Kpn*I site within the *SAP2* gene and used to transform the spheroplasts by integration at the *SAP2* locus. The *S. cerevisiae* and *C. albicans* transformants, selected by complementation of the *ura3* mutation, were grown on CAT plates.

Proper integration was evaluated by Southern blot analysis (Belhumeur *et al.*, 1993). Genomic DNA from *S. cerevisiae* transformants, prepared as described by Hoffman & Winston (1987), was digested with *Avr*II and probed with a 693 bp *Eco*RV-*Sma*I *URA3* (Fig. 1, panel *S. cerevisiae*) or a 597 bp *Bam*HI-*Kpn*I *SAP2* restriction fragment. *C. albicans* genomic DNA prepared according to Magee *et al.* (1987), was digested with *Kpn*I and probed with a 265 bp *Pst*I-*Dra*I *SAP2* DNA fragment (Fig. 1, panel *C. albicans*).

SDS-PAGE and Western blots

Intra- and extracellular protein extracts from *S. cerevisiae* plasmidic transformants grown 18 h in CAT medium at 30 °C, were obtained by lysing with glass beads (Harlow & Lane, 1988) and acetone precipitation, respectively. One-tenth of the original extracts volume was loaded in a 12% polyacrylamide separating gel to perform SDS-PAGE (Laemmli, 1970). For time course evaluation of Sap2p expression, 60 µl of culture supernatants were analysed by SDS-PAGE. Following electrophoresis, proteins were transferred on nitrocellulose membranes (Towbin *et al.*, 1979). Membranes were blocked with 2% (w/v) skim milk in Tris-buffered saline (TBS: 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl), and washed between steps with TBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (TBST). Membranes were incubated for 1 h with mouse anti-Sap2p monoclonal antibody IFG3, kindly provided by T. L. Ray (University of Iowa), diluted 1:500 in TBS-2% (w/v) skim milk. The bound antibody was detected using

alkaline-phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG (Gibco BRL) diluted 1:5000 in TBS-2% (w/v) skim milk.

Enzyme assays

Proteolytic activity was quantitated by the method of Milewski *et al.* (1994), with minor modifications. Briefly, culture supernatants (150 μ l) were mixed with 1% (w/v) BSA in 50 mM sodium citrate, pH 3.5 (600 μ l). After 1 h incubation at 37 °C, reactions were stopped by adding 400 μ l of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). Samples were cooled in an ice-bath for 10 min, and precipitated proteins were removed by centrifugation at 5000 *g*, 10 min. The supernatants absorbance was read at 280 nm and corrected for background using a control (for each point) in which TCA solution was added prior to the culture supernatant. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme causing ΔA_{280} 0.1 in 1 h.

Pathogenicity *in vivo*

The virulence of *S. cerevisiae* and *C. albicans* transformants as well as their parental strains was evaluated in murine models of oral and systemic candidiasis. Crl:CD-1 (ICR) BR female mice, weighing 22-24 g, were obtained from Charles River Breeding Farms (St-Constant, Québec, Canada) and were kept at the University of Montreal Animal Care Unit. For experimental infections, the yeast inoculum was prepared from cells grown overnight in CAT medium at 30 °C.

The oral infection model described by Chakir *et al.* (1994) was used with minor modifications. Briefly, both *S. cerevisiae* and *C. albicans* yeast cells were washed twice in sterile PBS (0.01 M, pH 7.4), and counted in a hemacytometer. Cells (1×10^8) were distributed in sterile plastic microfuge tubes and pelleted by centrifugation at 13000 *g*. Six mice per strain were anesthetized by the intraperitoneal route with 0.35 ml of ketamine (10 mg ml⁻¹). They were then inoculated by topical application into the oral cavity, using a sterile calcium alginate swab (Fisher Scientific). A longitudinal quantification of the microorganisms in the oral cavities of individual mice was done by daily oral swabbing until day 8 post-inoculation. Swabs used for sampling were dissolved in 2 ml volumes of Ringer's citrate buffer (Rodrigue *et al.*, 1989), and serial

dilutions in PBS were plated on CAT medium supplemented with 50 mg l⁻¹ chloramphenicol (CAT-Chl). Plates were incubated at 30 °C and colony-forming units (CFU) were counted.

Experimental murine systemic infection (Clemons *et al.*, 1994) was used to study *S. cerevisiae* virulence. Mice were inoculated intravenously with 2 x 10⁷ or 6 x 10⁷ cells, previously washed twice in sterile saline. Six mice per yeast strain were killed at one, two or four weeks after infection. To determine organ burden, brains and kidneys were removed aseptically, homogenized in 5 ml of sterile saline, and plated on CAT-Chl and Sabouraud supplemented with chloramphenicol (SDA-CHL) for determination of CFU.

The virulence of *C. albicans* strains was also evaluated in a model of systemic candidiasis. Mice were inoculated intravenously with 5 x 10⁵ cells, previously washed twice in PBS. Mice were observed daily for signs of morbidity over 15 days. Moribund animals were scored as nonsurvivors and euthanized by CO₂ inhalation. To evaluate tissue invasion, additional groups of infected mice were sacrificed at one, three or six days post-inoculation. One kidney from each animal was removed and prepared for histological analysis. They were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained by the Grocott procedure (Luna, 1992). The remaining kidney and the liver were also removed aseptically, weighed and homogenized in 5 ml PBS. Homogenates were plated on CAT-Chl and SDA-Chl, and incubated at 30 °C for colony counting. Data were expressed as CFU/g kidney or liver. Several colonies of *C. albicans* were isolated from both media to verify the *in vivo* stability of *SAP2* integration by Southern blot as described above.

Zymolyase and NaCl resistance

A zymolyase test was used to compare the sensitivity of the cell wall of transformants and parental strains (Lussier *et al.*, 1997). *S. cerevisiae* and *C. albicans* strains were grown in CAT medium to exponential phase (0.6 OD₆₀₀), washed twice in sterile saline and resuspended in sterile zymolyase buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) at 0.635 OD₆₀₀. Aliquots of 400 µl were mixed with 100 µl zymolyase 100T (1 mg ml⁻¹) or 100 µl of zymolyase buffer (controls). After 1 h incubation at 37 °C with gentle shaking,

5 μ l of serial dilutions were spotted on CAT agar medium. *C. albicans* and *S. cerevisiae* strains were also tested for NaCl resistance. Briefly, cultures grown overnight in CAT medium were patched onto CAT plates supplemented or without 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2 or 2.6% NaCl. Sensitivity to zymolyase and NaCl was determined by comparison of the level of growth after incubation at 30°C.

Statistical analysis

The data were fed to the SAS system (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The Kaplan and Meier (1958) product limit estimate was used to analyze survival data and plot the survival function. The Wilcoxon method was applied to compare the survival functions of experimentally infected mouse populations, and differences were considered significant at the 0.01 level.

Differences in weights and CFU g^{-1} of kidneys were compared among mouse populations by using the general linear models procedure two-way analysis of variance, conducted with two factors, one between (strain) and one within (time). Significant interactions ($p < 0.01$) were further analyzed using the Bonferroni (Dunn) t test, and the resulting comparisons were considered significant at the 0.01 level.

RESULTS

Expression and secretion of Sap2p by *S. cerevisiae*

As an initial approach toward heterologous expression of *C. albicans* SAP2 in *S. cerevisiae*, we performed a PCR amplification of this gene from *C. albicans* strain LAM-1. The 1244 bp PCR product containing the native prepro and mature coding regions was cloned into the multicopy expression vector pVT102-U downstream of the constitutive *ADH1* promoter, to create the plasmid pVTU-SAP2 (sense). A negative control pVTU-aSAP2 (antisense) bearing the PCR product in opposite orientation was also constructed. These recombinant plasmids were transformed in *S. cerevisiae* strains 6210 and S86, the latter defective in intracellular proteinases (Table II).

The expression of Sap2p was evaluated by Western blot, in intra- and extracellular extracts. As shown in Fig. 4 (lanes 3, 4 and 6), a single positive signal of approximately 42 kDa was detected in the extracts of strains transformed with pVTU-SAP2 (sense orientation). A decrease in loading revealed additional forms of 39 and 45 kDa (data not shown). The largest amount of Sap2p was detected in the extracellular fraction (secreted) indicating that the secretion signal was fully functional in *S. cerevisiae*. In addition, there was more abundant production of Sap2p by strain S86, the intracellular proteinases mutant, compared to 6210 (Fig. 4, lanes 4 and 6). We could not determine whether this difference was due to the lack of these proteinases, since these strains are not isogenic. In addition, degradation of casein was demonstrated in a Petri dish assay (Colina *et al.*, 1996a) using unconcentrated culture supernatant of S86 (sense orientation), but was absent in the antisense orientation (data not shown). Based on these results, we decided to select strain S86 harbouring pVTU-SAP2 for further experiments. No anti-Sap2p reacting material was detected in the strain transformed with pVTU-aSAP2 (antisense orientation; Fig. 4, lanes 1 and 2).

Overall, these findings indicated that the recombinant enzyme was efficiently expressed and secreted into the culture medium, and that the signal sequence of *C. albicans* SAP2 was functional in *S. cerevisiae*.

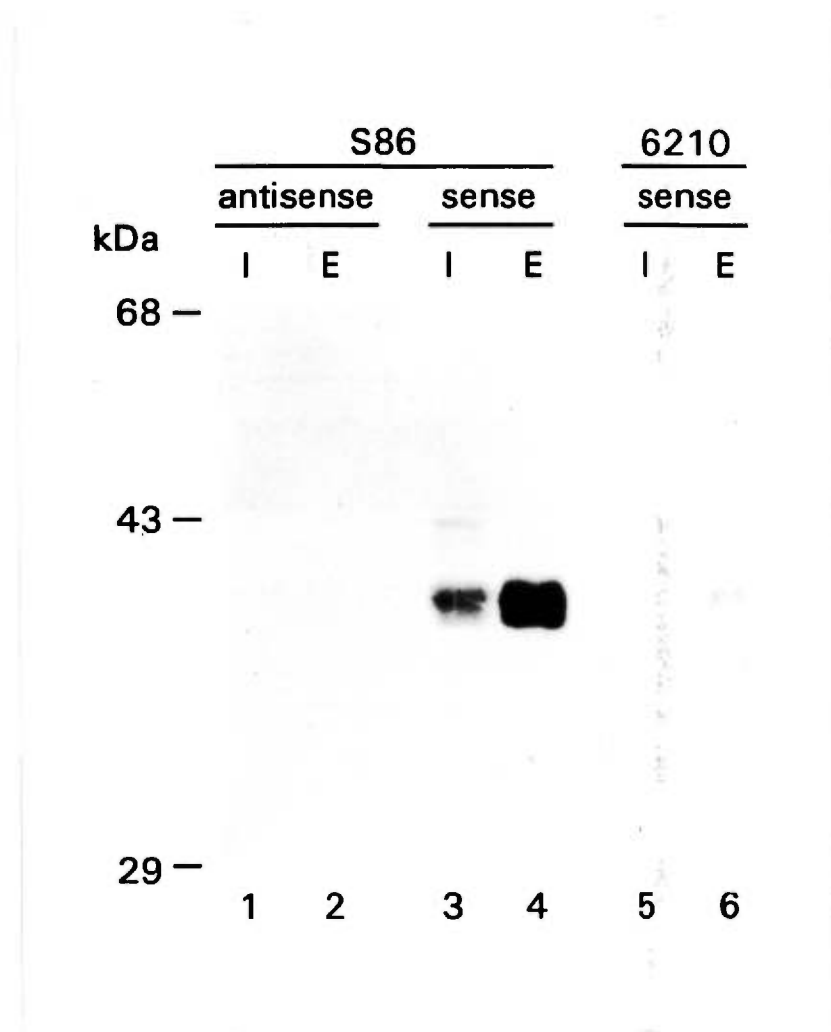


Figure 4: Western blot analysis of intra- (I) and extracellular (E) proteins of *S. cerevisiae* S86 and 6210 plasmidic transformants (with sense or antisense *SAP2* constructs) grown in CAT medium for 18 h at 30 °C, and probed with an anti-Sap2p monoclonal antibody. Loaded sample volumes were adjusted to equivalent mass cultures.

Integrative transformation of *S. cerevisiae* and *C. albicans*

To produce stable *S. cerevisiae* and *C. albicans* transformants that could be used in animal models and for further genetic analysis, plasmids carrying *SAP2* were integrated into the genome by homologous recombination.

