

2m11.2888.8

Université de Montréal

Expression des protéases aspartyles et de la phospholipase de *Candida albicans* au cours de l'infection *in vivo*

par

Jean-Sébastien Ripeau

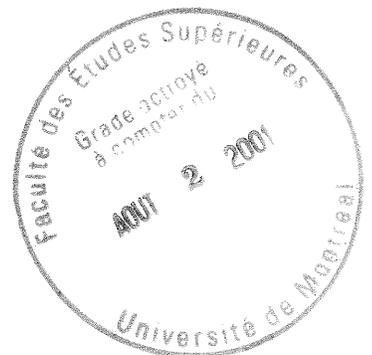
Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

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

avril, 2001

© Jean-Sébastien Ripeau, 2001



W

4

W58

2001

15.089

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Expression des protéases aspartyles et de la phospholipase de *Candida albicans* au cours de l'infection *in vivo*

présenté par :

Jean-Sébastien Ripeau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président du jury :	Dr Serge Montplaisir
Directeur de recherche :	Dr Louis de Repentigny
Codirecteur :	Dr Pierre Belhumeur
Membre du jury :	Dr Michel Roger

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

Les levures appartenant au genre *Candida* comprennent une centaine d'espèces différentes dont seulement quelques-unes ont un pouvoir pathogène. *Candida albicans* est, de nos jours, l'espèce qui cause le plus de problèmes infectieux chez l'homme. Cet organisme commensal de l'humain est aussi un pathogène opportuniste. C'est lorsque le système immunitaire est affaibli, lors de l'infection au VIH, de l'utilisation de puissants produits cytotoxiques contre des cancers ou d'immunosuppresseurs lors de transplantations d'organes, que le *C. albicans* peut devenir pathogène. L'étude des facteurs de virulence de cet organisme est donc essentielle pour comprendre son pouvoir pathogène. Cependant, les stratégies d'étude sont compliquées par l'état diploïde du *C. albicans* ainsi que par l'absence de cycle sexuel connu chez cet organisme.

Malgré tout, plusieurs facteurs de virulence putatifs ont été proposés chez cette levure. Il semble que ce ne soit pas un seul de ces facteurs qui cause la virulence mais plutôt l'ensemble additif de ceux-ci. Ces facteurs se définissent comme suit : la capacité d'adhérence des cellules aux surfaces de l'hôte, la capacité de transition des cellules de la forme blastoconidie à la forme filamenteuse, la possibilité des cellules de *C. albicans* de changer rapidement les gènes exprimés et la production d'enzymes extracellulaires. Le plus étudié de ces facteurs est la production de protéases aspartyles sécrétées, mieux connu sous le nom de *SAP* (Secreted Aspartyl Proteinases). La famille est constituée de neuf gènes caractérisés (*SAP1* à *9*) qui ont tous été identifiés et clonés. Ce sont surtout de nombreuses études *in vitro*, au niveau de l'ARN messager, qui ont permis de démontrer l'expression différentielle des *SAPs* dépendamment du stade de croissance, de la composition du milieu de culture et de la morphologie cellulaire. Nos connaissances de l'expression des *SAPs in vivo* sont beaucoup moins

avancées. La production de la phospholipase, par l'expression du gène *PLB1*, a été mise en évidence chez le *C. albicans in vitro* et semble également intervenir dans la pathogenèse de la candidose.

Le but de nos expériences était de détecter l'expression des différentes *SAPs* et de la *PLB1* au cours de la cinétique temporelle de la candidose buccale, réalisée de façon expérimentale à l'aide d'un modèle murin. Les cellules de *C. albicans* ont été recueillies tout au long de l'infection chez des souris C3H et DBA/2 normales ainsi que chez des souris C3H transgéniques exprimant le VIH type 1, et qui présentent les caractéristiques de l'infection au VIH chez l'humain. Suite à la lyse des cellules, des réactions de RT-PCR ont été effectuées pour détecter la présence des ARNm codant pour les *SAPs* et la *PLB1*. Nous avons montré des cinétiques d'infection chez les différentes souris semblables à celles qui étaient décrites dans la littérature. Nous avons montré un pic d'infection chez les souris C3H, deux pics d'infection chez les souris DBA/2 et une élimination du *Candida*, sept jours après le début de l'infection, chez les deux souches murines. Chez les souris C3H transgéniques, nous avons observé un premier pic d'infection, qui est suivi d'une infection persistante et qui se termine par une augmentation du *Candida* juste avant la mort des souris. Nous avons également démontré que les conditions d'expression *in vivo* étaient parfois différentes de celles retrouvées *in vitro*. Nous avons finalement réussi à montrer que les *SAPs* et la *PLB1* étaient exprimées tout au long de l'infection. Cependant, l'expression de certaines était transitoire, comme les *SAPs* 7 et 8 chez toutes les souris, alors que d'autres, tel que les *SAPs* 2, 5 et 9, étaient plus fortement exprimées et de façon constante lors de cette infection. Ces résultats démontrent l'expression différentielle des *SAPs* dans la candidose orale et suggèrent que certaines *SAPs* pourraient jouer des rôles spécifiques aux différents stades de l'installation et de l'entretien de l'infection.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1. Généralités sur le genre <i>Candida</i>.....	2
1.1 <i>Candida</i> sp.....	2
1.2 Dimorphisme du <i>Candida albicans</i>	2
1.3 Structure du <i>C. albicans</i>	4
1.4 <i>C. albicans</i> chez l'humain.....	5
1.5 Candidoses.....	7
2. Génétique de <i>C. albicans</i>.....	8
2.1 Vue d'ensemble.....	8
2.2 Approches pour l'étude génétique du <i>C. albicans</i>	9
3. Facteurs de virulence de <i>C. albicans</i>.....	10
3.1 Étapes lors de l'infection.....	10
3.2 Changement du phénotype exprimé.....	11
3.3 Dimorphisme cellulaire.....	13
3.4 Thigmotropisme.....	15
3.5 Adhérence.....	15
3.6 Division cellulaire et croissance.....	17
3.7 Production d'enzymes extracellulaires.....	18

4. Les protéases aspartyles sécrétées.....	18
4.1 Les protéases extracellulaires comme facteur de virulence.....	18
4.2 Les Saps sont produites par une famille de gène.....	21
4.3 Caractéristiques des différentes SAPs.....	24
4.3.1 Caractéristiques au niveau génique.....	24
4.3.2 Caractéristiques au niveau protéique.....	26
4.4 Expression différentielle des SAPs.....	33
4.5 Implications des différentes Saps lors de la candidose.....	38
4.6 L'implication des Saps dans la candidose orale.....	43
4.6.1 Les Saps impliquées dans la candidose orale chez les sidéens.....	43
4.6.2 L'expression <i>in vivo</i> des Saps au cours de la candidose orale.....	44
5. Les phospholipases.....	46
6. Les modèles animaux dans l'étude des candidoses orales.....	49
ARTICLE.....	52
DISCUSSION.....	95
RÉFÉRENCES.....	104
REMERCIEMENTS.....	xiii

LISTE DES TABLEAUX

Revue de la littérature :

Tableau I : Caractéristiques des différents gènes codant pour les Saps chez le *C. albicans* (adapté de Hube, 1996).....27

Tableau II : Pourcentage de similarité (coin supérieur droit) et de divergence (coin inférieur gauche), observé entre les séquences en acides aminés des différentes Saps chez le *C. albicans* (Monod, 1998).....28

LISTE DES FIGURES

Revue de la littérature :

Figure 1 Dimorphisme cellulaire observé chez le <i>C. albicans</i> (Odds, 1988). (a) Blastoconidies formées par bourgeonnement. (b) Formation d'hyphes. (c) Pseudohyphes.....	3
Figure 2 Étapes lors de l'infection par le <i>C. albicans</i> avec les différents facteurs de virulence pouvant intervenir à chacune de ces étapes (Odds, 1994).....	12
Figure 3 Structure des gènes codant pour les Saps chez le <i>C. albicans</i> (Hube, 1996).....	25
Figure 4 Dendrogramme montrant les relations liant les différentes Saps entre elles en tenant compte de leurs séquences en acides aminés (Monod, 1998).....	29
Figure 5 Modèle pour la régulation de l'expression de la Sap2, proposé suite aux différentes données obtenues sur cette Sap, chez le <i>C. albicans</i> (Hube, 1994).....	35
Figure 6 Expression différentielle des Saps de <i>C. albicans</i> selon la morphologie de la cellule et les conditions de croissance utilisées <i>in vitro</i> (Hube, 1998a).....	37

Article :

Fig. 7. Sensitivity of the RT-PCR assay for detection of gene expression. Expression of *SAP2* was reproducibly detected in the same experiment from triplicate samples of as little as 10^1 to 10^2 blastoconidia (A), or 1 pg of RNA (B) isolated from *C. albicans* LAM-1 grown in SDB for 15h at 37°C. The RT-PCR assay also repeatedly detected the expression of the *EFB1* gene, used as an internal mRNA control, from 1 pg of RNA isolated from *C. albicans* grown under these same conditions (B).....70 à 71

Fig. 8. (A,B) Oral burdens (upper panels) and longitudinal expression of virulence genes (lower panels) in intact mice orally infected with *C. albicans*. Assessments were conducted in immunocompetent C3H (A) and DBA/2 (B) mice. The temporal expression of each gene (lower panels) is represented by an open bar, and the width indicates the frequency of detection of expression. Numbers of mice: C3H, 13; DBA/2, 6. (C) Detection of RT-PCR products of *C. albicans* *SAP5*, *7* and *8* mRNAs during primary acute oral candidiasis in DBA/2 mice. Representative results are presented from duplicate samples of RNA, both originating from an identical pool of *C. albicans* harvested from one of two subsets of orally infected mice.....72 à 75

Fig. 9. (A-D) Oral burdens (upper panels) and longitudinal expression of virulence genes (lower panels) in non-transgenic littermates (A) and HIV-1 transgenic mice (B-D) orally infected with *C. albicans*. Color lines (B-D, upper panels) represent individual mice. The temporal expression of each gene (lower panels) is represented by an open bar, the width indicating the frequency of detection of expression (A-C), or by a positive (+) or negative (-) duplicate RT-PCR reaction on RNA from surviving individual mice (D). Because of the low burdens of *C. albicans* during persistent oral colonization (C), *C. albicans* harvested on days 14-35, 42-55 and 59-69 were pooled.

