

Université de Montréal

Expression *in vivo* des facteurs de virulence de *Candida albicans*

par

Marie Fiorillo

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

mars, 2001

© Marie Fiorillo, 2001



W

4

U58

2001

v. 092



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Expression *in vivo* des facteurs de virulence de *Candida albicans*

présenté par:

Marie Fiorillo

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury:	Dr Georges Szatmari
Directeur de recherche:	Dr Louis de Repentigny
Codirecteur:	Dr Pierre Belhumeur
Membre du jury:	Dr Pierre Auger

Mémoire accepté le:

## SOMMAIRE

Parmi les espèces appartenant au genre *Candida*, *Candida albicans* est celle que l'on retrouve le plus fréquemment lors des candidoses. Contrairement aux autres mycètes, *C. albicans* est un organisme commensal qui fait partie de la flore normale des muqueuses de l'humain. Ainsi, *C. albicans* est un pathogène opportuniste qui peut entraîner des infections lorsque le système immunitaire est affaibli. Il est donc important de bien déterminer le rôle des différents facteurs de virulence de *C. albicans*, et plus précisément leur expression *in vivo*, dans la pathogenèse de la candidose.

Jusqu'à ce jour, les facteurs de virulence putatifs de *C. albicans* les plus étudiés sont: la capacité d'adhérer aux surfaces de l'hôte, la capacité des cellules de passer de la forme levure à la forme filamenteuse, et la production d'enzymes extracellulaires permettant à *C. albicans* de pénétrer dans les tissus et de contrer les mécanismes de défense de l'hôte. Les différentes études réalisées à ce jour nous permettent de croire que la virulence de *C. albicans* ne résulte pas d'un seul de ces facteurs mais plutôt de la collaboration de plusieurs de ceux-ci. De plus, les études effectuées *in vitro* démontrent que l'expression des facteurs de virulence varie selon les conditions de culture utilisées. Toutefois, puisque la plupart des travaux ont été réalisés *in vitro*, nos connaissances de l'expression différentielle de ces gènes, ou tout autre gène relié à la virulence au cours de l'infection *in vivo*, demeurent très limitées. De telles connaissances sont essentielles à une meilleure compréhension de la pathogénie moléculaire de la candidose. Ainsi, nous avons vérifié l'hypothèse que l'expression des différents gènes exprimés au cours de la candidose *in vivo* varie en fonction du site et du stade temporel de l'infection.

L'objectif de ce projet était donc de comparer l'ensemble de l'expression génique de *C. albicans* lors de l'infection buccale et vaginale réalisée à l'aide d'un modèle murin. Cette comparaison est pertinente puisque le *C. albicans* est le premier responsable d'infections à ces deux sites anatomiques. Afin d'étudier l'expression génique, des prélèvements ont été effectués au niveau buccal et vaginal à différents temps après l'infection. Les cellules de *C. albicans* récoltées ont été lysées afin de récupérer l'ARN qui

a été, par la suite, utilisé pour effectuer un DDRT-PCR. Une étape de transcription inverse a été effectuée à partir des deux populations d'ARN à comparer, à l'aide d'amorces oligo(dT). Cette étape a été suivie d'un PCR sur l'ADNc ainsi obtenu, utilisant les mêmes amorces oligo(dT), des amorces arbitraires ainsi que des nucléotides radioactifs. Les fragments d'ADN ont été séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant et le patron des bandes, chez les deux populations de départ, a été comparé. Suite au DDRT-PCR, 33 bandes différentielles ont été obtenues, deux exprimées seulement au niveau buccal et 31 uniquement au niveau vaginal. Ces dernières ont été découpées, amplifiées, clonées, séquencées et comparées aux séquences retrouvées dans GenBank. La confirmation de l'expression différentielle par le *C. albicans* a permis de retenir deux gènes exprimés uniquement lors de l'infection vaginale. Ceux-ci présentaient un haut niveau d'homologie avec l'ITS1 de *C. albicans*, un cadre de lecture ouvert (ORF YLR154c) de *S. cerevisiae*, le gène *MET3* de levure et le « H<sup>+</sup> - transporting ATP synthase chain b » de *V. alginolyticus*.

Ces résultats appuient l'hypothèse de départ à l'effet que l'expression des gènes de *C. albicans* varie en fonction du site et du stade temporel de l'infection. Une meilleure compréhension de l'expression *in vivo* des gènes impliqués dans la pathogenèse de la candidose pourra mener à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques chez ce champignon opportuniste.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1. <i>CANDIDA ALBICANS</i> .....	2
1.1. Généralités.....	2
1.1.1. <i>Le genre Candida</i> .....	2
1.1.2. <i>Structure et physiologie de C. albicans</i> .....	3
1.1.3. <i>Dimorphisme de C. albicans</i> .....	3
1.1.4. <i>Génétique de C. albicans</i> .....	5
1.2. <i>Candidose chez l'humain</i> .....	6
1.2.1. <i>Facteurs prédisposants l'hôte à une candidose</i> .....	7
1.2.2. <i>Candidose orale</i> .....	8
1.2.3. <i>Candidose vaginale</i> .....	10
1.2.4. <i>Autres types de candidoses</i> .....	12
1.3. <i>Mécanismes de défense de l'hôte</i> .....	13
2. FACTEURS DE VIRULENCE DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ET PATHOGENÈSE DE LA CANDIDOSE.....	15
2.1. Adhérence .....	16
2.1.1. <i>Interaction protéine-protéine</i> .....	16
2.1.2. <i>Interaction protéine-sucre</i> .....	19
2.1.3. <i>Autres types d'interactions</i> .....	20
2.2. <i>Dimorphisme et instabilité phénotypique chez C. albicans</i> .....	21
2.2.1. <i>Dimorphisme</i> .....	21
2.2.2. <i>Instabilité phénotypique de C. albicans</i> .....	23

<b>2.3. Production d'enzymes extracellulaires.....</b>	<b>25</b>
2.3.1. <i>Protéases aspartiques</i> .....	25
2.3.1.1. Propriétés biochimiques des Saps .....	25
2.3.1.2. La famille des gènes <i>SAP</i> .....	26
2.3.1.3. Expression différentielle des Saps .....	29
2.3.1.4. Importance et rôle des Saps dans la virulence .....	31
2.3.2. <i>Phospholipases</i> .....	32
2.3.2.1. Les phospholipases chez <i>C. albicans</i> .....	32
2.3.2.2. Les phospholipases comme facteur de virulence .....	33
<b>2.4. Pathogenèse de la candidose.....</b>	<b>33</b>
<b>3. EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES GÈNES DE C. ALBICANS.....</b>	<b>34</b>
3.1. Expression différentielle des gènes de <i>C. albicans in vitro et in vivo</i> .....	35
3.2. Techniques utilisées pour mettre en évidence l'expression différentielle des gènes .....	36
3.2.1. <i>Criblage d'une librairie soustractive</i> .....	36
3.2.2. <i>Hybridation différentielle</i> .....	36
3.2.3. <i>Differential display RT-PCR</i> .....	37
3.2.3.1. Identification de gènes exprimés différemment chez <i>C. albicans, in vitro et in vivo</i> .....	38
3.3. <i>Microplaque d'ADN</i> .....	40
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>41</b>
1. Souches et conditions de culture.....	42
2. Inoculation des souris.....	42
3. Décompte des cellules de <i>C. albicans</i> dans les cavités buccale et vaginale des souris.....	43
4. Extraction de l'ARN de <i>C. albicans</i> LAM-1 provenant des souris .....	44
5. DDRT-PCR .....	47
6. Clonage et digestions enzymatiques.....	50
7. Séquençage .....	54

<b>8. Préparation des sondes marquées à la DIG .....</b>	<b>55</b>
8.1 <i>Extraction du fragment d'ADN du gel d'agarose .....</i>	<i>55</i>
8.2 <i>Extraction et précipitation de l'ADN .....</i>	<i>55</i>
8.3 <i>Marquage de l'ADN à la DIG.....</i>	<i>56</i>
<b>9. Extraction et purification de l'ADN génomique de <i>C. albicans</i> LAM-1.....</b>	<b>57</b>
<b>10. Digestion de l'ADN génomique de <i>C. albicans</i> LAM-1, transfert de Southern, hybridation et détection .....</b>	<b>57</b>
<b>11. RT-PCR effectué sur l'ARN de <i>C. albicans</i> LAM-1 provenant des cavités orale et vaginale des souris C3H et purification des produits de RT-PCR.....</b>	<b>60</b>
<b>12. Transfert de Southern des produits de RT-PCR, hybridation et détection.....</b>	<b>62</b>
<b>13. Préparation des milieux de culture.....</b>	<b>63</b>
<b>14. Préparation des solutions.....</b>	<b>65</b>
 <b>RÉSULTATS .....</b>	 <b>67</b>
1. <b>Cinétique de l'infection .....</b>	<b>68</b>
2. <b>DDRT-PCR .....</b>	<b>68</b>
3. <b>Clonage et digestions enzymatiques.....</b>	<b>70</b>
4. <b>Séquençage .....</b>	<b>73</b>
5. <b>Analyse de Southern sur l'ADN génomique de <i>C. albicans</i> LAM-1 .....</b>	<b>73</b>
6. <b>Expression différentielle .....</b>	<b>75</b>
 <b>DISCUSSION.....</b>	 <b>80</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>87</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xiv</b>

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

**Tableau I :** Caractéristiques des différents gènes *SAP* retrouvés chez *C. albicans*.....27

**Tableau II :** Implication des divers facteurs de virulence lors des différentes étapes de l'infection des tissus par *C. albicans*.....34

## LISTE DES FIGURES

### Revue de la littérature :

**Figure 1 :** Caractéristiques de la structure de base des *SAP*. Toutes les *SAP* codent pour un peptide signal, un propeptide contenant des sites (1 à 4) Lys-Arg ou Lys-Lys et une enzyme mature. De plus on retrouve deux résidus d'aspartate et quatre résidus de cystéine.....28

**Figure 2 :** Dendrogramme des Saps de *C. albicans*.....29

**Figure 3 :** Expression *in vitro* des gènes *SAP* de *C. albicans*. Les gènes sont exprimés différemment selon le stade de croissance, la morphologie, la température et la composition du milieu de culture.....30

### Résultats

**Figure 4 :** Décompte du nombre de CFU de *C. albicans* LAM-1 récolté chez des souris C3H. Au niveau buccal, l'ARN de *C. albicans* provenant de deux souris a été combiné pour effectuer le DDRT-PCR et l'ARN de trois autres souris a été regroupé pour le RT-PCR chacun des points représente la moyenne des observations provenant des souris individuelles. Au niveau vaginal, l'ARN de *C. albicans* provenant de quatre souris a été combiné pour le DDRT-PCR. L'ARN de *C. albicans* provenant de ces quatre mêmes souris a été utilisé individuellement pour le RT-PCR.....69

**Figure 5 :** Résultats partiels du DDRT-PCR, effectué à l'aide de l'amorce oligo(dT) T<sub>12</sub>MG et aux amorces arbitraires AP-1 à AP-5, sur l'ARN provenant des cavités buccale et vaginale des souris C3H.....71

**Figure 6 :** Produits de digestion obtenus avec l'enzyme AluI. Les cinq puits représentent cinq clones provenant d'une même bande différentielle.....72

**Figure 7** : Résultats de l'analyse de Southern, pour les clones D25A-1 et D27A-3, effectuée sur l'ADN génomique de *C. albicans* LAM-1 digéré avec les enzymes BamHI et HindIII.....74

**Figure 8A** : Homologie entre les séquences d'acides aminés du clone D26A-7 et de « H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase chain b » de *V. alginolyticus*.....76

**Figure 8B** : Homologie entre les séquences nucléotidiques du clone D23A-5/D27A-3 et le « internal transcribed spacer 1 » (ITS1) de *C. albicans*, le gène *MET3* de l'ATP sulphurylase de levure et le cadre de lecture ouvert (ORF YLR154c) de *S. cerevisiae*.....77

**Figure 9** : Expression différentielle des gènes *D23A-5*, *D26A-7* et *D27A-3* en fonction du site et du stade temporel de l'infection, déterminée par RT-PCR. L'intensité relative des produits de RT-PCR a été quantifiée par densitométrie (exprimée en unités arbitraires) et normalisée avec le contrôle interne *EFBI*.....79

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- aa : Acide aminé  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
Arg : Arginine  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
Asp : Acide aspartique  
CFU : *Colony-forming units*  
CRV : Candidose vaginale récurrente  
Cys : Cystéine  
dCTP : Désoxycytidine triphosphate  
ddH<sub>2</sub>O : Eau distillée déionisée  
DDRT-PCR : *Differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction*  
ddNTP : Didésoxynucléotide triphosphate  
DIG : Digoxigénine  
dNTP : Désoxynucléotide triphosphate  
IVET : *In vivo expression technology*  
kb : Kilobase  
kDa : Kilodalton  
KK : Lysine-lysine  
KR : Lysine-arginine  
Lys : Lysine  
MPA : Acide mycophénolique  
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*  
nm : Nanomètre  
ORF : *Open reading frame*  
pb : Paire de bases  
PCR : *Polymerase chain reaction*  
PFGE : *Pulsed field gel electrophoresis*

PLB : Phospholipase B

PLD : Phospholipase D

PMN : Polymorphonucléaire

RGD : Arginine-glycine-acide aspartique

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

Sap : *Secreted aspartyl proteinase*

SDA : *Sabouraud dextrose agar*

SDB : *Sabouraud dextrose broth*

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

U.V. : Rayons ultraviolets

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

À Grand-maman et  
Grand-papa ...

**REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 1. *CANDIDA ALBICANS*

#### 1.1 Généralités

*Candida albicans* est une levure appartenant au règne des Mycètes. Ces champignons unicellulaires (eucaryotes) se reproduisent par bourgeonnement ou par fission (Kurtz *et al.*, 1990a). Le genre *Candida* fait partie de la classe des deutéromycètes, qui est composée de toutes les espèces de mycètes dont la reproduction sexuée n'a pas encore été mise en évidence (McCullough *et al.*, 1996).

##### 1.1.1. *Le genre Candida*

Le genre *Candida* contient approximativement 200 espèces de levures, toutes caractérisées par l'absence d'un cycle sexuel, d'où l'appellation de levures imparfaites (Kurtz *et al.*, 1990a). Toutefois, des formes sexuées de types ascomycètes ont été découvertes pour certaines espèces (Segal, 1994). Malgré tout, la plupart des levures retrouvées à l'intérieur de ce genre se reproduisent par bourgeonnement multilatéral. Les différentes espèces de *Candida* varient entre elles quant à leur morphologie coloniale, leur forme cellulaire ainsi que leur capacité de former un mycélium (Kurtz *et al.*, 1990a; McCullough *et al.*, 1996). De plus, elles sont caractérisées par leur capacité d'assimiler et de fermenter différents composés. Donc, ces critères sont utilisés pour différencier les espèces de *Candida*. Grâce à l'avancement de la biologie moléculaire, il existe des techniques moléculaires, tel que l'utilisation d'enzymes de restriction ou de sondes spécifiques, qui permettent l'identification d'une espèce et même d'une sous-espèce (Segal, 1994). On retrouve la majorité des espèces de *Candida* dans un large éventail de niches écologiques. Parmi ces espèces, seulement sept espèces ont une importance médicale chez l'humain : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* et *C. kefyr* (McCullough *et al.*, 1996). La plupart des études portent sur *C. albicans* puisque ce dernier est le principal responsable d'infections fongiques chez l'humain.

### 1.1.2. Structure et physiologie de *C. albicans*

Comme tous les mycètes, *C. albicans* est un organisme eucaryote (Odds, 1988). Ceci implique qu'il est composé d'un noyau cellulaire muni d'une membrane nucléaire, de ribosomes, de mitochondries, d'un réticulum endoplasmique, d'un appareil de Golgi, ainsi que plusieurs granules et vacuoles. La membrane plasmique de *C. albicans* est une bicouche phospholipidique formée de protéines, de phospholipides, de glycolipides et de stérols estérifiés (ergostérol), ces derniers sont spécifiques aux champignons. Par conséquent, la membrane est une cible de choix pour les antifongiques appartenant à la classe des polyènes, qui se lient directement à l'ergostérol entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité de la membrane et une inhibition de la croissance cellulaire. De plus, *C. albicans* est entouré d'une structure définie, la paroi, qui agit comme une barrière de protection tout en assurant le maintien de la forme cellulaire. Outre ces fonctions, la paroi occupe le rôle de sites d'interactions entre la levure et l'environnement extérieur. Ainsi, la paroi de *C. albicans* est une structure complexe composée de mannane, de glucane et de chitine disposés sous forme de couches multiples (McCullough *et al.*, 1996). Le nombre de couches ainsi que leur morphologie varient en fonction du stade de croissance, de la forme cellulaire (levure ou hyphe) et du milieu de culture (Berdicevsky, 1994).

### 1.1.3. Dimorphisme de *C. albicans*

Une des principales caractéristiques de *C. albicans* est sa capacité de passer de la forme levure à la forme filamenteuse. La forme levure, aussi appelée blastospore, est en fait la forme unicellulaire du champignon (Odds, 1988). Cette blastospore se reproduit de façon asexuée. En effet, la cellule-mère commencera à former un bourgeon. Lorsque ce dernier aura atteint une certaine grosseur, la croissance du bourgeon s'arrêtera momentanément, puis une division nucléaire s'effectuera. Suite à cette division, une cloison (septum) sera formée et la cellule-fille se détachera de la cellule-mère pour devenir une entité distincte (Odds, 1988). Contrairement à la blastospore, l'hyphe est composée de plusieurs unités cellulaires séparées par des cloisons ou septums (Kurtz *et al.*, 1990a). Elle peut être formée à partir d'une hyphe déjà existante ou d'une blastospore. Effectivement, la blastospore

formera un tube germinal dont la croissance apicale sera stimulée. Par la suite, une division mitotique surviendra dans l'hyphe en croissance et la cloison sera formée (Odds, 1988). De plus, *C. albicans* peut aussi donner naissance à une pseudohyphe. Cette dernière ressemble fortement à une hyphe mais son processus de formation est différent (Kurtz *et al.*, 1990a). En effet, la pseudohyphe sera formée suite au bourgeonnement d'une blastospore, d'une hyphe ou d'une autre pseudohyphe (Odds, 1988). Il est donc possible de différencier les hyphes des pseudohyphes puisque ces dernières présentent des constriction au niveau des cloisons. Ce phénomène de dimorphisme, qui permet à *C. albicans* de passer de la phase levure à la phase filamenteuse, est influencé par plusieurs facteurs dont la température, le pH, la composition du milieu ainsi que la souche de *C. albicans* utilisée (Kurtz *et al.*, 1990a; Soll, 1992). Il est aussi important de mentionner que seul *C. albicans* forme de vrais hyphes lorsqu'il est incubé à 37°C en présence de sérum (Kurtz *et al.*, 1990a). Ainsi, *in vivo*, c'est un mélange de blastospores, de pseudohyphes et d'hyphes qui peut être observé (Odds, 1988). Toutefois, il est primordial de distinguer le dimorphisme-trimorphisme de *Candida* versus le dimorphisme observé chez d'autres champignons communément appelés des dimorphiques vrais, tels *Histoplasma capsulatum* et *Blastomyces dermatitis*. En effet, chez *C. albicans* les trois formes coexistent *in vivo*, à savoir la forme levure, pseudofilamenteuse et filamenteuse. Tandis que chez les dimorphiques vrais la forme levure seulement s'observe *in vivo* alors que la forme levure ou filamenteuse s'observe *in vitro*, en particulier selon la température ambiante et la richesse du milieu utilisé pour la culture. Ainsi, les pseudohyphes ne sont pas présents chez les dimorphiques vrais.

Une autre caractéristique particulière à *C. albicans* est sa capacité de produire des chlamydozoospores. Les chlamydozoospores sont des cellules rondes, à paroi épaisse, qui sont situées à l'extrémité ou à l'intérieur des hyphes ou des pseudohyphes (Berdicevsky, 1994). La paroi des chlamydozoospores est constituée de plusieurs couches. Les couches extérieures ressemblent fortement à la paroi des levures et sont principalement composées de  $\beta$ -1,3-D-glucane et de chitine tandis que les couches intérieures sont plus riches en protéines (Jansons et Nickerson, 1970). C'est lors de conditions défavorables (température, nutriments, sécheresse) que *C. albicans* produit des chlamydozoospores. Ainsi, il est suggéré que ces dernières aient un rôle d'emménagement ou de dormance (Bakerspigel et Burke, 1974). Puisque *C. albicans* est la seule espèce du genre *Candida* capable de produire des chlamydozoospores *in vitro*, leur formation est un outil d'identification (Odds, 1988). Ainsi,

des milieux de culture pauvres en source de carbone sont utilisés pour mettre en évidence cette structure.

#### 1.1.4. Génétique de *C. albicans*

Depuis les 20 dernières années, la recherche sur *C. albicans* a beaucoup évolué. En effet, les techniques en biologie moléculaire et en génétique se sont énormément améliorées et le progrès ne cesse d'avancer.

Tout débuta lorsqu'en 1979, Olayaia et Sogin proposèrent que *C. albicans* est diploïde. Grâce à la technique de cytofluorométrie en flux, ces deux chercheurs démontrèrent que *C. albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (diploïde) contenaient des quantités équivalentes d'ADN par cellule (Olayaia et Sogin, 1979). Ainsi, ils conclurent que *C. albicans* était diploïde. Par la suite, une expérience menée par Whelan et al. en 1980 vint renforcer cette idée de diploïdie (Whelan *et al.*, 1980). La méthode utilisée fut relativement simple. Des isolats cliniques de *C. albicans* furent exposés aux rayons ultraviolets (U.V.) et un spectre de mutants auxotrophes récessifs fut obtenu. Ces résultats confirmèrent l'existence d'hétérozygotie pour les auxotrophes récessifs. En effet, il fut conclu que le traitement U.V. induit des recombinaisons mitotiques qui entraînent l'homozygotie au locus d'auxotrophie. Par conséquent, l'hétérozygotie et la diploïdie de *C. albicans* furent démontrés.

L'étude des chromosomes de *C. albicans* fut complexe étant donné les réorganisations chromosomiques ainsi que les différences caryotypiques retrouvées entre les différentes souches de *C. albicans* (Pla *et al.*, 1996). *C. albicans* fut une des premières espèces dont le génome a été analysé par électrophorèse sur gel en champs alternés (PFGE) (Scherer et Magee, 1990). Cette technique a permis de démontrer que le génome de *C. albicans* est composé de huit paires de chromosomes homologues (Doi *et al.*, 1992). De plus, une carte physique et génétique de *C. albicans* a pu être construite grâce à l'utilisation de l'endonucléase *Sfi*I (Pla *et al.*, 1996).

Les techniques moléculaires étant toujours en évolution, l'étape suivante fut d'isoler les gènes de *C. albicans*. Puisque *S. cerevisiae* et *C. albicans* ont plus de 90% de leur gènes en commun, la plupart des gènes de *C. albicans* ont été isolés grâce aux gènes analogues

retrouvés chez *S. cerevisiae* (Magee et Scherer, 1998; Scherer et Magee, 1990). Ainsi, plusieurs approches ont été utilisées dont l'homologie de séquence avec d'autres organismes, la complémentation de mutations chez *S. cerevisiae* et *Escherichia coli* et la capacité qu'ont certains gènes de *C. albicans* à conférer de nouveaux phénotypes aux différentes espèces de *Saccharomyces* (Altboum, 1994; Scherer et Magee, 1990).

Une grande partie des progrès qui ont été réalisés pour les connaissances de *C. albicans* au niveau physiologique, biochimique et génétique sont dus à la caractérisation des différents mutants obtenus. Ainsi, plusieurs mutants ont été isolés grâce à la mutagenèse U.V. de souches qui sont naturellement hétérozygotes pour un gène particulier (Kurtz *et al.*, 1990b). Cette technique est restreinte puisqu'elle produit des mutants spécifiques, d'une variété limitée. Par contre la technique de disruption de gènes s'avère beaucoup plus efficace et permet la création de mutants nuls homozygotes. Donc, les deux allèles sont interrompus en deux rondes successives de transformation intégrative, en utilisant une cassette « ura-blaster » (Fonzi *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1998). Cette cassette est formée du marqueur *URA3* flanqué des deux gènes *hisG* provenant de la bactérie *Salmonella* (Lay *et al.*, 1998).

## 1.2. Candidose chez l'humain

Parmi toutes les espèces de *Candida*, *C. albicans* est celle que l'on retrouve le plus fréquemment lors des infections causées par ces levures (Odds, 1987). Contrairement aux autres mycètes, *C. albicans* est un organisme commensal qui fait partie de la flore normale des muqueuses de l'humain (Arendorf et Walker, 1989). En effet, chez l'humain le *Candida* se situe principalement au niveau du tractus gastro-intestinal (Odds, 1987). De plus, au moins 50% de la population est porteuse de *Candida* au niveau oral (McCullough *et al.*, 1996). Par contre, *C. albicans* est un pathogène opportuniste qui peut entraîner des infections lorsque le système immunitaire est affaibli. En effet, l'augmentation des infections opportunistes est étroitement liée à la hausse du nombre de patients ayant subi une greffe d'organe, ceux qui sont sous traitements de chimiothérapie, les sujets atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Baum, 1994) etc.

### 1.2.1. Facteurs prédisposants l'hôte à une candidose

Plusieurs facteurs prédisposent les humains aux infections par le *C. albicans*. Selon Odds, ces facteurs peuvent être divisés en quatre grandes catégories (Odds, 1988). Les facteurs naturels représentent la première. Elle comprend les maladies infectieuses, idiopathiques, congénitales et débilitantes telles que les infections microbiennes, les désordres endocriniens et les malformations au niveau du système immunitaire. De plus, cette catégorie contient aussi les conditions de digression par rapport au statut physiologique normal comme la grossesse, l'enfance et la vieillesse. La deuxième classe englobe les facteurs diététiques c'est-à-dire tout excès ou carence nutritionnelle qui peut altérer la composition de la flore microbienne tel qu'une diète riche en glucides ou une déficience en vitamines. Troisièmement, on retrouve les facteurs mécaniques : trauma, occlusion locale ou macération des tissus comme par exemple une brûlure, une blessure, le port d'un dentier ou de vêtements trop serrés. Finalement, la dernière catégorie est composée des prédispositions iatrogéniques tel que la prise de médicaments qui altèrent la composition de la flore microbienne normale ou qui altèrent les mécanismes de défense de l'hôte (antibiotiques, corticostéroïdes, agents immunosuppresseurs). Aussi, on retrouve dans cette catégorie les procédures chirurgicales et l'introduction de cathéters intraveineux. En somme, la sévérité et l'étendue de l'infection causée par *C. albicans* augmente en fonction du nombre ainsi que de la gravité des facteurs prédisposants (Odds, 1988).