(i) *S. cerevisiae*: The integrative plasmid, pRS-SAP2 (see Methods), was linearized at the *Nco*I site in *URA3* and transformed into the 754 strain. A negative control was obtained by integrating pRS306 without insert. Proper integration was evaluated by Southern blot, after digestion of parental and transformant genomic DNAs with *Avr*II. As shown in Fig. 5 (panel *S. cerevisiae*), a single 2.7 kb fragment hybridized to the *URA3* probe in the parental strain (754), as predicted. In positive transformants (884, 885), we expected a 9.1 kb fragment, resulting from the integration of pRS-SAP2. Unexpectedly, both strains gave a positive signal larger than 15 kb which can be interpreted as a double integration. Because of satisfactory expression of Sap2p, these strains were selected for further studies (see below). A 7.1 kb band was detected in negative control 894, corresponding to the integrated vector without *SAP2*. These findings were confirmed by probing the same blot with a radiolabelled *SAP2* DNA fragment (data not shown).

(ii) *C. albicans*: Plasmids pYPB-SAP2 and pYPB-mSAP2 carrying the wild-type and mutated *SAP2* under the control of *ADH1p*, respectively, were linearized at the *Kpn*I site to target the integration into the *SAP2* locus. Genomic DNAs were digested with *Kpn*I and probed with the *SAP2* fragment (see Methods). In the parental strain (CAI4), the *SAP2* probe hybridization resulted in a single band larger than 13 kb derived from the wild-type alleles of *SAP2*. The transformants S1, S2, N1 and N2 had an additional 13 kb fragment, which corresponds in size to the integrated construct (Fig. 5, panel *C. albicans*).

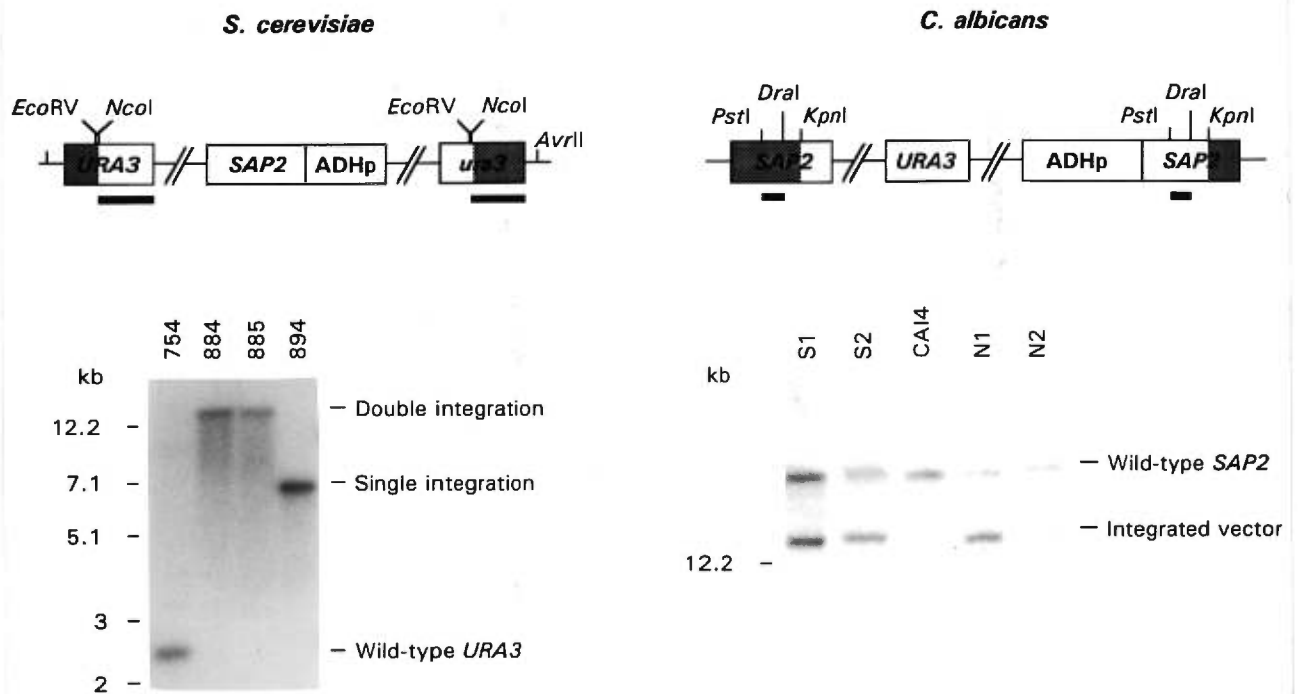


Figure 5: Southern blot analysis of wild-type and selected transformants of *S. cerevisiae* and *C. albicans*. Top, integration sites with probes indicated by thick lines. Bottom, *S. cerevisiae* and *C. albicans* genomic DNAs digested with *AvrII* and *KpnI*, respectively and probed with [³²P] *EcoRV-SmaI* (*S. cerevisiae*) or [³²P] *PstI-DraI* *SAP2* (*C. albicans*) DNA. Grey boxes represent the chromosomal copy of *URA3* and *SAP2* genes.

Kinetics of Sap2p secretion by *S. cerevisiae*

The time course for proteinase secretion was investigated in media containing free amino acids from acid hydrolysis of casein (CAT), or BSA as nitrogen source (YNB-BSA). In CAT medium, positive transformants 884 and 885 and negative control 894 showed growth rates similar to parental strain 754 (Fig. 6a, upper left). As shown in Fig. 6a (upper right), growth in YNB-BSA medium was restricted to strains harbouring the *SAP2* gene, suggesting their ability to use BSA as sole nitrogen source. However, it is noteworthy to mention that the growth rates in this medium were lower than in CAT.

In both media, secreted proteolytic activity was detected exclusively in those transformants carrying *SAP2* (Fig. 6b, middle left and right). However, the level of activity was 1.7-fold higher in CAT than in YNB-BSA, for the same cell density. This could reflect the greater physiological activity of the cells grown in the former medium. In CAT medium, the maximum level of proteinase activity was attained at the beginning of the stationary phase (Fig. 6b, middle left).

Additional information on Sap2p secretion was obtained from Western blot analysis of 885 transformant supernatants. Sap2p was detectable at the beginning of the exponential phase, after 6 and 24 h of incubation in CAT and YNB-BSA media, respectively (Fig. 6c, lower left and right). In both media, the protein was processed to three forms with approximate molecular masses of 45, 42 and 39 kDa. The middle 42 kDa form co-migrated with Sap2p purified from concentrated culture filtrate of *C. albicans* strain LAM-1, consistent with our previous observations (Colina *et al.*, 1996b). The higher 45 kDa form may result from altered post-translational modification or incomplete processing of the protein by *S. cerevisiae*, and the lower 39 kDa form may represent a degradation product. Using a zymogram procedure described previously (Colina *et al.*, 1996b), it was shown that each of the three bands had enzymatic activity using mucin as substrate (data not shown). No Sap2p was detected in negative control 894 (data not shown).

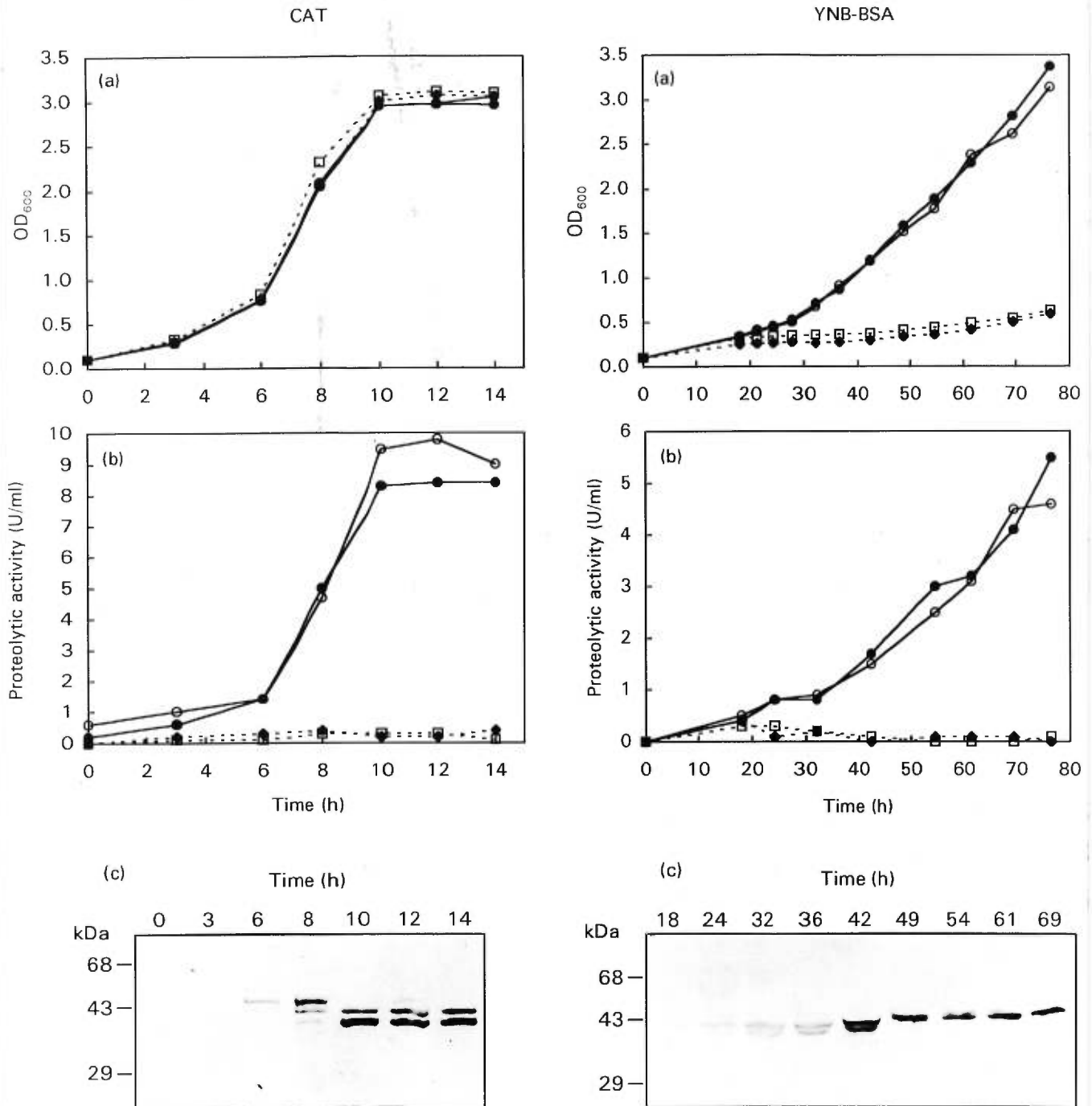


Figure 6: Kinetics of Sap2p secretion by *S. cerevisiae* positive transformants 884 (●) and 885 (○), negative control 894 (□), and parental strain 754 (◆), grown in 0.5% CAT (left) or YNB-BSA (right) media at 37 °C. At the indicated times, culture samples were evaluated for growth (a), extracellular proteolytic activity (b) and Sap2p expression in 885 (Western blot) (c). Data are mean values of duplicate experiments.

Kinetics of Sap2p secretion by *C. albicans*

Similarly to *S. cerevisiae*, *C. albicans* was grown in CAT or YNB-BSA medium, respectively non-inducing or inducing *SAP2* expression. In CAT medium, the growth rates of the secretor-transformant S2 as well as the negative controls N1 and N2 (with mutated *sap2*), were indistinguishable from that of the parental strain, CAI4. However, the secretor-transformant S1 grew far more slowly than CAI4 (Fig. 7a, upper left). In YNB-BSA medium, transformants S1 and S2 displayed similar growth rates, which were greater than those of CAI4 and negative controls (Fig. 7a, upper right). Overall, cultures of S2, N1, N2 and CAI4 reached a higher cell density when media were supplemented with amino acids rather than BSA as nitrogen source.

Under non-inducing conditions (CAT medium), secreted proteolytic activity was detectable only in the supernatants of transformants S1 and S2 (Fig. 7b, middle left). These results indicated that *SAP2*, placed under *ADH1p*, was constitutively expressed in transformants S1 and S2. In YNB-BSA medium, conditions in which wild-type *SAP2* is induced, proteolytic activity was detected in CAI4 and negative controls as well as in secretor-transformants. However, in the latter strains, activity was 3.3-fold (S1) and 1.75-fold (S2) higher than in CAI4 or negative controls (Fig. 7b, middle right). Although higher proteolytic activity in S1 could have possibly resulted from the integration of multiple copies of the *ADH1* fusion, this was unlikely because the intensities of the bands for wild-type *SAP2* and integrated vector were individually comparable in the Southern analysis of S1 and S2 (Fig. 5, right panel). Enhanced proteolytic activity in YNB-BSA compared to CAT medium (Fig. 7) may have resulted from the presence of other Saps produced in YNB-BSA (Hube et al., 1994).