Numbers of mice: non-transgenic, 4; transgenic, 6. (E) Detection of RT-PCR products of *C. albicans* SAP5, 7 and 8 mRNAs during acute oral candidiasis (days 2-8), persistent oral colonization (days 14-69) and a final outgrowth preceding death (days 77-98). Representative results are presented from duplicate samples of RNA, both originating from an identical pool of *C. albicans* harvested from one (C) or two (B) subsets of orally infected mice, or from the same individual mouse (D). ND, not determined.....76 à 81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Arg : arginine

ARNm : acide ribonucléique messenger

Asp : acide aspartique

bp : paire de bases

BSA : albumine de sérum bovin

CFU : colony forming unit

Gly : glycine

GPI : glycoposphatidylinositol

HAART : *Highly-active antiretroviral therapy*

Ig : immunoglobuline

IVET : *In vivo expression technology*

kDa : kilodalton

Lys : lysine

N-terminal : amino-terminal

OPC : *oropharyngeal candidiasis*

ORF : *open reading frame* (cadre de lecture ouvert)

PMN : polymorphonucléaire

UV : rayons ultraviolets

Sap : protéase aspartique sécrétée

SDB : *Sabouraud dextrose broth*

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquis

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

Tg : transgénique

VIH : virus d'immunodéficience humain

YCB : *yeast carbon base*

À mes parents et à Josée,
sans qui ce travail
n'aurait pas été possible
et
à la mémoire de Christian
pour les rêves non réalisés.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Généralités sur le genre *Candida*.

1.1 *Candida* sp.

Le genre *Candida* fait partie du groupe des levures, qui est constitué de champignons qui ont un mode de développement unicellulaire prédominant. Plus de 150 espèces sont retrouvées dans le genre *Candida* et la majorité de celles-ci sont caractérisées par l'absence de cycle sexuel connu au cours de leur développement. Le genre *Candida* se retrouve partout dans les différents habitats de la nature, ainsi que chez les plantes, les insectes et les animaux. Le *Candida* a des exigences de croissance généralement très faciles à satisfaire : condition de croissance aérobie dans un milieu riche ou pauvre en nutriments avec un pH entre 2,5 et 7,5 et une température entre 20 °C et 38 °C. Cet organisme possède également une très grande capacité d'adaptation à des conditions environnementales qui peuvent être très différentes. Seulement huit espèces sont considérées comme pathogènes chez le genre *Candida* : *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis* et le *Candida tropicalis* (Odds, 1988). Ces espèces sont retrouvées chez les animaux à sang chaud.

1.2 Dimorphisme du *Candida albicans*.

Parmi ces espèces, la plus souvent retrouvée chez l'homme lors d'infections causées par ces levures, et par conséquent, la plus étudiée, est le *C. albicans* (Odds, 1988). Cette levure est caractérisée par la présence d'un dimorphisme cellulaire. Elle peut se retrouver sous une forme unicellulaire plus ou moins sphérique qu'on appelle blastoconidie. Elle se divise par bourgeonnement (figure 1a). Ce processus débute par une excroissance qui se développe sur la cellule-mère. Lorsque celle-ci atteint

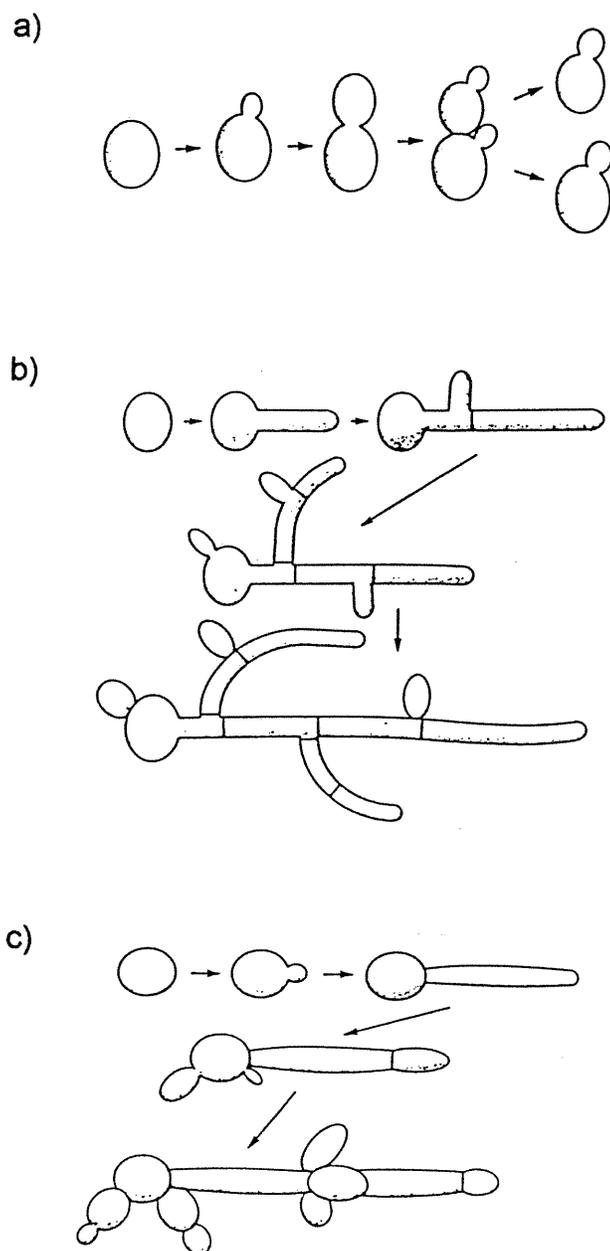


Figure 1 Dimorphisme cellulaire observé chez le *C. albicans* (Odds, 1988).
(a) Blastoconidies formées par bourgeonnement. (b) Formation d'hyphes.
(c) Pseudohyphes.

une certaine grosseur, il y a division des constituants cellulaires et du matériel génétique qui ont été dédoublés, suivant un processus de mitose, et il y a formation d'un septum qui vient diviser les deux cellules. Deux cellules identiques sont alors formées. Le *C. albicans* peut également générer des cellules qui ont une forme allongée et grâce à celles-ci former des filaments appelés hyphes. Une hyphe est un tube microscopique qui contient plusieurs cellules divisées entre elles par des septa. Ce processus est appelé germination (Odds, 1988). Dans ce processus, des divisions cellulaires se produisent, selon un processus de mitose, et des septa se forment pour diviser les cellules, ce qui forme un tube de plusieurs cellules. L'allongement du tube se fait dans la région apicale et lorsque le tube est assez long, il y a apparition de branches à d'autres endroits sur le filament (figure 1b). Le *C. albicans* peut également former des pseudohyphes. Cette structure est constituée de cellules qui lorsqu'elles se divisent, restent attachées les unes à la suite des autres. La division cellulaire se fait de la même manière que dans les structures précédentes. Il y a donc apparition d'un filament formé de blastoconidies qui prennent une forme plus ou moins allongée (figure 1c). Les pseudohyphes peuvent être distinguées des hyphes grâce aux petites constriction présentes entre les cellules (Odds, 1988).

1.3 Structure du *C. albicans*.

Le poids sec des cellules de *Candida* est formé d'environ 20 % à 40 % de protéines, de 30 % à 50 % de polysaccharides et d'un pourcentage variable de lipides qui varie en fonction de la souche, de l'âge de la culture, des conditions environnementales et de la source de carbone. Le pH intracellulaire du *C. albicans* se situe autour de 6.7 - 6.8 sauf dans les hyphes où le pH est de 6.4 (Odds, 1998). Le *Candida* possède une paroi cellulaire qui lui permet de garder sa forme et constitue le site de contact

avec l'environnement. Cette paroi serait constituée de cinq couches : la plus externe constituée majoritairement de mannoprotéines, la deuxième constituée surtout de mannane, la troisième semble contenir du mannane et du glucane, la quatrième contient surtout du glucane et la dernière, la plus proche de la membrane cellulaire, est formée de chitine, glucane et un peu de mannane (Odds, 1988). C'est cette couche qui confère la rigidité à la paroi cellulaire. Le *Candida* possède également une membrane cellulaire typique des cellules eucaryotes qui est constituée d'une double couche phospholipidique. On retrouve chez le *Candida* des mitochondries, un noyau à double membrane avec des pores, des ribosomes, un reticulum endoplasmique et des microtubules (Odds, 1988). Le *C. albicans* forme des cellules où l'on retrouve tous les éléments d'une cellule eucaryote typique.

1.4 *C. albicans* chez l'humain.

La majorité des humains sont porteurs, à une partie ou à une autre de leur corps, d'une espèce de *Candida* (McCullough et al., 1996 et Odds, 1988). Le *Candida* entretient normalement une relation de type commensale avec l'humain et on peut généralement le retrouver tout le long du tractus gastro-intestinal chez l'homme. Il y a plusieurs composants du système immunitaire qui entrent en jeu pour empêcher le *C. albicans* d'envahir les tissus (Cannon et al., 1995 et Odds, 1988). Les défenses innées de l'hôte jouent un rôle important. Ces défenses sont constituées de la barrière physique de l'épithélium, des peptides antimicrobiens linguaux, des IgA sécrétoires et de la salive où sont retrouvés des lysosymes, histatines et lactoférines. Les phagocytes, formés des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et des macrophages, constituent une deuxième ligne de défense importante de l'hôte. Les défenses acquises interviennent également dans l'élimination du *Candida* par l'hôte : la réponse immunitaire médiée par les cellules T ainsi que les cytokines produites par celles-ci contribuent

grandement au contrôle du *C. albicans* pour empêcher l'infection. La réponse humorale médiée par les cellules B semble aussi intervenir, mais à un degré plus variable, par la production d'anticorps contre le *Candida*. Il est aussi à noter que la flore bactérienne normale semble inhiber la prolifération du *C. albicans* (Greenfield, 1992). Cette inhibition pourrait s'effectuer par une compétition nutritionnelle, par une altération du milieu non favorable au *Candida*, par une compétition pour une même niche écologique ou pour les sites d'adhésion ou par la production de produits toxiques par les bactéries. Lorsque cette flore est modifiée, par l'emploi d'antibiotiques, les chances d'infection par le *Candida* sont augmentées.