Depuis les vingt dernières années, on dénote une nette progression du nombre et de l'intensité des traitements donnés aux patients atteints du SIDA et du cancer (Beck-Sagué *et al.*, 1993). De plus, la transplantation d'organes ainsi que l'avancement des techniques au niveau du support des nouveaux nés ont augmenté le taux de survie de ces patients (Beck-Sagué *et al.*, 1993). Par conséquent, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre d'action est à la hausse, ce qui entraîne une augmentation du nombre d'infections causées par ces champignons (Anaissie, 1992; Beck-Sagué *et al.*, 1993). Par le fait même, on retrouve un nombre accru d'infections dû à *C. albicans*.

Ainsi, deux groupes à risque sont particulièrement touchés par la candidose soit les sidéens et les cancéreux. Pour le premier groupe, les infections impliquées dans les stades précoces du SIDA partagent une caractéristique commune particulière, c'est-à-dire qu'elles

sont maîtrisées par la réponse immunitaire cellulaire. Donc, l'infection est associée à une dysfonction des lymphocytes T et des macrophages (Diamond, 1991). Or, les sites les plus fréquemment touchés par la candidose chez ces patients sont la cavité buccale, l'œsophage et la peau. Il est à noter que plus de 90% des sidéens développeront une candidose orale au cours de leur maladie (Phelan *et al.*, 1987), en l'absence de thérapie anti-rétrovirale. Chez les personnes atteintes du cancer, l'utilisation d'agents cytotoxiques, d'immunosuppresseurs ainsi que de cathéters intraveineux entraînent une augmentation du nombre d'infections à *C. albicans* (Odds, 1988). La neutropénie secondaire aux traitements de chimiothérapie, est la principale cause de ces candidoses. En effet, les neutrophiles représentent la première ligne de défense contre *C. albicans* (Diamond, 1991). Ainsi, un décompte de neutrophiles inférieur à 100 cellules/ml augmente considérablement les risques de contracter une infection à *C. albicans*. De plus, ces traitements de chimiothérapie causent des ulcérations au niveau de l'oropharynx et tout le long du tractus gastro-intestinal, ce qui facilite l'étape de colonisation et d'invasion par le *C. albicans* (Diamond, 1991). Par ailleurs, l'utilisation d'agents antibactériens (à large spectre d'action) combinée aux traitements de chimiothérapie entraînent une hausse de la charge de *C. albicans* au niveau du tractus gastro-intestinal. Cette augmentation des décomptes de *C. albicans*, associée aux ulcérations, peut engendrer une candidose invasive ou disséminée (Diamond, 1991).

### 1.2.2. Candidose orale

La candidose orale est une infection connue depuis très longtemps. En effet, aussi loin que 377 av. J.-C., Hippocrate décrivait des ulcérations au niveau de la cavité buccale qui étaient fort probablement causées par *Candida* (Odds, 1988). De nos jours, bien qu'une partie considérable de la population soit porteuse de levures au niveau buccal, soit environ 23% selon Brawner et Cutler, une très faible proportion est atteinte de candidose orale (Brawner et Cutler, 1989; Cannon *et al.*, 1995). Bien que les espèces *C. glabrata* et *C. tropicalis* soient occasionnellement isolées chez les patients atteints de muguet oral, *C. albicans* demeure l'espèce la plus fréquemment retrouvée lors de ces infections (MacFarlane, 1990). En effet, *C. albicans* peut coloniser plusieurs surfaces au niveau de la cavité orale tel que la langue, les joues et les gencives (Arendorf et Walker, 1989).

Puisque les surfaces épithéliales orales baignent dans la salive, plusieurs protéines salivaires se retrouvent à leur surface. Par conséquent, certaines protéines salivaires favoriseraient l'attachement du *C. albicans*, tandis que d'autres composantes de la salive inhiberaient ce processus (Cannon *et al.*, 1995). D'autre part, toute lésion au niveau des muqueuses de la bouche met en évidence des récepteurs, tel que la fibronectine et la laminine, qui permettent l'adhérence de *C. albicans*. De plus, *C. albicans* a la capacité d'interagir avec les microbes ou les produits microbiens retrouvés dans le biofilm recouvrant les surfaces orales (Holmes *et al.*, 1992). Comme mentionné précédemment, plusieurs facteurs peuvent prédisposer une personne à une candidose. Le muguet oral est souvent associé à une immunodéficience. Ainsi, les patients atteints du SIDA (immunodéficients) ou de néoplasies (immunosupprimés) sont fréquemment touchés par une candidose oropharyngée (Cannon *et al.*, 1995).

Fait intéressant, une étude menée par Brawner et Cutler démontre que les souches de *C. albicans* varient entre les individus immunocompétents et les individus immunosupprimés (Brawner et Cutler, 1989). En effet, les souches fréquemment retrouvées chez les patients immunosupprimés seraient plus souvent impliquées dans les lésions orales. De plus, McCullough *et al.* (1994) ont obtenu des résultats indiquant que l'expression phénotypique de *C. albicans* varie en fonction de la progression du VIH (virus d'immunodéficience humaine) lors de la candidose orale. Effectivement, le génotype de *C. albicans* persiste chez la majorité des patients atteints d'infection au VIH, tandis que l'expression phénotypique de souches génétiquement identiques varie considérablement en fonction du temps.

Finalement, faisons un survol des principales formes de candidoses orales existantes (Odds, 1988) :

- Le muguet est la forme la plus répandue de candidose orale. Ses caractéristiques sont la présence de plaques qui apparaissent à la surface des muqueuses orales, de la langue, des gencives et de la gorge. Cette infection est surtout retrouvée chez les patients immunocompromis, les personnes âgées et les nouveau-nés dont le système immunitaire et la flore gastro-intestinale ne sont pas encore établis.

- Le port de dentiers peut induire une stomatite causée par *C. albicans*. Entre 24 et 60% des individus portant des dentiers en sont atteints (Odds, 1988). Les signes particuliers de cette infection sont la présence d'érythème et d'oedème au niveau du palais.
- La perlèche est caractérisée par la présence de rougeurs et de fissures douloureuses au niveau des commissures des lèvres. Cette infection est souvent associée à la stomatite causée par le port de dentiers mais elle peut aussi être associée à d'autres formes de candidoses orales ou encore être retrouvée seule.

### 1.2.3. Candidose vaginale

La candidose vaginale est une infection des muqueuses du vagin causée par *Candida*. Elle constitue un problème important chez les femmes en âge de porter des enfants. En effet, environ 75% d'entre elles auront au moins une infection vaginale, causée par *Candida*, au cours de leur vie (Sobel, 1988). *C. albicans* est le principal responsable des candidoses vaginales puisqu'environ 85 à 90% de ces infections sont causées par cette levure. Pour ce qui est du 10 à 15% restant, elles sont engendrées par d'autres espèces de *Candida* dont les plus fréquentes sont *C. glabrata* et *C. tropicalis* (Fidel et Sobel, 1996). Les symptômes de la candidose vaginale sont bien connus et les principaux sont : la démangeaison, la sensation de brûlure et de douleur ainsi qu'une quantité anormale de sécrétions vaginales. De plus, on peut aussi noter la présence d'érythème et d'oedème au niveau de la vulve et du vagin (Odds, 1988).

Contrairement à l'infection buccale, la candidose vaginale n'est pas la conséquence d'une déficience au niveau du système immunitaire (Imam *et al.*, 1990). En effet, plusieurs facteurs dont la prise d'antibiotiques, l'usage d'anovulants, la grossesse, la thérapie d'hormones ainsi que le diabète sucré prédisposent à la vaginite (Sobel *et al.*, 1998). Par contre, des observations cliniques démontrent qu'en l'absence de ces facteurs, la candidose vaginale survient lors de la phase lutéale du cycle menstruel, lorsque le niveau d'oestrogène et de progestérone est élevé (Kalo-Klein et Witkin, 1989).

Parmi toutes les femmes qui présentent une vaginite, 5% développeront une candidose vaginale récurrente (CRV) (Steele *et al.*, 1999). Cette dernière est caractérisée

par trois épisodes de vaginite (ou plus) par année (Fidel et Sobel, 1996). Ainsi, cette CRV peut être causée par les mêmes facteurs que la candidose vaginale (voir paragraphe précédent) ou encore elle peut être idiopathique (Fidel et Sobel, 1996). En effet, les femmes atteintes de CRV peuvent être touchées par des épisodes répétés de vaginite malgré le fait qu'elles évitent tout les facteurs prédisposants. Or, l'utilisation d'agents antimycotiques est efficace lors d'une première vaginite ou d'une CRV mais ne protègent pas contre une réapparition de l'infection (Sobel, 1988). Ainsi, il existe deux mécanismes possibles pour expliquer la présence d'épisodes récurrents de vaginite idiopathique, soit les réinfections fréquentes par de nouvelles souches de *C. albicans* ou encore les rechutes causées par l'éradication incomplète de *C. albicans* suite au traitement antifongique (Fidel et Sobel, 1996). Dans le premier cas, suite à l'élimination complète du *C. albicans* du vagin, la levure y est réintroduite par transmission sexuelle ou par propagation contiguë provenant du tractus gastro-intestinal. Dans le deuxième cas, le *C. albicans* n'a pas été complètement éliminé du vagin. Donc, un petit nombre de cellules de *Candida* entraîne une rechute. Étant donné que les différents épisodes de CRV sont plus souvent causés par la même souche de *C. albicans* et que la colonisation se fait rapidement après l'arrêt de la thérapie antimycotique, la plupart des cas représentent une rechute plutôt qu'une réinfection (Sobel, 1988; Vazquez *et al.*, 1994). Conséquemment, la rechute peut être déterminée par des modifications qui se produisent chez le micro-organisme et/ou chez l'hôte (Fidel et Sobel, 1996). Effectivement, suite à une modification spontanée des mécanismes d'invasion du micro-organisme, *C. albicans* peut devenir plus virulent, ce qui lui permet de déjouer les mécanismes de défense de l'hôte. D'autre part, un changement au niveau de l'environnement local du vagin peut rendre l'hôte plus susceptible à la prolifération de *C. albicans* (Fidel et Sobel, 1996).

Finalement, les particularités qui distinguent les candidoses orale et vaginale suggèrent que les facteurs pathogéniques impliqués à ces deux sites sont nettement différents.

#### 1.2.4. Autres types de candidoses

Odds divise les infections à *Candida* en deux grandes catégories : les candidoses superficielles et les candidoses systémiques (Odds, 1988). Ainsi, la première catégorie représente les infections dont les lésions sont visibles sans l'utilisation d'instruments spéciaux. On y retrouve les candidoses de la cavité orale, des conduits auditifs, des organes génitaux, de la peau et des ongles. Parmi ces infections, les candidoses orales et vaginales sont les plus fréquentes, et ont été décrites en détail précédemment. À noter que les infections à *Candida* sont dix fois plus fréquentes au niveau des organes génitaux féminins que masculins, et c'est pourquoi la grande majorité des études portent sur la candidose vaginale. Les infections au niveau de la peau et des ongles sont beaucoup moins répandues. Par contre, la présence de lésions ou de chaleur et d'humidité au niveau des replis cutanés (aisselle, plis sous mammaires et inter-fessiers), des tissus sous-cutanés des doigts et des ongles permettent à *C. albicans* de proliférer à ces endroits. Un type plus rare mais plus sévère d'infection superficielle à *C. albicans* est la candidose mucocutanée chronique (Odds, 1988). Cette dernière est caractérisée par des infections simultanées qui affectent plusieurs sites superficiels tel que la bouche, la peau du visage et les ongles. Ces infections, qui peuvent persister plusieurs années, semblent associées à des problèmes au niveau de l'immunité cellulaire.

La candidose systémique consiste en l'infection d'organes profonds par le *C. albicans*. En effet, la plupart des organes peuvent être infectés chez les individus ayant une immunodéficiences. Ainsi, les tractus gastro-intestinal, respiratoire et urinaire sont souvent touchés chez ces individus. Une forme plus rare de candidose systémique est l'infection de l'endocarde. C'est principalement à partir de 1965, lors de l'avènement des interventions cardiaques, que le nombre d'endocardites causées par *C. albicans* a augmenté. De nos jours, cette infection survient principalement chez les patients ayant une cardiopathie qui ont subi une intervention à cœur ouvert, et chez les toxicomanes. Chez les individus fortement immunosupprimés, tel les personnes atteintes du SIDA, du cancer ou ayant subi une transplantation d'organe, la candidose systémique peut entraîner une candidose disséminée. Dans ce cas, le *Candida* est dispersé, via la circulation sanguine, dans d'autres organes profonds (tel le système nerveux central, en particulier au niveau de l'oeil). Le taux de mortalité associé aux candidoses disséminées est élevé, soit plus de 50%.

### 1.3. Mécanismes de défense de l'hôte

Les mécanismes impliqués dans la défense de l'hôte contre une infection à *C. albicans* sont nombreux et complexes. On y retrouve entre autres les barrières physiques, la flore bactérienne présente et la réponse immunitaire (Senet et Robert, 1995). Parmi les barrières physiques des surfaces cutanéomuqueuses, on retrouve l'épithélium qui empêche le *C. albicans* de pénétrer dans les tissus (Cannon *et al.*, 1995). De plus, le mucus qui recouvre l'épithélium est un moyen de défense efficace puisqu'il empêche l'installation des levures à la surface des cellules grâce à ses caractéristiques physico-chimiques ainsi qu'à son renouvellement fréquent. Finalement, la salive constitue la troisième barrière physique qui permet l'élimination des microbes. En effet, son écoulement continu ainsi que les molécules salivaires spécifiques qu'elle contient (lysozymes, histatines, lactoferrines) lui confèrent des propriétés anti-candidales (Cannon *et al.*, 1995). D'autre part, la flore bactérienne peut aussi limiter la croissance de *C. albicans* puisque les bactéries sont en compétition directe avec la levure au niveau des nutriments disponibles. Aussi, elles entravent l'adhérence de *C. albicans* dû à l'encombrement stérique et peuvent même sécréter des bactériocines qui inhibent la croissance du champignon (Fidel et Sobel, 1996).

Le système immunitaire joue un rôle important dans la défense de l'hôte contre l'infection à *C. albicans*. Il peut être divisé en trois parties : l'immunité innée, cellulaire et humorale. Ainsi, l'immunité innée, constituée des granulocytes, représente la première ligne de défense lors des infections systémiques ou disséminées (Staples *et al.*, 1977). En effet, non seulement les neutrophiles et les éosinophiles, mais également les monocytes ont la capacité de phagocyter le *C. albicans*, de forme levure ou filamenteuse, avant qu'il n'atteigne les tissus profonds (Cannon *et al.*, 1995). Parmi les granulocytes, les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) semblent avoir un rôle prédominant. Des études réalisées à l'aide de modèles animaux ont démontré que les PMN représentent le principal moyen de défense lors de la candidose systémique (Hurtrel *et al.*, 1980). De plus, lors d'une réponse inflammatoire à *C. albicans*, les PMN sont présents en plus grande quantité que les autres leucocytes et ont une activité anti-*Candida* plus prononcée (Cannon *et al.*, 1995). L'incidence accrue des candidoses invasives et systémiques chez les patients neutropéniques ou ayant des neutrophiles anormaux confirment l'importance des PMN dans la défense de l'hôte contre l'infection à *C. albicans* (Odds, 1988). Les macrophages

semblent assister les neutrophiles dans la protection contre les candidoses systémiques. Une expérience effectuée chez des souris par Qian et al. (1994) a mis en évidence une corrélation entre l'élimination des macrophages spléniques et l'augmentation de la susceptibilité aux candidoses disséminées expérimentales.

Bien que le rôle des PMN et des macrophages soit important lors des infections systémiques et disséminées, l'immunité cellulaire acquise est le principal mécanisme de défense lors des infections des muqueuses par *C. albicans* (Odds, 1988). En effet, l'importance de l'immunité cellulaire dans la résistance de l'hôte à ces infections est bien représentée par les candidoses sévères retrouvées au niveau des muqueuses chez les patients atteints du SIDA, résultant d'une déficience au niveau des lymphocytes T (Odds, 1988). De plus, certaines expériences ont démontré l'importance de l'immunité cellulaire acquise lors de la protection du tractus gastro-intestinal contre l'infection à *C. albicans* (Balish et al., 1990; Cantorna et al., 1990). Ainsi, en utilisant des souris immunodéficientes et immunocompétentes il a été démontré que les souris déficientes au niveau des cellules T n'ont pu éliminer efficacement le *C. albicans* du tractus gastro-intestinal. Inversement, les souris immunocompétentes, chez qui certaines fonctions phagocytaires ont été éliminées, ont pu supprimer l'infection rapidement.

Le rôle de l'immunité humorale dans la résistance aux infections mucosales et systémiques est très controversé. En effet, des études ont démontré qu'aucune augmentation des prédispositions aux candidoses mucosales ou systémiques n'a été noté chez les patients ayant des lymphocytes B anormaux (Rogers et Balish, 1980). Néanmoins, les anticorps IgA et IgG anti-*Candida* retrouvés dans les sécrétions de surface peuvent avoir un rôle de protection. Ces anticorps spécifiques à *Candida* peuvent se lier à la levure et réduire sa capacité d'adhérence aux cellules épithéliales. Ceci entraînerait un faible niveau de colonisation tout en évitant l'invasion des tissus par la levure.

Ajoutons maintenant quelques mots sur les mécanismes de défense de l'hôte lors d'une candidose vaginale. Contrairement aux candidoses systémiques ou affectant les autres muqueuses, les mécanismes de défense contre la vaginite sont peu connus. Toutefois, il semble que ces mécanismes soient différents. Ainsi, les neutrophiles qui jouent un rôle majeur lors de la candidose systémique ou disséminée ne semblent pas impliqués dans la

défense de l'hôte au cours d'une candidose vaginale. Une étude effectuée par Black et al. (1998), indique aucune différence quand à l'élimination du *Candida* de la cavité vaginale de souris normales et de souris neutropéniques. Par contre, cette même étude démontre qu'une élimination de ces PMN engendre une diminution de l'inflammation au niveau du vagin. Les neutrophiles semblent donc contribuer aux symptômes de la vaginite. L'immunité humorale semble aussi avoir un rôle dans la protection de l'hôte contre les vaginites. En effet, De Bernardis et al. (2000), ont démontré que l'immunité résultante d'une première infection vaginale à *C. albicans* permet de protéger l'hôte contre une deuxième infection via des anticorps qui ont une spécificité, et probablement, un isotype défini.

D'autre part, l'immunité cellulaire périphérique, qui est le mécanisme de défense dominant lors des candidoses mucosales, ne semble pas impliquée lors de la candidose vaginale. En effet, il a été démontré que la présence de cellules immunitaires périphériques est faible dans la muqueuse vaginale (Fidel *et al.*, 1997). Par contre, une activité immunitaire serait exprimée lors de l'infection vaginale (Fidel *et al.*, 1993). Ainsi, plusieurs études ont démontré que les cellules T vaginales sont phénotypiquement différentes des cellules T en périphérie (Fidel *et al.*, 1996a; Nandi et Allison, 1991). Ceci suggère la présence d'une immunité locale, indépendante de l'immunité systémique, capable de protéger la cavité vaginale contre l'infection à *Candida*.

## 2. FACTEURS DE VIRULENCE DE *CANDIDA ALBICANS* ET PATHOGENÈSE DE LA CANDIDOSE

Comme il a été mentionné précédemment, toutes les espèces de *Candida* n'ont pas le même degré de virulence. Ainsi, ces espèces possèdent probablement divers attributs cellulaires et moléculaires qui engendrent des degrés de virulence différents. Contrairement au *Clostridium tetani* qui élabore une seule toxine responsable des manifestations cliniques du tétanos, le *Candida* ne possède pas un seul facteur de virulence mais plutôt une panoplie de propriétés, chacune ayant un faible niveau de virulence (Odds, 1988). C'est grâce à une combinaison de ces propriétés que le *Candida* peut engendrer une infection chez un hôte immunocompromis ou non.

## 2.1. Adhérence

L'adhérence aux tissus de l'hôte constitue probablement l'étape la plus importante lors du développement d'une infection à *Candida*. En effet, une bonne adhérence permet au micro-organisme de coloniser puis d'infecter les tissus de l'hôte tout en évitant d'être éliminé. Les différentes espèces de *Candida* peuvent adhérer à plusieurs surfaces dont les cellules épithéliales buccales et vaginales ainsi qu'à l'épithélium gastro-intestinal. Il existe une hiérarchie parmi les espèces de *Candida* quant à leur capacité d'adhérer à l'épithélium et à l'endothélium de l'hôte. Des études ont démontré que *C. albicans* est l'espèce qui a la capacité d'adhérence la plus élevée tandis que *C. tropicalis* se retrouve au deuxième rang (King *et al.*, 1980; Klotz *et al.*, 1983). Ainsi, les propriétés adhésives des différentes espèces semblent concorder avec leur degré de virulence (*C. albicans* > *C. tropicalis* > autres espèces de *Candida*).

Les interactions adhésives entre *C. albicans* et l'hôte sont extrêmement complexes puisqu'elles impliquent les composants de l'hôte et du champignon. Ainsi, ces interactions seront divisées en trois catégories qui seront discutées ci-dessous.

### 2.1.1. Interaction protéine-protéine

Cette première catégorie renferme les interactions au cours desquelles une protéine à la surface de *C. albicans* reconnaît une protéine sur une cellule épithéliale ou endothéliale (Calderone et Braun, 1991). Les intégrines sont des molécules dimériques, présentes dans la membrane plasmique des cellules de mammifères, qui interagissent et se lient aux protéines de la matrice extracellulaire permettant ainsi l'ancrage des cellules. Elles sont composées de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dont les domaines extracellulaires permettent la reconnaissance et la liaison au fibrinogène, à la fibronectine et à la laminine, qui sont les ligands des intégrines retrouvées dans la matrice extracellulaire (Hostetter, 1994). Ces ligands sont caractérisés par la présence d'une séquence tripeptidique arginine-glycine-acide aspartique (RGD) retrouvée chez la plupart d'entre eux. Ainsi, les intégrines reconnaissent cette séquence. *Candida* possède des analogues de ces intégrines, qui lui permettent de s'ancrer au niveau de la matrice extracellulaire des cellules de mammifères.

Au niveau de l'épithélium, de nombreuses études portent sur un analogue d'intégrine de *C. albicans* impliqué dans la liaison au fragment iC3b du complément. En effet, Gilmore et al. (1988) ont démontré la présence de ces récepteurs (CR3) chez *C. albicans*. Par la suite, d'autres études ont confirmé la présence de similitudes antigéniques entre certaines protéines de *C. albicans* et les sous-unités  $\alpha_M$  et  $\alpha_X$  (CR3 et CR4 respectivement) des intégrines humaines dont le ligand est iC3b (Hostetter, 1994). D'autre part, puisque *C. albicans* est la levure la plus adhérente il semble logique de croire que l'expression des intégrines devraient être plus prononcée chez ce champignon. Ainsi, les expériences de cytométrie en flux confirment cette hypothèse et démontrent que l'adhérence ainsi que l'expression des intégrines se conforment à la même hiérarchie (Hostetter, 1998; Bendel *et al.*, 1995). Comme mentionné précédemment, les intégrines des cellules mammifères régulent l'adhésion en reconnaissant la séquence RGD dans les protéines de la matrice extracellulaire. En effet, la spécificité des ligands des différentes intégrines est basée sur les différents résidus flanquants la séquence RGD. Bendel et Hostetter (1993) ont démontré que l'analogue d'intégrine retrouvé chez *C. albicans* reconnaît aussi la séquence tripeptidique RGD ainsi que les régions flanquantes spécifiques dans le fragment iC3b. De plus, la participation de ces analogues d'intégrine dans l'adhésion épithéliale de *C. albicans* a été confirmée grâce à l'identification d'une protéine dont l'activité a pu être bloquée suite à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (Hostetter, 1994). Finalement, le criblage d'une banque d'ADN génomique de *C. albicans* a été effectué grâce à l'utilisation d'une sonde, provenant d'un clone d'ADN complémentaire, codant pour la région transmembranaire de  $\alpha_M$  de l'intégrine humaine CR3 (Hostetter, 1996). Ce criblage a mis en évidence la présence d'un clone codant pour une protéine d'environ 188 kDa, dotée de motifs semblables à ceux retrouvés chez  $\alpha_M$  et  $\alpha_X$  des intégrines humaines CR3 et CR4 respectivement. Cette intégrine, nommée  $\alpha_{INT1}$  est capable de reconnaître la séquence RGD et possède elle-même un site RGD (Hostetter, 1996). Ainsi, la présence du domaine capable d'identifier le tripeptide RGD dans les protéines de la matrice extracellulaire de l'épithélium permet à l'intégrine de *C. albicans* d'intervenir lors de l'adhésion tandis que le site RGD interne permet l'attachement des levures les unes aux autres et facilite l'étape de colonisation. De plus, il a été démontré, par Southern blot, que les levures moins pathogènes sont dépourvues de  $\alpha_{INT1}$  au niveau génomique. En effet, *C. tropicalis* et *S. cerevisiae* n'ont pas de  $\alpha_{INT1}$  tandis que toutes les

souches de *C. albicans* en possèdent. Ainsi,  $\alpha$ INT1 a été inséré dans *S. cerevisiae*, suite à une transformation avec un plasmide contenant le gène d'intérêt.  $\alpha$ INT1 confère à *S. cerevisiae* la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales de l'hôte et de former des tubes germinatifs (Hostetter, 1996).

Mentionnons brièvement que *C. albicans* pourrait avoir des protéines de surface qui lui permettrait d'adhérer à la fibronectine retrouvée sur les cellules épithéliales (Skerl *et al.*, 1984).

Les adhésines retrouvées au niveau de l'endothélium sont des analogues d'intégrines ou des protéines. En effet, Gustafson *et al.* (1991) ont démontré le rôle des analogues d'intégrines lors de l'adhésion de *C. albicans* à l'endothélium humain. Outre ces analogues d'intégrine, *C. albicans* peut adhérer à l'endothélium via trois protéines : la fibronectine, la laminine et le fibrinogène (Calderone et Braun, 1991). Une étude menée par Skerl *et al.* (1984) suggère que la fibronectine agit comme ligand, lors de l'adhésion endothéliale par les espèces *C. albicans* et *C. tropicalis*. En effet, la fibronectine, une glycoprotéine retrouvée dans le plasma et les tissus, permet l'attachement de plusieurs micro-organismes. Ainsi, *C. albicans* posséderait deux récepteurs pour la fibronectine, un à forte et l'autre à faible affinité (Negre *et al.*, 1994). De plus, il a été démontré que la région de la fibronectine qui interagit fortement avec *C. albicans* est en fait un peptide de 120 kDa contenant le domaine RGD (Penn et Klotz, 1994).