Finally, the supernatants of S2 and N1 strains were selected to evaluate the presence of Sap2p. In CAT medium, Sap2p of S2 (apparent molecular mass, 42 kDa) was detectable after 9 h of incubation, corresponding to the exponential phase (Fig. 7c, lower left). No protein was detected in N1 supernatants (data not shown). Interestingly, when BSA was included in the culture medium (Fig. 7c, lower right), S2 produced detectable Sap2p 3 h earlier than N1. The slower growth rate of N1 compared to S2 correlated with the apparent lower secretion of Sap2p.

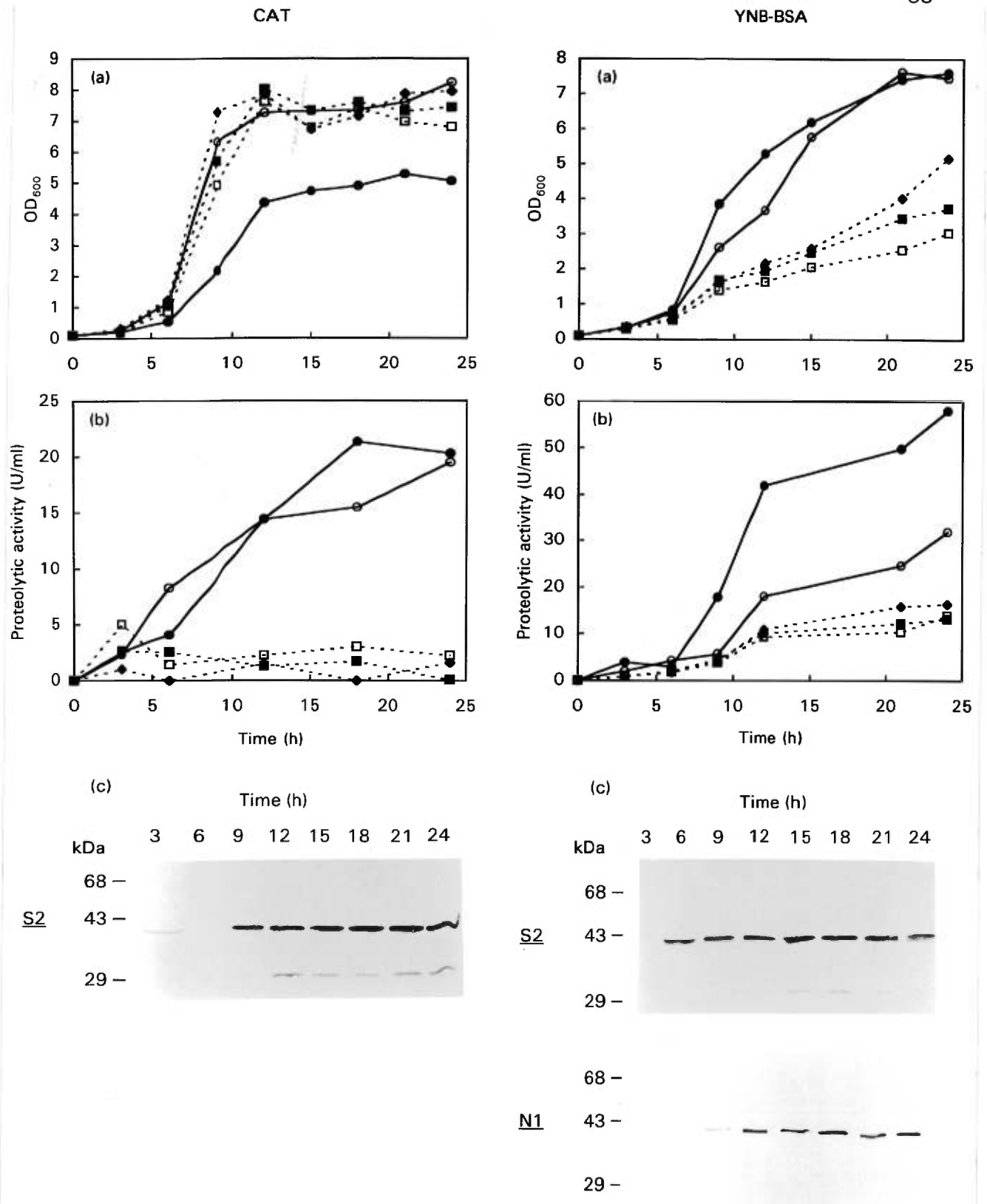


Figure 7: Kinetics of Sap2p secretion by *C. albicans* positive transformants S1 (●) and S2 (○), negative controls N1 (■) and N2 (□), and parental strain CAI4 (◆), grown in 1% CAT (left) or YNB-BSA (right) media, at 37 °C. At The indicated times, culture samples were evaluated for growth (a), extracellular proteolytic activity (b) and Sap2p expression in S2 and N1 (Western blot) (c). Data are mean values of duplicate experiments.

Germination rates of the transformants and parental strain were indistinguishable. After 3 h of incubation at 37 °C, more than 70% of blastoconidia had germinated.

Pathogenicity *in vivo*

The virulence of *S. cerevisiae* negative (894) and positive (884, 885) transformants was evaluated in experimental oral or systemic infection in intact mice. In the former, all three strains were completely cleared from the oral cavity 5 h after inoculation (data not shown). A similar result was obtained after systemic infection. No CFUs were recovered from kidneys or brains of mice over a period of 28 days after infection with each of the *S. cerevisiae* strains. The inoculum of 2×10^7 cells was selected in accordance with a previous study (Clemons *et al.*, 1994) which evaluated the pathogenic potential of various clinical and laboratory isolates of *S. cerevisiae*. In addition, when the experiment was repeated using 6×10^7 cells to exclude the possibility of an insufficient inoculum, cultures of homogenized organs remained completely negative for all strains. A control experiment was conducted using a 2×10^7 cells inoculum of *S. cerevisiae* Y55 (avirulent laboratory strain) and virulent clinical isolates YJM128 and YJM273, as described by Clemons *et al.* (1994). Quantification of CFUs in kidneys and brains of mice produced results very close to those previously reported (Clemons *et al.*, 1994) (data not shown). This confirmed that lack of virulence obtained with strains 884, 885 and 894 was not due to a technical problem.

C. albicans parental strain SC5314, and positive (S1, S2) and negative (N1, N2) transformants were compared for their virulence in two models of candidiasis. In the murine oral model, all four transformants were completely cleared 24 h after inoculation. Positive control *C. albicans* strain LAM-1 produced an initial decrease in CFUs at 24 h followed by a mean peak of 5.6×10^3 CFU 48 h after infection, as reported previously (Lacasse *et al.*, 1990). *C. albicans* parental strain SC5314 was less virulent than LAM-1 in the oral model, producing a peak of 3.0×10^3 CFU. Virulence of *C. albicans* transformants was also determined in a murine model of systemic candidiasis. In a first experiment, in which survival of mice was used as endpoint (Fig. 8), no mice died after intravenous infection with strain S1 which was

thus completely avirulent. However, strain SC5314 was significantly ($p < 0.007$) more virulent than S2, N1 and N2, which were not significantly different among themselves ($p > 0.15$). A second experiment evaluated kidney and liver burdens of the same strains after intravenous infection. Comparison of organ weights revealed no reproducibly significant differences on days 1, 3 and 6 after infection with strains SC5314, S1, S2, N1 and N2 (data not shown). However, comparison of mean log CFUs recovered from kidneys on these same days showed strikingly decreased CFU g^{-1} for strain S1 compared to the other four strains, which among themselves were not significantly different (Table III). CFUs in liver were two logs (day 1) and four logs (days 3 and 6) lower than those obtained from the kidneys. However, the relationship among strains remained the same. All strains produced equivalent liver CFUs on the three observation days, except for strain S1 which yielded negative cultures (data not shown). Finally, randomly selected colonies of S1, S2, N1 and N2 isolated from the kidneys of mice showed no modification at the *SAP2* locus by Southern blot.

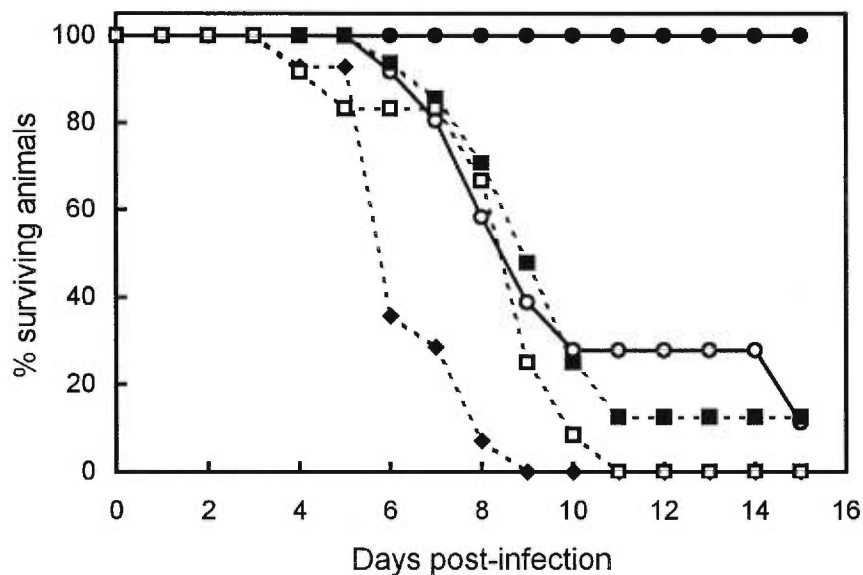


Figure 8: Survival of CD-1 mice infected intravenously with 5×10^5 cells of *C. albicans* transformants S1 (●) (n=12), S2 (○) (n=15), N1 (■) (n=14), N2 (□) (n=12) and parental strain SC5314 (◆) (n=14).

Table III: Comparative CFU of *C. albicans* parental strain and transformants recovered from kidneys at various times during disseminated infection of mice

Day	Strain	No of animals	Mean log CFU in kidney per g of tissue \pm SD
1	SC5314	7	4.45 \pm 0.75
	S1	7	0.88 \pm 1.39
	S2	7	4.57 \pm 0.27
	N1	4	5.93 \pm 0.07
	N2	5	5.53 \pm 0.52
3	SC5314	7	5.04 \pm 0.51
	S1	6	0.88 \pm 0.88
	S2	6	5.99 \pm 0.74
	N1	6	5.15 \pm 0.60
	N2	6	5.10 \pm 0.73
6	SC5314	7	4.98 \pm 0.59
	S1	6	0
	S2	4	5.58 \pm 0.15
	N1	5	5.78 \pm 0.28
	N2	6	5.55 \pm 0.31

In the previous experiment, one kidney was removed for CFU quantification and the other for histological analysis. Macroscopic examination of the kidneys showed several surface microabscesses on days 3 and 6 after infection for all strains except S1. Interestingly, larger microabscesses were noted for strain S2 on day 3, compared to the other strains. Histopathological examination demonstrated a mixture of blastoconidia, hyphae and pseudohyphae in the cortex on days 1 and 3 with strains SC5314, N1, N2 and S2. However, no fungi were observed on these same days in kidneys of mice infected with strain S1. Moreover, strain SC5314 produced several cortical abscesses on day 1, while strains N1, N2 and S2 produced very rare blastoconidia and hyphae. On day 3, more widespread fungi were seen with strain SC5314 compared to day 1, with extension into the renal medulla; N1, N2 and S2 were very sparse or absent.

Zymolyase and NaCl resistance

We observed decreasing viability of *S. cerevisiae* and *C. albicans* transformants expressing or overexpressing Sap2p on CAT medium held for 5 days at 4°C, after initial growth at 30°C for 48 h. This could have potentially resulted from cell wall damage produced by massive expression and/or secretion of the protease. The same hypothesis could also account for the absence of increased virulence of positive transformant S2 and the decreased virulence of S1 *in vivo*, compared to the negative controls. To assess this possibility, two different cell wall resistance assays were done. In both the zymolyase and NaCl resistance assays, all *S. cerevisiae* negative control and positive transformants demonstrated the same level of sensitivity. However, treatment with zymolyase resulted in a 2-log greater decrease in viability of *C. albicans* strain S1, compared to SC5314, S2, N1 and N2. In addition, growth of strain S1 was inhibited by 1.4% NaCl, compared to 2.2% for the other four *C. albicans* strains.

DISCUSSION

This is the first report describing the construction of stable *S. cerevisiae* and *C. albicans* integrative transformants, constitutively secreting Sap2p. We used the *S. cerevisiae* or *C. albicans ADH1* promoter (Bertram et al., 1996) on expression plasmids to overexpress *C. albicans SAP2* in both yeast species. The *ADH1* promoter has been previously used in studies of gene expression in *C. albicans* (Cormack et al., 1997).