C'est lors d'une baisse de l'efficacité du système immunitaire, lorsque les défenses innées et acquises de l'hôte ne peuvent plus contrôler le *Candida*, que celui-ci devient source de problèmes. Il devient alors un pathogène opportuniste pour l'humain. Donc, une augmentation des infections dues au champignon opportuniste *C. albicans* surviennent chez les personnes cancéreuses subissant des chimiothérapies (Anaissie, 1992), chez les patients atteints du SIDA (Diamond, 1991), chez les nouveau-nés et chez les patients subissant des chirurgies et des transplantations (Beck-Sagué et al., 1993). Ces situations sont de plus en plus fréquentes de nos jours. D'autres facteurs, tel que la grossesse, l'âge, certains traumatismes et la prise de corticostéroïdes ou d'antibiotiques, prédisposent les gens à la candidose (Odds, 1988).

Le *C. albicans* est constitué de plusieurs types de souches différentes. Le degré de virulence de chacun de ces types semble être variable. Des méthodes phénotypiques tel que le sérotypage, le typage grâce à un résistogramme, le typage grâce à la sensibilité des souches face à différentes « killer toxin », le morphotypage, le biotypage et le typage grâce aux différences mineures retrouvées dans certaines protéines ont été

grandement utilisées pour tenter de diviser cette espèce en sous-espèces (McCullough et al., 1996). Cependant, ces méthodes se sont avérées plus ou moins reproductibles et efficaces. Grâce au développement des méthodes génotypiques, entre autres la découverte des enzymes de restriction pour digérer l'ADN, des méthodes plus efficaces pour diviser cette espèce ont été élaborées (McCullough et al., 1996). Des études sont donc en cours pour permettre la mise sur pied d'une méthode facile et efficace permettant de typer cette espèce et de relier la virulence à des marqueurs spécifiques.

1.5 Candidoses.

Les candidoses sont divisées en deux groupes, celles qui sont superficielles et celles qui sont systémiques. Les candidoses superficielles sont formées de toutes les infections qui se développent et qui sont visibles à la surface du corps donc au niveau de la cavité buccale, des organes génitaux, de la peau et des ongles. C'est l'immunité médiée par les cellules T et les défenses innées de l'hôte qui interviennent surtout au niveau des infections mucocutanées (Greenfield, 1992).

Les candidoses systémiques se situent au niveau des organes profonds tel que les voies respiratoires, les voies urinaires, le tractus gastro-intestinal, le cœur et le système nerveux. Elles peuvent se développer au niveau d'un seul organe ou se propager à plusieurs organes à la suite d'une fongémie (Odds, 1988). Lorsque le *Candida* pénètre les organes profonds, les macrophages et les PMNs constituent la première ligne de défense. Plusieurs systèmes viennent aider ces cellules tels les facteurs du complément et les anticorps. Les cellules NK et les cellules T interviennent également dans ces types d'infections surtout grâce à la production de cytokines (INF- γ , TNF, IL-3, etc.) (Greenfield, 1992). Donc, le *C. albicans* peut se retrouver à plusieurs sites anatomiques dépendamment de l'état du

système immunitaire et de la capacité de pénétration de la levure. Il est à noter que dans les tissus humains touchés par une candidose, on retrouve, en général, un mélange de *Candida* sous la forme de blastoconidies, de pseudohyphes et d'hyphes (Odds, 1988).

La candidose orale est depuis longtemps rencontrée chez l'homme et l'espèce principalement retrouvée dans cette forme clinique est le *C. albicans* (Odds, 1988). La candidose pseudomembranaire (ou muguet) et la perlèche sont deux candidoses orales régulièrement rencontrées (Cannon et al., 1995). Les candidoses oropharyngées sont fréquentes entre autres chez les cancéreux, les personnes ayant subi une transplantation et chez les sidéens et celles-ci indiquent généralement une progression de la maladie sous-jacente (Cannon et al., 1995). Les facteurs prédisposants à ce type de candidose ont été mentionnés précédemment.

2. Génétique de *C. albicans*.

2.1 Vue d'ensemble

Il y a deux raisons qui rendent l'étude de la génétique plus difficile chez le *C. albicans*. La première, c'est l'absence de cycle sexuel connu chez ce dernier. Ceci amène une diminution de la variabilité apportée par la contribution de deux individus différents à la création d'un nouvel organisme. Cette situation empêche également la possibilité de contrôler la transmission de gènes permettant de créer des individus particuliers pour l'étude de certains gènes particuliers. *C. albicans* semble cependant se développer selon un cycle cellulaire normal en passant par les stades G1, S, G2 et M. Les différentes étapes sont cependant très difficiles à identifier car, les produits utilisés pour bloquer les stades modifient le développement cellulaire du *Candida* (Odds, 1988). La deuxième raison, c'est la découverte

de la nature diploïde du *C. albicans* (Olaiya et Sogin, 1979). Pour étudier un gène particulier chez cet organisme, il faut tenir compte des deux copies de celui-ci. Huit chromosomes ont été identifiés chez le *Candida*, désignés du plus gros au plus petit par les chiffres 1 à 7, et le huitième porte l'ADN ribosomal et est appelé R. Chez le *C. albicans*, on retrouve un pourcentage en GC, au niveau de l'ADN, variant entre 32 % et 37 % (Odds, 1988).

2.2 Approches pour l'étude génétique du *C. albicans*.

Pour l'étude de la génétique de cet organisme, plusieurs études et observations ont été effectuées sur des variants héréditaires qui sont obtenus suite à des mutations *de novo*, à des recombinaisons lors de la mitose ou à des erreurs lors de la ségrégation des chromosomes, des situations qui ont lieu naturellement ou grâce à l'utilisation de mutagènes, les rayons ultraviolets par exemple (Odds, 1988). Il est à noter que la réorganisation chromosomale peut représenter une importante alternative pour introduire de la variation génétique en l'absence de méiose dans un organisme. L'induction d'un cycle parasexuel grâce à la fusion de protoplastes a également été grandement utilisée pour étudier la génétique du *Candida*. C'est lors du retour à un stade diploïde de l'organisme, que le résultat sur la descendance peut être déterminé (Pla et al., 1996 et Scherer et Magee, 1990).

Sinon, le développement de stratégies au niveau moléculaire, qui utilisent des principes de transformation de *C. albicans* grâce à des protoplastes, de transformation intégrative où des séquences, sont intégrées dans le génome par l'intégration de plasmide dans celui-ci, ou encore de vecteurs autorépliquatifs qui se répliquent de façon autonome et indépendante des chromosomes dans la cellule, doivent être mises sur pied. L'isolement des

gènes, suivi de leur transfert dans un hôte génétique très semblable peut être utilisé. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme très semblable à *C. albicans*. Le génome du *S. cerevisiae* est entièrement séquencé et son fonctionnement est assez bien connu. Il est également possible d'utiliser l'homologie de séquence pour identifier des gènes chez le *C. albicans*, en utilisant *S. cerevisiae* dont le génome est entièrement connu et l'organisme est très étudié. Cependant, des différences importantes distinguent ces deux organismes : la pathogénicité de *Candida* alors que *S. cerevisiae* n'est pas pathogène, le dimorphisme de *Candida*, l'utilisation de codon non-standard par le *C. albicans* et la présence de gènes chez le *Candida* qui n'ont pas d'homologues chez *S. cerevisiae* (Magee et Scherer, 1998). L'inactivation de gènes, par intervention au niveau de la séquence ADN peut être utilisée (Pla et al., 1996 ; Scherer et Magee, 1990). Cependant, grâce aux techniques mentionnées plus haut, plusieurs gènes ont pu être identifiés et la génétique de ce pathogène a pu être étudiée et mieux comprise. L'étude des gènes de *C. albicans* va cependant prendre un nouveau virage grâce au séquençage complet du génome de l'organisme qui vient d'être effectué.

3. Facteurs de virulence de *C. albicans*.

3.1 Étapes lors de l'infection.

L'infection causée par le *Candida* peut être divisée en quatre étapes. La première est l'adhésion épithéliale de la levure et la colonisation de l'épithélium. Le *C. albicans* doit d'abord se fixer et ensuite se développer en grand nombre. Cette étape se déroule généralement au niveau de l'épithélium pavimenteux stratifié retrouvé au niveau de la cavité buccale, du vagin et de la peau. Ce sont les endroits où l'on retrouve le *Candida* le plus fréquemment et les portes d'entrée permettant au *Candida* de causer

l'infection. La deuxième étape consiste ensuite à pénétrer l'épithélium. Troisièmement, le *Candida* rejoint la vascularisation et peut être ainsi disséminé à de multiples organes profonds. Finalement, il adhère aux cellules endothéliales et pénètre les tissus et il y a alors candidose systémique (Odds, 1994). Plusieurs facteurs de virulence ont été proposés pour expliquer la pathogénicité du *C. albicans* et ces différents facteurs sembleraient agir aux différents stades de l'infection (Figure 2). Il faut ajouter que ce n'est pas seulement un facteur qui permet d'expliquer la pathogénicité de cette levure mais bien l'ensemble de ceux-ci agissant conjointement les uns avec les autres. Cette situation donne donc un niveau de complexité encore plus grand à l'infection causée par ce pathogène et plusieurs études sont conduites sur les différents facteurs pour comprendre le rôle de chacun dans la virulence.

3.2 Changement du phénotype exprimé.

Un des premiers facteurs favorisant la virulence de *C. albicans* est sa capacité de changer rapidement son phénotype exprimé. Avec l'absence de cycle sexuel chez cet organisme, celui-ci peut rapidement changer son expression antigénique et morphologique, grâce à des réorganisations génétiques, pour s'adapter aux différents microenvironnements de l'hôte. Il faut ajouter que le changement qui se produit est un changement spontané, qui peut être dû à une stimulation de l'environnement, mais qui arrive au même titre qu'une mutation (Soll, 1992). Les cellules-filles, générées à partir du changement, auront les mêmes propriétés que les cellules parentales. Contrairement à certains organismes (*Salmonella typhimurium*, par exemple), où lorsqu'il y a mutation, il y a changement et perte d'informations, les cellules-filles de *Candida* pourront reprendre les propriétés originales de la cellule parentale avant qu'il n'y ait eu le changement.