Des récepteurs pour la laminine et le fibrinogène ont également été décrits à la surface de *C. albicans* (Bouchara *et al.*, 1990; Bouali *et al.*, 1987), respectivement apparentés à l'intégrine  $\beta$ 1 et aux intégrines  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 retrouvées chez les mammifères (Hostetter, 1994). La fixation de ces deux protéines sur les tubes germinatifs ou les hyphes de *C. albicans* est réalisée via une protéine de 68 kDa et un doublet protéique de 60 à 62 kDa (Hostetter, 1994). Par conséquent, on pourrait supposer qu'une seule protéine candidate puisse reconnaître différents ligands, mais les données indiquent que les ligands ne sont pas interchangeables.

Les interactions protéine-protéine entre les adhésines de *C. albicans* et les protéines de surfaces des cellules épithéliales, endothéliales ou les composantes de la matrice

extracellulaire, démontrent l'importance des mécanismes de signalisation chez les mammifères lors de la destruction des tissus faisant suite à la colonisation et à l'invasion par le champignon.

### 2.1.2. Interaction protéine-sucre

La deuxième catégorie comprend les interactions entre une protéine de surface de *C. albicans* et un résidu de glucide associé à la membrane plasmique de la cellule hôte (Calderone et Braun, 1991). Il est à noter que ce type d'interaction ne se retrouve que lors de l'adhésion aux cellules épithéliales. Ainsi, McCourtie et Douglas (1981) ont démontré que les cellules de *C. albicans*, qui poussent dans un milieu dont la concentration de galactose, de sucrose, de glucose ou de maltose est élevée, ont une capacité d'adhérence à l'acrylique plus élevée que les cellules qui ont poussé dans un milieu contenant une faible concentration de glucose. Cette observation est pertinente puisque les individus suivant une diète riche en glucides sont prédisposés à développer une infection orale à *Candida* (Odds, 1988). Au cours de l'infection expérimentale chez la souris, il a été établi que les souches de *C. albicans* provenant de patients atteints de candidose ont un degré de virulence plus élevé suite à une croissance en présence de galactose plutôt que de glucose (McCourtie et Douglas, 1984). Ces résultats nous indiquent que la concentration relative des glucides pourrait être impliquée dans la dissémination de *C. albicans*, puisqu'elle influence l'adhérence *in vitro* et la virulence. De plus, suite à une croissance en présence de fortes concentrations de galactose, une couche fibrillaire-floconneuse apparaît à la surface des cellules de *C. albicans*. Cette couche semble impliquée dans l'adhésion aux cellules de l'hôte. Ainsi, la production d'un matériel polymérique extracellulaire a été mise en évidence chez les cellules de *C. albicans* lors de la croissance dans un milieu liquide contenant du galactose, du sucrose ou du glucose (McCourtie et Douglas, 1985). La purification de cette couche fibrillaire démontre que la partie active est une mannoprotéine, dont la portion protéique joue un rôle majeur au cours de l'adhésion (Critchley et Douglas, 1987a). Par ailleurs, des récepteurs pour *C. albicans* au niveau des cellules épithéliales ont été identifiés par Critchley et Douglas (1987b). En effet, les mannoprotéines de *C. albicans* se lieraient aux résidus de L-fucose et de N-acetyl-D-glucosamine retrouvés dans les glycosides à la

surface des cellules épithéliales de l'hôte. Cette liaison lectinique serait spécifique aux différentes souches de *C. albicans*.

### 2.1.3. Autres types d'interactions

Deux autres types d'adhérence seront brièvement discutés ci-dessous : l'adhérence hydrophobe et l'adhérence des hyphes.

Des interactions hydrophobes sont impliquées entre *C. albicans* et les cellules de l'hôte. Antley et Hazen (1988) ont démontré que les levures ayant une surface hydrophobe sont plus virulentes que les levures hydrophiles. Par ailleurs, la conversion d'une surface hydrophile à hydrophobe s'effectue rapidement à 37°C (Hazen *et al.*, 1986). Une fois devenue hydrophobe, *C. albicans* produit rapidement des tubes germinatifs et devient invasif (Odds, 1988). De plus, puisque les interactions hydrophobes ont une assez longue portée (jusqu'à 10 nm de distance), elles facilitent les interactions de courte portée (moins de 2 nm) en rapprochant les structures retrouvées sur les différentes surfaces (Hazen *et al.*, 1991).

D'autre part, la forme morphologique de *C. albicans* influence l'efficacité d'adhérence de ce champignon. En effet, la forme filamenteuse démontre des propriétés d'adhérence plus prononcées que la forme levure (Odds, 1988). Ceci pourrait être expliqué par la présence de protéines spécifiques à la surface des hyphes (e.g. Hwp1) qui favoriserait la formation de liens stables entre les hyphes et les cellules épithéliales (Staab *et al.*, 1999). Ainsi, l'expression de protéines de surface chez *C. albicans* varie en fonction de la phase de croissance. Donc, la forme filamenteuse expose des protéines de surface qui sont absentes ou masquées chez la forme levure (Ollert et Calderone, 1990).

En définitive, la surface cellulaire de *C. albicans* est très dynamique. En effet, les macromolécules exprimées à la surface de cette levure varient en fonction des conditions environnementales. Ces changements permettent à *C. albicans* d'adhérer à différents récepteurs et d'induire la candidose. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'adhérence

pourrait mener à la découverte de mesures préventives ou de traitements médicaux pour venir en aide aux individus prédisposés aux infections à *Candida*.

## 2.2. Dimorphisme et instabilité phénotypique chez *C. albicans*

*C. albicans* possède deux niveaux de régulation phénotypique : le dimorphisme et l'instabilité phénotypique.

### 2.2.1. Dimorphisme

Tel que mentionné précédemment, *C. albicans* a la capacité de passer de la forme levure à la forme filamenteuse, et vice versa. Gow (1994) propose que les champignons ont probablement évolué comme des utilisateurs de matière organique dans l'écosystème terrestre. Étant donné que la motilité des micro-organismes unicellulaires est limitée, le changement de morphologie en hyphes apporte beaucoup d'avantages à ces champignons. En effet, cette structure permet de traverser plusieurs barrières physiologiques ou physiques telles que les milieux faibles en nutriments ou des substrats solides. La transition de levures en hyphes est induite par plusieurs conditions de stress. Ainsi, une variation du pH ou de la température peut stimuler le développement d'hyphes. Aussi, les milieux de culture dont les nutriments sont inaccessibles, tel le sérum, ou pauvres en source de carbone et/ou d'azote, tel la N-acétylglucosamine, représentent des conditions de stress retrouvées *in vitro* (Brown et Gow, 1999). De plus, *C. albicans* semble répondre à des changements au niveau des hormones humaines (oestradiol et progestérone), ce qui suggère que la croissance sous forme filamenteuse *in vivo* serait influencée par certains facteurs de l'hôte (Brown et Gow, 1999). Il est important de noter que la transition levure à hyphes peut être inversée au cours de l'infection, selon les signaux provenant de l'environnement.

Le dimorphisme est donc considéré comme un des facteurs de virulence de *C. albicans*. La plupart des chercheurs semblent penser que la forme filamenteuse est la forme la plus virulente. Pourtant, il serait logique de croire que les deux formes soient impliquées dans la virulence mais de façons différentes. Effectivement, on retrouve un mélange de levures et d'hyphes dans les tissus infectés par *C. albicans*. Ainsi, ces deux formes morphologiques ont la capacité d'initier et de maintenir une infection chez l'hôte,

bien que l'une des deux formes pourrait être mieux adaptée pour survivre dans une microniche spécifique.

Plusieurs études ont été dirigées sur l'implication des hyphes dans la pathogenèse de la candidose. La forme filamenteuse a une capacité d'adhérence plus grande que la forme levure. C'est pourquoi les hyphes sont produites lors des premières étapes de la colonisation, ce qui facilite l'invasion des tissus (Odds, 1988). Sobel et al. (1984) ont comparé deux souches de *C. albicans*, l'une étant incapable de former des hyphes à 37°C (B311V6) et l'autre étant de type sauvage (B311-10), quant à leur capacité de causer une candidose vaginale chez le rat. Ainsi, *in vitro* à 25°C, les blastoconidies des deux souches adhèrent de façon comparable à l'épithélium vaginal. Par contre, suite à une exposition à des conditions favorisant la production d'hyphes, la souche B311V6 s'est avérée beaucoup moins adhérente que la souche sauvage. *In vivo*, la souche B311V6 produit moins d'infections que la souche B311-10 et lorsqu'elle cause une infection, cette dernière est atténuée. Ceci pourrait être le résultat d'une adhérence réduite aux cellules vaginales causée par l'incapacité de former des hyphes, ce qui entraîne une élimination du *C. albicans* B311V6 via les mécanismes de défense de l'hôte.

Les hyphes sont influencées par la topographie de la surface qu'elles colonisent. En effet, il a été démontré que les hyphes poussent à travers les pores et dans les sillons retrouvés sur une membrane déposée sur un milieu de culture (Sherwood *et al.*, 1992). Cette propriété (thigmotropisme) aide donc les hyphes à pénétrer dans certains tissus, via les bris microscopiques retrouvés au niveau de l'épithélium (Gow, 1994).

Plus récemment, il a été démontré que la morphogenèse de *C. albicans* semble être contrôlée par deux protéines : Cph1p et Efg1p (Lo *et al.*, 1997). La première est une kinase impliquée dans la cascade des MAPK (mitogen-activated protein kinase) tandis que la deuxième fait partie d'une famille de facteurs de transcription qui régule le développement chez les champignons et les vertébrés. Un double mutant nul *cph1/cph1 efg1/efg1* ne peut former des tubes germinatifs et des hyphes et par conséquent, est avirulent dans un modèle de candidose disséminée chez la souris. Ainsi, Cph1p et Efg1p

sont impliqués dans des mécanismes distincts mais parallèles qui stimulent le développement des hyphes (Brown et Gow, 1999).

D'autres facteurs de virulence spécifiquement retrouvés chez les hyphes sont les facteurs d'adhérence et l'expression d'enzymes hydrolytiques. Ainsi, *HWP1* est un gène exprimé par les hyphes mais non par les blastoconidies (Tsuchimori *et al.*, 2000). Ce gène code pour une protéine de surface, Hwp1p, qui semble être une cible de choix pour les transglutaminases mammifères (Staab *et al.*, 1996; Staab *et al.*, 1999). Cette protéine permet l'attachement de *C. albicans* à l'hôte. Ainsi, Tsuchimori *et al.* (2000) ont démontré qu'un mutant nul *hwpl* induit une diminution de la germination chez ce champignon, et ce dernier est capable d'initier l'infection mais incapable de la maintenir. Par contre, le mutant hétérozygote dont un seul allèle *HWP1* est fonctionnel présente une activité intermédiaire. Donc, la protéine produite par le gène *HWP1* est importante pour le développement des hyphes *in vivo* et pour la pathogénie de la candidose. Par ailleurs, les hyphes peuvent aussi exprimer des facteurs de virulence tel que des enzymes hydrolytiques nommées protéases aspartiques (Saps) (qui seront discutées en profondeur un peu plus loin). En effet, l'expression des *SAP4-SAP6* a été mise en évidence (Hube *et al.*, 1994). Ces protéases pourraient jouer un rôle lors de l'adhésion des hyphes et de l'invasion des tissus.

### 2.2.2. Instabilité phénotypique de *C. albicans*

C'est en 1935 que Negroni signale la présence de colonies ayant une morphologie atypique chez *C. albicans* (Negroni, 1935). Il est maintenant connu que la plupart des souches de *C. albicans* et de *C. tropicalis* sont capables d'effectuer des changements rapides (« switching ») entre un nombre limité de phénotypes, que l'on peut distinguer grâce à la morphologie coloniale (Slutsky *et al.*, 1985; Soll *et al.*, 1987). Ces changements phénotypiques réversibles et héréditaires, qui s'effectuent à haute vitesse lors d'un stress (nutritionnel, U.V., température), permettent à *C. albicans* de remanier et réguler son expression génique. Ceci lui conférerait la capacité de sélectionner les phénotypes les plus appropriés en fonction de la microniche dans laquelle il se retrouve (Odds, 1994).

Un des changements phénotypiques les plus étudiés est la transition blanc/opaque retrouvée chez la souche *C. albicans* WO-1. Cette souche, isolée d'un patient ayant subi

une transplantation de moëlle osseuse, présente deux morphologies distinctes. La première est prédominante et représente une colonie blanche et lisse similaire aux autres souches de *C. albicans* tandis que la deuxième, grise, opaque et de forme allongée est retrouvée moins fréquemment (Slutsky *et al.*, 1987; Soll, 1992). Ce phénomène de changement phénotypique se produit à une fréquence de  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$  par cycle cellulaire. De plus, Slutsky *et al.* (1987) ont démontré que trois autres morphologies coloniales peuvent être générées par la souche WO-1 à de plus basses fréquences, prouvant qu'une souche peut avoir plus de deux phénotypes de transition. La plupart des expériences sur l'instabilité phénotypique ont été effectuées *in vitro*. C'est en 1987 que l'équipe de David Soll indique que le changement phénotypique se produit *in vivo* au site d'infection (Soll *et al.*, 1987).

L'instabilité phénotypique est caractérisée par un changement au niveau du phénotype des souches de *C. albicans*, alors qu'aucune modification n'est apportée au génotype. Ainsi, McCullough *et al.* (1994) ont effectué une étude sur le génotype et le phénotype du *C. albicans* retrouvé au niveau de la cavité orale de patients infectés au VIH. Les résultats ont démontré la présence d'une souche génétiquement identique chez la plupart des patients, dont l'expression phénotypique variait en fonction de la progression de l'infection. Ceci suggère donc que ce mécanisme serait impliqué dans la pathogénicité de *C. albicans*. Effectivement, le changement phénotypique pourrait conférer de nouvelles caractéristiques de virulence à *C. albicans* comme la résistance aux antifongiques, l'expression de nouveaux antigènes lui permettant d'échapper au système immunitaire, des changements au niveau de l'adhésion et/ou de la pénétration des tissus, et l'expression de *SAPs*. Ainsi, cette diversité phénotypique lui permettrait d'habiter des sites anatomiques très divergeants tel la cavité orale et la cavité vaginale.

En résumé, le passage de la forme levure à la forme filamenteuse, de même que l'instabilité phénotypique de *C. albicans* lui confèrent la capacité d'exprimer divers facteurs de virulence qui lui permettent de coloniser différentes microniches au cours de l'infection.

### 2.3. Production d'enzymes extracellulaires

Parmi tous les facteurs de virulence putatifs de *C. albicans*, les enzymes hydrolytiques sont probablement celles qui ont attiré le plus d'attention. En effet, ce champignon pathogène sécrète des enzymes dont les deux principales catégories sont les protéases, qui hydrolysent les liens peptidiques, et les phospholipases qui hydrolysent les phospholipides. Ces enzymes dégradent donc les lipides et les protéines retrouvées dans les tissus des cellules de l'hôte. Ceci aurait pour effet de faciliter l'invasion des tissus de l'hôte par *C. albicans*.

#### 2.3.1. Protéases aspartiques

La classification des protéases est basée sur leur mécanisme catalytique. On retrouve donc quatre classes de protéases : sérine, cystéine, aspartique et métallo protéase (Hoegl *et al.*, 1996). Ainsi, le terme protéase aspartique provient du fait que l'enzyme a pour site actif un résidu d'acide aspartique. C'est en 1965 que Staib décrit pour la première fois une activité protéolytique extracellulaire chez *C. albicans* causée par la sécrétion d'une protéase aspartique (Sap). Outre *C. albicans*, l'espèce *C. tropicalis* ainsi que certaines souches de *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae* et *C. lipolytica* peuvent aussi sécréter des protéases aspartiques (Banerjee *et al.*, 1991).

##### 2.3.1.1. Propriétés biochimiques des Saps

Les Saps ont des masses moléculaires d'environ 42 kDa. Elles sont caractérisées par la présence d'un résidu leucine à la fin de la région C-terminale et d'un résidu tryptophane au début de la région N-terminale. Ces protéases sont principalement sécrétées dans les milieux acides, ayant un pH optimum situé entre 2.2 et 4.3 (Rüchel, 1981). Par contre, lorsqu'elles se retrouvent en présence d'un pH avoisinant 8.4, ces enzymes sont dénaturées de façon irréversible (Rüchel *et al.*, 1982). De plus, les Saps ont des points isoélectriques variant entre 4.1 et 4.5.

Ces enzymes ont un vaste éventail de substrats *in vitro*. Parmi ceux-ci, on retrouve plusieurs protéines présentes chez l'hôte tel que la kératine, le collagène, la mucine, les immunoglobulines et l'hémoglobine. De plus, lorsque les protéines sont les seules sources d'azote dans le milieu de culture, la plupart des espèces de *C. albicans* sécrètent la Sap2 de façon dominante (Rüchel *et al.*, 1983). Les Saps possèdent aussi des inhibiteurs. Ainsi, la pepstatine, les détergents non-ioniques tel le Triton X-100 et le Tween 80, et les sels d'ammonium inhibent soit l'expression ou l'activité des protéases *in vitro* (Rüchel, 1981).

### 2.3.1.2. La famille des gènes *SAP*

Les protéases aspartiques de *C. albicans* constituent une famille d'isoenzymes composées d'au moins dix gènes *SAP* (Tableau I). Tout d'abord, Magee *et al.* ont démontré l'existence de plusieurs gènes *SAP* (Magee *et al.*, 1993). De plus, ils ont assigné *SAP1* et *SAP2* aux chromosomes R et 6 respectivement. Par la suite, en faisant de l'hybridation à faible stringence, ils ont démontré la présence de *SAP3* sur le chromosome 3. La production de *SAP3* et *SAP4* par les cellules opaques de *C. albicans* WO-1 a été mise en évidence par une autre équipe (White *et al.*, 1993; Miyasaki *et al.*, 1994). Cette même équipe a établi que le gène *SAP4* est situé 3 kb en amont du gène *SAP1* sur le chromosome 6. Trois autres gènes ont été identifiés, *SAP5*, *SAP6* et *SAP7* (Monod *et al.*, 1994). *SAP5* et *SAP6* ont été localisés sur le chromosome 6 tandis que *SAP7* est retrouvé sur le chromosome 1. Finalement, deux autres gènes, *SAP8* et *SAP9*, ont été découvert sur le chromosome 3 (Monod *et al.*, 1998). Il semble qu'un dixième gène appartenant à cette famille a été identifié. En effet, des données non-publiées de Felk *et al.* supposent la présence d'une *SAP10*.

La structure primaire est conservée chez les Saps. En effet, tous les gènes *SAP* codent pour une pré-proenzyme qui est composée d'environ 60 acides aminés (aa) de plus que l'enzyme mature (Figure 1) (Hube, 1996). Ainsi, le peptide signal, retrouvé dans la partie N-terminale, est composé d'environ 14 à 22 aa et est relié au propeptide. Ce dernier renferme des sites putatifs (1 à 4) Lysine-Arginine (KR) ou Lysine-Lysine (KK), qui servent de sites d'action pour une protéase analogue à la Kex2 retrouvée chez *S. cerevisiae*. Le clivage du peptide signal et du propeptide est nécessaire pour qu'il puisse y avoir

sécrétion de la Sap (Togni *et al.*, 1996). Les protéases matures ainsi obtenues sont homologues aux autres protéases aspartiques et contiennent des résidus de cystéine, impliquées dans le maintien de la structure tri-dimensionnelle. De plus, l'enzyme mature contient deux résidus d'aspartate qui constituent le site actif des protéases aspartiques.

Tableau I. Caractéristiques des différents gènes *SAP* retrouvés chez *C. albicans* (Tiré et modifié de Hube, 1996).

Gène	Pré- propeptide	Sites KR/KK (propeptide)	ORF	Enzyme mature	Localisation (chromosome)
<i>SAP1</i>	50 aa	2 KR	1173 pb	341 aa	6
<i>SAP2</i>	56 aa	2 KR	1194 pb	342 aa	R
<i>SAP3</i>	58 aa	1 KR	1194 pb	340 aa	3
<i>SAP4</i>	75 aa	4 KR	1254 pb	342 aa	6
<i>SAP5</i>	76 aa	4 KR	1254 pb	342 aa	6
<i>SAP6</i>	76 aa	4 KR	1254 pb	342 aa	6
<i>SAP7</i>	211 aa	1 KK	1764 pb	377 aa	1
<i>SAP8</i>	73 aa	2 KR	1209 pb	330 aa	3
<i>SAP9</i>	50 aa	1 KR	1632 pb	494 aa	3
<i>SAP10</i> *	?	?	?	?	?

\* Felk A., Schäfer W. & Hube B. données non-publiées.

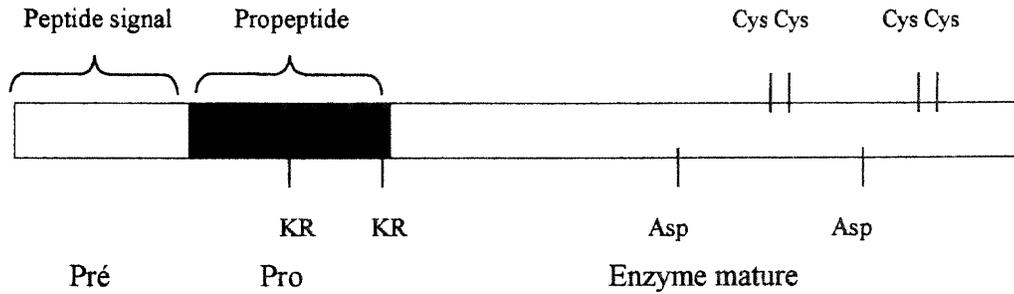


Figure 1. Caractéristiques de la structure de base des *SAP*. Toutes les *SAP* codent pour un peptide signal, un propeptide contenant des sites (1 à 4) Lys-Arg (KR) ou Lys-Lys (KK) et une enzyme mature. De plus, on retrouve deux résidus d'aspartate et quatre résidus de cystéine (Tiré et modifié de Hube, 1996).

Ainsi, ces isoenzymes sont similaires. D'ailleurs, un alignement des séquences des acides aminés des différentes Saps révèlent des pourcentages d'homologie élevés entre certaines d'entre elles. En effet, Sap4p, Sap5p et Sap6p ont une similarité qui se situe entre 77 et 89%, tandis que pour Sap1p, Sap2p et Sap3p ce pourcentage est de 67 à 69% (Monod *et al.*, 1998). Au contraire, les Sap7p et Sap9p divergent des autres Saps. Effectivement, leurs pourcentages d'homologie avec les autres Saps sont relativement faibles (entre 17 et 29%). Monod *et al.* ont donc pu construire un dendrogramme démontrant les liens entre les différentes Saps (Figure 2) (Monod *et al.*, 1998). Ceci permet de constater que certains groupes de Saps sont très reliés entre eux, tel les groupes Sap1p à Sap3p et Sap4p à Sap6p, tandis que d'autres sont intermédiaires (Sap8p) ou éloignés (Sap7p et Sap9p).

La présence d'une famille de gènes codant pour les Saps rend plausible l'hypothèse selon laquelle les différentes Saps seraient exprimées différemment en fonction des facteurs environnementaux spécifiques (Hoegl *et al.*, 1996).

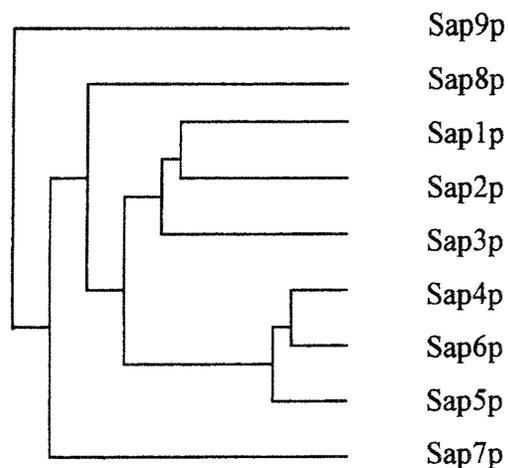


Figure 2. Dendrogramme des Saps de *C. albicans* (Tiré et modifié de Monod *et al.*, 1998).

### 2.3.1.3. Expression différentielle des Saps

Plusieurs expériences effectuées *in vitro* démontrent l'expression différentielle des Saps. Ainsi, Morrow *et al.* (1992) ont prouvé que *SAP1* est exprimé par la forme opaque de *C. albicans* WO-1. Ce résultat a été confirmé par une autre équipe qui de plus, a démontré l'expression de *SAP2* et *SAP3* par les cellules blanches et opaques de WO-1 (Figure 3) (Hube *et al.*, 1994). Ce même groupe a mis en évidence les transcrits des *SAP4-SAP6* à pH neutre, lors de la croissance de *C. albicans* sous forme d'hyphe. Des transcrits de *SAP8* sont présents à 37°C mais une augmentation de l'expression de ce gène est notée lorsque la température est de 25°C. Finalement, *SAP9* est exprimé lors de la phase de croissance tardive, lorsque l'expression de la *SAP8* est diminuée. Enfin, aucune expression de la *SAP7* n'a été détectée lors des différentes conditions de culture utilisées (Monod *et al.*, 1998). En conclusion, ces expériences révèlent que le stade de croissance, la morphologie, la température ainsi que la composition du milieu sont tous des facteurs qui influencent l'expression des Saps.

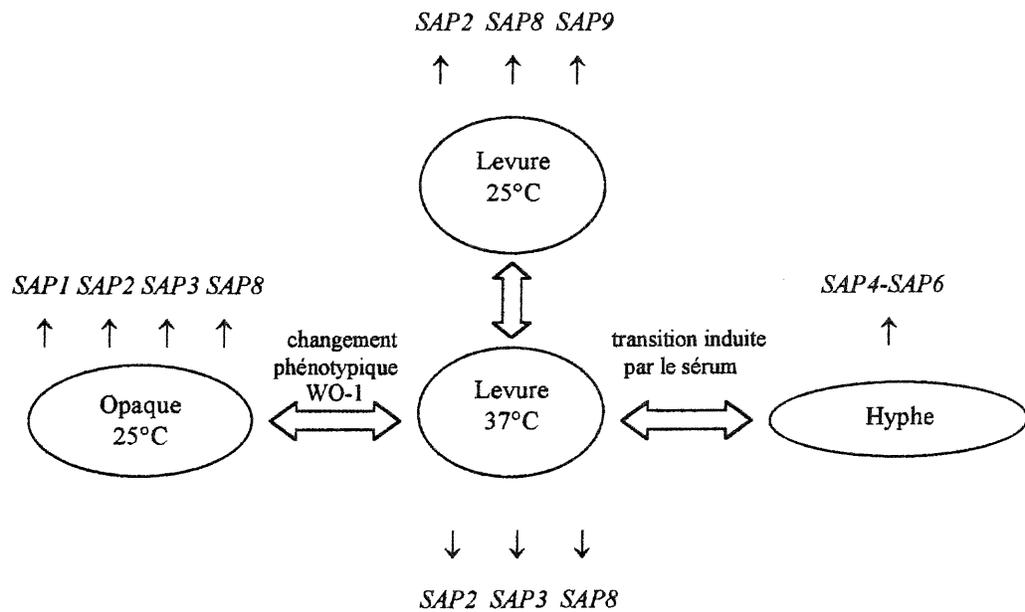


Figure 3. Expression *in vitro* des gènes *SAP* de *C. albicans*. Les gènes sont exprimés différemment selon le stade de croissance, la morphologie, la température et la composition du milieu de culture (Tiré et modifié de Hube, 1996).