On the basis of *SAP2* DNA and Sap2p N-terminal sequences, the mRNA is translated as a preproform, 56 amino acids larger than the mature protein. The prepropeptide has a signal peptide sequence of 14-21 amino acids with 1 to 4 putative signal peptidase cleavage sites and two Lys-Arg sequences, one of which is immediately before the N-terminus of the mature form (Wright et al., 1992; Hube, 1996). Thus, Sap2p was expected to be processed in *S. cerevisiae* because it has been shown that the cleavage of *C. tropicalis* Sap heterologously expressed in *S. cerevisiae* is mediated by *KEX2*-dependent proteolysis (Togni et al., 1996).

The Sap2p signal peptide was functional in *S. cerevisiae*, allowing the secretion of three active forms of Sap2p. While we cannot rule out the possibility of posttranslational modifications, the higher molecular mass form (45 kDa) may result from incomplete processing of the proteinase by *S. cerevisiae*. The secretion of a premature form may be due to saturation of the processing system as a consequence of overexpression of the protein. Previous reports have shown that heterologous expression of *C. tropicalis SAPT1* (Togni et al., 1996) or *C. albicans SAP1* (Smolenski et al., 1997) in *S. cerevisiae* resulted in secretion of extracellular active enzyme identical to the native form, indicating that no oligosaccharide chains were added. In both cases, the expression was under the control of inducible promoter *GAL10* and the hosts were not deficient in intracellular proteinases. Although no extensive studies have been done on the intracellular processing of *C. albicans* Sap2p, Banerjee et al. (1991) and Homma et al. (1992) reported the detection of a 45 kDa intracellular precursor of Sap2p. More recently, it was shown that heterologous expression of *SAPT1* of *C. tropicalis* by *S. cerevisiae*, resulted in intracellular forms 4 to 6 kDa larger

than the mature protein (Togni *et al.*, 1996). Further experiments will be required to clarify these issues.

Considering that *S. cerevisiae* is nonpathogenic, the study of the virulence of strains secreting Sap2p is an attractive system to address its role in pathogenicity in the absence of other putative factors. Although episomal expression of Sap1p has been previously achieved in *S. cerevisiae* (Smolenski *et al.*, 1997), we have now obtained expression of the major transcription product Sap2p from an integrated construct, suitable for studies of virulence in animal models. The constitutive expression of Sap2p by *S. cerevisiae* clearly allowed it to hydrolyse and use BSA. This may be important for survival in animal models, because it would enable it to use host proteins as nitrogen source.

A model of the regulation of *SAP2* expression suggests that *C. albicans* has a basal level of proteinase expression, which yields peptides that act as inducers of *SAP2* expression, via a positive feedback mechanism (Hube *et al.*, 1994). Our data indicate that *SAP2* expression was deregulated in those *C. albicans* strains constitutively producing Sap2p. In the presence of high molecular weight protein, the enzyme was secreted precociously, which resulted in earlier induction of the wild-type *SAP2* gene and higher amounts of total proteinase activity. These strains constitute a novel approach to explore the role of early and high expression of Sap2p during experimental infections. In fact, De Bernardis *et al.* (1995) have shown that highly vaginopathic strains expressed both *SAP1* and *SAP2* earlier in experimental vaginitis than moderately or nonvaginopathic strains. Furthermore, it has been hypothesized that Saps may play a role early in systemic dissemination of *C. albicans* to deep organs from mucosal sites (Kimberly *et al.*, 1997). Finally, *C. albicans* isolates from oral cavities of symptomatic HIV-infected patients secreted significantly higher levels of proteinase than those from asymptomatic or noninfected patient (Ollert *et al.*, 1995; De Bernardis *et al.*, 1996). When tested in experimentally infected animals, the high-producers had enhanced virulence (De Bernardis *et al.*, 1996). However, whether the increased proteinase activity was due to a particular Sap(s) was not determined.

In pathogenicity studies *in vivo*, expression of *SAP2* as a sole putative virulence factor did not cause an avirulent strain of *S. cerevisiae* to become virulent, and

constitutive expression of *SAP2* did not augment virulence of *C. albicans* in experimental oral or systemic infection in intact mice. The absence of enhanced virulence of *S. cerevisiae* *SAP2* transformants is consistent with the long held view that *C. albicans* possesses a multiplicity of properties, each with a low propensity for enhancing fungal infectivity and none necessarily dominant, and all, even in combination unable to overcome fully intact host defenses (Odds, 1988).

Unknown mutations occurring concurrently in all strains would be unlikely to explain the significantly enhanced survival of mice infected with *C. albicans* negative control (N1, N2) or positive *SAP2* transformant (S2), compared to parental strain SC5314. In addition, although N1, N2 and S2 only contain one copy of *URA3*, while the wild-type SC5314 has two copies, a gene dosage effect is also unlikely to be responsible for the attenuated virulence of N1, N2 and S2 since heterozygous *URA3* mutants were as virulent as parental strains in experimentally infected mice (Leberer et al., 1997). Because the negative controls (N1, N2) would have been expected to be as virulent as the wild-type SC5314, mutated *SAP2* may have been translated into a truncated protein, resulting in saturation of the secretory pathway.

Although positive *C. albicans* transformants S1 and S2 were expected to be isogenic, they had different phenotypes. S1 grew much slower in CAT medium compared to all other strains including the wild-type SC5314. In addition, this strain had higher proteolytic activity in YNB-BSA medium and was avirulent after systemic infection in intact mice. The strikingly decreased virulence of strain S1 and its enhanced cell wall sensitivity compared to the other *C. albicans* transformants suggest that *SAP2* overexpression may have damaged the cell wall, resulting in enhanced killing by polymorphonuclear leukocytes and other intact host defenses. Alternately, an unknown mutation in S1 causing slower growth in CAT medium may also have attenuated virulence. With regard to strain S2, a mutation may have caused a reduced secretion of Sap2p, which in turn caused less damage to the cell wall of *C. albicans*. Lack of enhancement of virulence of positive *C. albicans* transformant S2 compared to negative controls N1 and N2 may have resulted from unlikely spurious mutations during transformation, the route of infection, the absence of

immunosuppression, or defects in other virulence factors due to saturation of secretory pathways. In this regard, all *C. albicans* transformants maintained the ability to form pseudohyphae and hyphae *in vivo*. Although Sap2p is the most abundant transcript of *C. albicans* yeast cells, increased virulence *in vivo* may require not only its enhanced expression, but also the early participation of other putative virulence factors including members of the Sap isoenzyme family, such as Saps 4, 5 and 6 which are produced by the hyphal form of *C. albicans*. Finally, an absence of *SAP2* constitutive expression in the animal models was unlikely because *ADH1* is a strong constitutive promoter. Furthermore, *C. albicans* transformants isolated from the kidneys of mice showed no modification at the *SAP2* locus. Further studies will be required to determine whether differences in virulence would be observed in a rat vaginal model between the wild-type and strains overexpressing *SAP2*. Although *SAP2* constitutive expression did not augment virulence, this new approach may be a useful paradigm in the study of virulence attributes in *Candida* and other fungal pathogens.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. A.R.C. was the recipient of a studentship from the Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnologicas, Caracas, Venezuela.

We are grateful to W. Fonzi for providing *C. albicans* strain CA14, to A. H. Bussey for *S. cerevisiae* strain clABYS86, and to K. V. Clemons for *S. cerevisiae* YJM128, YJM273 and Y55 strains. We also wish to thank A. J. P. Brown for vector YPB-ADH1pL, and T. L. Ray for anti-Sap2 monoclonal antibody.

We thank Annie-Claude Mialhe for excellent technical assistance and Marc Fredette, Michel Lamoureux and Yves Lepage for statistical analysis.

REFERENCES

- Banerjee, A., Ganesan, K. & Datta, A. (1991).** Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **137**, 2455-2461.
- Belhumeur, P., Lee, A., Tam, R., Di Paolo, T., Fortin, N. & Clark, M. W. (1993).** *GSP1* and *GSP2*, genetic suppressors of the *prp20-1* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol Cell Biol* **13**, 2152-2161.
- Bertram, G., Swoboda, R.K., Gooday, G.W., Gow, N.A.R. & Brown, A.J.P. (1996).** Structure and regulation of the *Candida albicans ADH1* gene encoding an immunogenic alcohol dehydrogenase. *Yeast* **12**, 115-127.
- Borg, M. & Rüchel, R. (1988).** Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* **56**, 626-631.
- Cassone, A., De Bernardis, F., Mondello, F., Cedia, T. & Agatensi, L. (1987).** Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* **156**, 777-783.
- Chakir, J., Côté, L., Coulombe, C. & Deslauriers, N. (1994).** Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 (H-2^d) mice. *Oral Microbiol Immunol* **9**, 88-94.
- Clemons, K. V., McCusker, J. H., Davis, R. W. & Stevens D. A. (1994).** Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Infect Dis* **169**, 859-867.

Colina, A.-R., Aumont, F., Belhumeur, P., de Repentigny, L. (1996a). Development of a method to detect secretory mucinolytic activity from *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **34**,401-406.

Colina, A.-R., Aumont, F., Deslauriers, N., Belhumeur, P. & de Repentigny, L. (1996b). Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* **64**, 4514-4519.

Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A.R., Falkow, S. & Brown, A.J.P. (1997). Yeast enhanced-green fluorescent protein (yEGFP) : a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**,303-311.

Crandall, M. & Edwards Jr., J. E. (1987). Segregation of proteinase-negative mutants from heterozygous *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**, 2817-2824.

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

De Bernardis, F., Cassone, A., Sturtevant, J. & Calderone, R. (1995). Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. *Infect Immun* **63**, 1887-1892.

De Bernardis, F., Chiani, P., Ciccozzi, M., Pellegrini, G., Ceddia, T., D'Offizzi, G., Quinti, I., Sullivan, P. A. & Cassone, A. (1996). Elevated aspartyl proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human Immunodeficiency virus. *Infect Immun* **64**, 466-471.

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

Gillum, A. M., Tsay, W. Y. H. & Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of the *S. cerevisiae* and *E. coli pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**, 179-185.

Harlow, E. & Lane, D. (1988). *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Hoffman, C. S. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.

Homma, M., Kanbe, T., Chibana, H. & Tanaka, K. (1992). Detection of intracellular forms of secretory aspartic proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **138**, 627-633.

Hube, B. (1996). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* **7**, 55-69.

Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. P. & Gow, N. A. R. (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **14**, 87-99.

Hube, B., Sanglard, D., Odds, F. C., Hess, D., Monod, M., Schäfer, W., Brown, A. J. P. & Gow, N. A. R. (1997). Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* **65**, 3529-3538.

Kaplan, E. L. & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Statist Assoc* **53**, 457-481.

Kimberly, F., Bausch, K., Noonan, J., Huguenel, E. & Tamburini, P. (1997). Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun* **65**, 551-556.

Kwon-Chung, K. J., Lehman, D., Good, C. & Magee, P. T. (1985). Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **49**, 571-575.

Lacasse, M., Fortier, C., Trudel, L., Collet, A. J. & Deslauriers N. (1990). Experimental oral candidosis in the mouse: microbiological and histological aspects. *J Oral Pathol Med* **19**, 136-141.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Leberer, E., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Harcus, D., Dignard, D., Ash, J., Johnson, L. & Thomas, D.Y. (1997). Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste 20p-like protein kinase CaCl4p. *Curr Biol* **7**, 539-546.

Luna, G. L. (1992). *Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts*. Downers Grove, IL: Johnson Printers.

Lussier, M., White, A.-M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S. B., Horenstein, C. I., Chen-Weiner, J., Ram, A. F. J., Kapteyn, J. C., Roemer, T. W., Vo, D. H., Bondoc, D. C., Hall, J., Wei Zhong, W., Sdicu, A.-M., Davies, J., Klis, F. M., Robbins, P. W. & Bussey H. (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435-450.

Macdonald, F. & Odds, F. C. (1983). Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* **129**, 431-438.

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

Milewski, S., Mignini, F., Covelli, I. & Borowski, E. (1994). Specific inhibition of acid proteinase secretion in *Candida albicans* by Lys-Nva-FMDP. *J Med Vet Mycol* **32**, 1-11.

Monod, M., Togni, G., Hube, B., & Sanglard, D. (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteases in *Candida* species. *Mol Microbiol* **13**, 357-368.

Odds, F. C. (1988). *Candida and Candidosis: a Review and Bibliography, 2nd edn.* London: Ballière Tindall.

Ollert, M. W., Wende, C., Görlich, M., McMullan-Vogel, C. G., Borg-von Zepelin, M., Vogel, C.-W. & Korting, H. C. (1995). Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* **33**, 2543-2549.