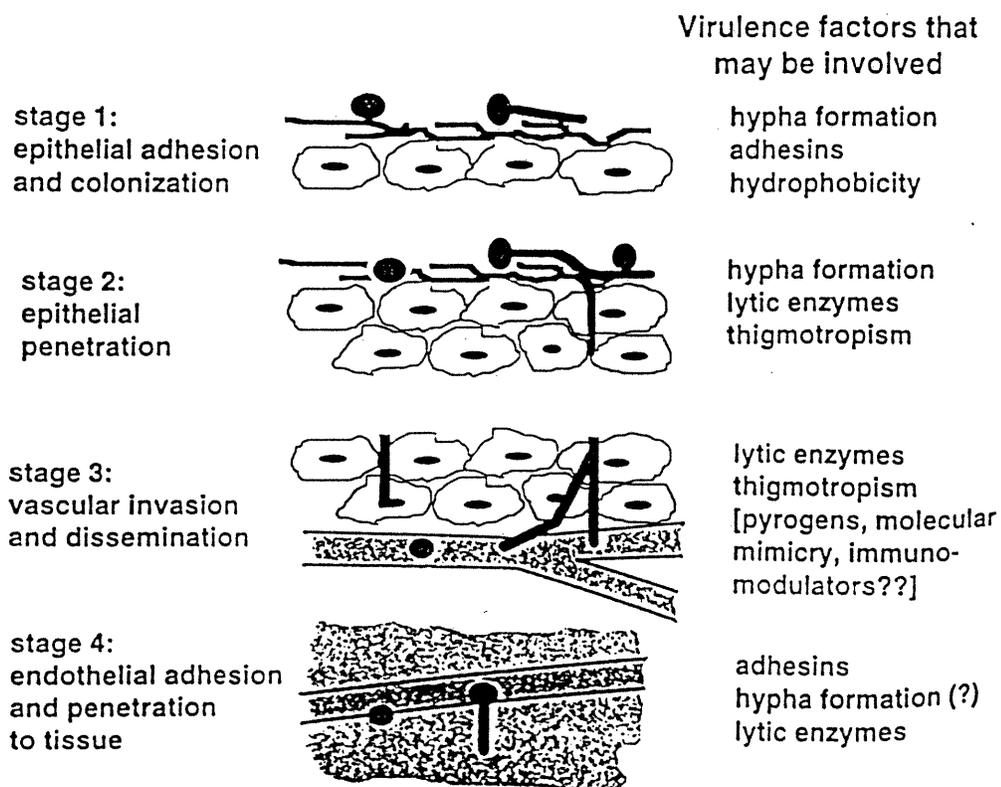


Figure 2 Étapes lors de l'infection par le *C. albicans* avec les différents facteurs de virulence pouvant intervenir à chacune de ces étapes (Odds, 1994).

Ce changement de phénotype peut toucher la régulation de plusieurs gènes du *Candida*, y compris ceux modifiant sa physiologie cellulaire, ceux touchant sa morphologie et même ceux qui codent pour les facteurs de virulence (Soll, 1992). L'exemple le plus marquant de cette propriété est exprimé par la souche WO-1, qui peut donner des colonies blanches ou changer son phénotype et donner des colonies opaques, suite à des changements environnementaux. Lors de l'expression de ces deux phénotypes, des différences ont été trouvées dans l'expression des gènes (Soll, 1992 et 1993). Ces changements peuvent avoir lieu au niveau de la cellule, soit au niveau de sa forme ou de son métabolisme, mais ils peuvent également affecter la morphologie coloniale du *Candida*. La présence de plusieurs types de colonies pour une même souche, suite à un faible traitement aux UV, a été remarquée sur une même gélose (Scherer et Magee, 1990). Cette propriété, permettant au *Candida* de modifier son aspect et son antigénicité, lui donne un puissant atout pour lui permettre d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

3.3 Dimorphisme cellulaire.

Le dimorphisme cellulaire de *C. albicans* constitue un autre facteur de virulence. Comme mentionné précédemment, le *Candida* peut se retrouver sous une forme plus ou moins sphérique de levure ou blastoconidies, ou encore sous une forme allongée appelée hyphes. Chez les hyphes, seule la cellule apicale reste active, les autres cellules derrière celle-ci sont remplies par des vacuoles et sont métaboliquement inactives. Elles vont redevenir actives et régénérer leur cytoplasme seulement lorsqu'il y aura formation d'une autre branche (Gow, 1994). Cette morphologie constitue donc une sorte de moyen d'exploration du milieu. Il s'agit cependant du facteur de virulence qui cause sans doute le plus de controverse. En effet, les hyphes ne peuvent être associées à la morphologie cellulaire exclusivement

retrouvée au cours de la candidose. Il a été démontré que dans un tissu infecté, on pouvait retrouver seulement des blastoconidies en l'absence d'hyphes (Odds, 1994). Toutefois, en général, les deux types cellulaires sont retrouvés dans les tissus infectés par le *C. albicans*. Plusieurs facteurs compliquent les études sur le sujet (Cutler, 1991). Tout d'abord, le nombre de mutants nuls que l'on peut obtenir suite à la mutation des gènes spécifiquement étudiés est faible, à cause du caractère diploïde de *Candida*. Les inoculums de départ sont difficiles à ajuster, car s'il est facile de compter des blastoconidies, les hyphes formées de plusieurs cellules, sont moins faciles à compter. De plus, il n'y a pas que deux formes possibles pour le *Candida*, mais également des pseudohyphes qui ont des caractéristiques à leur surface différentes des deux autres formes (Cutler, 1991).

Pour favoriser le passage entre les deux types cellulaires, différentes méthodes qui changent soit le milieu environnemental de la cellule (comme l'augmentation de température ou de pH), soit le milieu cellulaire (comme la densité cellulaire), peuvent être utilisées (Kerridge, 1993). Cependant ces changements affectent souvent la cellule elle-même. Il a été démontré que les cellules de *Candida* en croissance à 25 °C ont des propriétés de surface différentes de celles cultivées dans le même milieu à 37 °C, et que ce changement affecte la virulence de ces cellules (Antley et Hazen, 1988). Des études ont été réalisées au niveau moléculaire pour tenter de comprendre l'impact du dimorphisme sur la virulence du *C. albicans* (Gow, 1994). L'importance d'un gène, *PHR1*, a été démontrée dans la transition de la forme levure aux hyphes. Celui-ci est activé par un changement de température ou de pH (Fonzi et al., 1993 ; de Bernardis et al., 1998). Il apparaît tout de même que la forme hyphe semble très bien adaptée pour l'exploration et la pénétration des surfaces de l'hôte. Puisque les hyphes adhèrent mieux que les levures aux surfaces épithéliales, dans un rapport variant entre 2 et 50 fois (Greenfield, 1992), les hyphes pourraient favoriser

l'infection au premier contact avec les muqueuses (Odds, 1994). Les deux types cellulaires semblent donc impliqués dans la capacité du *Candida* à causer l'infection, même si leurs rôles respectifs sont encore incertains.

3.4 Thigmotropisme.

Le thigmotropisme est une autre propriété que possède le *C. albicans* pour pénétrer les barrières de l'hôte. Cet organisme réagit à la topographie de la surface sur laquelle il se trouve. Sous sa forme d'hyphe, il peut donc suivre la surface et s'introduire dans les trous ou les petits passages qu'il rencontre. Il a été remarqué que ce n'est pas du chémotropisme (attirance par une substance) qui semble diriger le *Candida* mais bien une exploration de surface qui guide le chemin de celui-ci (Gow, 1994 ; Odds, 1994). Les mécanismes régissant ce phénomène ne sont pas encore bien identifiés mais ceci donne un atout important au *C. albicans* pour pénétrer les barrières qu'il peut rencontrer.

3.5 Adhérence.

L'adhérence est une étape importante dans le processus d'infection par le *Candida*. Cette adhérence est permise grâce aux molécules de surface présentes chez le *Candida* ainsi que celles présentes chez l'hôte. Ce sont ces molécules qui permettent le contact et la colonisation de l'épithélium. Un premier facteur qu'on peut inclure dans cette catégorie est l'hydrophobicité de surface. En effet, ce caractère permet une adhérence non-spécifique aux surfaces, ce qui permet au *Candida* de se fixer à plusieurs endroits différents. Il a été démontré que les cellules cultivées à température pièce expriment plus de molécules hydrophobes que celles en culture à 37 °C, et que ces cellules ont une plus grande adhérence aux cellules (Hazen et al., 1991). L'hydrophobicité influe même sur la vitesse de

formation des hyphes puisque celles-ci sont beaucoup plus hydrophobes que les cellules sous forme levures (Kimura et Pearsall, 1980). Il est donc plus avantageux pour le *C. albicans* de se retrouver sous forme d'hyphes car les chances de se fixer aux surfaces de l'hôte augmentent beaucoup.