Cette expression différentielle *in vitro* suggère donc que les différentes *SAP* seraient exprimées à divers moments au cours de l'infection et dans différents tissus. Ainsi, plusieurs expériences démontrent l'expression différentielle des *SAP in vivo*. De Bernardis et al. (1995) ont étudié l'expression de *SAP1* et *SAP2* au niveau de la cavité vaginale chez les rats. Les résultats indiquent que *SAP1* et *SAP2* sont exprimés lors des premières étapes de l'infection vaginale. D'autre part, une étude effectuée sur la candidose orale, à partir d'épithélium humain reconstitué, confirme l'expression différentielle des *SAP* (Schaller et al., 1998). En effet, les Sap1p et Sap3p sont retrouvées dans les premiers stades de l'infection orale. Par la suite, lors de l'apparition des lésions au niveau des tissus, l'expression de *SAP6* a été mise en évidence. Cette expression concorde aussi avec la première apparition d'hyphes. Il est à noter que les Sap4p et Sap5p n'ont pas été détectées. Plus tardivement, l'expression de la *SAP2* a été observée. Cette dernière n'était pas retrouvée dans les premières étapes de l'infection. Ceci pourrait être expliqué par le fait que *SAP2* est exprimée dans des conditions acides *in vitro* (Hube, 1996). Le pH de la bouche étant neutre, *SAP2* n'aurait donc pas été exprimé au départ mais plus tardivement, suite à l'établissement d'une microniche acide. Finalement, l'expression de *SAP8* est dénotée à la

fin de la co-culture *in vitro*. Ainsi, ces résultats démontrent une progression temporelle de l'expression des *SAP*,  $SAP1$  et  $SAP3 > SAP6 > SAP2 > SAP8$ , lors de l'infection orale *in vitro*. Par ailleurs, Naglik et al. (1999) ont confirmé l'expression de ces gènes et de la *SAP7* chez des patients atteints de candidose orale.

Ces différentes expériences confirment l'hypothèse d'une variation de l'expression des *SAP in vivo* en fonction du stade temporel et du site d'infection. Ainsi, la pathogénèse de la candidose serait associée, entre autre, à l'expression différentielle des *SAP*.

#### 2.3.1.4. Importance et rôle des Saps dans la virulence

Les Saps semblent jouer un rôle important dans la virulence. En effet, les protéases aspartiques sont sécrétées principalement par les espèces les plus pathogènes de *Candida*. Ainsi, *C. albicans* est l'espèce la plus protéolytique. D'ailleurs, une étude effectuée par Cassone et al. (1987), a démontré que les *C. albicans* provenant de femmes atteintes de vaginite produisent beaucoup plus de Saps que les *C. albicans* provenant de femmes porteuses saines ou asymptomatiques du champignon.

Pour évaluer l'importance des Saps dans la virulence de *C. albicans*, plusieurs chercheurs ont utilisé des mutants nuls des gènes *SAP*. Grâce au protocole « ura-blaster », des mutants nuls *sap1*, *sap2* et *sap3* ainsi qu'un triple mutant nul *sap4-6* ont été construits (Hube et al., 1997; Sanglard et al., 1997). Les mutants nuls *sap1*, *sap2* et *sap3* ont démontré une virulence atténuée comparativement à la souche parentale, lors d'une infection disséminée chez la souris et le cobaye (Hube et al., 1997). De la même façon, le triple mutant nul s'est avéré moins virulent que la souche sauvage au cours d'une candidose systémique effectuée chez ces mêmes animaux. Par ailleurs, De Bernardis et al. (1998a) ont évalué la virulence de ces mutants lors de la candidose vaginale chez les rats. Ils ont ainsi pu démontrer une hiérarchie dans le potentiel de virulence des Saps :  $SAP2 > SAP1 > SAP3$ . En effet, la délétion de *SAP 2* enraye presque complètement le pouvoir pathogène de *C. albicans*, ce qui mène à une élimination rapide du champignon de la cavité vaginale des rats. Par contre, le triple mutant nul *sap4-6* ne contribue pas à la virulence de *C. albicans* lors d'une candidose vaginale puisque le mutant est aussi

pathogène que la souche parentale. Ces expériences démontrent donc l'importance des Saps dans la virulence de *C. albicans*.

Finalement, les Saps semblent associées à d'autres facteurs pathogéniques tels que l'adhérence, la formation d'hyphes, la destruction de l'épiderme ainsi que la résistance de la levure à l'activité des phagocytes (Hoegl *et al.*, 1996). Les rôles biologiques des Saps sont donc variés et leur permettent d'être impliqués dans plusieurs phénomènes associés à la pathogenèse de la candidose.

### 2.3.2. Phospholipases

Le terme « phospholipases » regroupe des enzymes hétérogènes capables d'hydrolyser un ou plusieurs liens esters retrouvés dans les glycérophospholipides qui composent les membranes biologiques des cellules de l'hôte (Ghannoum, 2000). Ainsi, toutes ces enzymes ont pour substrat les phospholipides, mais chaque phospholipase agit sur un lien ester spécifique. Il existe donc, quatre types majeurs de phospholipases : A, B, C et D. *C. albicans* sécrète la phospholipase B (PLB) qui enlève les acides gras *sn*-1 et *sn*-2 des phospholipides. Cette enzyme, qui a pour synonymes lysophospholipase et lysophospholipase-transacylase, comporte deux types d'activités. La première, l'hydrolase, permet à l'enzyme de couper les acides gras des phospholipides et des lysophospholipides tandis que la deuxième, la transacylase, lui confère la capacité de produire des phospholipides en transférant un acide gras libre sur un lysophospholipide (Ghannoum, 2000).

#### 2.3.2.1. Les phospholipases chez *C. albicans*

C'est en 1960 que la sécrétion extracellulaire de phospholipases par *C. albicans* a été mise en évidence. Les premières études démontraient que parmi toutes les espèces de *Candida*, seul *C. albicans* pouvait produire une phospholipase extracellulaire (Samaranayake *et al.*, 1984). Ces résultats ont par la suite été infirmés et il a été démontré que d'autres espèces de *Candida*, tel *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* et *C. krusei*, sécrètent aussi des phospholipases mais en plus petite quantité

(Ghannoum, 2000). D'autre part, suite au clonage des gènes de la phospholipase, deux gènes codant pour la PLB (*PLB1* et *PLB2*) et un gène codant pour la phospholipase D (*PLD*) ont été découverts chez *C. albicans*. Ainsi, le gène *PLB1* donne naissance à une protéine de 605 aa tandis que la protéine de *PLB2* est composée de 608 aa (Leidich *et al.*, 1998; Sugiyama *et al.*, 1999). La présence de ces deux protéines homologues (65% d'homologie) a été suggérée par plusieurs facteurs dont le fait qu'une délétion de *PLB1* n'entraînait pas une perte d'activité totale de la phospholipase, suggérant ainsi que l'activité résiduelle était causée par un deuxième gène. En outre, la PLD est une enzyme retrouvée aussi chez *S. cerevisiae*, qui joue un rôle essentiel dans la méiose. *C. albicans* n'ayant pas de méiose, cette enzyme pourrait être impliquée dans la régulation du dimorphisme (McLain et Dolan, 1997).

#### 2.3.2.2. Les phospholipases comme facteur de virulence

Les phospholipases seraient impliquées dans la pénétration, l'endommagement et la lyse des cellules de l'hôte. En effet, les membranes de ces cellules sont composées de phospholipides qui peuvent être hydrolysés par les phospholipases. Ceci entraîne la déstabilisation des membranes et par le fait même la lyse des cellules, de telle sorte que *C. albicans* pourrait envahir le tissu et causer une infection. De plus, la sécrétion des phospholipases par *C. albicans* semble aussi jouer un rôle dans l'adhérence du champignon aux cellules de l'hôte. En effet, Barrett-Bee *et al.* (1985) ont démontré que le *C. albicans* qui adhère le plus fortement aux cellules épithéliales buccales est celui qui sécrète le plus de phospholipase. Donc, les phospholipases font partie des facteurs de virulence de *C. albicans*.

#### 2.4. Pathogenèse de la candidose

D'important progrès ont été fait dans la découverte de facteurs pouvant contribuer à la pathogénie de *C. albicans*. Ainsi, l'adhérence, le dimorphisme, le changement phénotypique et la production d'enzymes extracellulaires sont tous des facteurs de virulence putatifs de ce champignon. Avec les informations récoltées au cours des dernières

années, il est possible de proposer un processus d'infection pour *C. albicans*, qui réunit les différents facteurs de virulence proposés (Tableau II) (Odds, 1994). Ces facteurs sont exprimés à différents stades de l'infection si bien que chacun d'eux est important dans le processus infectieux.

Tableau II. Implication des divers facteurs de virulence lors des différentes étapes de l'infection des tissus par *C. albicans* (Tiré et modifié de Odds, 1994).

Stade d'infection	Facteurs de virulence impliqués
Stade 1 : Adhérence à l'épithélium et colonisation	Adhésines, hydrophobicité et formation d'hyphes
Stade 2 : Pénétration de l'épithélium	Formation d'hyphes, enzymes extracellulaires et thigmotropisme
Stade 3 : Invasion vasculaire et dissémination	Enzymes extracellulaires, thigmotropisme et immunomodulateurs (?)
Stade 4 : Adhérence à l'endothélium et pénétration des tissus	Adhésines, formation d'hyphes et enzymes extracellulaires

Donc, la capacité des cellules de *C. albicans* de croître rapidement ainsi que sa diversité de facteurs de virulence lui confèrent son pouvoir pathogène.

Ce champignon pathogène peut varier l'expression de ces facteurs et par conséquent, s'adapter à plusieurs microenvironnements retrouvés chez l'hôte.

### 3. EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES GÈNES DE *C. ALBICANS*

La pathogenèse de la candidose est complexe puisqu'elle implique des facteurs de l'hôte et de la levure. En effet, au cours de ce processus, plusieurs gènes sont régulés par des facteurs environnementaux. Ceci implique que les gènes de l'hôte et du champignon sont activés et désactivés de façon variable au cours de l'infection. Or, plusieurs gènes mentionnés précédemment (*SAP*, *PLB*, gènes codant pour des protéines de surface) sont

exprimés différemment. L'expression de ces gènes peut être influencée par plusieurs facteurs dont la température, la pH et la morphologie cellulaire. Ainsi, pour coloniser et envahir les tissus, *C. albicans* doit répondre aux divers changements environnementaux et aux mécanismes de défense de l'hôte. C'est donc en partie grâce à l'expression différentielle de ces gènes que *C. albicans* peut s'adapter aux différentes microniches présentes chez l'hôte. L'identification de gènes exprimés différemment lors des diverses étapes de l'infection pourrait mener à une meilleure compréhension de la candidose. De telles connaissances pourraient engendrer la découverte de nouvelles cibles pour les antifongiques.

### 3.1. Expression différentielle des gènes de *C. albicans in vitro* et *in vivo*

Saporito-Irwin et al. (1995) ont identifié un gène, *PHR1*, codant pour une glycoprotéine de surface, ancrée dans la membrane de *C. albicans*. *In vitro*, ce gène est exprimé lorsque le pH du milieu de culture est supérieur à 5.5; cependant, lorsque le pH diminue *PHR1* n'est plus exprimé. Plus récemment, un homologue de *PHR1*, *PHR2*, a été mis en évidence (Mühlschlegel et Fonzi, 1997). Contrairement à *PHR1*, *PHR2* est exprimé lorsque le pH est inférieur à 5 mais ne l'est pas lorsque le pH est supérieur à 6. Ainsi, ces gènes sont exprimés différemment en fonction du pH du milieu, indépendamment de la température, des facteurs nutritionnels et de la morphologie cellulaire. De plus, il a été démontré que ces gènes jouent un rôle dans la morphogénèse de *C. albicans in vitro* (Saporito-Irwin et al., 1995; Mühlschlegel et Fonzi, 1997). En effet, lorsque *PHR1* est supprimé, *C. albicans* ne peut former des levures ou des hyphes normaux à pH alcalin, tandis qu'à pH acide cette formation est conservée. Inversement, lorsque *PHR2* est délété, la morphogénèse de *C. albicans* est anormale à pH acide mais est normale à pH alcalin.

Suite aux résultats obtenus *in vitro*, il reste à savoir si le pH retrouvé à différents sites anatomique chez l'hôte, est un signal environnemental qui gouverne l'expression des gènes et de la virulence de *C. albicans*. Un modèle de candidose systémique chez la souris (pH 7.3) ainsi qu'un modèle de candidose vaginale chez le rat (pH 4.5) ont été utilisés pour vérifier cette hypothèse (Ghannoum et al., 1995; De Bernardis et al., 1998b). Les résultats

ont démontré que *PHR1* était exprimé lors de l'infection systémique tandis que *PHR2* était présent au cours de l'infection vaginale. Par ailleurs, le mutant nul *phr1/phr1* pouvait engendrer une candidose vaginale mais était avirulent lors de l'infection systémique. Inversement, un mutant nul *phr2/phr2* était avirulent au cours de l'infection vaginale mais pouvait causer une candidose systémique chez les souris. Cette étude confirme donc que le pH est un signal environnemental qui gouverne l'expression différentielle des gènes et de la virulence de *C. albicans*. Par le fait même, la capacité de *C. albicans* à s'établir dans certaines niches est médiée par l'adaptation spécifique à ces niches. Cette adaptation est possible en partie grâce à l'expression différentielle des gènes.

### **3.2. Techniques utilisées pour mettre en évidence l'expression différentielle des gènes**

#### *3.2.1. Criblage d'une librairie soustractive*

Le criblage d'une librairie soustractive (« subtractive library screening ») consiste à construire une librairie d'ADNc à partir de différentes sources d'ARN (Sambrook *et al.*, 1989). Ainsi, l'ARNm est isolé à partir des cellules provenant des deux conditions que l'on veut comparer. L'ARN provenant de la première condition subit une transcription inverse ce qui donne naissance à l'ADNc. Ce dernier est dénaturé et mis en présence de l'ARN de la deuxième condition dans le but de former des hybrides ADNc-ARN. Suite à cette hybridation, l'ADNc non-hybridé est purifié par chromatographie à l'hydroxyapatite et est utilisé comme matrice pour synthétiser un ADNc double brin. Ceci forme donc une librairie composée d'ADNc exprimé seulement lors de la première condition.

#### *3.2.2. Hybridation différentielle*

L'hybridation différentielle (« differential hybridation ») consiste à construire une librairie d'ADNc à partir d'une population cellulaire (Birse *et al.*, 1993). Cette librairie est dupliquée sur un filtre. Par la suite, ces duplicatas sont criblés avec des sondes représentant deux conditions de culture différentes, permettant ainsi la mise en évidence des gènes exprimés différemment.

Le criblage d'une librairie soustractive et l'hybridation différentielle sont deux techniques efficaces pour identifier des gènes exprimés différemment mais elles comportent plusieurs désavantages (Sturtevant, 2000). En effet, ces méthodes nécessitent la construction et le criblage d'une librairie d'ADNc, ce qui prend un certain temps. De plus, elles requièrent une grande quantité d'ARN, ne détectent pas les changements subtils et sont donc peu sensibles. Finalement, ces deux techniques permettent l'identification de changements dans une seule population et permettent l'étude de seulement deux populations ou variables à la fois.

### 3.2.3. *Differential display RT-PCR*

Le « differential display RT-PCR » (DDRT-PCR) développé par Liang et Pardee (1992), permet aussi l'identification de gènes exprimés différemment mais de façon moins laborieuse que les deux techniques mentionnées précédemment. De plus, le DDRT-PCR est une technique beaucoup plus sensible que le criblage d'une librairie soustractive et que l'hybridation différentielle. Le DDRT-PCR se divise en 4 étapes. La première étape consiste à effectuer une transcription inverse sur l'ARN isolé de différentes populations cellulaires, à l'aide d'un assortiment dégénéré d'amorces oligo(dT) ancrées. Ceci permettra la production d'un « pool » d'ADNc. Deuxièmement, un PCR est effectué, en utilisant l'oligo(dT) de départ et une amorce arbitraire (10-mers), dans le but d'amplifier aléatoirement l'ADNc. L'utilisation d'un nucléotide radioactif lors du PCR permettra la détection des produits de PCR sur un gel de séquençage. Ainsi, en troisième lieu, les produits du DDRT-PCR sont visualisés sur un gel de polyacrylamide. Les résultats à comparer étant côte à côte, il est facile d'identifier les gènes exprimés différemment. Finalement, les bandes différentielles sont excisées du gel séché, éluées et réamplifiées en utilisant les amorces oligo(dT) et arbitraire de départ. Par la suite, ces produits de PCR peuvent être clonés et séquencés, et l'expression différentielle des gènes peut être confirmée par l'analyse de transferts de Northern.

Donc, le DDRT-PCR possède plusieurs avantages par rapport au criblage d'une librairie soustractive et à l'hybridation différentielle (Sturtevant, 2000). En effet, cette technique est rapide, simple et reproductible. De plus, contrairement aux deux autres méthodes, le DDRT-PCR permet d'identifier des gènes exprimés différemment dans

plus d'une population et de comparer plus de deux populations ou variables à la fois. Mais le principal avantage du DDRT-PCR est qu'il nécessite peu d'ARN de départ. Malgré tout, cette technique possède aussi un désavantage majeur qui est la présence de faux-positifs. Ces faux-positifs peuvent être causés par plusieurs facteurs dont l'hybridation à faible stringence lors du PCR, l'isolement de produits de PCR qui migrent à la même hauteur que le fragment d'intérêt et l'amplification par l'amorce arbitraire seulement. Des précautions doivent donc être prises lors de la synthèse des amorces, de la réamplification et du criblage.

### 3.2.3.1. Identification de gènes exprimés différenciellement chez *C. albicans*, *in vitro* et *in vivo*

En utilisant la technique du DDRT-PCR, Mühlischlegel et al. (1998), ont démontré la présence de gènes exprimés différenciellement par *C. albicans* lors d'une étude *in vitro* sur l'adhérence de ce champignon. Ainsi, *C. albicans* était exposé à quatre conditions de culture différentes. Suite à l'extraction de l'ARN provenant de ces quatre conditions, un DDRT-PCR a été effectué et quatre bandes différentielles ont été identifiées. Ces dernières ont été clonées et pour chacune de ces bandes, trois clones ont été sélectionnés pour le séquençage. Ainsi, un des clones séquencés présentait une homologie élevée avec les gènes *BMH* retrouvés chez *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*. Ces gènes codent pour des protéines appartenant à la famille 14-3-3 et semblent impliquées dans des mécanismes de signalisation et de régulation. Ainsi, des études plus approfondies devront être effectuées pour déterminer le rôle de ces gènes dans la virulence de *C. albicans*.

Mirbod et al. (1996) ont comparé par DDRT-PCR, l'expression des ARNm des deux souches de *C. albicans* ayant des potentiels de virulence différents : l'une pouvant produire de grande quantité de phospholipase (virulente) et l'autre produisant une faible quantité de cette enzyme (avirulente). Suite à une croissance *in vitro*, l'ARN des deux souches a été extrait et un DDRT-PCR a été effectué. Ainsi, dix bandes exprimées différenciellement ont été identifiées et séquencées. Les séquences nucléotidiques de ces ADNc ont été comparées à des banques de données et un des fragments a révélé 90% d'homologie au gène *TIF-2*, qui est un facteur d'initiation de la traduction retrouvé chez les

levures. Des analyses de Northern ont confirmé que ce gène est exprimé 1.4 fois plus abondamment chez la souche virulente. Ainsi, des études plus approfondies devront être effectuées pour déterminer si une augmentation de l'expression de *TIF-2* induit la production de protéines reliées à la virulence, telle la phospholipase.

L'utilisation du DDRT-PCR *in vitro* est intéressante mais pour la compréhension des interactions impliquées dans la virulence, l'identification des gènes exprimés différemment *in vivo* serait plus pertinente.

Zhao et al. (1998) ont donc comparé, grâce au DDRT-PCR, l'expression des gènes de *C. albicans* lors d'une candidose orale chez les rats versus la croissance *in vitro*. Il est important de mentionner que la comparaison a tout d'abord été effectuée à l'aide d'ARN isolé chez un seul rat. Suite au DDRT-PCR, 70 fragments exprimés différemment ont été identifiés et parmi ceux-ci, 35 ont été étudiés de façon plus approfondie. Ces fragments ont été sélectionnés parce qu'ils représentaient des gènes exprimés seulement *in vivo*, qu'ils étaient détectés de façon reproductible lors d'un deuxième PCR et qu'ils étaient présents de façon reproductible chez deux rats différents. Ainsi, les 35 clones ont été analysés par hybridation de Southern avec l'ADN de *C. albicans* et de rat. Sept fragments étaient homologues à l'ADN de la levure, deux à l'ADN de rat et les 26 autres ne correspondaient ni à l'un ni à l'autre. Donc, les sept fragments spécifiques à *C. albicans* ont été examinés et parmi eux, un fragment s'est avéré homologue à un gène de la famille *ALS*, qui est impliqué dans l'agglutination et probablement dans l'adhérence. Un deuxième fragment s'est révélé homologue au gène *gidB* retrouvé chez les bactéries, qui joue peut-être un rôle dans la division cellulaire. Les cinq fragments restants n'ont pas démontré d'homologie significative avec les banques de données. Cette expérience démontre l'utilité du DDRT-PCR pour mettre en évidence des gènes exprimés différemment *in vivo*.

### 3.3. Microplaque d'ADN

Les projets de séquençage génomique vont bon train. En effet, plusieurs génomes sont séquencés (e.g. *S. cerevisiae*) tandis que d'autres le seront très bientôt (*C. albicans*). Par conséquent, les microplaques d'ADN (« DNA chip ») qui contiennent la plupart des gènes exprimés par un génome sont de plus en plus disponibles sur le marché. Ces microplaques mettent à profit la propriété inhérente que possède une molécule d'acide nucléique simple-brin de se lier spécifiquement, par appariement de bases, à une séquence complémentaire. Ainsi, la sélectivité de ce processus d'hybridation permet d'obtenir des résultats très précis. Cette technique peut donc être utilisée pour plusieurs analyses dont l'expression différentielle des gènes. L'ARN poly(A)<sup>+</sup> est isolé à partir de deux populations d'intérêt et est marqué grâce à l'incorporation de deux dCTP marqués avec différents fluorochromes (Schena *et al.*, 1995). De cette façon, les deux échantillons peuvent être hybridés simultanément sur la microplaque d'ADN et peuvent être détectés par un laser. Cette technique comporte donc certains avantages tel que la capacité de comparer le même assortiment de gènes à plusieurs conditions expérimentales différentes et d'analyser une grande quantité de clones à la fois. Mais, elle implique aussi certains désavantages : elle nécessite une grande quantité d'ARN pour préparer les sondes ainsi qu'un équipement spécial pour préparer les microplaques et analyser les résultats.

En conclusion, il est important de comprendre que malgré le fait que ces diverses techniques mettent en évidence des gènes exprimés différemment, ce n'est pas parce qu'un gène est exprimé de façon différentielle qu'il est nécessairement impliqué dans la virulence du micro-organisme. Ainsi, il faudra déterminer le rôle du gène dans le processus biologique pour connaître son implication dans la pathogenèse. Donc, l'utilisation de mutants nuls est impérative pour préciser la contribution de ces gènes dans la virulence.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Souches et conditions de culture

La souche de *C. albicans* LAM-1 (sérotypage A) utilisée pour cette étude a été isolée du sang d'un patient atteint d'une candidose systémique, et a été obtenue de N. Deslauriers de l'Université Laval, à Québec (Lacasse *et al.*, 1990). La souche LAM-1 a été cultivée dans 50 ml d'un milieu SDB (voir section 13) à une température de 30°C, pendant 16 h avec agitation à 200 rpm (Rosi 1000, Thermolyne). Les levures (blastospores) ont ensuite été centrifugées à 16 000 g (Eppendorf, Centrifuge 5415 C) pendant deux minutes et le surnageant a été jeté. Les cellules ont été lavées à deux reprises par centrifugation, avec du PBS 10mM (pH 7.4) (voir section 14). Puis, elles ont été resuspendues dans le PBS et un décompte a été effectué à l'aide d'un hémacytomètre (Bright-Line, Reichert). Ainsi,  $1 \times 10^8$  cellules et  $2.5 \times 10^7$  cellules ont été réparties dans des microtubes stériles, centrifugées et le surnageant a été retiré. Les culots obtenus ont été utilisés pour inoculer les souris, au niveau des cavités orale et vaginale respectivement.

### 2. Inoculation des souris

Des souris C3H (Charles River Canada) âgées de 33-38 jours ont été utilisées pour cette expérience. Ces souris ont été anesthésiées à l'aide de 100 µl d'un mélange d'Hypnorm (Janssen) : ddH<sub>2</sub>O : Versed (Roche) (1 : 2 : 1) par la voie intrapéritonéale. Dix souris ont été inoculées au niveau buccal en appliquant le culot de  $1 \times 10^8$  cellules de *C. albicans* LAM-1 sur la langue, les joues et le palais des souris, grâce à l'utilisation d'écouvillons stériles en fibre d'alginate de calcium (Fisher) (Lacasse *et al.*, 1990). Au niveau vaginal, dix souris ont été inoculées à l'aide d'un embout de micropipette, avec  $2.5 \times 10^7$  cellules de la souche LAM-1, resuspendues dans 20 µl de PBS 10mM stérile (pH 7.4) (Fidel *et al.*, 1996b).