Robinson, J. S., Klionski, D. J., Banta, L. M. & Emr, S. D. (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol* **8**, 4936-4948.

Rodrigue, L., Marion, D., Trudel, L., Barthe, C. & Lavoie, M. C. (1989). Comparison of methods for the evaluation of the oral microbiota of mice. *J. Microbiol Methods* **10**, 71-82.

Rose, M. D., Winston, F. & Hieter, P. (1990). *Methods in yeast genetics: a Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ross, I. K., De Bernardis, F., Emerson, G. W., Cassone, A. & Sullivan, P. A. (1990). The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* **136**, 687-694.

Rothstein, N. (1983). One step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 202-211.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**, 5463-5467.

Sanglard, D., Togni, G., de Viragh, P. A. & Monod, M. (1992). Disruption of the gene encoding the secreted acid protease (ACP) in the yeast *Candida tropicalis*. *FEMS Microbiol Lett* **95**, 149-156.

Sanglard, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F. C. & Gow, N. A. R. (1997). A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* **65**, 3539-3546.

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

Sikorski, R. S. & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.

Smolenski, G., Sullivan, P. A., Cutfield, S. M. & Cutfield, J. F. (1997). Analysis of secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes. *Microbiology* **143**, 349-356.

Togni, G., Sanglard, D. & Monod, M. (1994). Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: virulence in mice of a proteinase negative mutant. *J Med Met Mycol* **32**, 257-265.

Togni, G., Sanglard, D., Quadroni, M., Foundling, S. I. & Monod, M. (1996). Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: functional analysis of preproregion cleavages in *C. tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **142**, 493-503.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.

Vernet, T., Dignard, D. & Thomas, D. Y. (1987). A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene* **52**, 225-233.

White, T. & Agabian, N. (1995). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol* **177**, 5215-5221.

White, T., Köhler, G. A., Miyasaki, S. H. & Agabian, N. (1995). Expression of virulence factors in *Candida albicans*. *Can J Bot* **73(Suppl. 1)**, S1058-S1054.

Wright, R. J., Carne, A., Hieber, A. D., Lamont, I. L., Emerson, G. W. & Sullivan, P. A. (1992). A second gene for a secreted aspartate proteinase in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **174**, 7848-7853.

DISCUSSION

DISCUSSION

Nous avons réussi, dans cette étude, à construire des transformants intégratifs stables de *S. cerevisiae* sécrétant la protéine Sap2 de *C. albicans* (transcrit majeur) de façon constitutive. Compte tenu du statut avirulent de *S. cerevisiae*, ce résultat est très intéressant puisque ces transformants peuvent être utilisés dans des modèles animaux afin d'évaluer la contribution de la Sap2p à la virulence de *C. albicans*.

Pour la construction de nos transformants, nous avons opté pour le promoteur de l'alcool déshydrogénase I (*ADHI*), promoteur fort, considéré constitutif et couramment utilisé pour l'expression de gènes de levure (Schneider et Guarente, 1991). En outre, nous avons décidé de conserver le peptide signal et le propeptide propres à la Sap2p puisque plusieurs signaux hétérologues et homologues ont déjà été utilisés avec succès chez *S. cerevisiae* (Moir et Davidow, 1991). Par ailleurs, deux études ont établi que la maturation de la Sap2p est effectuée chez *C. albicans* par un homologue de l'endopeptidase Kex2 de *S. cerevisiae* (Newport et Agabian, 1997), et que la maturation et la sécrétion de la Sapt1 de *C. tropicalis*, exprimée chez *S. cerevisiae*, se font correctement (Togni *et al.*, 1996).

Les résultats obtenus confirment que le peptide signal de la Sap2p est fonctionnel chez *S. cerevisiae*. Trois formes de la protéine sont sécrétées dans les deux milieux testés. Une technique de zymogramme nous a permis de démontrer que les trois formes étaient actives envers la mucine comme substrat. La forme de masse moléculaire intermédiaire (42 kDa) semble correspondre à la forme mature normale de la protéine Sap2. Par contre, la forme la plus petite (39 kDa) correspondrait plus probablement à un produit d'auto-dégradation. D'ailleurs, il est intéressant de remarquer que cette forme plus petite tend à s'accumuler en milieu CAT, tandis qu'elle disparaît au cours du temps en milieu YNB-BSA. Cette observation valide l'hypothèse d'une auto-dégradation. En effet, le milieu CAT ne contient aucun substrat disponible, et la protéine sécrétée en grande quantité aurait tendance à s'autodégrader. Par contre, en milieu YNB-BSA, l'albumine bovine représente un substrat idéal pour la

Sap2. Malgré tout, d'autres explications sont possibles comme un changement post-traductionnel ou une maturation incorrecte. Cette dernière explication est d'ailleurs la plus probable pour justifier la présence de la forme la plus grande de la Sap2p (45 kDa). La sécrétion en très grande quantité de la protéine Sap2 (promoteur fort) pourrait en effet engendrer une saturation du processus de sécrétion et entraîner une maturation incomplète de la protéine. Une forme plus grande de plusieurs acides aminés serait alors sécrétée. D'ailleurs, des études portant sur le mécanisme de sécrétion de la Sap2p ont établi l'existence de précurseurs intracellulaires de 45 et 47 kDa (Homma *et al.*, 1992, 1993). En outre, Togni *et al.* (1996) et Newport & Agabian (1997) ont démontré la présence d'un mécanisme alternatif de maturation pour la Sapt1p de *C. tropicalis* et la Sap2p de *C. albicans* respectivement, menant à la sécrétion d'une forme plus grande de chacune des protéines. Ce mécanisme, faisant entre autre intervenir l'autoclivage, prenait place lorsque le clivage par l'homologue de la Kex2 était impossible. Ces observations sont en accord avec la possibilité de la sécrétion d'une forme incomplète de la protéine Sap2, de plus haute masse moléculaire, suite à une saturation du processus sécrétoire. Une solution possible à ce problème aurait pu consister à mettre le gène *SAP2* sous le contrôle d'un promoteur moins fort. En effet, l'expression chez *S. cerevisiae* de la protéine Sapt1 de *C. tropicalis* sous le contrôle du promoteur inductible *GAL10* menait à la sécrétion d'une seule forme de la protéine, la forme mature (Togni *et al.*, 1996). Cependant, l'utilisation d'un promoteur inductible ne serait pas envisageable dans notre cas en raison de l'analyse de nos transformants dans des modèles animaux.

Les résultats des courbes de croissance confirment que *S. cerevisiae* est capable d'utiliser la BSA hydrolysée par la Sap2p. Cette observation est très importante puisqu'elle indique la faculté de ces transformants à utiliser des protéines environnantes comme substrat, phénomène essentiel pour leur survie *in vivo*. Cependant, le taux de croissance en présence de BSA comme seule source d'azote est beaucoup plus faible qu'en milieu CAT contenant des acides aminés. Ceci tend à démontrer que malgré leur capacité à hydrolyser la BSA et à l'utiliser, les transformants n'ont pas une activité physiologique maximale ou «idéale». Par ailleurs,

les taux d'activité protéolytiques observés en milieu CAT sont plus élevés qu'en milieu YNB-BSA, ce qui confirme le fait que les transformants aient une activité physiologique plus importante dans le premier milieu.

Les études de pathogénicité *in vivo* reposaient sur deux modèles murins de candidose, un modèle de candidose oro-pharyngée et un modèle de candidose disséminée. Dans les deux modèles les transformants de *S. cerevisiae* sécrétant la protéase Sap2 n'ont pu établir d'infection, au même titre que la souche parentale et le contrôle négatif. Les quatre souches ont été très rapidement éliminés de la cavité buccale et des tissus des souris. L'absence de virulence ou de persistance prolongée *in vivo* chez les transformants sécrétant la Sap2p semble indiquer que l'expression de cette protéase comme seul facteur de virulence ne peut rendre une souche de *S. cerevisiae*, originellement avirulente, virulente. Ces résultats paraissent confirmer l'hypothèse courante selon laquelle aucun des facteurs de virulence putatifs de *C. albicans* n'est un facteur dominant, mais que tous contribuent à cette même virulence (Odds, 1988). En outre, des études récentes effectuées sur la famille des Sap ont semblé démontrer qu'aucune des Sap en particulier ne serait un facteur vraiment dominant au cours de candidoses disséminées et que toutes auraient une action à différents moments et dans différentes sites au cours du processus infectieux (Hube *et al.*, 1997b; Sanglard *et al.*, 1997a). Nos résultats corroborent donc cette hypothèse. L'absence d'autres facteurs de virulence tels que le dimorphisme, l'adhérence, la sécrétion de phospholipases, ainsi que l'absence d'autres membres de la famille des Sap chez *S. cerevisiae* empêcheraient donc la levure de devenir virulente malgré l'expression de la Sap2p. Il serait alors peut-être intéressant d'exprimer chez ces mêmes transformants de *S. cerevisiae* des gènes *SAP* additionnels ou des gènes d'autres facteurs de virulence. De même, l'expression de *SAP2* de *C. albicans* chez une souche de *S. cerevisiae* virulente (Clemons *et al.*, 1993; Nyirjesy *et al.*, 1995) serait une expérience pertinente. Elle permettrait d'évaluer hors de son contexte le rôle de cette protéine (aucune autre Sap présente), mais tout en s'assurant d'un niveau basal de pathogénicité adéquat pour l'analyse. Cependant, la nature clinique de ces souches pourrait rendre les manipulations génétiques laborieuses.

Si l'hypothèse précédente semble la plus pertinente pour expliquer les résultats que nous avons obtenus, il reste de nombreux points non négligeables qui auraient pu également contribuer à l'avirulence de nos souches. Le premier tient au choix des modèles de candidoses. En effet, seuls des modèles de candidoses orales et disséminées ont été testés. Il serait alors peut-être intéressant d'analyser nos transformants dans un autre modèle déjà bien documenté, celui de la candidose vaginale. D'ailleurs, des études récentes semblent démontrer que les différents gènes *SAP* n'auraient pas la même importance selon le type de candidose. Dans l'une d'entre elles, Schaller *et al.* (1998) ont analysé, grâce à la technique de RT-PCR, l'expression de différents gènes *SAP* par *C. albicans* dans un système d'infection *in vitro* basé sur un épithélium reconstitué de la muqueuse orale humaine. Dans ce système, la première détection d'expression de gènes *SAP* (*SAP1* et *SAP3*) est observée en même temps que les premières lésions au niveau de l'épithélium. Les auteurs conclurent que ces deux gènes pourraient jouer un rôle au stade précoce de cette candidose expérimentale. L'augmentation des lésions coïncida ensuite avec l'apparition de l'expression du gène *SAP6* et la formation des premiers hyphes. Enfin, les gènes *SAP2* et *SAP8* furent exprimés seulement à un stade avancé de la candidose expérimentale, lorsque les levures avaient envahi les espaces intercellulaires élargis de l'épithélium. Par ailleurs, les auteurs comparèrent, dans la même étude, des échantillons de muqueuse orale de deux patients atteints de candidose orale. Fait intéressant, l'échantillon provenant d'une personne non atteinte d'infection au VIH (muguet oral pendant quelques jours) présentait un patron d'expression similaire au stade précoce de la candidose orale expérimentale, c'est-à-dire l'expression des gènes *SAP1*, *SAP3* et *SAP6*. Par contre, le patient atteint du VIH et souffrant de candidose orale depuis plus d'un an présentait un patron d'expression identique aux stades avancés de l'infection, soit les gènes *SAP1*, *SAP2*, *SAP3* et *SAP6*. Cette hiérarchie dans l'expression des gènes *SAP* au cours d'une infection orale serait reliée aux changements progressifs des conditions environnementales comme la disponibilité des substrats inducteurs, l'apparition de microniches acides et le développement des hyphes. Comme on peut ainsi le remarquer, la protéase Sap2 jouerait un rôle dans les étapes tardives de l'infection orale, ce qui pourrait expliquer

l'avidité des transformants de *S. cerevisiae* en absence de l'expression d'autres Sap ou d'autres facteurs de virulence. Dans une deuxième étude, portant cette fois sur les candidoses vaginales, De Bernardis *et al.* (1999) analysèrent la survie de mutants *sap* nuls (*sap1* à *sap6* et le triple mutant *sap4-6*) dans un modèle de candidose vaginale chez la rate. Dans cette expérience, les mutants *sap1* à *sap3* furent éliminés très tôt de l'organisme des rates tandis que les mutants *sap4* à *sap6* ne présentèrent pas ou peu d'altération dans leur survie par rapport à la souche parentale. Par ailleurs, les résultats démontrèrent que le mutant *sap2* était remarquablement moins virulent que les autres. Une expérience additionnelle effectuée à partir des fluides vaginaux des rates infectées par les différents mutants établit que l'activité Sap totale exprimée durant les infections vaginales par *C. albicans* était attribuable de façon prédominante à l'expression de la Sap2p. La protéase Sap2 semble donc avoir une importance capitale dans ce type d'infection. Ces résultats diffèrent donc de ceux obtenus par Schaller *et al.* et viennent souligner la pertinence de l'utilisation d'un modèle animal de candidose vaginale pour l'étude de transformants sécrétant la Sap2p.