Il est clair qu'une hiérarchie s'impose chez le genre *Candida* et que l'espèce *C. albicans* a la plus grande capacité d'adhérence (McCullough et al., 1996 ; Barrett et al., 1985 ; Critchley et Douglas, 1985). Il a été démontré que les espèces de *Candida* les plus souvent responsables de la candidose au niveau des muqueuses (*C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*) ont une plus forte capacité d'adhérence aux cellules épithéliales buccales et vaginales que les autres espèces de *Candida* (King et al., 1980). Plusieurs surfaces ont été démontrées comme étant propices à l'établissement du *Candida* (Odds, 1988). Plusieurs récepteurs ont été identifiés chez le *C. albicans*, à l'égard du C3d, du iC3b, du fibrinogène, de la laminine, de la fibronectine, du fucose et de la N-acétylglucosamine, tous des composants sélectifs et spécifiques de l'hôte (Odds, 1994 ; Pendrak et Klotz, 1995). Les ligands ou adhésines sont divisés en trois groupes (Cutler, 1991 ; Odds, 1994 et Greenfield, 1992). Le premier est constitué de molécules impliquées dans des interactions protéine-protéine. Dans cette catégorie, on retrouve des adhésines formées par des parties protéiques des glycoprotéines du *C. albicans* qui se fixent à des séquences Arg-Gly-Asp (RGD) de l'hôte, retrouvées au niveau des matrices glycoprotéiques extracellulaires. Ces ligands sont souvent présents chez la forme hyphe du *Candida*. Le deuxième groupe est constitué de molécules impliquées dans des interactions protéine-sucre. Des parties protéiques des glycoprotéines du *C. albicans*, souvent engagées dans des activités lectines, se fixent à la partie sucre des glycoprotéines membranaires de l'hôte. Et finalement, il y a le groupe d'adhésines formé par des parties polysaccharidiques de molécules, souvent retrouvées au niveau des mannoprotéines, qui se fixent à des

composants inconnus chez l'hôte. Il faut remarquer que le *Candida* utilise des ligands plus général, comme des carbohydrates, pour sa fixation au niveau de l'épithélium qui est beaucoup plus critique pour sa survie que sa fixation au niveau des cellules endothéliales (Pendrak et Klotz, 1995).

Bien entendu, les adhésines ne constituent pas un facteur de virulence comme tel, mais elles participent à une étape cruciale dans le développement de l'infection par le *C. albicans*, l'adhérence. Il faut également noter le grand nombre et la très grande diversité des ligands qui permettent au *Candida* de se fixer à l'hôte et ainsi causer la maladie. Les recherches se poursuivent pour identifier d'autres molécules qui serviraient à la fixation de cet organisme. Il faut aussi ajouter que le *Candida* a la possibilité de mimer certaines molécules de l'hôte, ce qui lui permet d'échapper au système immunitaire soit en modulant l'action de celui-ci, soit en se cachant de son action. Cependant, il y a encore très peu de preuves à ce niveau et les recherches se poursuivent également dans cette voie.

3.6 Division cellulaire et croissance.

Deux autres propriétés interviennent en faveur du *Candida*, pour lui permettre de causer la maladie. La première est sa vitesse de division rapide, qui est seulement d'environ une heure dans des conditions optimales de croissance (Odds, 1988). Ceci lui permet de se propager rapidement et ainsi d'éviter l'élimination par le système immunitaire. L'autre avantage consiste en ses demandes nutritionnelles qui sont très faciles à satisfaire. En effet, le *Candida* croît bien dans plusieurs types de milieu, comme nous l'avons vu précédemment, et il ne demande aucun élément particulier pour croître. Ceci lui permet donc de se retrouver dans plusieurs microniches différentes et de poursuivre sa croissance. Ces deux caractéristiques lui donnent des atouts majeurs pour infecter des sites différents chez l'hôte.

3.7 Production d'enzymes extracellulaires.

Finalement, le dernier facteur de virulence proposé chez le *C. albicans* est la production d'enzymes extracellulaires par cet organisme. C'est le facteur qui a probablement été le plus étudié chez cette espèce. Le *Candida* peut produire des enzymes sécrétoires qui peuvent dégrader les différents constituants cellulaires de l'hôte. Ces enzymes permettraient au *Candida* de franchir les barrières des muqueuses et de se disséminer aux organes profonds.

4. Les protéases aspartyles sécrétées.

4.1 Les protéases extracellulaires comme facteur de virulence.

Chez plusieurs bactéries causant des maladies chez l'humain, il a été démontré que la production d'enzymes extracellulaires avait un rôle à jouer dans la pathogénicité de l'organisme. La présence de ces enzymes a également été démontrée chez le *C. albicans* (Rüchel et al., 1992). C'est sans doute le facteur de virulence qui a été le mieux caractérisé chez cet organisme. Le plus important groupe d'enzymes extracellulaires, identifié chez cette levure, est formé des protéases aspartyles sécrétées.

Il a été démontré, en 1980, grâce à la microscopie électronique à transmission, qu'il y avait un contact physique entre le *C. albicans* et les cellules de l'épithélium buccal lors de l'infection expérimentale, réalisée *in vitro* à l'aide de modèles de culture d'organe de la muqueuse buccale provenant de différents animaux (Howlett and Squier, 1980). Cette adhérence se caractériserait par un contact intime entre la surface des cellules épithéliales et les couches de la paroi cellulaire du *Candida*. Des

changements au niveau de l'organisation des couches de la paroi cellulaire ont également été remarqués lors de la germination de cette levure au cours de l'infection. Le seul dommage observé chez les cellules épithéliales, lors de l'invasion par le *C. albicans*, est apparu lors de la pénétration de la membrane cellulaire des cellules épithéliales par l'extrémité distale de l'hyphe, à une certaine distance du lieu d'attachement. Ces observations ont suggéré la présence d'une activité enzymatique permettant le passage de l'hyphe à travers la membrane cellulaire de l'hôte, illustrant ainsi la capacité du *C. albicans* à coloniser et à traverser les cellules de l'épithélium buccal (Howlett et Squier, 1980).

Staib fut le premier à détecter la présence de protéases acides extracellulaires produites par le *C. albicans* et à proposer celles-ci comme un facteur de virulence (Staib, 1965 et 1969). Par la suite, il a été démontré que 103 souches cliniques de *C. albicans*, prises au hasard, ont toutes exprimé des protéases dans un milieu de culture contenant de l'albumine sérique bovin (BSA). L'activité protéase a été détectée par la dégradation de l'hémoglobine et son inhibition en présence de pepstatine A. En purifiant et en comparant les protéases provenant de deux souches différentes, il a été découvert que celles-ci possédaient le même poids moléculaire et présentaient une réaction croisée immunologiquement. Cependant, elles étaient différentes quant à leur pH optimum, leur point isoélectrique, leur spécificité de substrat et leur dégradation des IgG. Les IgA, importantes dans la protection au niveau des muqueuses, étaient quant à elles dégradées par les deux enzymes ce qui pourrait contribuer à la persistance du *Candida* à ces endroits (Rüchel et al., 1982).

Des études ont été effectuées, avec des mutants ayant une production réduite de protéase, générés à l'aide de traitements chimiques. Dans une première étude, le mutant, semblable phénotypiquement, biochimiquement et

morphologiquement à la souche sauvage, s'est avéré moins virulent que la souche sauvage lorsque injecté par la voie intraveineuse chez la souris. Les décomptes de *Candida* retrouvés dans les organes étaient également moins élevés. Lorsque les souches ont été cultivées dans un milieu induisant les protéases, les PMNs murins et humains ont phagocyté et tué plus facilement la souche mutante que la souche sauvage (Macdonald et Odds, 1983). Dans une seconde étude, le même type de mutant a été généré et étudié dans un modèle murin utilisant l'inoculation intraveineuse du *Candida*. La souche sauvage tuait les souris en moins de 21 jours, mais la souche mutante ne causait aucune mortalité. De plus, un révertant spontané de la souche mutante s'est avéré létal pour les souris (Kwon-Chung et al., 1985).

Ces résultats ont été corroborés par l'inoculation intraveineuse d'un mutant stable et de la souche sauvage chez la souris, démontrant que la souche mutante était 1000 fois moins infectieuse que la souche parentale (Ross et al., 1990). Finalement, des souris ont été infectées avec des souches de *C. albicans* ayant des activités protéases différentes en culture. Les souris infectées avec les souches de type Ia, produisant une activité protéase depuis des semaines *in vitro*, ont montré le plus haut taux de mortalité et une grande invasion des tissus par le *Candida*, incluant la sécrétion des protéases démontrée histologiquement, par rapport aux souches Ib, produisant une activité protéase déclinant après deux ou trois jours *in vitro*, ou aux souches II, ne produisant pas de protéase. Certaines souches du type Ib et II ont cependant montré une assez forte virulence (Kondoh et al., 1987). Ces différentes études ont suggéré que les protéases jouent un rôle dans la virulence, mais que d'autres facteurs interviennent probablement dans la pathogénicité.

Lors de l'étude de 53 souches de *C. albicans* isolées de patients, toutes les souches produisaient des protéases, d'activités variables, et

toutes adhéraient aux cellules épithéliales. Cette production de protéases a été mise en corrélation avec l'adhérence aux cellules épithéliales buccales (23 souches) et la létalité chez les souris (14 souches). Un lien a été établi entre l'adhérence, l'activité des protéases et la pathogénicité. Les souches adhérant le plus fortement aux cellules épithéliales, avaient le plus haut taux d'activité protéase et étaient les plus pathogènes (Ghannoum et Elteen, 1986). Il a également été démontré que lorsqu'on ajoute de la pepstatine au cours de la candidose cutanée expérimentale chez la souris, l'adhérence du *Candida* n'est pas diminuée mais il n'y a plus de dépressions qui se forment à la surface des kératinocytes. Ceci suggère donc que les protéases pourraient faciliter l'adhérence et surtout l'invasion de la surface épithéliale (Ray et Payne, 1988).

La production de protéases extracellulaires a été mise en évidence chez le *C. albicans* ainsi que chez le *C. tropicalis* et le *C. parapsilosis* mais pas chez les autres espèces de *Candida* moins pathogènes (Douglas, 1988 ; Hoegl et al., 1996). Les protéases de ces trois espèces sont reliées entre elles antigéniquement mais possèdent des poids moléculaires différents (Banerjee et al., 1991). Lors de l'infection de la muqueuse buccale humaine, les protéases ont été détectées à la surface des blastoconidies ainsi que sur les hyphes du *C. albicans* de sérotype A, mais seulement sur les blastoconidies de sérotype B et sur les blastoconidies et les hyphes du *C. tropicalis*. Les expériences utilisant la pepstatine A ont montré une réduction de l'adhérence de *Candida*, suggérant que les protéases jouent un rôle dans l'attachement de la levure (Borg et Rüchel, 1988). Ces expériences ont donc mis en évidence le rôle probable des protéases extracellulaires comme facteurs de virulence chez *C. albicans*.