### 3. Décompte des cellules de *C. albicans* dans les cavités buccale et vaginale des souris

La quantification des cellules de *C. albicans* LAM-1, au niveau buccal et vaginal a été effectuée de façon longitudinale. L'échantillonnage s'est réparti sur plusieurs jours : 24 h, 36 h, jours 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8. Dans la cavité orale, les cellules ont été recueillies par un écouvillonnage de la langue, du palais et des joues de chacune des souris. L'écouvillon a par la suite été dissout dans 2 ml d'une solution de Ringer additionnée de citrate de sodium (voir section 14). Une partie de cette suspension cellulaire (100 µl) a été ensemencée, en duplicata, sur un milieu SDA contenant du chloramphénicol (50 µg/ml) (voir section 13) et placée dans un incubateur à 37°C (Model 4 Precision Scientific, Thelco) pendant 16 h. Suite à cette incubation, le décompte des CFU a été effectué comme suit :

$$\left( \frac{\text{Nombre de colonies sur le Pétri 1} + \text{nombre de colonies sur Pétri 2}}{2} \right) \times 20$$

Moyenne

Facteur de dilution pour ramener sur le 2 ml de de départ (nous avons ensemencé seulement 100 µl sur Pétri à partir du 2 ml de départ).

Ceci nous a permis de calculer le nombre total de cellules de *C. albicans* retrouvé dans le 2 ml initial de la solution de Ringer et par le fait même, de tracer un graphique représentant la cinétique de l'infection par *C. albicans*. Les cellules dans la portion restante de la solution de Ringer ont été utilisées pour l'isolement de l'ARN (voir section 4).

Au niveau vaginal, les cellules ont été recueillies grâce à des lavages (2 lavages/souris) de la cavité vaginale, effectués avec 100 µl de PBS 10mM (pH 7.2) stérile au moyen d'une micropipette (Fidel *et al.*, 1996b). Il est important de mentionner que les souris ont été préalablement anesthésiées, avant les lavages vaginaux, à l'aide de métofan (Janssen) selon les conditions conseillées par le manufacturier. Les étapes subséquentes ont été effectuées tel que décrit précédemment pour l'infection buccale. À noter que la morphologie cellulaire de *C. albicans* LAM-1 sur des états frais provenant des échantillonnages oraux et vaginaux, a été observée 36 h après l'inoculation des souris.

#### 4. Extraction de l'ARN de *C. albicans* LAM-1 provenant des souris

Les cellules récoltées ont été traitées avec une solution contenant 5% de Tween 20, 5% de NP-40 et 5% de Triton X-100 (voir section 14) pour éliminer les cellules murines et les bactéries (Rand *et al.*, 1994). Ainsi, cette solution est ajoutée en raison de 10% du volume de la solution de Ringer contenant les levures, et le tout est incubé dans un bain-marie (Model 83, Precision Scientific, Thelco) à 37°C pendant 15 min. Suite à cette étape, une centrifugation permet l'obtention d'un dépôt cellulaire, le surnageant est retiré tandis que le culot est conservé à -80°C. Avant l'extraction, les culots sont dégelés et resuspendus dans 10 µl de PBS 10mM pH 7.4.

Grâce aux calculs effectués précédemment (voir section 3) les levures provenant des différentes souris (à 36 h) ont été combinées dans le but d'obtenir le même nombre de cellules de départ, avant l'extraction d'ARN, entre les deux groupes à comparer (buccal vs vaginal). Donc, les cellules de *C. albicans* de deux souris ont été unies au niveau buccal tandis qu'au niveau vaginal, ce sont les cellules de quatre souris qui ont été associées. Par conséquent, on retrouve environ  $2.85 \times 10^4$  cellules de *C. albicans* dans chacun des deux groupes, avant l'extraction de l'ARN. L'ARN extrait de ces  $2.85 \times 10^4$  cellules a été utilisé ultérieurement lors du DDRT-PCR.

D'autre part, pour le RT-PCR (voir section 11), l'ARN de *C. albicans* LAM-1 provenant de plusieurs souris atteintes d'une candidose orale a été combiné. Cet ARN a été associé en fonction du site, du moment et de la cinétique de l'infection. Ainsi, l'ARN provenant de trois souris a été regroupé pour chacun des temps de l'infection (24 h, 36 h, jour 2, 3 et 4). Au niveau vaginal, l'ARN de *C. albicans* LAM-1 n'a pas été combiné, et les temps d'infection étudiés ont été moins nombreux. En effet, l'ARN de *C. albicans* provenant de trois souris individuelles (non-combiné) au temps d'infection 24 h et l'ARN des levures isolées d'une souris au jour 2 de l'infection ont fait l'objet de l'analyse par RT-PCR.

L'extraction de l'ARN a été effectuée en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen) associé aux billes de verre (425-600 microns, Sigma) et à l'appareil FP120 Fast Prep (Bio 101, Savant) qui agite vigoureusement les échantillons, selon le protocole suivant :

- 1) Après avoir combiné les cellules des différentes souris, les échantillons sont centrifugés (Eppendorf Centrifuge 5415 C) 3 min à 14 000 g et le surnageant est enlevé.
- 2) Resuspendre les culots dans 600  $\mu$ l de la solution RLT (Qiagen). Transférer les échantillons dans des tubes de 2 ml (Gordon Technologies) contenant des billes de verre.
- 3) Mettre les tubes dans l'appareil FP120 Fast Prep pendant 30 sec à vitesse 6.5. Ensuite, refroidir les échantillons sur glace.
- 4) Refaire l'étape 3 deux fois.
- 5) Prendre la phase aqueuse (au-dessus des billes) et transférer dans un nouveau microtube. Centrifuger 3 min à 14 000 g. Ceci entraînera la formation d'un culot.

- 6) Transférer la surnageant dans un nouveau microtube, ajouter un volume d'éthanol à 70% et mélanger en pipettant.
- 7) Transférer la solution de l'étape 6 dans une colonne du RNeasy Mini Kit, centrifuger 15 sec à 8000 g et se débarrasser du filtrat.
- 8) Ajouter 700 µl de RW1 (Qiagen) dans la colonne et centrifuger 15 sec à 8000 g. Retirer le filtrat.
- 9) Transférer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml (Qiagen) et ajouter 500 µl de RPE (Qiagen) dans la colonne. Centrifuger 15 sec à 8000 g et se débarrasser du filtrat.
- 10) Remettre 500 µl de RPE dans la colonne et centrifuger 4 min à 14 000 g en laissant les tubes ouverts, pour permettre à la membrane de s'assécher.
- 11) Transférer la colonne dans un nouveau tube de 1.5 ml (Qiagen) et laisser sécher la membrane pendant 15 min (tubes ouverts) sous la hotte.
- 12) Une fois la membrane séchée, ajouter 30 µl d'eau RNase-free (Qiagen) dans la colonne et centrifuger 1 min à 8000 g.

Cette méthode résulte en une lyse efficace des cellules de *C. albicans* LAM-1 (Müller *et al.*, 1998). En effet, l'analyse d'un état frais au microscope confirme la lyse de toutes les cellules (levure et hyphe). Par la suite, la membrane à base de gel de silice retrouvée dans les colonnes du RNeasy Mini Kit permet de fixer l'ARN qui sera récupéré après de nombreux lavages. L'ARN obtenu a ensuite été traité à la DNase I (Gibco BRL, Life Technologies), tel que suggéré par le manufacturier, pour éviter toute contamination de l'échantillon avec de l'ADN. Les expériences préliminaires ont permis de démontrer que cette méthode donne des résultats optimaux quant à la quantité, la rapidité et la qualité de l'ARN récolté à partir de la forme levure et de la

forme filamenteuse de *C. albicans* LAM-1. Nous n'avons pas pu quantifier l'ARN extrait, à l'aide d'une lecture de densité optique, puisque la quantité extraite était faible. Selon le protocole du RNeasy Mini Kit, environ 25 µg d'ARN est récupéré à partir de  $1 \times 10^7$  cellules de levure (*S. cerevisiae*). Ainsi, nous avons estimé que 71 pg serait extrait de  $2.85 \times 10^4$  cellules de *C. albicans* LAM-1.

## 5. DDRT-PCR

La trousse RNAmapping™ (GenHunter) a été utilisée pour effectuer la réaction de DDRT-PCR, selon les conditions recommandées par le manufacturier. Brièvement, environ 4.7 pg d'ARN extrait a été utilisé pour la transcription inverse, en présence des amorces oligo(dT) « ancrées » au début de la queue de poly A<sup>+</sup> (GenHunter) et de la transcriptase inverse MMLV. Par la suite, l'ADNc a été amplifié par PCR avec un oligo(dT), une amorce arbitraire (GenHunter), des α-[<sup>35</sup>S] dATP (Amersham Pharmacia), des dNTP et de l'Amplitaq (Perkin Elmer).

Les oligo(dT) utilisés dans cette étude sont : T<sub>12</sub>MG, T<sub>12</sub>MA, T<sub>12</sub>MT et T<sub>12</sub>MC (GenHunter) (M représentant un G, un A ou C) et les amorces arbitraires (GenHunter) sont les suivantes : AP-1 (5'-AGCCAGCGAA-3'), AP-2 (5'-GACCGCTTGT-3'), AP-3 (5'-AGGTGACCGT-3'), AP-4 (5'-GGTACTCCAC-3') et AP-5 (5'-GTTGCGATCC-3'). Le DDRT-PCR a été effectué à l'aide de l'appareil GeneAmp 9600 Thermocycler de Perkin Elmer, en utilisant les conditions suivantes de PCR : 40 cycles [94°C, 15 sec → 40°C, 2 min → 72°C, 30 sec] suivit d'une extension finale à 72°C pendant 5 min.

Les produits du DDRT-PCR, marqués radioactivement, ont été visualisés sur un gel de polyacrylamide à 6%, en conditions dénaturantes, tel que décrit ci-dessous :

*Gel dénaturant de polyacrylamide à 6%*

- 42 g d'urée (Bioshop)
- 15 ml d'une solution à 38% d'acrylamide/2% N,N'-méthylène-bisacrylamide
- 10 ml de TBE 10X (voir section 14)
- 4 ml de persulfate d'ammonium 1.6%
- 39 ml de ddH<sub>2</sub>O
- 50 µl de TEMED (Sigma)

Le persulfate d'ammonium à 1.6% et le TEMED sont ajoutés à la fin pour éviter une polymérisation trop rapide de la solution.

Solution de persulfate d'ammonium à 1.6%:

- Dissoudre 0.08g de persulfate d'ammonium (Sangon) dans 5 ml de ddH<sub>2</sub>O
- Conserver la solution à 4°C

Solution à 38% d'acrylamide/2% N,N'-méthylène-bisacrylamide

- À 50 ml de ddH<sub>2</sub>O ajouter :
- 38 g d'acrylamide (Gibco BRL, Life Technologies)
- 2 g de N,N'-méthylène-bisacrylamide
- Compléter le volume à 100 ml avec ddH<sub>2</sub>O et dissoudre le tout à 37°C dans un bain-marie (Model 83, Precision Scientific, Thelco), en mélangeant fréquemment. Conserver la solution à 4°C, à l'abri de la lumière.

Méthode:

- 1) Mettre à niveau, à l'horizontale, une plaque de verre propre et déposer les séparateurs (0.4 mm d'épaisseur) de chaque côté de la plaque.

- 2) Couler un peu de la solution du gel de polyacrylamide dans le bas de la plaque de verre et déposer l'extrémité de la deuxième plaque de verre sur la solution de polyacrylamide. Faire glisser doucement la deuxième plaque de verre sur la première et ajouter la solution du gel de polyacrylamide au fur et à mesure que l'on fait glisser la deuxième plaque de verre.
- 3) Une fois le gel coulé, placer les peignes (à dents carrées) à l'extrémité supérieure des plaques de verre. Puis maintenir les deux plaques de verre en place avec des pinces placées de chaque côté et aux extrémités du montage.
- 4) Recouvrir les deux extrémités du gel d'une pellicule de plastique et laisser polymériser au moins 2 h.
- 5) Une fois le gel de polyacrylamide polymérisé, enlever le papier et les pinces, et nettoyer l'extérieur des deux plaques de verre. Placer le gel sur le support (appareil à séquençage modèle 32, BRL) et ajouter le tampon de migration TBE 1X (voir section 14). S'assurer qu'il n'y a pas de fuite dans le montage.
- 6) Faire «pré-migrer» le gel 1 h (60 watts, le voltage ne doit pas excéder 1700 volts).
- 7) Suite à cette «pré-migration», rincer les puits avant d'y mettre les échantillons.
- 8) Mélanger 3.5  $\mu$ l de chaque échantillon avec 2  $\mu$ l de colorant indicateur de migration (GenHunter) et incuber le tout à 80°C (Dri bath type 17600, Thermolyne) pendant 2 min. Suite à cette incubation, charger immédiatement les échantillons sur le gel.
- 9) Faire migrer le gel environ 3h30 à 60 watts (le voltage ne doit pas excéder 1700 volts), jusqu'à ce que le colorant xylène cyanol se retrouve au bas du gel.

10) Après la migration, défaire le montage et mettre le gel à l'horizontale. Retirer la vitre supérieure doucement pour démouler le gel. Recouvrir le gel d'un papier de buvardage (Blotting paper VWR brand grade 238, VWR Scientific) et soulever doucement le papier, de façon à ce que le gel se détache de la vitre et reste collé au papier de buvardage.

11) Recouvrir le gel d'une pellicule de plastique et faire sécher à l'aide d'un séchoir à gel (Slab dryer model 483, BioRad) à 80°C pendant 1 h.

Par la suite, le gel a été exposé pendant 18 h à -80°C dans une cassette (Kodac X-omatic Cassette C-1) avec un film BioMax MS (Kodak) et le Transcreen LE (Kodak). Ce dernier permet la détection des radiations de faible énergie, telle que le <sup>35</sup>S, en augmentant la sensibilité. Les résultats à comparer étant côte à côte, cela permet d'identifier les gènes exprimés différemment. Les résultats différentiels ont été confirmés par un deuxième PCR effectué sur l'ADNc obtenu suite au DDRT. Les bandes différentielles ont été coupées du gel, éluées (selon le protocole de RNAmapping de GenHunter) et réamplifiées par PCR comme mentionné ci-dessus.

## 6. Clonage et digestions enzymatiques

Le Perfectly Blunt Cloning Kit, le vecteur pSTBlue-1 et les cellules compétentes NovaBlue (Novagen) ont été utilisés pour effectuer le clonage des bandes différentielles réamplifiées, la transformation des vecteurs et la sélection des clones, selon les conditions recommandées par le fabricant. Ainsi, dix colonies ont été choisies au hasard pour chacune des bandes différentielles. La moitié de chaque colonie a été repiquée dans un milieu LB contenant de l'ampicilline (50 µg/ml) et de la tétracycline (15 µg/ml) (voir section 13), suivi d'une croissance à 37°C sous agitation (200 rpm) (Rosi 1000, Thermolyne) pendant 16 h. Cette étape permet la conservation des clones à -80°C, en ajoutant 0.3 ml de glycérol stérile (BDH) à 0.7 ml de la culture bactérienne. D'autre part, l'autre moitié de la colonie est transférée dans un microtube contenant 50 µl d'eau distillée déionisée stérile. Le tout est mélangé pour disperser l'amas cellulaire et placé dans l'eau bouillante pendant 5 min. Ceci entraîne la lyse des cellules et la

dénaturation des DNases. L'étape suivante est une centrifugation qui provoque le dépôt des débris cellulaires. Finalement, 35 µl du surnageant est transféré dans un nouveau tube, dont 25 µl sont conservés à -20°C et 10 µl sont utilisés pour effectuer un PCR sur le vecteur à l'aide des amorces T7 (5' TAATACGACTCACTATA 3') et U-19 (5' ACGTCGTGACTGGGAAAAC 3') (AlphaDNA), tel que décrit par le fabricant (Novagen). Les produits de PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose (Gibco BRL, Life Technologies) à 1.5% et ont confirmé la présence des fragments d'intérêt dans les vecteurs. L'ADN plasmidique, provenant des clones qui se sont révélés positifs, a été extrait et purifié grâce au QIAprep Miniprep Kit (Qiagen). Cette trousse permet la lyse alcaline des cellules bactériennes et l'adsorption de l'ADN plasmidique sur la membrane de gel de silice alors que l'ARN, les protéines cellulaires et les métabolites se retrouvent dans le filtrat. L'ADN plasmidique est par la suite lavé et élué avec de l'eau à pH 7.0. Donc, 15 µl de la culture bactérienne, conservée à -80°C, a été repiquée dans 3 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (50 µg/ml) et de la tétracycline (15 µg/ml) (voir section 13), suivi d'une croissance pendant 16 h à 37°C sous agitation (200 rpm) (Rosi 1000, Thermolyne). Les étapes subséquentes ont été effectuées tel que suggéré par le fabricant. Suite à cette extraction/purification, parmi les dix clones conservés pour chaque bande différentielle, cinq clones ont été sélectionnés au hasard pour le séquençage. Une étude plus approfondie des ces clones a été faite en digérant l'ADN des clones sélectionnés avec les enzymes de restriction *EcoRI* (Gibco BRL, Life Technologies) et *AluI* (Gibco BRL, Life Technologies) selon le protocole suggéré par le manufacturier. Ainsi, la digestion des clones avec *EcoRI* confirme la présence du fragment dans le vecteur tandis que la digestion avec *AluI* permet de comparer les clones entre eux. Les produits de la digestion avec *AluI* sont visualisés sur un mini-gel de polyacrylamide à 12% (non-dénaturant) :

*Mini-gel de polyacrylamide à 12% (non-dénaturant)*

- 8 ml d'une solution à 29% d'acrylamide/1% N,N'-méthylène-bisacrylamide
- 7.86 ml de ddH<sub>2</sub>O
- 4 ml de persulfate d'ammonium à 10%
- 7 µl de TEMED (Sigma)

Le persulfate d'ammonium à 10% et le TEMED sont ajoutés à la fin, pour éviter une polymérisation trop rapide de la solution.

Solution de persulfate d'ammonium à 10%

- Dissoudre 1 g de persulfate d'ammonium (Sangon) dans 10ml de ddH<sub>2</sub>O
- Conserver la solution à 4°C

Solution à 29% d'acrylamide/1% N,N'-méthylène-bisacrylamide

- À 50 ml ddH<sub>2</sub>O ajouter :
- 29 g d'acrylamide (Gibco BRL, Life Technologies)
- 1 g de N,N'-méthylène-bisacrylamide
- Compléter le volume à 100 ml avec ddH<sub>2</sub>O et dissoudre le tout à 37°C dans un bain-marie (Model 83, Precision Scientific, Thelco), en mélangeant fréquemment. Conserver la solution à 4°C, à l'abri de la lumière.

Méthode:

- 1) Faire le montage du mini-appareil à électrophorèse vertical (Mini-PROTEAN II, BioRad) et couler les deux gels à l'aide d'une pipette de 10 ml. Placer les peignes (0.75 mm).
- 2) S'assurer qu'il n'y a pas de fuite et laisser polymériser 1 h.

- 3) Enlever les peignes et rincer les puits avec ddH<sub>2</sub>O pour se débarrasser de l'acrylamide non-polymérisée restante.
- 4) Transférer le montage dans le réservoir d'électrophorèse et remplir l'espace entre les deux gels avec du TBE 1X (voir section 14). S'assurer qu'il n'y a pas de fuite.
- 5) Remplir le fond du réservoir avec du TBE 1X et rincer les puits avec le TBE 1X.
- 6) Combiner 5 µl du produit de la réaction de digestion et 1 µl de colorant indicateur de migration (6X loading dye, MBI Fermentas) et charger le mélange dans les puits avec une seringue de 10 µl (Hamilton).
- 7) Faire migrer les gels à 80 volts et arrêter la migration lorsque le bleu de bromophénol se retrouve au bas du gel.
- 8) Défaire le montage et enlever une des vitres, de sorte que le gel reste collé à l'autre vitre.
- 9) Submerger le gel et la vitre dans une solution de bromure d'éthidium (0.5 µg/ml) (ICN) (mélanger 15 µl d'EtBr (10µg/ml) dans 300 µl de TBE 1X) et laisser agir 45 min à température pièce. Ensuite, sortir la vitre et le gel de la solution, essuyer le surplus de liquide et recouvrir le gel d'une pellicule de plastique.
- 10) Prendre une photo (Multi Image™ Light Cabinet et Alpha Imager™ 2200, Canberra Packard Canada) en décollant le gel de la vitre mais en le laissant sur la pellicule de plastique.

*AluI* donne un patron de bandes qui est spécifique à chaque clone, ce qui permet d'identifier les clones semblables et ainsi, éviter le séquençage de clones similaires.

## 7. Séquençage

Les clones sélectionnés ont été séquencés grâce à l'appareil ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) et du ABI Prism<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). Le principe de cette technique est simple. Un séquençage en cycle (25 cycles: 96°C→10 secondes, 50°C→5 secondes, 60°C→ 4 minutes) est effectué sur le plasmide purifié (avec le QIAprep Miniprep Kit) contenant le fragment d'intérêt, en utilisant l'amorce U-19, des dNTP (dATP, dCTP, dITP, dUTP) et des didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués avec des colorants fluorescents différents. Les ddNTP sont donc incorporés dans le fragment synthétisé. Suite à une étape de purification, les produits du séquençage en cycle sont transférés dans le 310 Genetic Analyzer. Puisque les fluorophores émettent à des longueurs d'onde différentes, l'appareil peut détecter ces quatre marqueurs fluorescents et déterminer la séquence nucléotidique du fragment. La méthode décrite par le manufacturier a été utilisée, toutefois une modification y a été apportée. En effet, la protocole suggère d'utiliser 8 µl du Ready Reaction Mix (qui contient les dNTP, les ddNTP marqués, l'Amplitaq DNA polymerase FS, le MgCl<sub>2</sub> et le tampon Tris-HCl pH 9.0) dans la réaction de PCR de 20 µl. Nous avons plutôt dilué 2 µl du Ready Reaction Mix dans 6 µl du tampon de séquençage 2.5X (voir section 14). Cette dilution s'avère aussi efficace que le Ready Reaction Mix non dilué pour les réactions de séquençage, si bien que 85 clones ont été séquencés.

Suite au séquençage, la recherche d'homologie au niveau des séquences nucléotidiques et des séquences d'acides aminés a été effectuée dans GenBank, grâce aux logiciels Blastn et Blastx respectivement (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Trente-six clones ont donné des résultats intéressants suite à la recherche dans GenBank.

## 8. Préparation des sondes marquées à la DIG

### 8.1 *Extraction du fragment d'ADN du gel d'agarose*

Les 36 clones retenus contiennent donc tous des fragments d'intérêt qui seront marqués à la digoxigénine (DIG) et qui serviront de sonde lors des analyses par la méthode de Southern. Ainsi, les cultures bactériennes contenant les clones, conservées à  $-80^{\circ}$ , ont été repiquées (15  $\mu$ l) dans 3 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline et de la tétracycline (voir section 13), tel que décrit dans la section clonage et digestions enzymatiques. L'ADN plasmidique a été extrait et purifié à l'aide du QIAprep Miniprep Kit (Qiagen), et une digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* (Gibco BRL, Life Technologies) a été effectuée selon les conditions suggérées par le manufacturier. Cette étape permet d'exciser le fragment d'intérêt du vecteur. Les produits de digestion ont été séparés sur un gel d'agarose (Gibco BRL, Life Technologies) à 1.5%, et deux bandes distinctes ont été obtenues pour chaque clone, l'une représentant le vecteur et l'autre, le fragment d'intérêt. Cette dernière a été extraite du gel grâce au QIAEX II Agarose gel Extraction Kit (Qiagen), qui utilise des particules de silice se liant spécifiquement à l'ADN en présence d'une forte concentration de sel. Brièvement, le fragment d'ADN est découpé du gel et déposé dans un tube contenant les particules de silice. L'agarose est solubilisé et l'ADN se lie aux particules de silice grâce à la présence d'une solution ayant une concentration élevée de sel. Par la suite, des étapes de lavages sont effectuées, permettant l'élimination des protéines, du sel, du bromure d'éthidium et de l'agarose résiduel. Finalement, l'ADN est élué dans de l'eau à pH 7.0. Le protocole a été effectué tel que décrit par le fabricant.

### 8.2 *Extraction et précipitation de l'ADN*

Après l'extraction de l'ADN du gel d'agarose, une extraction au phénol/chloroforme a été effectuée. Voici les principales étapes : 1) Ajouter un volume d'une solution à 1:1 (v/v) de phénol : chloroforme alcool isopentylique (24:1) (Fisher) à l'échantillon d'ADN et 2) mélanger jusqu'à l'obtention d'une émulsion. 3) Centrifuger à 12 000 g pendant 15 sec. 4) Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube.

5) Réextraire l'interface en ajoutant un volume de TE 1X pH 7.8 (voir section 14) et mélanger. Centrifuger 15 sec à 12 000 g et récupérer la phase aqueuse, qui sera combinée à celle de l'étape 4. 6) Ajouter un volume de chloroforme : alcool isopentylique (24 :1) aux phases aqueuses combinées de l'étape 5 et répéter les étapes 2 à 4. Cette extraction est suivie d'une précipitation à l'éthanol qui se résume comme suit : 1) Ajouter 0.1 volume d'acétate de sodium 3M, pH 5.2 (voir section 14) à l'ADN. 2) Ajouter deux volumes d'éthanol absolu refroidit à -20°C. Mettre la solution à -20°C pendant 45 min. 3) Centrifuger à 12 000 g, 12 min à 4°C (Eppendorf, Centrifuge 5402). 4) Enlever le surnageant et remplir le tube à moitié avec de l'éthanol à 70% froid (-20°C) et centrifuger à 12 000 g, pendant 4 min à 4°C. Retirer le surnageant. 5) Laisser le tube ouvert à température pièce jusqu'à ce que l'éthanol se soit complètement évaporé. 6) Resuspendre l'ADN dans 16 µl d'eau distillée déionisée et rincer les parois du tube avec cette eau.

### 8.3 Marquage de l'ADN à la DIG

Finalement, les fragments d'ADN sont marqués à la DIG grâce à la trousse DIG High Prime DNA Labeling (Roche). Le principe du marquage à la DIG est simple. L'ADN à marquer est dénaturé et mis en présence du fragment Klenow de l'ADN polymérase, de dUTP marqués à la DIG (DIG-11-dUTP) et d'oligonucléotides aléatoires. Le fragment Klenow synthétise un brin complémentaire d'ADN en utilisant l'extrémité 3'OH des oligonucléotides aléatoires qui servent d'amorces. Ainsi, lors de la synthèse, les dUTP marqués sont incorporés dans le nouveau brin d'ADN complémentaire. La réaction de marquage se divise en cinq étapes : 1) Mettre 1 µg d'ADN dans 16 µl d'eau distillée déionisée. 2) Dénaturer l'ADN en chauffant dans de l'eau bouillante pendant 10 min et refroidir dans un bain glace/éthanol. 3) Ajouter 4 µl de DIG-High Prime (composé des oligonucléotides aléatoires, du fragment Klenow, des DIG-11-dUTP, des dATP, dCTP, dGTP, dTTP et d'un tampon concentré en glycérol 50% (v/v)), mélanger et centrifuger brièvement. 4) Incuber 20 h à 37°C (Rosi 1000, Thermolyne). 5) Arrêter la réaction en chauffant 10 min à 65°C.