L'absence de virulence de nos transformants peut également être expliquée par « l'état physiologique » des cellules sécrétant la Sap2p. En effet, la sécrétion à un niveau non physiologique de la protéase (surproduction) pourrait saturer le processus sécrétoire et déséquilibrer le métabolisme des cellules, comme semble le démontrer l'analyse des «Western blot» et des courbes de croissance. Le problème pourrait même mener à une certaine dégradation cellulaire interne. Deux raisons principales possibles à ce phénomène peuvent être proposées. La première serait l'utilisation du promoteur de l'*ADH1*, promoteur fort et constitutif. Son changement par un promoteur constitutif moins fort pourrait ramener le taux de sécrétion de la protéase Sap2 à un taux plus physiologique. La deuxième raison serait le choix d'une souche de *S. cerevisiae* déficiente en protéases vacuolaires afin de maximiser la production de la Sap2p. Cette décision, quoique pertinente, a pu contribuer à la surproduction de la Sap2p et au dérèglement du métabolisme général des cellules. L'utilisation d'une souche possédant toutes ces protéases vacuolaires pourrait régler le problème en

permettant un certain niveau de dégradation de la protéine Sap2 produite. Finalement, l'intégration multiple du gène *SAP2* dans le génome des transformants pourrait également contribuer à la surproduction de Sap2p. Le déséquilibre physiologique général des transformants et la présence possible de dégradation cellulaire causée par la Sap2p contribueraient à la diminution de la survie des cellules, surtout en milieu animal où les conditions environnementales ne sont pas optimales pour la croissance de *S. cerevisiae* et où le taux de croissance serait minimal, comme le démontre les résultats des courbes de croissance en milieu YNB-BSA. D'ailleurs, l'observation d'une viabilité diminuée des transformants exprimant la Sap2p après quelques jours à 4 °C vient corroborer cette hypothèse. Une analyse de la sensibilité des transformants à la zymolyase et au NaCl nous a permis cependant de déterminer que cette diminution de viabilité n'était pas due à un endommagement de la paroi cellulaire par la production de Sap2p en grande quantité.

Si l'absence d'autres facteurs de virulence chez *S. cerevisiae*, le choix des modèles animaux de candidoses et la surproduction de la protéine Sap2 représentent les raisons principales expliquant l'absence de virulence des transformants, d'autres facteurs beaucoup moins probables peuvent y avoir contribué. Parmi ceux-ci, on peut mentionner la présence de mutations inconnues dans les deux transformants sécrétant la Sap2p et l'absence d'expression de la protéine en milieu animal malgré la présence du promoteur constitutif. En fait, le promoteur de l'*ADH1* n'est pas tout à fait un promoteur constitutif puisque son expression est réprimée de deux à dix fois en absence de source de carbone fermentable (Moir & Davidow, 1991). Il est très difficile d'évaluer les nutriments disponibles *in vivo* pour des microorganismes mais l'hypothèse d'une répression de l'expression de la Sap2p en raison d'une trop faible quantité de source de carbone fermentable est cependant peu plausible. Par ailleurs, une altération de l'expression du gène *URA3* présent dans la cassette de construction des transformants est très peu probable. En effet, l'utilisation du gène *URA3* comme marqueur de sélection est très courante. On peut mentionner notamment la technique d'interruption de gènes «ura-blaster», menant à l'insertion d'un gène *URA3* dans un gène cible, qui est utilisée de façon extensive afin de rechercher des gènes de

virulence. Récemment, une étude a établi que les résultats obtenus avec des transformants construits grâce à ces techniques devaient être considérés avec précaution (Lay *et al.*, 1998). En effet, il est important que dans de tels transformants l'orotidine 5'-monophosphate (OMP) décarboxylase, codée par le gène *URA3*, conserve une activité suffisante, puisqu'une réduction trop importante d'une telle activité entraîne une diminution du taux de croissance et pourrait engendrer une diminution de virulence. Or, Lay *et al.* (1998) ont démontré que l'activité OMP décarboxylase des souches construites par la technique «ura-blaster» est très variable. Cela serait probablement dû à une altération de l'expression du gène *URA3* dans le site d'insertion, causée notamment par un état d'expression différent (par rapport au locus natif du gène *URA3*) en raison de l'empaquetage des chromosomes ou par la non disponibilité de ces propres éléments régulateurs. Par ailleurs, les auteurs ajoutent que la réintroduction du gène *URA3* dans son locus initial élimine le problème. Dans notre cas, les plasmides intégratifs utilisés pour la construction des transformants de *S. cerevisiae* ont tous été intégrés dans le locus du gène *URA3*, menant à la réinsertion du gène *URA3* dans son locus natif. La possibilité d'une altération de l'expression de ce gène semble donc peu probable. Une expérience parallèle effectuée dans notre laboratoire consistait à construire des transformants de *C. albicans* surexprimant la Sap2p. La technique consistait à intégrer un plasmide contenant le gène *SAP2*, sous le contrôle du promoteur de l'*ADH1*, et le marqueur *URA3* dans le gène *SAP2* d'une souche *ura-*. Dans ce cas, la présence du gène *URA3* dans le locus du gène *SAP2* pouvait altérer l'expression du gène *URA3* et donc fausser les résultats obtenus.

Bien que les transformants de *S. cerevisiae* sécrétant la Sap2p n'aient pas acquis un certain degré de virulence, il reste que cette nouvelle approche peut être très utile pour l'étude de facteurs de virulence, en permettant notamment d'éviter les problèmes fréquents de redondance de certains de ces facteurs. Il conviendra alors d'utiliser un hôte adéquat (capable de persister *in vivo*) et de faire particulièrement attention au niveau de sécrétion du facteur en question. Il faut également toujours tenir compte du fait que la virulence chez les microorganismes est le plus souvent le produit

de nombreux facteurs. Chez *C. albicans*, pour qui les facteurs de virulence putatifs sont assez nombreux (adhérence, dimorphisme, expression différentielle de protéines Sap...), cette approche peut être très utile, mais semble plus prometteuse si on garde *C. albicans* comme souche hôte pour la surexpression du facteur en question. L'utilisation de *S. cerevisiae* serait peut-être plus pertinente pour l'étude «hors de leur contexte» de facteurs de virulence d'un microorganisme dont les attributs de virulence putatifs sont moins nombreux et moins diversifiés.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- Anaissie E. (1992).** Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* **14 (Suppl 1)**: S43-S53.
- Anderson J. M. & Soll D. R. (1987).** Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**: 5579-5588.
- Anderson J. M., Cundiff L., Schnars B., Gao M. X., Mackenzie I. & Soll D. R. (1989).** Hypha formation in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *Infect Immun* **57**: 458-467.
- Anderson J. M., Mihalik R. & Soll D. R. (1990).** Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *J Bacteriol* **172**: 224-235.
- Arai T., Mikami Y. & Yokoyama K. (1977).** Phagocytosis of *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages and guinea pig neutrophils. *Sabouraudia* **15**: 171-177.
- Banerjee A., Ganesan K. & Datta A. (1991).** Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **137**: 2455-2461.
- Banno Y., Yamada T. & Nozawa Y. (1985).** Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* **23**: 47-54.
- Barnes J. L., Osgood R. W., Lee J. C., King R. D. & Stein J. H. (1983).** Host-parasite interactions in the pathogenesis of experimental renal candidiasis. *Lab Invest* **49**: 460-467.

Barrett-Bee K., Hayes Y., Wilson R. G. & Ryley J. F. (1985). A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* **131**: 1217-1221.

Beck-Sagué C. M., Jarvis W. R. & the National Nosocomial Infections Surveillance System (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* **167**: 1247-1251.

Bendel C. M. & Hostetter M. K. (1993). Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Clin Invest* **92**: 1840-1849.

Bendel C. M., St Sauver J. & Hostetter M. K. (1995). Epithelial adhesion in yeast species: correlation with surface expression of the integrin analog. *J Infect Dis* **171**: 1660-1663.

Bennett D. E., McCreary C. E. & Coleman D. C. (1998). Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. *Microbiology* **144**: 55-72

Ben-Yaacov R., Knoller S., Caldwell G. A., Becker J. M. & Koltin Y. (1994). *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 648-652.

Bergen M. S., Voss E. & Soll D. R. (1990). Switching at the cellular level in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **136**: 1925-1936.

Borg M. & Rüchel R. (1988). Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* **56**: 626-631.

Borg-von Zepelin M., Beggah S., Boggian K., Sanglard D. & Monod M. (1998). The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol* **28**: 543-554.

Bouali A., Robert R., Tronchin G. & Senet J. M. (1987). Characterization of binding of human fibrinogen to the surface of germ-tubes and mycelium of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**: 545-551.

Bouchara J. P., Tronchin G., Annaix V., Robert R. & Senet J. M. (1990). Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect Immun* **58**: 48-54.

Brassart D., Woltz A., Golliard M. & Neeser J. R. (1991). *In vitro* inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha 1-2Gal beta-bearing complex carbohydrates. *Infect Immun* **59**: 1605-1613.

Calderone R. A. & Braun P. C. (1991). Adherence and receptor relationship of *Candida albicans*. *Microbio Rev* **55**: 1-20.

Cassone A., De Bernardis F., Mondello F., Ceddia T. & Agatensi L. (1987). Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* **156**: 777-783.

Chbani-Rima A., Linas M. D. & Seguela J. P. (1993). Étude de la protéinase acide chez *Candida albicans*: purification et corrélation entre sa sécrétion *in vitro*, la virulence des souches et leur adhésion aux cellules épithéliales humaines. *J Mycol Méd* **3**: 20-29.

Chibana H. & Tanaka K. (1996). Analysis of the cell cycle in the budding yeast *Candida albicans* by positioning of chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with repetitive sequences. *Genes Cells* **1**: 727-740.

Clemons K. V., McCusker J. H., Davis R. W. & Stevens D. A. (1993). Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Infect Dis* **169**: 859-867.

Cockayne A. & Odds F. C. (1984). Interactions of *Candida albicans* yeast cells, germ tubes and hyphae with human polymorphonuclear leucocytes *in vitro*. *J Gen Microbiol* **130**: 465-471.

Cole G. T., Seshan K. R., Pope L. M. & Yancey R. J. (1988). Morphological aspects of gastrointestinal tract invasion by *Candida albicans* in the infant mouse. *J Med Vet Mycol* **26**: 173-185.

Cole G. T., Lynn K. T., Seshan K. R. & Pope L. M. (1989). Gastrointestinal and systemic candidosis in immunocompromised mice. *J Med Vet Mycol* **27**: 363-380.

Colina A. -R., Aumont F., Deslauriers N., Belhumeur P. & de Repentigny L. (1996). Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* **64**: 4514-4519.

Crandall M. & Edwards Jr J. E. (1987). Segregation of proteinase-negative mutants from heterozygous *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**: 2817-2824.

Critchley I. A. & Douglas L. J. (1987a). Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**: 629-636.

Critchley I. A. & Douglas L. J. (1987b). Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. **133**: 637-643.

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

De Bernardis F., Agatensi L., Ross I. K., Emerson G. W., Lorenzini R., Sullivan P. A. & Cassone A. (1990). Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* **161**: 1276-1283.

De Bernardis F., Boccanera M., Rainaldi L., Guerra C. E., Quinti I. & Cassone A. (1992). The secretion of aspartyl proteinase, a virulence enzyme, by isolates of *Candida albicans* from the oral cavity of HIV-infected subjects. *Eur J Epidemiol* **8**: 362-367.

De Bernardis F., Cassone A., Sturtevant J. & Calderone R. (1995). Expression of *Candida albicans* *SAP1* and *SAP2* in experimental vaginitis. *Infect Immun* **63**: 1887-1892.

De Bernardis F., Chiani P., Ciccozzi M., Pellegrini G., Ceddia T., D'Offizzi G., Quinti I., Sullivan P. A. & Cassone A. (1996). Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* **64**: 466-471.

De Bernardis F., Boccanera M., Asriani D., Spreghini E., Santoni G. & Cassone A. (1997). Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun* **65**: 3399-3405.

De Bernardis F., Arancia S., Morelli L., Hube B., Sanglard D., Schäfer W. & Cassone A. (1999). Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular *SAP2*, are virulence factors for *Candida* vaginitis. *J Infect Dis* **179**: 201-208.