4.2 Les Saps sont produites par une famille de gènes.

La découverte de plusieurs gènes codant pour des protéases extracellulaires chez le *C. albicans* a enrichi l'exploration de ce facteur de virulence. De façon générale, les protéases se divisent en quatre groupes. Elles peuvent être de type sérine, cystéine, aspartique ou métallo protéases (Hoegl et al., 1996). Chez le *Candida*, elles ont été identifiées comme des protéases aspartyles sécrétées ou Saps (Secreted Aspartyl Proteinases). Le premier gène codant pour une protéase aspartyle a été identifié et cloné de la souche ATCC 10231 de *C. albicans* (Hube et al., 1991). Un second gène est par la suite identifié chez la souche ATCC 10261 (Wright et al., 1992). La comparaison entre les deux gènes est alors effectuée, et une homologie de 77% au niveau de la séquence en ADN et de 73% au niveau de la séquence en acides aminés de la protéine, est alors constatée. Cette différence est alors attribuée à la présence de deux gènes codant pour des SAPs différentes. Suite à des analyses Southern, il est démontré qu'il y avait bien deux gènes codant pour des SAPs chez le *C. albicans* (Wright et al., 1992). Une première étude comparative est alors effectuée sur les deux gènes codant pour des protéases, séquencés par ces deux groupes différents, chez deux souches différentes, pour déterminer s'il s'agissait du même gène ou non (Magee et al., 1993). Il a été démontré que les deux gènes se retrouvaient sur deux chromosomes différents chez le *Candida*, la *SAP1* se retrouvant sur le chromosome 6 alors que la *SAP2* se retrouvant sur le chromosome R. La présence des deux gènes ainsi que leur localisation, ont été identifiées chez quatre souches de *Candida* différentes. Lorsque la présence de ces gènes a été détectée par Southern blot génomique, avec lavage à basse stringence, l'hybridation a révélé plusieurs bandes différentes d'ADN génomique. Ce résultat a donc suggéré la présence d'autres gènes codant pour des SAPs. Ces résultats ont donc indiqué que les gènes codant pour les SAPs semblent former une famille de gènes, la première identifiée chez cet organisme (Magee et al., 1993).

L'identification d'une troisième protéase sécrétée, par la souche WO-1, avec une masse moléculaire différente des deux autres déjà identifiées, a mené à la découverte de la *SAP3*. Lorsque les séquences N-terminales des *SAPs 1 - 3* ont été comparées, chacune des séquences était unique mais très reliée aux deux autres (White et al., 1993). Il a par ailleurs été démontré que les trois protéines ont des points isoélectriques différents. La démonstration que les trois protéines sont codées par des loci différents, a éliminé la possibilité qu'il s'agisse d'allèles différentes du même gène et a confirmé la présence de trois isoenzymes différentes pour les protéases (White et al., 1993).

Un quatrième gène, *SAP4*, a par la suite été identifié au niveau de la séquence ADN, en amont de la séquence codant pour la *SAP1* (Miyasaki et al., 1994). En criblant une librairie génomique de *C. albicans* avec une sonde pour *SAP1*, en des conditions de faible stringence, trois autres gènes codant pour des *SAPs* ont été identifiés : *SAP5*, *SAP6* et *SAP7* (Monod et al., 1994). Lors de la comparaison des séquences primaires de ces trois nouveaux gènes avec celles des *SAPs* déjà identifiées, des différences ont été notées entre tous ces gènes, mais la structure et la séquence de ceux-ci sont très apparentées. Lorsque leur position sur les chromosomes a été déterminée, la *SAP1* et *SAP4* se retrouvaient sur le chromosome 6, la *SAP2* sur le R, la *SAP3* sur le 3, la *SAP5* et 6 sur le 6 et la *SAP7* sur le 1. Ces données ont été retrouvées chez quatre souches de *C. albicans* différentes (Monod et al., 1994). La présence de deux autres gènes a aussi été notée mais non identifiée (Monod et al., 1994). Ces deux autres gènes ont par la suite été caractérisés comme étant les *SAP8* et 9 (Monod et al., 1998). Ces deux gènes montrent des séquences différentes mais reliées aux autres *SAPs*, et sont localisés sur le chromosome 3 (Monod et al., 1998). Ces données indiquent donc que la famille des *SAPs* est constituée d'au moins neuf gènes qui codent pour des enzymes qui sont semblables mais bien

distinctes les unes des autres et que celles-ci sont codées par des loci différents sur les chromosomes de *Candida*. La mention de la découverte d'une dixième SAP a été faite (Schaller et al., 2000) mais celle-ci n'a pas encore été caractérisée.

4.3 Caractéristiques des différentes SAPs.

4.3.1 Caractéristiques au niveau génique.

Les gènes codant pour les SAPs ont tous une même structure (figure 3). La transcription des gènes débute à la région pré-pro (Hube, 1996). La région pré de la protéine serait constituée d'une séquence signal qui orienterait l'ARNm vers le reticulum endoplasmique rugueux pour que l'enzyme soit transportée dans le lumen de celui-ci et qu'elle puisse par la suite, prendre la voie lui permettant d'être sécrétée à l'extérieur de la cellule. Dans la partie propeptide des protéines, on retrouve des séquences Lys-Arg, dont l'une se retrouve juste en amont de l'extrémité N-terminale de la protéine, ce qui permettrait à cette partie d'être enlevée pour l'obtention de l'enzyme mature. Ces séquences interviendraient dans un processus semblable à celui observé chez *S. cerevisiae*, où une protéase intracellulaire, la Kex2p, vient couper les peptides après des séquences tandem telles les séquences Lys-Arg (Julius et al., 1984). Un processus de clivage autocatalytique, pour générer l'enzyme mature, a également été mis en évidence chez *Candida*, bien que celui-ci soit moins efficace que celui produit par la voie de la KEX2 (Togni et al., 1996). Il a également été démontré que l'excision de la pré-pro région est un prérequis pour la sécrétion des SAPs (Togni et al., 1996).

La dernière partie du gène code donc pour l'enzyme mature. Toutes les protéines Sap possèdent des résidus acides aspartiques en position 32

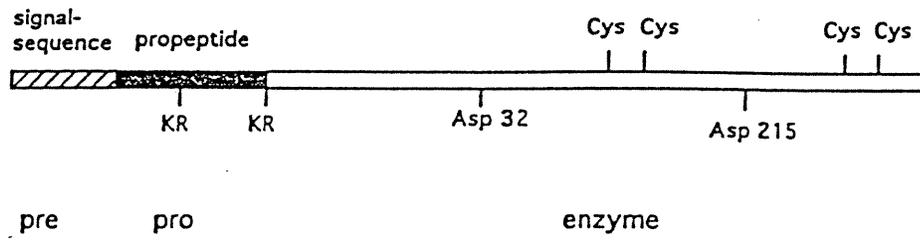


Figure 3 Structure des protéines Saps du *C. albicans* (Hube, 1996).

et 215 qui seraient impliquées dans le site catalytique de la protéase. Ils possèdent également tous quatre résidus cystéines probablement impliqués dans la structure tri-dimensionnelle de la protéine. Le tableau 1 montre les caractéristiques observées chez les neuf gènes *SAP* (Hube, 1996 ; Monod et al. 1998). Tous les gènes possèdent une séquence pré-propeptide de longueur variable mais toujours présente, un nombre variable de sites Lys-Arg et des cadres de lecture ouverts de longueur semblable ainsi que des enzymes matures de longueur semblable sauf pour *SAPs* 7 et 9. De plus, les séquences génomiques codant pour les protéines sont assez conservées entre elles. Les gènes semblent donc coder pour des protéases assez semblables mais avec des différences mineures qui les distinguent.

4.3.2 Caractéristiques au niveau protéique.

Les séquences en acides aminés ont été comparées entre les différentes *Saps* (Monod et al., 1998). Le tableau 2 donne les pourcentages de similarités et de divergences entre les différentes *Saps*. La figure 4 quant à elle donne les relations liant les *Saps* retrouvées chez le *C. albicans*, le *C. tropicalis* (*Sapt*) et le *C. parapsilosis* (*Sapp*), de même que la protéase ancrée au glycoposphatidylinositol (GPI), *Yap3p*, retrouvée chez *S. cerevisiae*, en fonction de la similarité de leurs séquences en acides aminés. En regardant le tableau 1, le tableau 2 et la figure 4, certaines évidences se dégagent. Premièrement, les *Saps* 1, 2 et 3 sont assez similaires entre elles et forment un groupe assez apparenté. Elles ont un pourcentage de similarité en acides aminés assez élevé (67 à 70%), possèdent un pré-propeptide de longueur semblable (entre 50 et 58 acides aminés), un nombre semblable de sites Lys-Arg, des ORFs et des enzymes matures de longueur semblable. Les *Saps* 4, 5 et 6 forment un autre groupe très apparenté (Fig. 4). Elles possèdent un pré-propeptide de longueur très semblable (75 à 76 acides aminés), le même nombre de sites Lys-Arg ainsi

Tableau I Caractéristiques des différentes Saps chez le *C. albicans*
(adapté de Hube, 1996).

Gène	Longueur de la région pré-peptide (en acides aminés)	Nombre de sites Lys-Arg / Lys-Lys dans le pré-peptide	ORF (en paires de base)	Longueur de l'enzyme mature (en acides aminés)	Localisation sur les chromosomes
SAP1	50	2 Lys-Arg	1173	341	6
SAP2	56	2 Lys-Arg	1194	342	R
SAP3	58	1 Lys-Arg	1194	340	3
SAP4	75	4 Lys-Arg	1254	342	6
SAP5	76	4 Lys-Arg	1254	342	6
SAP6	76	4 Lys-Arg	1254	342	6
SAP7	211	1 Lys-Lys	1764	377	1
SAP8	73	2 Lys-Arg	1215	332	3
SAP9	50	2 Lys-Arg	1632	494	3

Tableau II Pourcentage de similarité (coin supérieur droit) et de divergence (coin inférieur gauche), observé entre les séquences en acides aminés des différentes Saps chez le *C. albicans* (Monod, 1998).