## 9. Extraction et purification de l'ADN génomique de *C. albicans* LAM-1

Le *C. albicans* LAM-1 a été cultivé sur un Pétri de YPD contenant du chloramphénicol (50 µg/ml) (voir section 13) à 37°C pendant 16 h. Il a ensuite été repiqué dans 50 ml de YPD liquide (voir section 13). Cette culture est incubée à 37°C, sous agitation constante (200 rpm) (Rosi 1000, Thermolyne) pendant 16 h. Suite à la croissance, un décompte à l'hémacytomètre est fait et la solution est diluée pour d'obtenir  $3 \times 10^8$  cellules/ml. Le Qiagen Genomic-tip 20/G (Qiagen) a été utilisé pour extraire et purifier l'ADN génomique de *C. albicans* LAM-1. Cette trousse est basée sur l'utilisation de plusieurs tampons permettant la lyse des cellules et/ou du noyau. Suite à cette étape, l'ADN génomique se lie à la résine échangeuse d'ions, contenue dans les colonnes Genomic-tip 20/G, grâce à l'utilisation de solutions à faible concentration en sels. Les lavages subséquents, effectués avec des solutions contenant des concentrations intermédiaires de sels, permettent l'élimination de l'ARN, des protéines et des impuretés de faible poids moléculaire. L'ADN génomique est finalement élué dans une solution à haute teneur en sels. Ces sels sont retirés suite à une étape de précipitation à l'isopropanol. Le protocole a été effectué tel que décrit par le manufacturier.

## 10. Digestion de l'ADN génomique de *C. albicans* LAM-1, transfert de Southern, hybridation et détection

Une hybridation par la méthode de Southern a été effectuée dans le but de déterminer si les sondes marquées à la DIG reconnaissent une séquence de *C. albicans* LAM-1.

Une partie de l'ADN génomique purifié de *C. albicans* LAM-1 a été digérée avec l'enzyme de restriction *Bam*HI (Gibco BRL, Life Technologies) tandis que l'autre partie a subi une digestion avec l'enzyme *Hind*III (Gibco BRL, Life Technologies). Les digestions ont été effectuées selon les protocoles du fabricant. Suite à ces digestions, 1 µg d'ADN digéré avec chaque enzyme a été chargé, côte à côte, sur un gel d'agarose (Gibco, BRL, Life Technologies) à 0.6%. Ainsi, le premier puits contenait l'ADN

génomique digéré avec *BamHI*, le deuxième l'ADN génomique digéré avec *HindIII* et le troisième puits contenait le fragment d'ADN d'intérêt (non-marqué à la DIG, voir section 8.1) servant de témoin positif pour la sonde marquée à la dig correspondante, lors du transfert de Southern. La migration a été effectuée pendant 16 h à 37 volts. Par la suite, un Southern a été effectué sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche) selon le protocole suivant :

- 1) Prendre une photo du gel (Multi Image™ Light Cabinet et Alpha Imager™ 2200, Canberra Packard Canada).
- 2) Couper les parties inutiles du gel, ainsi que le coin gauche au bas du gel, à l'aide d'une lame de rasoir. Mesurer les dimensions du gel.
- 3) Faire tremper le gel 45 min sous agitation constante (Orbit shaker, Lab-line instruments) à température pièce, dans plusieurs volumes de NaCl 1.5M, NaOH 0.5N.
- 4) Rincer brièvement le gel dans de ddH<sub>2</sub>O et transférer le gel dans plusieurs volumes de Tris 1M (pH 7.4), NaCl 1.5M. Laisser tremper 30 min sous agitation constante (Orbit shaker, Lab-line instruments) à température pièce. Suite à cette incubation, remplacer la solution par une solution de Tris 1M (pH 7.4), NaCl 1.5M fraîche et continuer l'incubation pendant 15 min.

Pendant les incubations :

- Couper un morceau de membrane de nylon chargée positivement (Boehringer Mannheim) et 4 papiers de buvardage (Blotting paper VWR brand grade 238, VWR Scientific) de la même dimension que le gel.
- Couper le coin gauche au bas de la membrane.
  
- Faire tremper deux papiers de buvardage et la membrane dans du 2X SSC (50 ml de 20X SSC dans 450 ml ddH<sub>2</sub>O) environ 15 min.
- Couper des papiers absorbants de la même grosseur que le gel.

- 5) Dans un plateau, placer un papier de buvardage de plus grande dimension que le gel et placer sur celui-ci deux des papiers de buvardage coupés précédemment. Ajouter du 20X SSC pour que les papiers soient imbibés de la solution.

20X SSC :

- 3M NaCl (Fisher)
- 0.3M citrate de sodium (Gibco BRL, Life Technologies)
- Ajuster le pH à 7.0 avec du NaOH 10N (Sigma)

- 6) Sortir le gel de la solution de Tris 1M (pH 7.4), NaCl 1.5M, l'inverser puis, le placer (centré sur les papiers de buvardage) sur le montage et enlever les bulles d'air.
- 7) Placer de la Parafilm (American National Can.) tout le tour du gel et placer la membrane imbibée de 2X SSC sur le gel, en alignant les coins coupés. Enlever les bulles d'air.
- 8) Déposer les deux autres papiers de buvardage, pré-trempés dans le 2X SSC, sur la membrane et enlever les bulles d'air.
- 9) Placer des papiers absorbants sur les deux papiers de buvardage et appliquer un poids (500 g) sur le montage.
- 10) Laisser transférer 4 h, en remplaçant les papiers absorbants au besoin.
- 11) Défaire le montage et fixer l'ADN sur la membrane avec le U.V. Stratalinker 1800 (Stratagene) (s'assurer de placer l'ADN vers le haut). La membrane peut ainsi être conservée à température pièce.

Par la suite, cette membrane a subi une préhybridation ainsi qu'une hybridation avec les sondes marquées à la DIG selon le procédé proposé par le manufacturier (tel

que décrit dans le manuel du DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II, Roche).

Finalement, les sondes ont été détectées grâce au Detection Starter Kit II (Roche) selon le protocole du fabricant. Cette trousse qui utilise la détection par chimiluminescence, décèle un signal lumineux produit au site d'hybridation de la sonde. Ainsi, ce processus se résume en trois étapes : 1) La membrane est traitée avec le Blocking reagent (Roche) pour prévenir toute liaison non-spécifique. 2) Par la suite, la membrane est incubée dans une solution contenant un anticorps (Anti-Dioxigenin Fab Fragment, Roche) qui est conjugué à la phosphatase alcaline. 3) La membrane sur laquelle on retrouve la sonde et l'anticorps liés est mise en contact avec un substrat chimiluminescent (CSPD, Roche). Les résultats peuvent être visualisés suite à une exposition de la membrane en présence d'un film à rayons X (Fuji Medical X-ray film Super RX, Kodak X-omatic Cassette) qui détectera le signal chimiluminescent.

#### **11. RT-PCR effectué sur l'ARN de *C. albicans* LAM-1 provenant des cavités orale et vaginale des souris C3H et purification des produits de RT-PCR**

Les calculs effectués précédemment (voir section 3) nous ont permis de déterminer le nombre de cellules de *C. albicans* LAM-1 retrouvées dans chaque groupe (voir section 4). Il est donc possible d'ajuster le nombre de cellules de départ, pour chacun de ces groupes, à 2900. Ainsi, un RT-PCR est fait sur l'ARN provenant de ces groupes « ajustés », à l'aide d'amorces de 20 nucléotides, correspondants aux extrémités des fragments d'intérêt des clones positifs au Southern.

##### *Transcription inverse*

- 2 µl de 10X RT buffer (Qiagen)
- 2 µl de dNTP mix (5mM de chacun des dNTP) (Qiagen)
- 1 µl d'amorces 3' (10µM) (AlphaDNA)
- 1 µl d'amorces 5' (10µM) (AlphaDNA)
- 1 µl de RNase Out RNase inhibitor (10 U/µl) (Gibco BRL, Life Technologies)
- 1 µl de Sensiscript reverse transcriptase (Qiagen)

- 10.2 µl d'eau RNase-free (Qiagen)  
18.2 µl (volume total)

À ce 18.2 µl, ajouter 1.8 µl d'ARN et placer 1 h à 37°C dans le GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin Elmer).

Le témoin négatif contient de l'eau au lieu de l'ARN, en présence des amorces d'*EFBI* (AlphaDNA) (voir page suivante). Le témoin positif contient de l'ARN et les amorces d'*EFBI*.

#### *PCR*

- 62.5 µl de ddH<sub>2</sub>O stérilisée
- 10 µl de 10X PCR buffer (Qiagen)
- 3 µl de dNTP mix (10mM de chacun des dNTP) (Amersham Pharmacia)
- 2 µl d'amorces 3' (30nmole/ml (AlphaDNA)
- 2 µl d'amorces 5' (30nmole/ml (AlphaDNA)
- 0.5 µl de Taq DNA polymerase (5 U/µl) (Qiagen)
- 20 µl de produits de RT  
100 µl (volume total)

Placer les tubes dans l'appareil GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin Elmer). Le PCR a été effectué selon les conditions suivantes:

- 3 min à 94°C
- 35 Cycles:
  - 30 sec à 94°C
  - 30 sec à 55°C
  - 1 min à 72°C
- 10 min à 72°C
- 4°C à l'infini

Les mêmes témoins, négatif et positif, que le RT ont été utilisés.

*Séquences nucléotidiques des amorces*

- D23A-5: 3' : 5' GCCGGACTTCCCGTACGACT 3'  
5' : 5' GAATCCGGTTAAAATTCCGG 3'
- D26A-7: 3' : 5' CACAAACTTGAAACACATTC 3'  
5' : 5' GATGAAGCCAACGATAAAAAG 3'
- D27A-3: 3' : 5' GCCGACTTCCCTTATCTACA 3'  
5' : 5' CGGCAACGTAACCTGAATGTG 3'
- *EFBI*: 3' : 5' CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG 3'  
5' : 5' ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC 3'

Par la suite, les produits de RT-PCR ont été concentrés avec les Amicon<sup>®</sup> Microcon<sup>®</sup>-PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore) selon le protocole du manufacturier.

## **12. Transfert de Southern des produits de RT-PCR, hybridation et détection**

Les produits de RT-PCR concentrés ont été chargés sur un gel d'agarose (GibcoBRL, Life Technologies) à 1.5%. La migration a été effectuée à 25 volts pendant 16 h. Suite à la migration, un transfert de Southern a été effectué (voir section 10), suivi d'une hybridation avec les sondes marquées à la DIG, selon les conditions recommandées par le fabricant. L'hybridation a été mise en évidence grâce au processus de détection décrit à la section 10. Les membranes ont été exposées (18 h) dans une cassette (Kodak X-omatic Cassette) en présence d'un film (Fuji Medical X-ray Film Super RX) et ce dernier a été développé dans le Mini-Med/90 X-Ray Film Processor (Picker). Finalement, les résultats obtenus sur les films ont été analysés à l'aide de l'appareil MultiImage<sup>™</sup> Light Cabinet et du Alpha Imager<sup>™</sup> 2200 (Canberra Packard Canada).

### 13. Préparation des milieux de culture

#### *SDB*

- À 800 ml ddH<sub>2</sub>O, ajouter 65 g de Sabouraud dextrose broth (Difco)
- Compléter à 1000 ml avec ddH<sub>2</sub>O
- Autoclaver 20 min

#### *SDA + chloramphénicol (50 µg/ml)*

- À 800 ml ddH<sub>2</sub>O, ajouter 65 g de Sabouraud dextrose agar (BBL)
- Compléter à 1000 ml avec ddH<sub>2</sub>O
- Autoclaver 20 min
- Laisser refroidir à 50°C et ajouter 1.5 ml de chloramphénicol (34 mg/ml)

#### Solution de chloramphénicol (34 mg/ml)

- À 15 ml d'éthanol 100%, ajouter 510 mg de chloramphénicol (Sigma)

#### *LB + ampicilline (50 µg/ml) + tétracycline (15 µg/ml)*

- À 900 ml ddH<sub>2</sub>O ajouter:
- 10 g de bacto tryptone (Difco)
- 5 g de bacto yeast extract (Difco)
- 10 g de NaCl (Fisher)
- Ajuster le pH à 7.0 avec du NaOH 5N (Sigma)
- Compléter le volume à 1000 ml avec ddH<sub>2</sub>O
- Stériliser 20 min à l'autoclave
- Laisser refroidir à 50°C et ajouter 1 ml d'ampicilline (50 mg/ml) et 3 ml de tétracycline (5 mg/ml)

#### Solution d'ampicilline (50 mg/ml)

- Dissoudre 0.5 g d'ampicilline (Roche) dans 6 ml ddH<sub>2</sub>O
- Compléter le volume à 10 ml avec ddH<sub>2</sub>O et stériliser par filtration, avec un filtre de 0.22 micron (Millipore)

Solution de tétracycline (5 mg/ml)

- Dissoudre 0.05 g de tétracycline (Sigma) dans 10 ml d'éthanol 100%

*Pétri YPD + Chloramphénicol (50 µg/ml)*

- À 800 ml ddH<sub>2</sub>O ajouter :
- 10 g de bacto yeast extract (Difco)
- 20 g de bacto peptone (Difco)
- 20 g de dextrose (BDH)
- 20 g d'agar (Difco)
- Ajuster le volume à 1000 ml
- Autoclaver 20 min
- Laisser refroidir à 50°C et ajouter 1.5 ml de chloramphénicol (34 mg/ml)

*YPD liquide*

- À 800 ml ddH<sub>2</sub>O ajouter:
- 10 g de bacto yeast extract (Difco)
- 20 g de bacto peptone (Difco)
- 20 g de dextrose (BDH)
- Ajuster le volume à 1000 ml
- Autoclaver 20 min

## 14. Préparation des solutions

### *PBS 10mM*

- 1.8mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$  (Fisher)
- 8.4mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$  (BDH)
- 15mM NaCl (Fisher)
- Ajuster le pH avec du NaOH (Sigma)

### *Solution de Ringer additionnée de citrate de sodium*

#### Solution de Ringer 100%

- 38.5mM NaCl (Fisher)
- 1.4mM KCl (J.T. Baker Chemicals)
- 0.81mM  $\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$  (Fisher)
- 0.6mM  $\text{NaHCO}_3$  (Fisher)

Diluer la solution de Ringer 100% pour obtenir une solution de 25% et ajouter 1% de citrate de sodium (w/v) (Gibco BRL, Life Technologies). Autoclaver 20 min.

### *Solution 5% Tween 20, 5% NP-40 et 5% Triton X-100*

#### Mélanger:

- 2.5 ml de Tween 20 (Fisher)
- 2.5 ml de NP-40 (Biopharm)
- 2.5 ml de Triton X-100 (J.T. Baker Chemicals)
- 42.5 ml ddH<sub>2</sub>O

*TBE 10X*

Pour 1000 ml:

- 1M de Tris base (Roche)
- 0.83M d'Acide borique (Amersham Pharmacia)
- Ajouter 40 ml de EDTA 0.5 M (pH8.0) (American Chemicals LTD)

*TBE 5X*

- Diluer TBE 10X : mélanger 250 ml de TBE 10X avec 250 ml ddH<sub>2</sub>O

*TBE 1X*

- Diluer TBE 10X : mélanger 50 ml de TBE 10X avec 450 ml ddH<sub>2</sub>O

*Tampon de séquençage 2.5X*

- Dans 400 ml ddH<sub>2</sub>O dissoudre:
- 0.2M Tris base (Roche)
- Ajuster le pH à 9.0 avec du HCl (BDH)
- 5mM MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O (Biopharm)

*TE 1X pH 7.8*

- 10mM Tris HCl (pH 7.8)
- 1mM EDTA (pH 8.0)

*Acétate de sodium 3M, pH 5.2*

- 3M NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>•3H<sub>2</sub>O (Biopharm)
- Ajuster le pH à 5.2 avec de l'acide acétique glacial (American Chemicals LTD)

## **RÉSULTATS**

## RÉSULTATS

### 1. Cinétique de l'infection

Dix souris ont été inoculées au niveau buccal et dix autres au niveau vaginal avec *C. albicans* LAM-1 (blastospores). Le décompte des CFU de *C. albicans* provenant de ces deux sites, à différents moments de l'infection, a permis d'établir la cinétique d'infection orale et vaginale. Au niveau de la cavité buccale, le déroulement de l'infection était semblable chez toutes les souris (Figure 4A). En effet, les souris ont présenté une augmentation du nombre de CFU et un pic d'infection situé en majorité entre 36 h et 48 h. Par la suite, une diminution du nombre de CFU est notée et, au jour 8, le *C. albicans* a été éliminé de la cavité buccale de toutes les souris. Au niveau vaginal, la cinétique de l'infection était plus variable, mais le *C. albicans* a également été uniformément éliminé huit jours après l'inoculation (Figure 4B). Ainsi, les cinétiques d'infection obtenues suite à l'infection buccale et, chez certaines souris lors de l'infection vaginale, ont révélé la présence d'un pic d'infection à 36 h. C'est donc ce point qui a été étudié de façon approfondie grâce au DDRT-PCR (voir section 2).

La morphologie cellulaire de *C. albicans* LAM-1 a été observée sur des états frais, provenant des échantillonnages oraux et vaginaux effectués 36 h après l'inoculation des souris. La forme levure (70%) ainsi que la forme filamenteuse (30%) ont été retrouvées dans toutes nos observations.

### 2. DDRT-PCR

Un DDRT-PCR a été effectué sur l'ARN total de *C. albicans* LAM-1 provenant des cavités buccale et vaginale des souris, dans le but d'identifier des gènes exprimés différemment (entre ces deux sites), dont certains pourraient être impliqués dans la virulence de la levure. Pour ce faire, quatre amorces oligo(dT) ancrées ont été combinées à cinq amorces arbitraires (AP-1 à AP-5). Le patron des bandes obtenu sur gel, suite au DDRT-PCR, a été comparé entre les sites d'infection buccal et vaginal

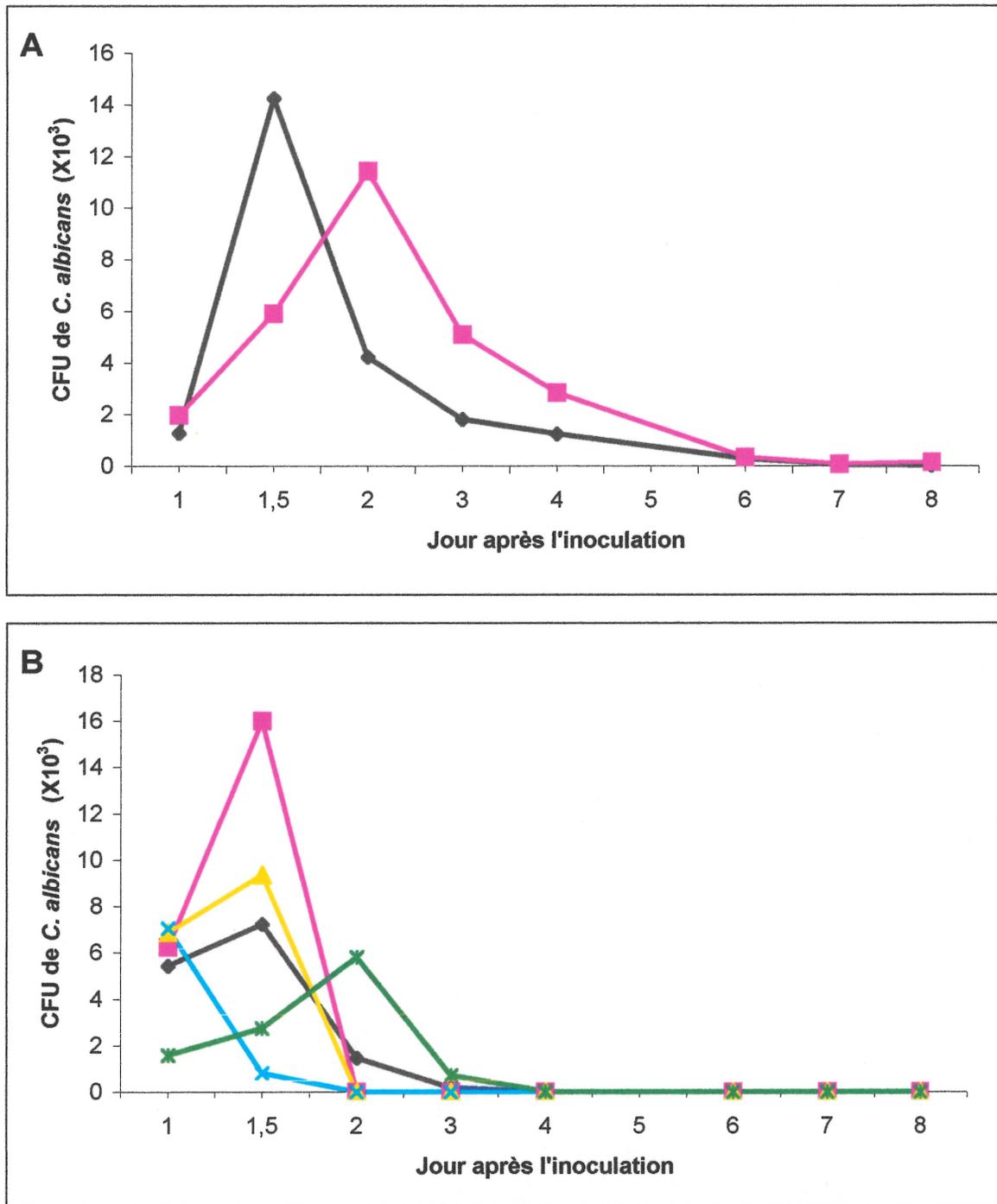


Figure 4: Décompte du nombre de CFU de *C. albicans* LAM-1 récolté chez des souris C3H. A) Au niveau buccal, l'ARN de *C. albicans* provenant de deux souris (au jour 1,5) a été combiné pour effectuer le DDRT-PCR (trait noir) et l'ARN de trois autres souris a été regroupé pour le RT-PCR (trait rose) (voir section 6) chacun des points représente la moyenne des observations provenant des souris individuelles. B) Au niveau vaginal, l'ARN de *C. albicans* provenant de quatre souris a été combiné pour le DDRT-PCR (au jour 1,5) (trait noir; chacun des points représente la moyenne des observations des quatres souris). L'ARN de *C. albicans* provenant de ces quatre mêmes souris a été utilisé individuellement pour le RT-PCR (traits bleu, jaune, rose et vert) (voir section 6).

(Figure 5, résultats partiels). L'expression différentielle a été confirmée grâce à un deuxième PCR effectué sur l'ADNc obtenu suite au premier DDRT.

En parallèle, un DDRT-PCR a été fait sur des échantillons récoltés au niveau des cavités buccale et vaginale, chez des souris non-inoculées avec *C. albicans* LAM-1. Ces résultats ont servi de témoin négatif, tout en permettant l'élimination de bandes présentes chez toutes les souris.

Les bandes différentielles ont été sélectionnées selon trois critères: elles devaient être 1) présentes seulement au niveau buccal ou au niveau vaginal, 2) retrouvées suite à un deuxième PCR et 3) absentes des résultats de DDRT-PCR chez les souris non-inoculées. Grâce à ces comparaisons, 33 bandes différentielles ont été identifiées. Parmi celles-ci, deux bandes ont été identifiées exclusivement lors de l'infection buccale, alors que 31 ont été obtenues seulement lors de l'infection vaginale.

### 3. Clonage et digestions enzymatiques

Les 33 bandes différentielles ont été coupées du gel, éluées, réamplifiées par PCR et clonées dans le vecteur pSTBlue-1. Pour chacune de ces bandes, cinq clones ont été sélectionnés au hasard pour l'analyse par digestion. Ces cinq clones ont été digérés avec l'enzyme de restriction *EcoRI* (résultats non-inclus). Cette digestion a permis d'extraire le fragment d'intérêt du vecteur, confirmant que les fragments attendus sont présents et qu'ils correspondent à la longueur prévue suite au DDRT-PCR (fragments entre 250 et 650 pb).

En parallèle, une digestion avec l'enzyme *AluI* a été effectuée dans le but de comparer les cinq clones entre eux. Cette digestion a permis d'identifier les clones semblables (Figure 6). Les cinq premiers puits contiennent les produits de digestion de différents clones provenant d'un même fragment. On constate que les clones retrouvés dans les puits 1, 2 et 4 sont distincts puisque le patron des bandes obtenu est différent pour chacun des clones. Étant donné que ces clones sont divergents, ils seront tous les

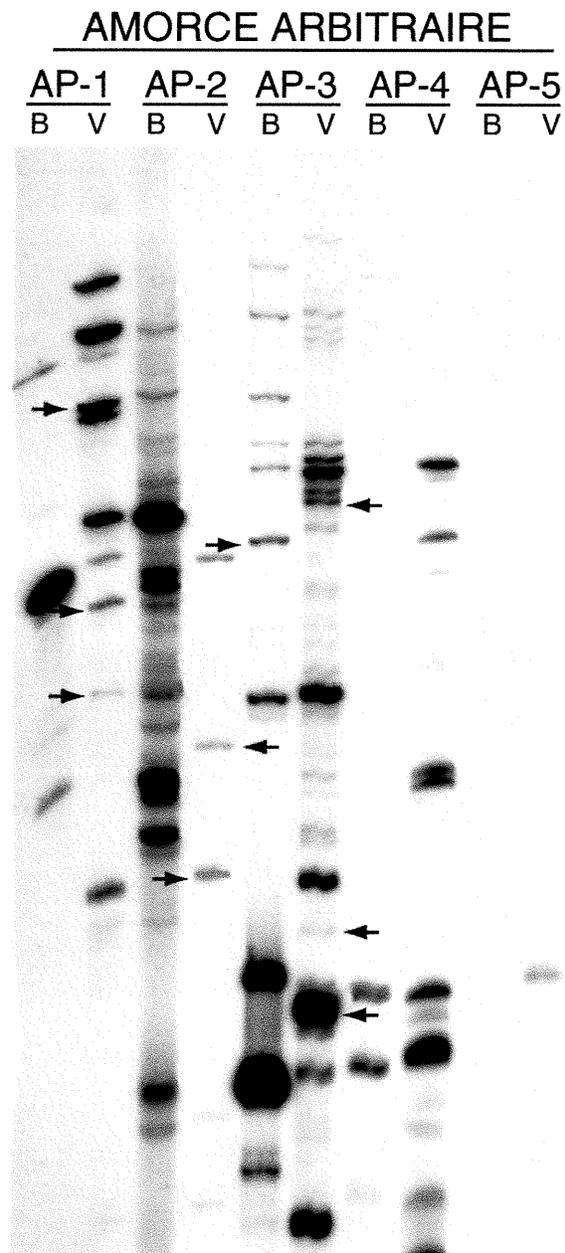


Figure 5: Résultats partiels du DDRT-PCR, effectué à l'aide de l'amorce oligo(dT)  $T_{12}$  MG et aux amorces arbitraires AP-1 à AP-5, sur l'ARN provenant des cavités buccale (B) et vaginale (V) des souris C3H. Les bandes différentielles sont identifiées par une flèche. La migration a été poursuivie jusqu'à ce que le xylène cyanol se retrouve au bas du gel. Les bandes retrouvées sur le gel correspondent à des fragments d'ADN  $\geq 200$  pb.