De Repentigny L., Phaneuf M. & Mathieu L.-G. (1992). Gastrointestinal colonisation and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice. *Infect Immun* **60**: 4907-4914.

Diamond R. D. (1991). The growing problem of mycoses in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* **13**: 480-486.

Dick J. D., Merz W. G. & Saral R. (1980). Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* **18**: 158-163.

Douglas L. J., Houston J. G. & McCourtie J. (1981). Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells after growth on different carbon sources. *FEMS Microbio Lett* **12**: 241-243.

Fallon K., Bausch K., Noonan J., Huguenel E. & Tamburini P. (1997). Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun* **65**: 551-556.

Fasoli M & Kerridge D. (1988). Isolation and characterization of fluoropyrimidine-resistant mutants in two *Candida* species. *Ann N Y Acad Sci.* **544**:260-263.

Fling M. E., Kopf J., Tamarkin A., Gorman J. A., Smith H. A. & Koltin Y. (1991). Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol Gen Genet* **227**: 318-329.

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

Franz R., Kelly S. L., Lamb D. C., Kelly D. E., Ruhnke M. & Morschhäuser J. (1998). Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 3065-3072.

Gale C., Finkel D., Tao N., Meinke M., McClellan M., Olson J., Kendrick K. & Hostetter M. (1996). Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 357-361.

Gale C. A., Bendel C. M., McClellan M., Hauser M., Becker J. M., Berman J. & Hostetter M. K. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* **279**: 1355-1358.

Germaine G. R., Tellefson L. M. & Johnson G. L. (1978). Proteolytic activity of *Candida albicans*: action on human salivary proteins. *Infect Immun* **22**: 861-866.

Ghannoum M. & Abu Elteen K. (1986). Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **24**: 407-413.

Ghannoum M.A. (1988). Mechanisms potentiating *Candida* infections. A review. *Mycoses* **31**: 543-557.

Ghannoum M.A. & Abu-Elteen K.H (1990). Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses* **33**: 265-282.

Ghannoum M.A. (1998). Extracellular phospholipases as universal. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **39**: 55-59.

Gilmore B. J., Retsinas E. M. & Hostetter M. K. (1988). An iC3b receptor on *Candida albicans*: structure, function, and correlates for pathogenicity. *J Infect Dis* **157**: 38-46.

Goldway M., Teff D., Schmidt R., Oppenheim A. B. & Koltin Y. (1995). Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the *BEN^r* gene. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 422-426.

Gustafson K. S., Vercellotti G. M., Bendel C. M. & Hostetter M. K. (1991). Molecular mimicry in *Candida albicans*. Role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. *J Clin Invest* **87**: 1896-1902.

Hasenclever H. F. & Mitchell W. O. (1961). Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two groups in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **82**: 570-573.

Hazen K. C., Brawner D. L., Riesselman M. H., Jutila M. A. & Cutler J. E. (1991). Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect Immun* **59**: 907-912.

Hellstein J., Vawter-Hugart H., Fotos P., Schmid J. & Soll D. R. (1993). Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. *J Clin Microbiol* **31**: 3190-3199.

Homma M., Kanbe T., Chibana H. & Tanaka K. (1992). Detection of intracellular forms of secretory aspartic proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Bacteriol* **138**: 627-633.

Homma M., Chibana H. & Tanaka K. (1993). Induction of extracellular proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Bacteriol* **139**: 1187-1193.

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

Hube B., Turver C. J., Odds F. C., Eiffert H., Boulnois G. J., Köchel H. & Rühel R. (1991). Sequence of the *Candida albicans* gene encoding the secretory aspartate proteinase. *J Med Vet Mycol* **29**: 129-132.

Hube B., Monod M., Schofield D. A., Brown A. J. P. & Gow N. A. R. (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **14**: 87-99.

Hube B. (1996). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* **7**: 55-69.

Hube B., Sanglard D., Monod M., Brown A. J. P. & Gow N. A. R. (1997a). Extracellular proteolytic activity of *Candida* species. Dans *Host-fungus interplay*. Proceedings of the Fifth Symposium on Topics in Mycology, National Foundation for Infectious Diseases, Bethesda, Md, pp 109-122.

Hube B., Sanglard D., Odds F. C., Hess D., Monod M., Schäfer W., Brown A. J. P. & Gow N. A. R. (1997b). Disruption of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* **65**: 3529-3538.

Hurtrel B., Lagrange P. H. & Michel J. C. (1980). Systemic candidiasis in mice. II. Main role of polymorphonuclear leucocytes in resistance to infection. *Ann Immunol (Paris)* **131C**: 105-118.

Ibrahim A. S., Mirbod F., Filler S. G., Banno Y., Cole G. T., Kitajima Y., Edwards Jr. J. E., Nozawa Y. & Ghannoum M. A. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**: 1993-1998.

Jones E. W. (1991). Tackling the protease problem in *S. cerevisiae*. Dans Guthrie C., Fink G. R., ed. *Methods in enzymology: Guide to yeast genetics and molecular biology* (vol. 194). Academic Press, Inc., San Diego, Californie, pp 428-453.

Jones E. W., Webb G. C. & Hiller M. A. (1997). Biogenesis and function of the yeast vacuole. Dans Pringle J. R., Broach J. R. & Jones E. W., ed. *The molecular and*

cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Julius D., Blake A., Blair L., Kunisawa R. & Thomer J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* **37**: 129-132.

Kagaya K. & Kukasawa Y. (1981). Murine defense mechanism against *Candida albicans* infection. II. Opsonization, phagocytosis, and intracellular killing of *C. albicans*. *Microbiol Immunol* **25**: 807-818.

Kaiser C. A., Gimeno R. E. & Shaywitz D. A. (1997). Protein secretion, membrane biogenesis, and endocytosis. Dans Pringle J. R., Broach J. R. & Jones E. W., ed. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Kaminishi H., Hagihara Y., Hayashi S. & Cho T. (1986). Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. *Infect Immun* **53**: 312-316.

Kaminishi H., Tanaka M., Cho T., Maeda H. & Hagihara Y. (1990). Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* **58**: 2139-2143.

Kaminishi H., Miyaguchi H., Tamaki T., Suenaga N., Hisamatsu M., Mihashi I., Matsumoto H., Maeda H. & Hagihara Y. (1995). Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* **63**: 984-988.

Kelly R., Miller S. M., Kurtz M. B., Kirsch D. R. (1987). Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step gene disruption to isolate *ura3* mutants. *Mol Cell Biol* **7**: 199-208.

Kelly S. L., Lamb D. C., Kelly D. E., Manning N. J., Loeffler J., Hebart H., Schumacher U. & Einsele H. (1997). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett* **400**: 80-82.

Kennedy M. J. & Volz P. A. (1983). Dissemination of yeasts after gastrointestinal inoculation in antibiotics-treated mice. *Sabouraudia* **21**: 27-33.

Kennedy M. J. & Volz P. A. (1985a). Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and dissemination by *Candida albicans*. *Sabouraudia* **23**: 265-273.

Kennedy M. J. & Volz P. A. (1985b). Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun* **49**: 654-663.

Kennedy M. J., Rogers A. L., Hanselmen L. R., Soll D. R. & Yancey R. J. Jr (1988). Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *Mycopathologia* **102**: 149-156.

Kerridge D., Fasoli M & Wayman F. J. (1988). Drug resistance in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Ann N Y Acad Sci* **544**:245-259.

Kilian M., Mestecki J. & Russel M. W. (1988). Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* **52**: 296-303.

King R. D., Lee J. C. & Morris A. L. (1980). Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* **27**: 667-674.

Klotz S. A., Drutz D. J., Harrison J. L. & Huppert M. (1983). Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. *Infect Immun* **42**: 374-384.

Klotz S. A. & Maca R. D. (1988). Endothelial cell contraction increases *Candida* adherence to exposed extracellular matrix. *Infect Immun* **56**: 2495-2498.

Klotz S. A. & Smith R. L. (1991). A fibronectin receptor of *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J Infect Dis* **163**: 604-610.

Klotz S. A., Smith R. L. & Stewart B. W. (1992). Effect of an arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide on hematogenous candidal infections in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 132-136.

Klotz S. A. (1994). Plasma and extracellular matrix proteins mediate in the fate of *Candida albicans* in the human host. *Med Hyp* **42**: 328-334.

Klotz S. A., Hein R. C., Smith R. L. & Rouse J. B. (1994). The fibronectin adhesin of *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**: 4679-4681.

Kolotila M. P. & Diamond R. D. (1990). Effects of neutrophils and *in vitro* oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. *Infect Immun* **58**: 1174-1179.

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

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

Kurtz M. B., Kelly R. & Kirsch D. R. (1990). Overview of *Candida* physiology, pathogenicity and new anticandidal agents. Dans Kirsch D. R., Kelly R., Kurtz M. B., ed. The genetics of *Candida*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 1-19.

Kwon-chung K. J., Lehman D., Good C. & Magee P. T. (1985). Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **49**: 571-575.

Lay J., Henry K., Clifford J., Koltin Y., Bulawa C. E. & Becker J. M. (1998). Altered expression of selectable marker *URA3* in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* **66**: 5301-5306.

Lerner C. G. & Goldman R. C. (1993). Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. *J Gen Microbiol* **139**: 1643-1651.

Li R. K. & Cutler J. E. (1993). Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **268**: 18293-18299.

Lo H.-J., Köhler J. R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A. & Fink G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.

Louie A., Dixon D. M., El-maghrabi E. A., Burnett J. W., Baltch A. L. & Smith R. P. (1994). Relationship between *Candida albicans* epidermolytic proteinase activity and virulence in mice. *J Med Vet Mycol* **32**: 59-64.

Lyman C. A., Simons E. R., Melnick D. A. & Diamond R. D. (1987). Unopsonized *Candida albicans* hyphae stimulate a neutrophil respiratory burst and a cytosolic calcium flux without membrane depolarization. *J Infect Dis* **156**: 770-776.

Macdonald F. & Odds F. C. (1980). Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *J Med Microbiol* **13**: 423-435.

Macdonald F. & Odds F. C. (1983). Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* **129**: 431-438.

Magee B. B., Hube B., Wright R. J., Sullivan P. J. & Magee P. T. (1993). The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect Immun* **61**: 3240-3243.

Mahanty S., Greenfield R. A., Joyce W. A. & Kincade P. W. (1988). Inoculation candidiasis in a murine model of severe combined immunodeficiency syndrome. *Infect Immun* **56**: 3162-3166.

Maiti P. K., Kumar A., Kumar R. & Mohapatra L. N. (1985). Role of antibodies and effect of BCG vaccination in experimental candidiasis in mice. *Mycopathologia* **91**: 79-85.

Marriott M. S. (1975). Isolation and chemical characterization of plasma membranes from the yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **86**: 115-132.

Martin M. V., Craig G. T. & Lamb D. J. (1984). An investigation of the role of true hyphae production in the pathogenesis of experimental oral candidosis. *Sabouraudia* **22**: 471-476.

Masuoka J., Wu G. & Hazen K. C. (1998). Evidence that hydrophobic interactions mediate *Candida albicans* adhesion to extracellular matrix proteins. Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, Georgia, May 17-21, 1998. (n° F-28)

- McCourtie J. & Douglas L. J. (1984).** Relationship between cell surface composition, adherence, and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **45**: 6-12.
- McCourtie J. & Douglas L. J. (1985).** Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. *J Gen Microbiol* **131**: 495-503.
- McCullough M. J., Ross B. C. & Reade P. C.(1996).** *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg* **25**: 136-144.
- McLain N. & Dolan J. W. (1997).** Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**: 3521-3526.
- Miyake T., Takeya K., Nomoto K. & Muraoka S. (1977).** Cellular elements in the resistance to *Candida* infection in mice. I. Contribution of T lymphocytes and phagocytes at various stages of infection. *Microbiol Immunol* **21**: 703-725.
- Miyasaki S. H., White T. C. & Agabian N. (1994).** A fourth secreted aspartyl proteinase gene (*SAP4*) and a *CARE2* repetitive element are located upstream of the *SAP1* gene in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **176**: 1702-1710.
- Moir D. T., Davidow L. S. (1991).** Production of proteins by secretion from yeast. Dans Guthrie C., Fink G. R., ed. *Methods in enzymology: Guide to yeast genetics and molecular biology* (vol. 194). Academic Press, Inc., San Diego, Californie, pp 491-507.
- Monod M., Togni G., Hube B. & Sanglard D. (1994).** Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* **13**: 357-368.
- Monod M., Hube B., Hess D. & Sanglard D. (1998).** Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* **144**: 2731-2737.