	Sap1p	Sap2p	Sap3p	Sap4p	Sap5p	Sap6p	Sap7p	Sap8p	Sap9p
Sap1p	***	67.1	67.6	57.4	55.4	56.6	20.4	50.0	28.1
Sap2p	26.7	***	69.8	55.0	52.5	55.0	27.4	50.0	28.6
Sap3p	29.0	27.5	***	53.0	49.2	52.3	26.9	50.5	22.1
Sap4p	40.8	42.4	43.7	***	77.2	89.9	26.4	43.4	29.5
Sap5p	42.6	45.2	47.5	22.1	***	80.4	26.1	41.2	26.8
Sap6p	41.0	42.1	44.2	9.4	19.6	***	27.3	42.4	26.3
Sap7p	74.8	75.9	75.7	76.6	75.9	76.4	***	25.3	17.1
Sap8p	48.5	46.6	45.8	54.6	56.2	55.0	74.8	***	26.3
Sap9p	66.4	67.2	67.8	65.8	68.2	66.7	76.8	68.6	***

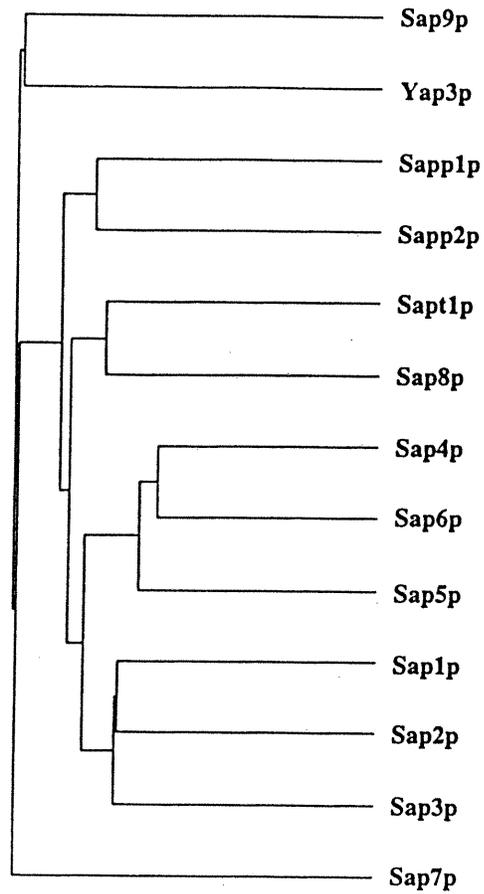


Figure 4 Dendrogramme montrant les relations liant les différentes Saps entre elles en tenant compte de leurs séquences en acides aminés (Monod, 1998).

que des ORFs et des enzymes de longueurs identiques et des pourcentages de similarité entre 77 % et 90 %. La Sap7 montre le plus de divergence avec les autres Saps, ayant un pourcentage de similarité autour de 20%. Elle possède un pré-propeptide plus long que les autres, un site Lys-Lys plutôt que Lys-Arg, une séquence en nucléotides et une enzyme mature beaucoup plus longues que celles des autres Saps. La Sap8 est très semblable aux deux premiers groupes de Saps. La Sap9 est très divergente par rapport aux autres Saps. Elle possède une séquence en nucléotides et une enzyme mature plus longues que celles des autres Saps. Elle se rapproche davantage de la protéase Yap3p de *S. cerevisiae* que les autres Saps, et lors de l'examen de sa séquence, il a été noté que cette Sap possède des caractéristiques la classant parmi les protéases aspartiques liées au GPI (Monod et al., 1998).

Les Saps sont normalement actives en milieu acide, ayant un pH optimum entre 2.2 et 3.3, et lorsque le pH devient trop basique, autour de 8.4, l'enzyme est irréversiblement dénaturée (Hoegl et al., 1996). La Sap2p montre une activité optimum autour de pH 3 - 4 et son activité est détectée jusqu'à pH 6 (Hube et al., 1998). Il a été suggéré que le *C. albicans* pourrait acidifier les tissus qui l'entourent pour permettre aux Saps d'être actives (Hube et al., 1998). Les protéases aspartyles sont également sensibles à l'inhibiteur pepstatine A. Il s'agit d'un hexapeptide retrouvé chez le *Streptomyces* et qui est un inhibiteur classique des protéases du type aspartique (Davies, 1990). Il a été démontré que la croissance des souches de *C. albicans* est normale en présence de source d'azote de faible poids moléculaire et de pepstatine A, mais qu'elle est inhibée, en présence de pepstatine A, lorsque la source d'azote est constituée de protéines (Ross et al., 1990). Cette situation montre bien que la pepstatine A inhibe irréversiblement les protéases et empêche ainsi le *Candida* de dégrader les protéines lui permettant d'obtenir l'azote essentiel pour sa croissance.

Parmi les protéases aspartyles, la Sap2p a été la plus étudiée sur le plan biochimique, car elle représente le principal produit d'expression de la forme levure du *C. albicans in vitro* (Hube, 1996). Très peu d'études ont été faites sur les protéines Saps, la majorité étant plutôt faites sur l'expression des ARNm correspondants. *In vitro*, il y a production de protéases par la forme levure de façon exponentielle jusqu'à 16 heures, dans un milieu contenant de la BSA (Banerjee et al., 1991 ; Ross et al., 1990). La présence de BSA comme source d'azote ou la présence de peptides, permet l'expression des SAPs alors que la croissance en présence de sulfate d'ammonium ou d'acides aminés empêche l'expression de celles-ci (Banerjee et al., 1991 ; Homma et al., 1993 ; Ross et al., 1990).

L'utilisation d'autres protéines, tel que l'hémoglobine, l'ovalbumine, les histones, le peptone et le tryptone, permet la production des Saps à des niveaux différents (Banerjee et al., 1991). Chez l'humain, la variété des cibles pour les Saps est donc très grande et plusieurs molécules sont dégradées par les Saps *in vitro*: immunoglobulines (même les IgA sécrétoires qui sont considérées comme les plus résistantes à la protéolyse (Hube, 1996)), protéine C3 du complément, l'inhibiteur de l' α 1-protéase, cystéine-A épidermale, α 2-macroglobuline, portion protéique de la mucine, kératine, collagène, hémoglobine, fibronectine, etc. (Hube et al., 1998). Une étude, où les Saps 1, 2, 3 et 6 ont été produites en grande quantité, dans un système utilisant *Escherichia coli*, a montré que les Saps coupent entre les acides aminés hydrophobes et que chacune des Saps possède une spécificité différente pour l'acide aminé qui se retrouve aux sites de coupure (Koelsch et al., 2000). Dans une autre étude, où les Saps 1, 2 et 3 ont été purifiées, l'activité des Saps a été mesurée lors de variations de pH et de température et en présence de différents substrats (Smolenski et al., 1997). Les profils des courbes de production des protéases obtenus en fonction du pH étaient

sensiblement les mêmes pour les trois Saps, avec un pic d'activité entre 3.2 et 3.5 et une absence d'activité à pH 7. Cependant, la Sap3 était la seule à montrer de l'activité à un pH inférieur à 2.5. Il en est de même avec la température, où la température maximale avant la perte d'activité est de 45°C, mais la Sap3 reste très active au-delà de celle-ci. Les trois Saps peuvent hydrolyser les mêmes substrats mais semblent les couper à des endroits différents. Ces données indiquent donc que les Saps se ressemblent mais peuvent agir différemment et à différents moments par leur action. Ceci pourrait expliquer la présence d'autant de Saps, agissant de façon complémentaire comme facteurs de virulence.

La mise en évidence d'une proenzyme intracellulaire des Saps a été montrée par l'identification de deux enzymes intracellulaires, l'une de 45 kDa, qui semble être le précurseur d'une autre enzyme de 43 kDa. Ces deux enzymes ont été retrouvées dans la fraction membranaire de *Candida*, et lorsque cette fraction est de nouveau séparée, les deux protéines se retrouvent dans des fractions différentes (Homma et al., 1992). Donc les gènes *SAP* semblent être transcrits en ARNm, qui va migrer vers le cytoplasme. L'ARNm est traduit au niveau du reticulum endoplasmique rugueux, puis la proenzyme est larguée dans la lumière de celui-ci. Elle est par la suite transférée dans l'appareil de Golgi et incorporée dans des vésicules sécrétoires. Les vésicules sont par la suite transportées vers la membrane cellulaire, après l'activation de l'enzyme dans les derniers compartiments du Golgi (Hube, 1998). Les vésicules fusionnent ensuite avec la membrane pour libérer l'enzyme mature à l'extérieur de la cellule (Homma et al., 1992 ; Hoegl et al., 1996).

La régulation de l'expression des *SAPs* semble avoir lieu au niveau de l'ARNm (Hube, 1996 ; Hube et al.1998). Trois résultats expérimentaux appuient cette interprétation. Le premier découle de l'observation que les

Saps ne s'accumulent pas dans la cellule mais semblent sécrétées immédiatement après leur synthèse (Banerjee et al., 1991). Ceci renforce une étude précédente où il ne semblait pas y avoir d'accumulation intracellulaire de Saps (Ross et al., 1990). Deuxièmement, le niveau d'ARN et le niveau de la protéine sont comparables, ce qui suggère qu'aucun mécanisme post-transcriptionnel ne régule ces enzymes (White et Agabian, 1995). Troisièmement, les Saps extracellulaires sont détectables seulement quatre minutes après leur traduction, ce qui indique que la régulation ne se fait pas au niveau de la protéine (Homma et al., 1993). Ces trois points indiquent qu'aussitôt l'ARNm transcrit, il est traduit en protéine. Donc le contrôle pour l'expression se fait avant la production d'ARNm ou au niveau de la production de celle-ci.

4.4 Expression différentielle des SAPs.

Lors de l'identification des gènes codant pour les Saps, il a été démontré, chez la souche de *C. albicans* WO-1, que les trois premières Saps étaient exprimées différemment (White et al., 1993). Les cellules de la souche WO-1 ont la possibilité de changer de phénotype, et elles peuvent se retrouver sous une forme blanche ou sous une forme opaque. Ce changement de phénotype a été corrélé avec des patrons d'expression des protéases différents dans les deux situations, les cellules opaques exprimant les SAPs 1 à 3 alors que les cellules blanches expriment seulement la SAP2. Lors de l'induction d'hyphes à pH neutre, c'est le gène SAP6 qui est principalement exprimé. Ces données indiquent que le patron d'expression des SAPs est déterminé par le type de cellules qui sont présentes dans le milieu. *In vitro*, les facteurs environnementaux présents dans le milieu où se retrouve le *Candida* interviennent au niveau de la quantité de Saps exprimées : le milieu utilisé, le pH et les substrats présents changent le niveau d'expression des Saps (White et Agabian, 1995).