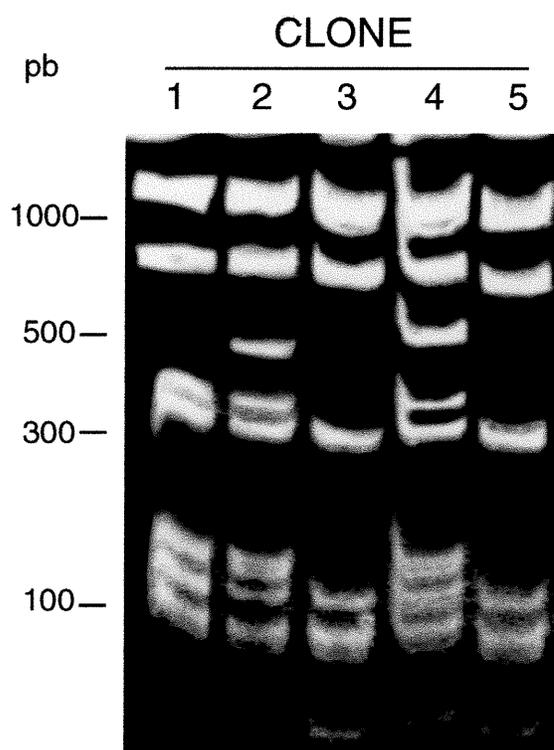


Figure 6: Produits de digestion obtenus avec l'enzyme Alul (gel de polyacrylamide 12%). Les cinq puits représentent cinq clones provenant d'une même bande différentielle.

trois séquencés. Par contre, si on compare les puits 3 et 5, on remarque que le patron de digestion obtenu est identique dans les deux pistes. Ceci confirme la similitude des deux clones. Par conséquent, seulement un de ces deux clones, sélectionné au hasard, sera séquencé. Cette étape de digestion, avec l'enzyme de restriction *AluI*, évite le séquençage de clones semblables. Ainsi, 85 clones ont été choisis pour le séquençage.

#### 4. Séquençage

Quatre-vingt-cinq clones ont été séquencés avec l'appareil ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Suite au séquençage, des recherches ont été effectuées dans GenBank à partir des séquences nucléotidiques obtenues et des séquences d'acides aminés déduites. Trente-cinq fragments ont été retenus en fonction de la longueur significative des clones et d'un pourcentage d'homologie variant entre 48 et 95% avec des séquences connues chez les micro-organismes, les plantes ou les mammifères. Ces 35 fragments provenaient des deux bandes exprimées différemment au niveau buccal, suite au DDRT-PCR, et de 20 des 31 bandes identifiées au niveau vaginal.

#### 5. Analyse de Southern sur l'ADN génomique de *C. albicans* LAM-1

Les échantillons de *C. albicans* récoltés chez les souris ont été traités avec une solution de 5% Tween 20/NP-40/Triton X-100. Ceci permet l'élimination des cellules épithéliales et des bactéries provenant des souris puisque ces dernières sont sensibles à ce traitement, contrairement à *C. albicans*. Malgré ces précautions, nous avons quand même retrouvé une quantité d'ADNc séquencé codant pour l'ARNm de souris et de bactéries plutôt que pour celui de *C. albicans*. Ainsi, pour s'assurer que les 35 fragments séquencés, qui révèlent des résultats significatifs, appartiennent au *C. albicans*, un transfert de Southern a été effectué sur l'ADN génomique de *C. albicans* digéré avec *BamHI* ou *HindIII*, en utilisant 35 sondes marquées à la DIG spécifiques aux 35 fragments d'intérêt. La figure 7 montre une partie des résultats obtenus suite au transfert de Southern. On remarque que la sonde D27A-3 se lie à l'ADN génomique de *C. albicans* tandis que la sonde D25A-1 n'a pas d'homologie avec le champignon. Suite

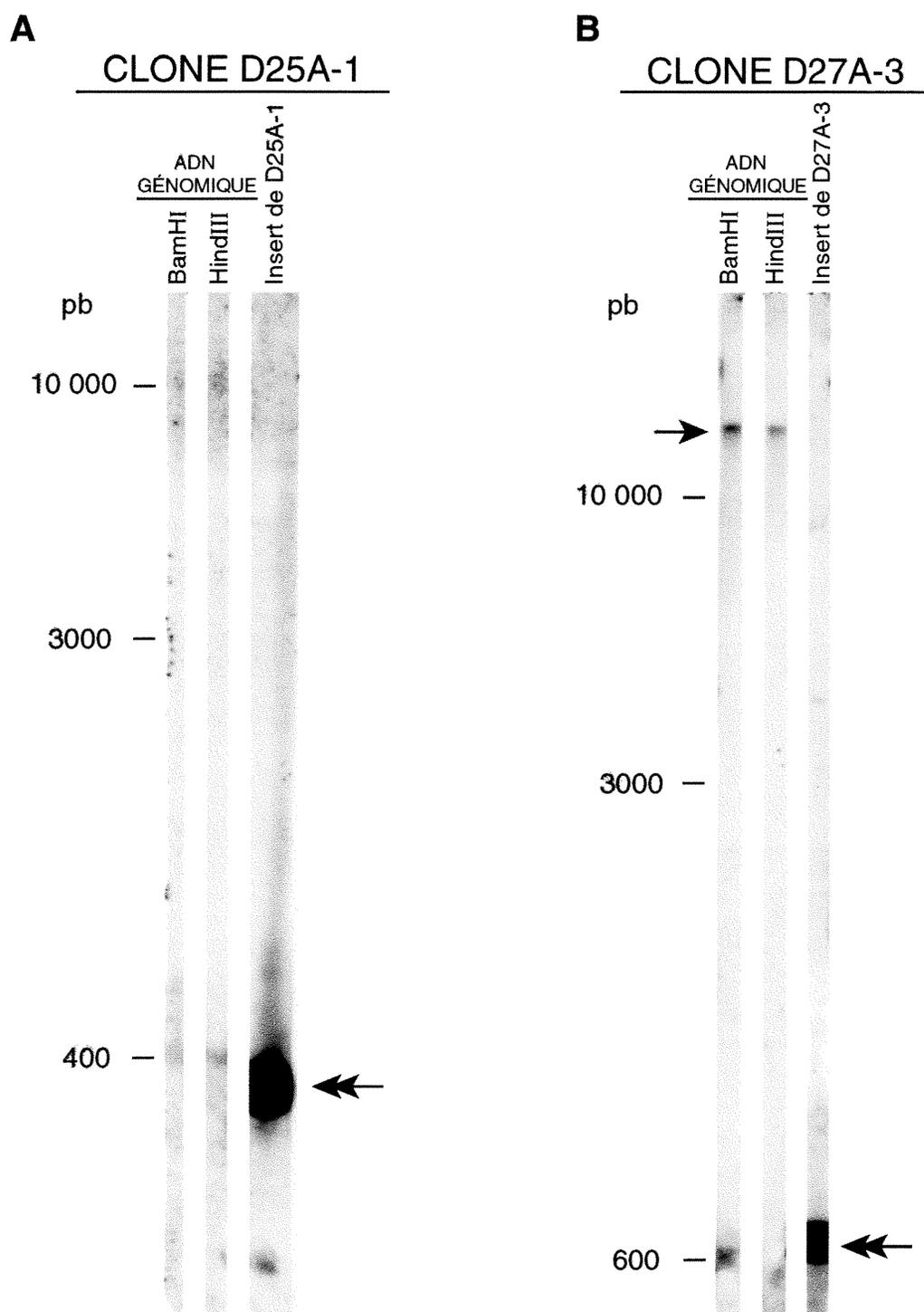


Figure 7: Résultats de l'analyse de Southern, pour les clones D25A-1 et D27A-3, effectuée sur l'ADN génomique de *C. albicans* LAM-1 digéré avec les enzymes BamHI et HindIII. La flèche simple identifie la sonde liée à l'ADN génomique digéré, tandis que la double flèche identifie le témoin positif, soit la sonde liée à elle-même.

à cette analyse, trois sondes se sont avérées positives (D23A-5, D26A-7, D27A-3) en démontrant une homologie avec *C. albicans* LAM-1. La figure 8 montre les séquences des clones D23A-5, D26A-7 et D27A-3 ainsi que les résultats obtenus suite aux recherches dans GenBank. Puisque les séquences nucléotidiques de D23A-5 et D27A-3 se sont avérées similaires à 93%, D27A-3 a donc servi *de facto* de témoin interne lors de l'analyse de l'expression différentielle. En effet, nous avons décidé d'utiliser une deuxième paire d'amorces pour D27A-3 lors du RT-PCR effectué dans le but de déterminer l'expression différentielle des gènes (voir section 6). De cette façon, les résultats obtenus avec D27A-3 permettent une confirmation indépendante de l'expression différentielle de D23A-5. À noter que les différences obtenues entre les séquences nucléotidiques de D23A-5 et D27A-3 sont dues à des erreurs lors du séquençage automatique. Ainsi, suite au Southern effectué sur l'ADN génomique de *C. albicans*, D23A-5 et D27A-3 ont présenté des résultats identiques.

## 6. Expression différentielle

La plupart des chercheurs confirment l'expression différentielle des gènes grâce à l'analyse de Northern, qui consiste à utiliser l'ADNc des bandes différentielles comme sondes dirigées contre les échantillons d'ARN originaux. Cette technique est efficace mais nécessite une grande quantité d'ARN. Dans notre cas, la quantité d'ARN est limitée et une méthode alternative est donc utilisée. Cette dernière consiste à effectuer un RT-PCR, à l'aide d'amorces correspondants aux extrémités du fragment d'intérêt, sur l'ARN de départ. Ainsi, pour éviter de biaiser les résultats, le nombre de cellules de départ de *C. albicans* LAM-1 a été ajusté à 2900, pour les échantillons buccaux et vaginaux. Par conséquent, les cellules provenant de trois souris ont été combinées au niveau oral. Au niveau vaginal, les cellules n'ont pas été regroupées et le nombre de cellules provenant de trois souris individuelles a été ajusté et utilisé séparément pour l'analyse. Le RT-PCR a donc été effectué sur l'ARN provenant de ces « groupes ajustés ». Cette étape est suivie d'une migration des produits de RT-PCR sur un gel d'agarose et d'un transfert de Southern. Finalement, des sondes spécifiques marquées à la DIG sont dirigées contre les produits de RT-PCR retrouvés sur la

A

sp|P12989|ATPF\_VIBAL ATP SYNTHASE B CHAIN >gi|79237|pir||S06078 H<sup>+</sup>-transporting ATP  
 synthase (EC 3.6.1.34) chain b - *Vibrio alginolyticus*  
 >gi|581814|emb|CAA34177| (X16050) uncF (AA 1-156)  
 [*Vibrio alginolyticus*]

D26A-7 2 ASEKGKEFIDQANKKGGKELLDEANDKSKXFLXEARKELNHLEXEGONLLSQFVAVVKSTA 181  
 A ++ +A + E++++AN + L EAR+E + E Q +L+Q A +++

*V. alginolyticus* 57 AQANASDQLKEAKRTATEIIEQANKRKSQILDEAREE---AQAERQKILAQAEELEAER 113

D26A-7 182 NSIGQSLNKAGAELQLATSAAVSRTSVE 265  
 N L K A L +A + + S++

*V. alginolyticus* 114 NRARDDLRLKQVATLAVAGAEEKILERSID 141

Figure 8A : Similarité entre les séquences d'acides aminés du clone D26A-7 et de « H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase chain b » de *V. alginolyticus*

gb|L28817.1|YSARRE *Candida albicans* internal transcribed spacer 1 (ITS1); 5.8S ribosomal RNA; internal transcribed spacer 2 (ITS2)  
Length = 4025

D23A-5/ D27A-3: 7 cgaaggggaatccggttaaaattccggaacttggatatggattcttcacggcaacgtaac 66  
|||||  
ITS1: 2251 cgaaggggaatccggttaaaattccggaacttggatatggattcttcacggcaacgtaac 2310

D23A-5/ D27A-3: 67 tgaatgtggagaentcggcgtgagccctgggaggagtattctttcttcttaacagctta 126  
|||||  
ITS1: 2311 tgaatgtggagacgtcggcgtgagccctgggaggagtattctttcttcttaacagctta 2370

D23A-5/ D27A-3: 127 tcaccctggaattggtttatccggagatggggtcttatggctggaagagcgggtaattt 186  
|||||  
ITS1: 2371 tcaccctggaattggtttatccggagatggggtcttatggctggaagagcgggtaattt 2430

D23A-5/ D27A-3: 187 tgcccggtccgggtgcgcttaacnaccggtccttgaataatccacaggaanggaalagltttca 246  
|||||  
ITS1: 2431 tgcccggtccgggtgcgcttaacnaccggtccttgaataatccacaggaanggaalagltttca 2489

D23A-5/ D27A-3: 247 tgcccaagtctactcataacc 268  
|||  
ITS1: 2490 tg-ccaagtctactcataacc 2510

emb|Z73326|SCYLR154C *S.cerevisiae* chromosome XII reading frame ORF YLR154c  
Length = 12591

D23A-5/ D27A-3: 3 cgaaggggaatccggttaaaattccggaacttggatatggattcttcacggcaacgtanc 62  
|||||  
ORF YLR154c: 6022 cgaaggggaatccggttaagattccggaacctggatatggattcttcacggtaacgtaac 5963

D23A-5/ D27A-3: 63 tgaatgtggagaenttgcntgagccctggnggagttatctttcttcttaacagctta 122  
|||||  
ORF YLR154c: 5962 tgaatgtggagacgtcggcgcgagccctgggaggagtattctttcttcttaacagctta 5903

D23A-5/ D27A-3: 123 tcaccctggaattggtttatccgnanattggggtcttatggctggaanagcgggtaattt 182  
|||||  
ORF YLR154c: 5902 tcaccctggaattggtttatccggagatggggtcttatggctggaanagcgggtaattt 5843

D23A-5/ D27A-3: 183 tgcccggtccgggtgcgcttaacnaccggtccttgaataatccacaggaaggaatagttttcat 242  
|||||  
ORF YLR154c: 5842 tgctggctccgggtgcgcttgcgacggcccgtaataatccacaggaaggaatagttttcat 5783

D23A-5/ D27A-3: 243 gccagtcgtactcatannccancaggtctccaaggttaacagcctctanctgatagaa 302  
|||  
ORF YLR154c: 5782 gccaggtcgtactgataaccgcagcaggtctccaaggtgaacagcctctagttgatagaa 5723

D23A-5/ D27A-3: 303 naat 306  
|||  
ORF YLR154c: 5722 taat 5719

emb|X06413|SCMET3 Yeast MET3 gene for ATP sulphurylase

D23A-5/ D27A-3: 3 cgaaggggaatccggttaaaattccggaacttggatatggattcttcacggcaacgtanc 62  
|||||  
MET3: 57 cgaaggggaatccggttaagattccggaacctggatatggattcttcacggtaacgtaac 116

D23A-5/ D27A-3: 63 tgaatgtggagaenttgcntgagccctggnggagttatctttcttcttaacagctta 122  
|||||  
MET3: 117 tgaatgtggagacgtcggcgcgagcc-tgggaggagtattctttcttcttaacagctta 175

D23A-5/ D27A-3: 123 tcaccctggaattggtttatccgnanattggggtcttatggctggaanagcgggtaattt 182  
|||||  
MET3: 176 tcaccctggaattggtttatccggagatggggtcttatggctggaanagcgggtaattt 235

D23A-5/ D27A-3: 183 tgcccggtccgggtgcgcttaacnaccggtccttgaataatccacaggaaggaatagttttcat 242  
|||||  
MET3: 236 tgctggctccgggtgcgcttgcgacggcccglyaaataatccacaggaaggaatagttttcat 295

D23A-5/ D27A-3: 243 gccagtcgtactcatannccancaggtctccaaggttaacagcctctanctgatagaa 302  
|||  
MET3: 296 gccaggtcgtactgataaccgcagcaggtctccaaggtgaacagcctctagttgatagaa 355

D23A-5/ D27A-3: 303 naat 306  
|||  
MET3: 356 taat 359

Figure 8B: Homologie entre les séquences nucléotidiques du clone D23A-5/D27A-3 et le " internal transcribed spacer 1 " de *C. albicans*, le gène *MET3* de levure et le cadre de lecture ouvert (ORF YLR154c) de *S. cerevisiae*.

membrane de nylon. La méthode décrite ci-dessus est avantageuse puisqu'elle permet la détection d'une faible quantité d'ARN et nécessite peu d'ARN de départ.

Les résultats obtenus suite à l'analyse de Southern n'ont pas démontré de variation de l'expression génique à 24 h, en comparant les sites buccal et vaginal (Figure 9A). Toutefois, au jour 2, *D23A-5/D27A-3* était beaucoup plus fortement exprimé au cours de l'infection buccale comparativement à l'infection vaginale, alors que l'expression du gène *D26A-7* était presque silencieuse à ces deux sites (Figure 9). De façon générale, au niveau buccal, *D26A-7* était exprimé fortement à 24 h puis, son expression a diminué à 36 h et au jour 2 pour finalement augmenter aux jours 3 et 4 (Figure 9A). Au niveau vaginal, une faible diminution de l'expression du gène *D26A-7* a été observée entre le temps 24 h et le jour 2 (Figure 9B). Il en était de même pour le gène *D23A-5/D27A-3*.

Il est important de mentionner que les résultats obtenus suite au Southern, analysés par densitométrie, ont été normalisés avec les résultats du contrôle de quantité *EFBI* (Schaller *et al.*, 1998). Ce dernier code pour un facteur d'élongation qui est exprimé de façon constitutive. Ceci implique donc que l'expression de ce gène ne devrait pas varier au cours de la croissance active de *C. albicans*. Ainsi, *EFBI* permet de normaliser la quantité d'ARN de départ. De plus, l'utilisation de *EFBI* comme contrôle permet aussi de déterminer si l'ARN de départ a été contaminé avec de l'ADN génomique. En effet, lorsque l'ARN de ce gène est amplifié, nous nous retrouvons avec un produit de RT-PCR de 526 pb (Maneu *et al.*, 1996). D'autre part, si l'échantillon est contaminé avec de l'ADN le produit de RT-PCR obtenu aura 891 pb puisque l'ADN génomique de *EFBI* contient un intron de 365 pb.

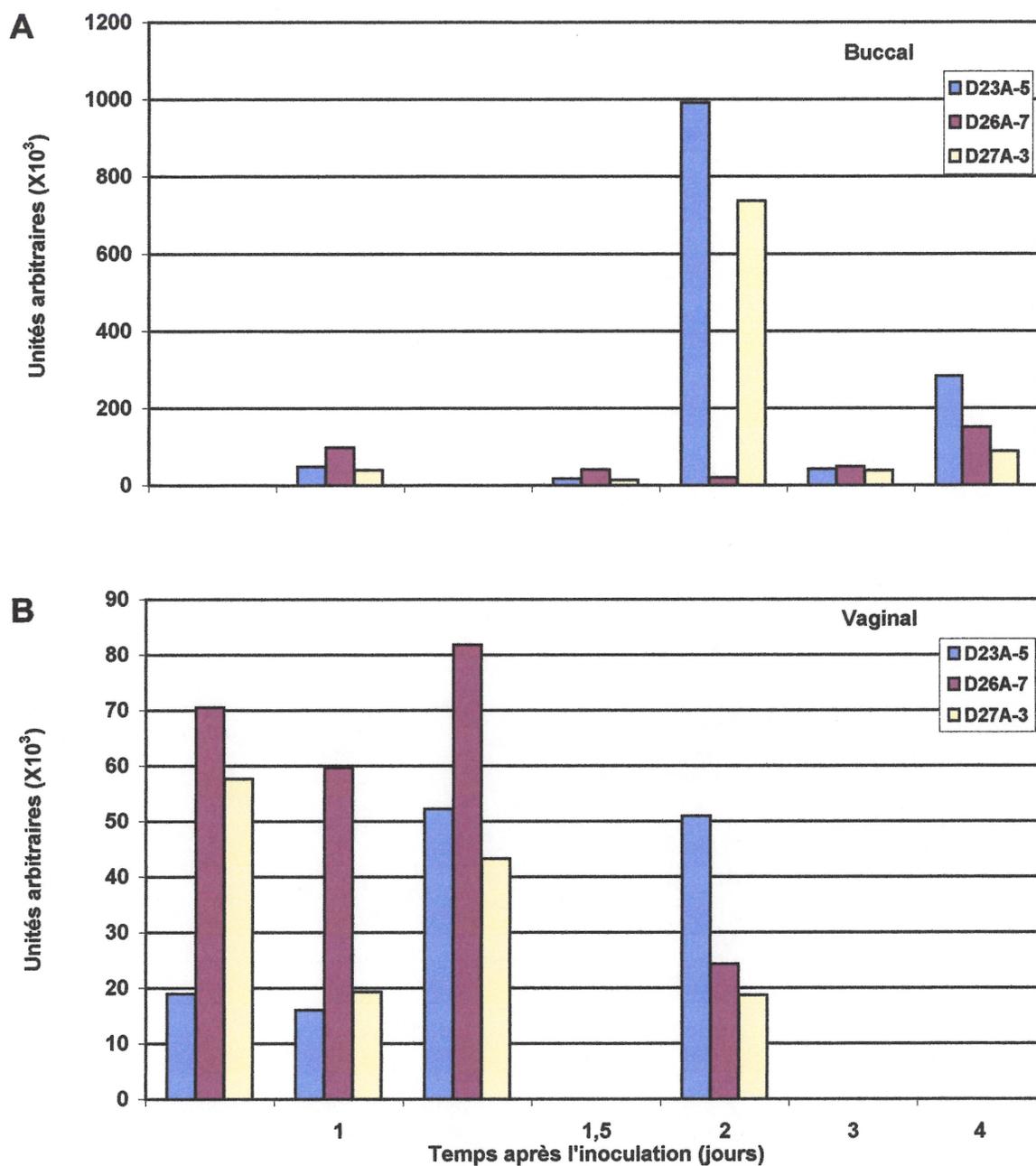


Figure 9 : Expression différentielle des gènes *D23A-5*, *D26A-7* et *D27A-3* en fonction du site et du stade temporel de l'infection, déterminée par RT-PCR. L'intensité relative des produits de RT-PCR a été quantifiée par densitométrie (exprimée en unités arbitraires) et normalisée avec le contrôle interne *EFB1* (voir section 6). Une échelle différente est utilisée pour représenter les résultats aux panneaux A et B.

## **DISCUSSION**

## DISCUSSION

Nos connaissances de l'expression différentielle des gènes reliés à la virulence de *C. albicans*, au cours de l'infection *in vivo*, demeurent très limitées. Lors de cette étude, nous avons donc établi un modèle murin d'infection buccale et vaginale avec *C. albicans* LAM-1 et comparé l'expression génique, par le *C. albicans*, à ces deux sites.

Au niveau buccal, la cinétique de la courbe d'infection confirme les résultats déjà obtenus (Lacasse *et al.*, 1990). Au niveau vaginal, la cinétique d'infection diffère d'une souris à l'autre. De façon générale, les décomptes de CFU sont moins élevés et l'infection est moins persistante que lors de l'infection buccale. Ceci pourrait être causé par une plus grande variabilité d'échantillonnage, dû au site lui-même et à la technique utilisée, servant à déterminer le nombre de CFU de la cavité vaginale comparativement à la cavité buccale.

L'expression différentielle des gènes de *C. albicans*, entre les cavités orale et vaginale, a été comparée grâce à la technique de « differential display ». Tel que prévu, cette méthode a permis la mise en évidence de plusieurs bandes différentielles (Zhao *et al.*, 1998). Un des problèmes majeurs de cette technique est la présence de faux-positifs. Ces derniers sont causés entre autres par la contamination des échantillons de *C. albicans* par des bactéries et des cellules épithéliales provenant des souris. Cette contamination entraîne donc une diminution de la spécificité de la détection de l'expression des gènes de *C. albicans* lors du DDRT-PCR. Par conséquent, nous avons voulu nous assurer que les bandes différentielles sélectionnées étaient véritablement associées au *C. albicans*. Pour ce faire, nous avons tout d'abord utilisé des détergents dans le but de détruire les cellules bactériennes et mammifères. Nous avons effectué un deuxième PCR sur les produits de RT pour nous assurer de la reproductibilité des bandes obtenues. Ainsi, seules les bandes présentes suite aux deux PCR ont été sélectionnées. De plus, un DDRT-PCR a été effectué sur des échantillons récoltés au niveau des cavités orale et vaginale de souris non-inoculées. Les résultats de ce DDRT-PCR ont été comparés aux bandes sélectionnées. De

cette façon, toutes les bandes sélectionnées retrouvées également chez les souris non-inoculées ont été rejetées, ce qui élimine un nombre considérable de faux-positifs. Donc, tel que relevé dans la littérature, la vaste majorité des bandes différentielles ont été écartées (Zhao *et al.*,1998) et nous nous sommes donc retrouvés avec 33 bandes différentielles qui ont fait l'objet d'une analyse plus approfondie.