Morrison C. J., Hurst S. F., Bragg S. L., Kuykendall R. J., Diaz H., McLaughlin D. W. & Reiss E. (1993a). Purification and characterization of the extracellular aspartyl proteinase of *Candida albicans*: removal of extraneous proteins and cell wall mannoprotein and evidence for lack of glycosylation. *J Gen Microbiol* **139**: 1177-1186.

Morrison C. J., Hurst S. F., Bragg S. L., Kuykendall R. J., Diaz H., Pohl J. & Reiss E. (1993b). Heterogeneity of the purified extracellular aspartyl proteinase from *Candida albicans*: characterization with monoclonal antibodies and N-terminal amino acid sequence analysis. *Infect Immun* **61**: 2030-2036.

Morrow B., Srikantha T. & Soll D. R. (1992). Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **12**: 2997-3005.

Morrow B., Srikantha T., Anderson J. & Soll D. R. (1993). Coordinate regulation of two opaque-phase-specific genes during white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect Immun* **61**: 1823-1828.

Morrow B., Ramsey H & Soll D. R. (1994). Regulation of phase-specific genes in the more general switching system of *Candida albicans* strain 3153A. *J Med Vet Mycol* **32**: 287-294.

Narayanan R., Joyce W. A. & Greenfield R. A. (1991). Gastrointestinal candidiasis in a murine model of severe combined immunodeficiency syndrome. *Infect Immun* **59**: 2116-2119.

Negi M., Tsuboi R., Matsui T. & Ogawa H. (1984). Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. *J Invest Dermatol* **83**: 32-36.

Newport G. & Agabian N. (1997). KEX2 influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. *J Biol Chem* **272**: 28954-28961.

Nyirjesy P., Vazquez J. A., Ufberg D. D., Sobel J. D., Boikov D. A. & Buckley H. R. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* vaginitis: transmission from yeast used in baking. *Obstetrics & Gynecology* **86**: 326-329.

Odds F. C. (1988). *Candida and candidosis: a review and bibliography*, 2nd edn. London: Ballière Tindall, pp. 259-267.

Olaiya A. F. & Sogin S. J. (1979). Ploidy determination of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **140**: 1043-1049.

Ollert M. W., Söhnchen R., Korting H. C., Ollert U., Bräutigam S. & Bräutigam W. (1993). Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* **61**: 4560-4568.

Ollert M. W., Wende C., Görlich M., McMullan-Vogel C. G., Borg-von Zepelin M., Vogel C.-W. & Korting H. C. (1995). Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* **33**: 2543-2549.

Orr F. W., Adamson I. Y. R. & Young L. (1986). Promotion of pulmonary metastasis in mice by bleomycin-induced endothelial injury. *Cancer Res* **46**: 891-897.

Pendrak M. L. & Klotz S. A. (1995). Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol Lett* **129**: 103-114.

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

Pomes R., Gil C. & Nombela C. (1985). Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. *J Gen Microbiol* **131**: 2107-2113.

Pringle J. R., Broach J. R. & Jones E. W., ed. (1997). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Pugh D. & Cawson R. A. (1975). The cytochemical localization of phospholipase A and lysophospholipase in *Candida albicans*. *Sabouraudia* **13**: 110-115.

Pugh D. & Cawson R. A. (1977). The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia* **15**: 29-35.

Ray T. L. & Payne C. D. (1988). Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida* acid proteinase. *Infect Immun* **56**: 1942-1949.

Ray T. L., Payne C. D., Morrow B. & Soll D. R. (1989). Switch-phenotypes of *Candida albicans* strain WO-1 express different systemic and cutaneous virulence in murine models. *Clin Res* **37**: 764A.

Ray T. L. & Payne C. D. (1990). Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* **58**: 508-514.

Remold H., Fasold H. & Staib F. (1968). Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **167**: 399-406.

Ross I K., De Bernardis F., Emerson G. W., Cassone A. & Sullivan P. A. (1990). The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. *J Gen Microbiol* **136**: 687-694.

Rüchel R. (1981). Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **659**: 99-113.

Rüchel R. (1983a). On the role of proteinases from *Candida albicans* in the pathogenesis of acroecrosis. *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig A* **255**: 524-536.

Rüchel R. (1983b). On the renin-like activity of *Candida* proteinases and activation of blood coagulation in vitro. *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig A* **255**: 368-379.

Rüchel R. & Böning B. (1983). Detection of *Candida* proteinase by enzyme immunoassay and interaction of the enzyme with alpha-2-macroglobulin. *J Immunol Methods* **61**: 107-116.

Rüchel R., Uhlemann K. & Böning B. (1983). Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig A* **255**: 537-548.

Rüchel R., Böning B. & Borg M. (1986). Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection *in vitro*. *Infect Immun* **53**: 411-419.

Rüchel R., Ritter B. & Schaffrinski M. (1990). Modulation of experimental systemic murine candidosis by intravenous pepstatin. *Zbl Bakt* **273**: 391-403.

Rüchel R., Zimmermann F., Böning-Stutzer B. & Helmchen U. (1991). Candidiasis visualised by proteinase-directed immunofluorescence. *Virchows Archiv A Pathol Anat* **419**: 199-202.

Rüchel R., De Bernardis F., Ray T. L., Sullivan P. A. & Cole G. T. (1992). *Candida* acid proteinases. *J Med Vet Mycol* **30 (suppl 1)**: 123-132.

Samaranayake L. P., Raeside J. M. & MacFarlane T. W. (1984). Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. *Sabouraudia* **22**: 201-207.

Sandin R. L., Rogers A. L., Patterson R. J. & Beneke E. S. (1982). Evidence for mannose-mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells *in vitro*. *Infect Immun* **35**: 79-85.

Sanglard D., Kuchler K., Ischer F., Pagani J.-L., Monod M. & Bille J. (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2378-2386.

Sanglard D., Ischer F., Monod M. & Bille J. (1996). Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2300-2305.

Sanglard D., Hube B., Monod M., Odds F. C. & Gow N. A. R. (1997a). A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* **65**: 3539-3546.

Sanglard D., Ischer F., Monod M. & Bille J. (1997b). Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143**: 405-416.

Schaller M., Schäfer W., Korting H. C. & Hube B. (1998). Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* **29**: 605-615.

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

Schneider J. C. & Guarente L. (1991). Vectors for expression of cloned genes in yeast: regulation, overproduction, and underproduction. Dans Guthrie C., Fink G. R., ed. *Methods in enzymology: Guide to yeast genetics and molecular biology* (vol. 194). Academic Press, Inc., San Diego, Californie, pp 373-388.

Shepherd M. G. (1985). Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections. *Infect Immun* **50**: 541-544.

Silberberg A. (1989). Mucus glycoprotein, its biophysical and gel-forming properties. Dans *Mucus and related topics*. Symposia of the society for experimental biology, symposium XLIII, Cambridge, Great Britain, pp 43-63.

Skerl K. G., Calderone R. A., Segal E., Sreevalsan T. & Sceld W. M. (1984). *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. *Can J Microbiol* **30**: 221-227.

Slutsky B., Buffo J. & Soll D. R. (1985). High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* **230**: 666-669.

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

Smolenski G., Sullivan P. A., Cutfield S. M. & Cutfield J. F. (1997). Analysis of secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes. *Microbiology* **143**: 349-356.

Sobel J. D., Muller G. & Buckley H. R. (1984). Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infect Immun* **44**: 576-580.

Sokol-Anderson M., Sligh J. E. Jr., Elberg S., Brajtburg J., Kobayashi G. S. & Medoff G. (1988). Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrog Agents Chemother* **32**: 702-705.

Soll D. R. & Mitchell L. H. (1983). Filament ring formation in the dimorphic yeast *Candida albicans*. *J Cell Biol* **96**: 486-493.

Soll D. R., Langtimm C. J., McDowell J., Hicks J. & Galask R. (1987). High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *J Clin Microbiol* **25**: 1611-1622.

Soll D. R. (1990). Dimorphism and high-frequency switching in *Candida albicans*. Dans Kirsch D. R., Kelly R., Kurtz M. B., ed. The genetics of *Candida*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 147-176.

Soll D. R. (1992). High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* **5**: 183-203.

Soll D. R., Morrow B., Srikantha T., Vargas K. & Wertz P. (1994). Developmental and molecular biology of switching in *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **78**: 194-201.

Soll D. R. (1997). Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**: 279-288.

Srikantha T. & Soll D. R. (1993). A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. *Gene* **131**: 53-60.

Srikantha T., Chandrasekhar A. & Soll D. R. (1995). Functional analysis of the promoter of the phase-specific *WH11* gene of *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **15**: 1797-1805.

Staab J. F. & Sundstrom P. (1998). The hyphal surface protein, Hwp1, of *Candida albicans* mediates stabilized adhesion to human BEC's that is resistant to SDS and heat Abstracts of the 98th General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, Georgia, May 17-21, 1998. (n° F-37)

Staib F. (1965). Serum-proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. *Sabouraudia* **4**: 187-193.

Staib F. (1969). Proteolysis and pathogenicity of *Candida albicans* strains. *Mycopathol Mycol Appl* **37**: 345-348.

Takahashi M., Banno Y. & Nozawa Y. (1991). Secreted *Candida albicans* phospholipases: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase. *J Med Vet Mycol* **29**: 193-204.

Togni G., Sanglard D., Quadroni M., Foundling S. I. & Monod M. (1996). Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: functional analysis of preproregion cleavages in *C. tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **142**: 493-503.

Tsushima H., Mine H., Kawakami Y., Hyodoh F. & Ueki A. (1994). *Candida albicans* aspartic proteinase cleaves and inactivates human epidermal cysteine proteinase inhibitor, cystatin A. *Microbiology* **140**: 167-171.

Tuite M. F. (1992). Strategies for the genetic manipulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biotech* **12**: 157-188.

Vanden Bossche H., Marichal P., Odds F. C., Le Jeune L. & Coene M. C. (1992). Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 2602-2610.

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

Vanden Bossche H., Warnock D. W., Dupont B., Kerridge D., Sen G. S., Improvisi L., Marichal P., Odds F. C., Provost F. & Ronin O. (1994b). Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J med Vet Mycol* **32**: 189-202.

Wagner T., Borg-v. Zepelin M. & Rüchel R. (1995). pH-dependent denaturation of extracellular aspartic proteinases from *Candida* species. *J Med Vet Mycol* **33**: 275-278.

Whelan W. L., Partridge R. M. & Magee P. T. (1980). Heterozygosity and segregation in *Candida albicans*. *Mol Gen Genet* **180**: 107-113.

White T. C., Miyasaki S. H., & Agabian N. (1993). Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **175**: 6126-6133.

White T. C. & Agabian N. (1995). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol* **177**: 5215-5221.

White T. C., Köhler G. A., Miyasaki S. H. & Agabian N. (1995). Expression of virulence factors in *Candida albicans*. *Can J Bot* **73 (suppl. 1)**: S1058-S1064.

White T. C (1997). The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14 α demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 1488-1494.

White T. C., Marr K. A. & Bowden R. A. (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**: 382-402.

Wickes B. L. & Petter R. (1996). Genomic variation in *C. albicans*. *Curr Top Med Mycol* **7**: 71-86.

Wirsching S., Michel S., Köhler G. & Morschhäuser J. (2000). Activation of the multiple drug resistance gene *MDR1* in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol* **182**: 400-404.

Wright R. J., Carne A., Hieber A. D., Lamont I. L., Emerson G. W. & Sullivan P. A. (1992). A second gene for a secreted aspartate proteinase in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **174**: 7848-7853.

Yu L., Lee K. K., Ens K., Doig P. C., Carpenter M. R., Staddon W., Hodges R. S., Paranchych W. & Irvin R. T. (1994a). Partial characterization of a *Candida albicans* fimbrial adhesin. *Infect Immun* **62**: 2834-2842.

Yu L., Lee K. K., Sheth H. B., Lane-Bell P., Srivastava G., Hindsgaul O., Paranchych W, Hodges R. S. & Irvin R. T. (1994b). Fimbria-mediated adherence of *Candida albicans* to glycosphingolipid receptors on human buccal epithelial cells. *Infect Immun* **62**: 2843-2848.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à témoigner ma reconnaissance au Dr Louis de Repentigny et au Dr Pierre Belhumeur pour m'avoir donné leur confiance, mais aussi pour leur patience, leur soutien et leurs conseils tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais également remercier Guillaume, Francis, Martin, Hélène, Fléchère, ainsi que Francine et Ana Rosa pour leur amitié et leurs bons conseils.

Merci aussi à Benoit pour sa patience d'ange et son soutien permanent.

Finalement, j'aimerais témoigner toute ma reconnaissance à mes parents, sans qui je n'aurais jamais pu venir étudier au Québec. Merci de m'avoir toujours soutenue, merci pour votre confiance et les sacrifices que vous avez faits.