Suite au clonage, plusieurs moyens ont été utilisés dans un ordre défini pour analyser les 165 clones provenant des clonages des bandes différentielles. Ainsi, pour limiter le nombre de réactions de séquençage, les clones ont été digérés avec l'enzyme de restriction *AluI*. Cette enzyme coupe une séquence spécifique de 4 bases : 5' AG↓CT 3'. La séquence reconnue étant courte, *AluI* coupe fréquemment l'ADN et permet l'obtention d'un profil plus complexe de fragments générés. Ainsi, en comparant les différents patrons obtenus sur gel, il est possible de sélectionner les clones divergents, ce qui évite le séquençage de clones similaires (Sturtevant, 2000). Quarante-cinq clones ont été séquencés et parmi ceux-ci, 35 ont donné des résultats significatifs suite à l'analyse dans GenBank. Un bon nombre des clones séquencés codent pour : 1) des gènes de bactéries ou de souris, 2) ont peu ou pas d'homologie avec les séquences connues de micro-organismes, de plantes ou de mammifères, 3) possèdent une séquence dont la longueur de l'homologie n'est pas significative. En effet, lors de l'étape d'excision de la bande différentielle, suite au DDRT-PCR, il peut y avoir co-purification de produits de PCR qui ont co-migré avec la bande d'intérêt, ce qui entraîne la présence de faux-positifs. Par conséquent, nous avons voulu nous assurer que les 35 clones choisis appartenaient bien au *C. albicans*. Donc, une analyse de Southern a été effectuée sur l'ADN génomique de *C. albicans* LAM-1 et trois clones (D23A-5, D26A-7, D27A-3) ont révélé une homologie avec le champignon. La comparaison des clones avec des séquences connues dans GenBank effectuée précédemment, indique que deux des clones (D23A-5 et D27A-3) sont similaires entre eux et présentent des homologies au niveau de l'ADN et ce sur toute la longueur des séquences nucléotidiques d'un « internal transcribed spacer 1 » (ITS1) de *C. albicans* (98% d'homologie), d'un cadre de lecture ouvert (ORF YLR154c) de *S. cerevisiae* (87% d'homologie) et du gène *MET3* de l'ATP sulphurylase de levure (87% d'homologie). Le

troisième clone (D26A-7) est homologue (à 48% à travers la protéine) à la « H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase chain b » de la bactérie *Vibrio alginolyticus*.

Attardons-nous quelques instants sur la fonction de chacune de ces séquences. L'ITS1 se retrouve sur l'ARN ribosomal de *C. albicans* et constitue donc une séquence conservée, présente en plusieurs copies chez cette levure (Fujita *et al.*, 1995). L'ITS1 correspond à une séquence de longueur variable, située entre les gènes ribosomaux 18S et 5.8S, qui est spécifique à chaque espèce de *Candida* (Turenne *et al.*, 1999). Ainsi, grâce au PCR, l'ITS1 est utilisé lors de l'identification rapide de l'espèce de *Candida* infectant un patient (Hendolin *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000).

D'autre part, le ORF YLR154c de *S. cerevisiae* code pour une protéine de 110 acides aminés de fonction inconnue, dont le gène est situé sur le chromosome XII.

Le soufre est un nutriment minéral essentiel pour la croissance des plantes et des animaux puisqu'une fois réduit, cet élément est incorporé dans les acides aminés soufrés, dans divers métabolites contenant du soufre et dans les coenzymes. Chez les plantes et les micro-organismes, le transport du sulfate via des transporteurs spécifiques entraîne une transformation du sulfate en sulfide. Puisque le sulfate détient un faible potentiel d'oxydo-réduction, il doit être activé via une réaction ATP dépendante. Ainsi, chez la levure, le gène *MET3* code pour une ATP sulphurylase, qui est impliquée dans la première étape de l'assimilation du sulfate inorganique. En effet, l'ATP sulphurylase catalyse la production d'adénosine 5'-phosphosulfate à partir de sulfate et d'ATP (Care *et al.*, 1999).

Finalement, *V. alginolyticus* est une bactérie marine anaérobie facultative qui possède une pompe à sodium NaDH/ubiquinone oxydoréductase (Krumholz *et al.*, 1990). Le gradient de sodium provoqué par ce processus peut être utilisé pour la production d'ATP via une activité ATP synthase sodium dépendante. L'ATP synthase est une protéine membranaire qui transforme le gradient électrochimique de cation en énergie, sous forme d'ATP (Krumholz *et al.*, 1989). Les gènes de cette ATPase se retrouvent sur l'opéron *unc*, qui révèle un haut degré de similarité avec l'opéron *unc* de *Escherichia coli*.

L'expression différentielle de ces trois gènes a été analysée de façon plus approfondie par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Au niveau buccal, *D26A-7* est exprimé fortement au début (24 h) et à la fin (jour 4) de l'infection. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le *C. albicans* est plus actif du point de vue métabolique et nécessite plus d'énergie lors de l'installation de l'infection et lors de l'élimination de la cavité orale de l'hôte, d'où une augmentation de l'expression du gène codant pour un homologue de « H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase chain b ». Ainsi, il serait intéressant de déterminer où se situe le pic de l'activité métabolique reflétant une phase active de croissance chez *C. albicans* lors de l'infection buccale et vérifier, par le fait même, si *D26A-7* est réellement exprimé au cours de cette phase active de croissance. Pour ce faire, nous pourrions extraire l'ARN de *C. albicans* provenant de la cavité orale de souris à différents moments de l'infection. Par la suite, un RT-PCR serait effectué sur l'ARN à l'aide des amorces de *D26A-7* et des amorces permettant l'amplification d'un ARN correspondant à une protéine ribosomale. Cette dernière, étant exprimée présumément plus fortement lorsque le *C. albicans* est très actif au niveau métabolique, permettra de préciser l'emplacement de la phase active de croissance. Les résultats obtenus par RT-PCR pourront être analysés par Southern.

D'autre part, au niveau vaginal, *D26A-7* ne semble pas exprimé différemment. Afin de confirmer ces résultats, il faudrait refaire le RT-PCR sur le clone *D26A-7* en utilisant plus de souris et en étudiant un plus grand nombre de points dans le temps. Pour *D23A-5* et *D27A-3*, nous nous attendions à obtenir des résultats semblables quant à leur expression puisque ces deux gènes ont des séquences similaires. Nos attentes se sont confirmées. Lors de l'infection buccale, *D23A-5/D26A-7* est exprimé fortement au jour 2. Une explication possible de ce phénomène est que puisque le pic d'infection se situe au jour 2, lors de l'infection orale, il est plausible que *D23A-5/D27A-3* qui code pour l'ITS1 de *C. albicans*, le gène *MET3* ou le ORF YLR154c de *S. cerevisiae* soit exprimé plus fortement à ce temps. En effet, il semble que ce gène soit impliqué lors de la multiplication de la levure, ce qui explique qu'au jour 2, le *C. albicans* étant au maximum de sa multiplication, *D23A-5/D27A-3* est plus fortement exprimé. Une fois de plus, ce résultat devra être confirmé en effectuant un RT-PCR sur l'ARN provenant d'un plus grand nombre de souris et s'échelonnant sur un laps de temps plus long. Au cours de

l'infection vaginale, l'expression génique de *D23A-5/D27A-3* demeure constante. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la différence d'expression entre les cavités orale et vaginale. L'expression différentielle pourrait être influencée par les conditions environnementales divergentes retrouvées à ces deux sites. De plus, les cellules récoltées au niveau buccal et vaginal ne sont peut-être pas au même stade de croissance, ce qui pourrait agir sur l'expression génique.

Si les résultats obtenus s'avèrent reproductibles, il faudra déterminer les séquences complètes des gènes *D26A-7* et *D23A-5* (ou *D27A-3*) à l'aide d'une banque génomique d'ADN de *C. albicans*. Il sera possible, par cette approche, de séquencer les gènes complets et de confirmer qu'ils codent pour les gènes attendus.

Enfin, si ces gènes se révèlent essentiels pour le *C. albicans*, leur rôle dans la virulence ne pourra pas être analysé par la technique du «ura-blaster» (Fonzi *et al.*, 1993). En effet, si les deux allèles d'un gène essentiel sont interrompus par une cassette « ura-blaster », le *C. albicans* ne peut exprimer ce gène, ce qui s'avère létal pour la levure. Toutefois, l'étude de la virulence d'un gène essentiel pourrait être analysée par la méthode de « *in vivo* expression technology » (IVET). Cette dernière permet la détection de l'expression *in vivo* des gènes au cours de l'infection (Staib *et al.*, 2000). Ainsi, le IVET utilise une recombinaison spécifique au site comme rapporteur, qui indique l'activation des gènes qui sont exprimés de façon transitoire à différents stades de l'infection. Le gène *FLP*, qui code pour une recombinase spécifique au site de *S. cerevisiae*, a été modifiée génétiquement pour permettre son expression chez *C. albicans*. L'excision d'un marqueur qui confère la résistance à l'acide mycophénolique (MPA) par le *FLP* est contrôlée par l'induction d'un promoteur qui utilise le *FLP* comme gène rapporteur. De cette façon, lorsque le promoteur est activé, la cellule devient sensible au MPA, ce qui entraîne une diminution du diamètre des colonies obtenues suite à une croissance sur un milieu contenant du MPA. Il est donc possible d'identifier et de quantifier les cellules qui expriment le gène.

Par conséquent, la technique IVET pourrait être utilisée pour étudier le rôle de nos deux gènes, *D23A-5/D27A-3* et *D26A-7*, dans la virulence de *C. albicans*. Il suffit de

fusionner le promoteur de notre gène d'intérêt en amont du gène *FLP* et d'intégrer le tout dans un des allèles correspondant au gène d'intérêt, chez la souche CF11 de *C. albicans*, qui contient le marqueur *MPA<sup>R</sup>*. Ainsi, les souris seraient inoculées, au niveau buccal et vaginal, avec le *C. albicans* CF11 contenant la fusion et des échantillonnages seraient effectués à divers moments au cours de l'infection. Suite à une croissance de ces échantillons sur un milieu contenant le MPA, on pourrait déterminer l'expression différentielle du gène d'intérêt. En effet, lorsque le gène d'intérêt est exprimé, la recombinaise *FLP* est aussi exprimée ce qui entraîne l'excision du marqueur *MPA<sup>R</sup>*. De cette façon, les cellules qui expriment le gène d'intérêt ne sont plus résistantes au MPA, ce qui résulte en une diminution du diamètre des colonies obtenues sur un milieu de culture contenant du MPA. Donc, en calculant le pourcentage de colonies sensibles au MPA, nous pouvons déterminer l'expression différentielle du gène d'intérêt à un moment précis de l'infection. Ainsi, il serait possible d'obtenir une quantification spécifique de l'expression différentielle de ces gènes essentiels en fonction du site et du stade temporel de la candidose. Les résultats obtenus pourront contribuer à une meilleure compréhension de la pathogénie de cette infection fongique, tout en ouvrant la possibilité d'exploiter les produits d'expression de ces gènes comme cibles thérapeutiques potentielles.

## **RÉFÉRENCES**

## RÉFÉRENCES

- Altbourn Z. (1994).** Genetic studies in *C. albicans*. Dans Segal E., Baum G. L., ed. Pathogenic yeasts and yeast infections. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 33-48.
- Anaissie E. (1992).** Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* **14 (Suppl 1)**: S43-S53.
- Antley P. P. & Hazen K. C. (1988).** Role of yeast cell growth temperature on *Candida albicans* virulence in mice. *Infect Immun* **56**: 2884-2890.
- Arendorf T. M. & Walker D. M. (1989).** The prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* **25**: 1-10.
- Bakerspigel A. & Burke S. (1974).** A possible function of the chlamydo spores of *Candida albicans*. *Mycopathologia Mycol Appl* **54**: 147-152.
- Balish E., Filutowicz H. & Oberley T. D. (1990).** Correlates of cell-mediated immunity in *Candida albicans*-colonized gnotobiotic mice. *Infect Immun* **58**: 107-113.
- Banerjee A., Ganesan K. & Datta A. (1991).** Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **137**: 2455-2461.
- 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.
- Baum G. L. (1994).** Epidemiology, pathogenesis, and immunology. Dans Segal E., Baum G. L., ed. Pathogenic yeasts and yeast infections. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 89-94.

**Beck-Sagué C. M., William R. J. & 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., Sauver J. St., Carlson S. & Hostetter M. K. (1995).** Epithelial adhesion in yeast species : correlation with surface expression of the integrin analog. *J Infect Dis* **171**: 1160-1163.

**Berdicevsky I. (1994).** Ultrastructure of *Candida albicans*. Dans Segal E., Baum G. L., ed. Pathogenic yeasts and yeast infections. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 11-22.

**Birse C., Irwin M., Fonzi W. & Shypherd P. (1993).** Cloning and characterization of *ECE1*, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* **61**: 3648-3655.

**Black C. A., Eyers F. M., Russell A., Dunkley M. L., Clancy R. L. & Beagley K. W. (1998).** Acute neutropenia decreases inflammation associated with murine vaginal candidiasis but has no effect on the course of infection. *Infect Immun* **66**: 1273-1275.

**Bouali A., Robert R., Tronchin G. & Senet J. M. (1987).** Characterization of binding of human fibrinogen to the surface of germ-tube and mycellium 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.

**Brawner D. L. & Cutler J. E. (1989).** Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* **24**: 1335-1341.

**Brown A. J. P., Cormack B. P., Gow N. A. R., Kvaal C., Soll D. R. & Srikantha T. (1998).** Advances in molecular genetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Med Mycol* **36 (Suppl 1)**: 230-237.

**Brown A. J. P. & Gow N. A. R. (1999).** Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**: 333-338.

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

**Cannon R. D., Holmes A. R., Mason A. B. & Monk B. C. (1995).** Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res* **74**: 1152-1161.

**Cantorna M. T. & Balish E. (1990).** Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice. *Infect Immun* **58**: 1093-1100.

**Care R. S., Trevethick J., Binley K. M. & Sudbery P. E. (1999).** The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol* **34**: 792-798.

**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.

**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 receptor for *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**: 637-643.

**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., Arancia S., Morelli L., Hube B., Sanglard D., Schäfer W. & Cassone A. (1998a).** 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 Bernardis F., Mühlshlegel F. A., Cassone A. & Fonzi W. A. (1998b).** The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**: 3317-3325.

**De Bernardis F., Santoni G., Boccanera M., Spreghini E., Adriani D., Morelli L. & Cassone A. (2000).** Local anticandidal immune responses in a rat model of vaginal infection by and protection against *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 3297-3304.

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

**Doi M., Homma M., Chindamporn A. & Tanaka K. (1992).** Estimation of chromosome number and size by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J Gen Microbiol* **138**: 2243-2251.

**Fidel P. L., Jr., Lynch M. E. & Sobel J. D. (1993).** *Candida*-specific cell-mediated immunity is demonstrable in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* **61**: 1990-1995.

**Fidel P. L., Jr. & Sobel J. D. (1996).** Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Microbiol Rev* **9**: 335-348.

**Fidel P. L., Jr., Wolf N. A. & KuKuruga M. A. (1996a).** T lymphocytes in the murine vaginal mucosa are phenotypically distinct from those in the periphery. *Infect Immun* **64**: 3793-3799.

**Fidel P. L., Jr., Cutright J. L., Tait L. & Sobel J. D. (1996b).** A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J Infect Dis* **173**: 425-431.

**Fidel P. L., Jr., Luo W., Chabain J., Wolf N. A. & Van Buren E. (1997).** Use of cellular depletion analysis to examine circulation of immune effector function between the vagina and periphery. *Infect Immun* **65**: 3939-3943.

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

**Fujita S. -I., Lasker B. A., Lott T. J., Reiss E. & Morrison C. J. (1995).** Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol* **33**: 962-967.

**Ghannoum M. A., Spellberg B., Saporito-Irwin S. M. & Fonzi W. A. (1995).** Reduced virulence of *Candida albicans* *PHR1* mutants. *Infect Immun* **63**: 4528-4530.

**Ghannoum M. A. (2000).** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**: 122-143.

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

**Gow N. A. R. (1994).** Growth and guidance of the fungal hypha. *Microbiology* **140**: 3193-3205.

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

**Hazen K. C., Plotkin B. J. & Klimas D. M. (1986).** Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Infect Immun* **54**: 269-271.

**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.

**Hendolin P. H., Paulin L., Koukila-Kähkölä P., Anttila V. -J., Malmberg H., Richardson M. & Ylikoski J. (2000).** Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol* **38**: 4186-4192.

**Hoegl L., Ollert M. & Korting H. C. (1996).** The role of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in the development of candidosis. *J Mol Med* **74**: 135-142.

**Holmes A. R., Cannon R. D. & Shepherd M. G. (1992).** Mechanisms of aggregation accompanying morphogenesis in *Candida albicans*. *Oral Microbiol Immunol* **7**: 32-37.

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

**Hostetter M. K. (1996).** Adhesion and morphogenesis in *Candida albicans*. *Pediatr Res* **39**: 569-573.

**Hostetter M. K. (1998).** Linkage adhesion, morphogenesis, and virulence in *Candida albicans*. *J Lab Clin Med* **132**: 258-263.

- 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., 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.
- Hurtrel B., Lagrange P. H. & Michel J. C. (1980).** Systemic candidiasis in mice. II. Main role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to infection. *Ann Immunol* **13C**: 105-118.
- Imam N., Carpenter C. C., Mayer K. H., Fisher A., Stein M. & Danforth S. B. (1990).** Hierarchical pattern of mucosal *Candida* infections in HIV-seropositive women. *Am J Med* **89**: 142-146.
- Jansons V. K. & Nickerson W. J. (1970).** Chemical composition of chlamydospores of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **104**: 922-932.
- Kalo-Klein A. & Witkin S. S. (1989).** *Candida albicans*: cellular immune system interactions during different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* **161**: 1132-1136.
- 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* species. *Infect Immun* **42**: 374-384.

**Krumholtz L. R., Esser U. & Simoni R. D. (1989).** Nucleotide sequence of the *unc* operon of *Vibrio alginolyticus*. *Nucleic Acids Res* **17**: 7993-7994.

**Krumholtz L. R., Esser U. & Simoni R. D. (1990).** Characterization of the H<sup>+</sup>-pumping F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase of *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* **172**: 6809-6817.

**Kurtz M. B., Kelly R. & Kirsch D. R. (1990a).** 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.

**Kurtz M. B., Kelly R. & Kirsch D. R. (1990b).** Molecular genetics of *Candida albicans*. Dans Kirsch D. R., Kelly R., Kurtz M. B., ed. The genetics of *Candida*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 21-73.

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

**Lay J., Henry L. 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.

**Leidich S. D., Ibrahim A. S., Fu Y., Koul A., Jessup C., Vitullo J., Fonzi W., Mirbod F., Nakashima S., Nozawa Y. & Ghannoum M. A. (1998).** Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**: 26078-26086.

- Liang P. & Pardee A. B. (1992).** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971.
- Lo H. J., Kölher J. R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A. & Fink G. R. (1997).** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- MacFarlane T. W. (1990).** Ecology and epidemiology of *Candida*. Dans Samaranayake L. P., MacFarlane T. W., ed. Oral candidosis. London : Wright, pp 21-46.
- McCourtie J. & Douglas L. J. (1981).** Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect Immun* **32**: 1234-1241.
- McCourtie J. & Douglas L. J. (1984).** Relationships 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 J. M., Ross B. C., Dwyer B. D. & Reade P. C. (1994).** Genotype and phenotype of oral *Candida albicans* from patients infected with the human immunodeficiency virus. *Microbiology* **140**: 1195-1202.
- 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.

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

**Magee P. T. & Scherer S. (1998).** Genome mapping and gene discovery in *Candida albicans*. *ASM News* **64**: 505-511.

**Maneu V., Cervera A. M., Martinez J. P. & Gozalbo D. (1996).** Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (*EFB1*) coding for the elongation factor EF-1 $\beta$ . *FEMS Microbiol Lett* **145**: 157-162.

**Martin C., Roberts D., Van Der Weide M., Rossau R., James G., Smith T. & Maher M. (2000).** Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* **38**: 3735-3742.

**Mirbod F., Nakashima S., Kitajima Y., Ghannoum M.A., Cannon R. D. & Nozawa Y. (1996).** Molecular cloning of a gene encoding translation initiator factor (TIF) from *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **34**: 393-400.

**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.

**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.

**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.

**Mühlschlegel F. A & Fonzi W. A. (1997).** *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of expression. *Mol Cell Biol* **17**: 5960-5967.

**Mühlschlegel F. A., Fonzi W. A., Hoyer L., Payne T., Poulet F. M, Clevenger J., Latge J. -P., Beauvais A., Paris S., Monod M., Sturtevant J., Ghannoum M., Nozawa Y. & Calderone R. (1998).** Molecular mechanisms of virulence in fungus-host interactions. *J Med Vet Mycol* **36 (Suppl.1)**: 238-248.

**Müller F. -M. C., Werner K. E., Kasai M., Francesconi A., Chanock S. J. & Walsh T. J. (1998).** Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J Clin Microbiol* **36**: 1625-1629.

**Naglik J. R., Newport G., White T. C., Fernandes-Naglik L. L., Greenspan J. S., Greenspan D., Sweet S. P., Challacombe S. J. & Agabian N. (1999).** *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun* **67**: 2482-2490.

**Nandi D. & Allison J. P. (1991).** Phenotypic analysis and gamma/delta-T cell receptor repertoire of murine T cells associated with the vaginal epithelium. *J Immunol* **147**: 1773-1778.

**Negre E., Vogel T., Levanon A., Guy R., Walsh T. J. & Roberts D. D. (1994).** The collagen binding domain of fibronectin contains a high affinity binding site for *Candida albicans*. *J Biol Chem* **269**: 22039-22045.

**Negróni P. (1935).** Variación bacica et tipo R de *Mycotorula albicans*. *Rev Soc Argent Biol* **11**: 449-453.

**Odds F. C. (1987).** *Candida* infections : an overview. *CRC Crit Rev Microbiol* **15**: 1-5.

**Odds F. C. (1988).** *Candida* and candidosis : a review and bibliography, 2<sup>nd</sup> edn. London : Ballière Tindall, 468p.

**Odds F. C. (1994).** *Candida* species and virulence : the study of virulence attributes in *Candida albicans* has come of age, and the host-fungus interplay may be more complex than previously realized. *ASM News* **60**: 313-315.

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

**Ollert M. W. & Calderone R. A. (1990).** A monoclonal antibody that defines a surface antigen on *Candida albicans* hyphae crossreacts with yeast cell protoplasts. *Infect Immun* **58**: 625-631.

**Penn C. & Klotz S. A. (1994).** Binding of plasma fibronectin to *Candida albicans* occurs through the cell binding domain. *Microb Pathog* **17**: 387-393.

**Phelan J. A., Saltzman B. R., Friedland G. H. & Klein R. S. (1987).** Oral findings in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **64**: 50-56.

**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.

**Qian Q. F., Jutila M. A., Vanrooijen N. & Cutler J. E. (1994).** Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* **152**: 5000-5008.

**Rand K. H., Houck H. & Wolff (1994).** Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Prob* **8**: 215-222.

**Rogers T. J. & Balish E. (1980).** Immunity to *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **44**: 660-682.

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

**Rüchel R., Tegeler R. & Trost M. (1982).** A comparison of secretory proteinases from different strain of *Candida albicans*. *Sabouraudia* **20**: 233-244.

**Rüchel R., Uhlemann K. & Böning B. (1983).** Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* **255**: 537-548.

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

**Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989).** Molecular cloning : a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Sping Harbor, N. Y, pp 10.40-10.42.

**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.

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

**Schaller M., Schaefer 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.

**Schena M., Shalon D., Davis R. W. & Brown P. O. (1995).** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470.

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

**Segal E. (1994).** General biological characteristics of *Candida*. Dans Segal E., Baum G. L., ed. Pathogenic yeasts and yeast infections. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 3-11.

**Senet J. -M. & Robert R. (1995).** Physiopathologie des candidoses. *J Mycol Méd* **5**: 145-166.

**Sherwood J., Gow N. A. R., Gooday G. W., Gregory G. W. & Marshall D. (1992).** Contact sensing in *Candida albicans* a possible aid to epithelial penetration. *J Med Vet Mycol* **30**: 461-469.

**Skerl K. G., Calderone R. A., Segal E., Sreevalsan T. & Scheld W. M. (1984).** *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectine. *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 in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**: 189-197.

**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.

**Sobel J. D. (1988).** Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann N Y Acad Sci* **544**: 547-557.

**Sobel J. D., Faro S., Force R., Foxman B., Ledger W. J., Nyirjesy P. R., Reed B. D. & Summers P. R. (1998).** Vulvovaginal candidiasis : epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* **178**: 209-211.

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

**Staab J. F., Ferrer C. A. & Sundstrom P. (1996).** Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine-rich amino acid motif on a hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **271**: 6298-6305.

**Staab J. F., Bradway S. D., Fidel P. L. & Sundstrom P. (1999).** Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**: 1535-1538.

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

**Staib P., Kretschmar M., Nichterlein T., Hof H. & Morschhäuser J. (2000).** Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *PNAS* **97**: 6102-6107.

**Staples P. J., Boujak J., Douglas R. J., Jr. & Leddy J. P. (1977).** Candidiasis in a previously healthy girl – implication of a leukocyte candidacidal defect. *Clin Immunol Immunopathol* **7**: 157-167.

**Steele C., Ozenci H., Luo W., Scott M. & Fidel P. L., Jr. (1999).** Growth inhibition of *Candida albicans* by vaginal cells from naive mice. *Med Mycol* **37**: 251-259.

**Sturtevant J. (2000).** Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. *Clin Microbiol Rev* **13**: 408-427.

**Sugiyama Y., Nakashima S., Mirbod F., Kanoh H., Kitajima Y., Ghannoum M. A. & Nozawa Y. (1999).** Molecular cloning of a second phospholipase B gene, *caPLB2* from *Candida albicans*. *Med Mycol* **37**: 61-67.

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

**Tsuchimori N., Sharkey L. L., Fonzi W. A., French S. W., Edwards J. E., Jr. & Filler S. G. (2000).** Reduced virulence of *HWP-1*-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect Immun* **68**: 1997-2002.

**Turenne C. Y., Sanche S. E., Hoban D. J., Karlowsky J. A. & Kabani A. M. (1999).** Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol* **37**: 1846-1851.

**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.

**Vazquez J. A., Sobel J. D., Demitriov R., Vaishampayan J., Lynch M. & Zervos M. J. (1994).** Karyotyping of *Candida albicans* isolated obtained longitudinally in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* **170**: 1566-1569.

**Zhao X. J., Newsome J. T. & Cihlar R. L. (1998).** Up-regulation of two *Candida albicans* genes in the rat model of oral candidiasis detected by differential display. *Microb Pathog* **25**: 121-129.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer toute ma gratitude au Dr Louis de Repentigny et au Dr Pierre Belhumeur de m'avoir impliqué dans leur projet ainsi que pour leur appui, leur disponibilité et leurs conseils tout au long de ma maîtrise.

Je tiens aussi à remercier Francine et Jean-Sébastien pour leur amitié et leur soutien.

Une pensée particulière à tous ceux qui m'ont soutenus au cours de ma maîtrise.