Les conditions permettant l'expression des SAPs ont été évaluées (Hube et al., 1994 ; Hube, 1996 ; Monod et al., 1998). La *SAP1* est régulée durant les changements phénotypiques du *Candida*. Son expression est diminuée lorsque la cellule se retrouve en phase stationnaire et lors de l'ajout d'acides aminés dans le milieu. La présence de protéines dans le milieu où se trouve la cellule n'est pas nécessaire pour l'expression de cette protéase. La Sap2 est l'enzyme qui est le plus exprimé par la forme levure du *Candida* dans un milieu contenant des protéines, qui sont essentielles pour l'expression de cette protéase. C'est pourquoi les études faites sur la production de protéases par le *C. albicans*, avant l'identification de la famille de gènes, portaient probablement sur la Sap2. Plusieurs sources de carbone différentes peuvent induire cette Sap mais il doit absolument y avoir une source de carbone métabolisable pour l'expression de celle-ci. Cette Sap est exprimée lors de la phase de croissance exponentielle, à 25°C et à 37°C, et est inhibée à la phase stationnaire. La Sap3 est retrouvée lors du changement phénotypique ainsi que dans les conditions où la Sap2 est fortement exprimée. Contrairement à la *SAP1* et à la *SAP2*, elle est exprimée dans la phase stationnaire de l'organisme mais elle est inhibée en présence d'acides aminés. Pour l'expression de ces trois SAPs, un pH acide, entre 3 et 5, semble requis.

Comme la Sap2 a été la Sap qui a été la mieux étudiée, un modèle a été proposé pour montrer la régulation de son expression (Hube, 1994). Ce modèle est présenté à la figure 5. Il semblerait qu'il y aurait toujours une faible expression basale de Saps, soit de la Sap2 seule ou d'un ensemble de quelques Saps. En présence de protéines dans le milieu, ce niveau basal de Saps permettrait l'hydrolyse de celles-ci et la production de peptides qui augmenterait la production de Sap2. Donc, ce ne serait pas les protéines mais bien les peptides générés dans le milieu par la Sap elle-même qui

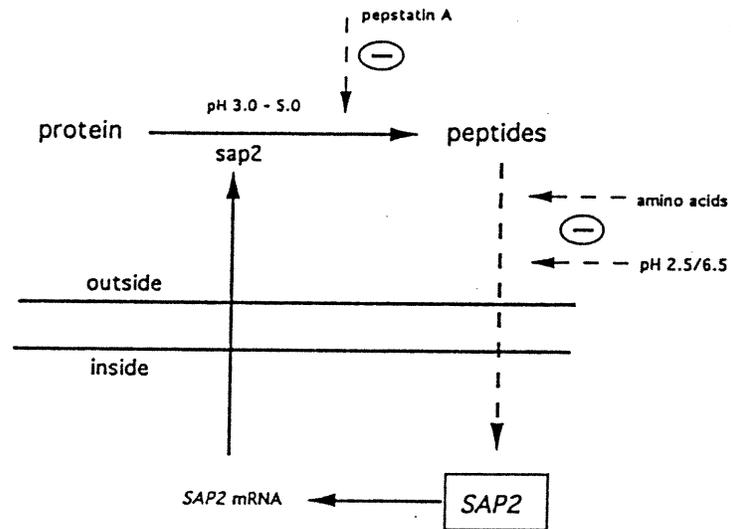


Figure 5 Modèle pour la régulation de l'expression de la Sap2, proposé suite aux différentes données obtenues sur cette Sap, chez le *C. albicans* (Hube, 1994).

agirait sur son expression, et il s'agirait donc d'une rétroaction positive. La Sap2 est active entre pH 3 et 5. Lorsque le pH devient trop acide ou trop basique, la vitesse à laquelle sont formés les peptides générés par la Sap2 est diminuée, puisque l'enzyme est moins active, ce qui diminue l'expression de cette Sap. Même lors de l'ajout de peptides à des pH inférieurs à 2.5 ou supérieurs à 6.5, la production de Sap est diminuée, ce qui indique qu'il y a également une inhibition au niveau du système de transport des peptides ou de la voie de transduction du signal dans la cellule à ces pH. L'ajout de pepstatine A inhibe l'activité de la Sap2 et il y a disparition de cette Sap, ce qui suggère que les peptides générés par la Sap2 sont importants pour l'expression de celle-ci.

Les Saps 4 à 6 ont été identifiées lors de la formation de tubes germinatifs induits par l'ajout de sérum au milieu de culture à pH neutre. Le pH doit être de 6 ou plus pour obtenir de grandes quantités de cette Sap. L'activité de ces enzymes n'a pas été démontrée à pH neutre mais il est possible que celles-ci soient stables à ce pH et qu'elles agissent dans des microniches acides. Certaines composantes protéiques du sérum semblent importantes pour l'induction de ces protéases, puisque lors de l'induction d'hyphes par d'autres méthodes, ces Saps n'ont pas été trouvées. La présence de glucides n'est pas essentielle pour l'induction de celles-ci et la présence d'acides aminés n'inhibe pas la production de ces Saps. L'expression de la Sap7 n'a pas été détectée dans aucune des conditions *in vitro* étudiées. La Sap8 est exprimée surtout à 25 °C et plus faiblement à 37 °C. Cette Sap est surtout présente lorsque les cellules sont en début de phase exponentielle. La Sap9 est retrouvée lorsque les cellules sont en phase stationnaire.

Comme l'illustre bien la figure 6, il y a expression différentielle des Saps *in vitro* selon les conditions où se retrouve la cellule. Cette

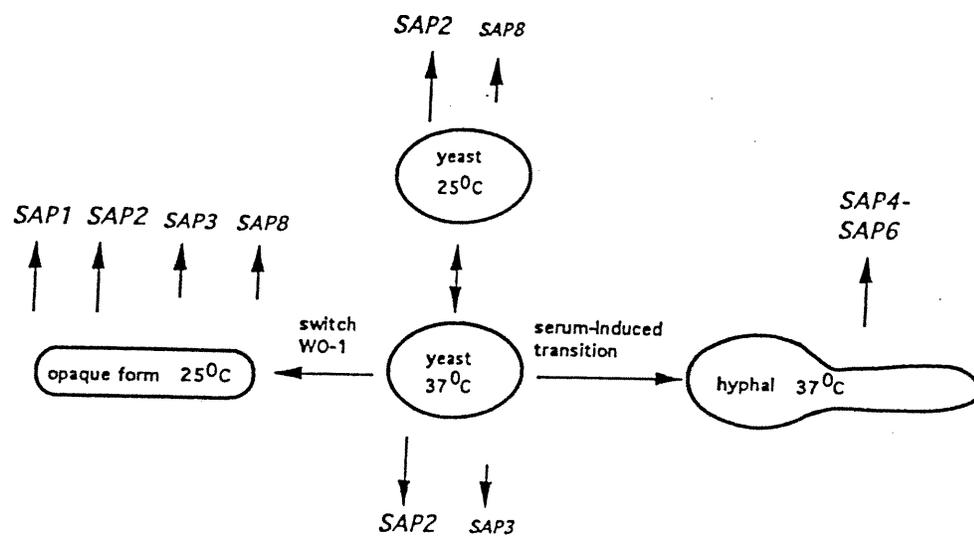


Figure 6 Expression différentielle des Saps de *C. albicans* selon la morphologie de la cellule et les conditions de croissance utilisées *in vitro* (Hube, 1998a).

caractéristique offre donc au *C. albicans* un outil puissant, lui permettant d'envahir des sites anatomiques variés. On peut constater que les Saps sont étroitement associées aux autres facteurs de virulence proposés chez le *Candida*. Les Saps interviennent et affectent l'adhérence des cellules au niveau des muqueuses et leur expression est modifiée lors du changement phénotypique ainsi que lors de la transition blastoconidie-hyphe. Il s'agit d'un facteur qui contribue grandement à la virulence du *Candida* et qui lui confère une grande capacité d'adaptation lui permettant d'envahir les muqueuses. En effet, le *Candida* a la possibilité d'exprimer les SAPs 4 à 6 dans des conditions où le pH est neutre, une condition retrouvée au niveau buccale, et d'exprimer d'autres SAPs dans des microniches acides. L'expression différentielle des SAPs permettrait donc au *Candida* de pénétrer les tissus de l'hôte en hydrolysant les protéines de surface, en augmentant l'adhérence grâce à l'hydrolyse de ces mêmes protéines, de dégrader les composants du système immunitaire de l'hôte ainsi que de digérer les protéines de l'hôte pour se procurer des éléments nutritifs tel l'azote, essentiel à sa croissance (Hube, 1996).

4.5 Implications des différentes Saps lors de la candidose.

Le développement de la biologie moléculaire a permis d'étudier directement la contribution des gènes à la virulence. Grâce à une méthode de perturbation de gènes spécifiques, la contribution de plusieurs des Saps a pu être étudiée. Des mutants homozygotes nuls ont été générés pour chacune des trois premières Saps (Hube et al., 1997). Les mutants ont montré des vitesses de croissance semblables à celle de la souche parentale dans un milieu riche. Lorsque les mutants ont été cultivés dans un milieu où les protéines étaient la seule source d'azote, les mutants *sap1* et *sap3* ont montré une vitesse de croissance plus lente que la souche parentale et le mutant *sap2* a montré une croissance très faible, formant des

agrégats et produisant une très faible activité protéolytique. Après l'ajout d'ions d'ammonium, le mutant *sap2* a repris une croissance normale. Ces observations démontrent bien l'importance de cette Sap. Après l'inoculation intraveineuse des mutants chez des souris et des cobayes, les animaux ayant reçu les mutants $\Delta sap1$, 2 ou 3 ont survécu beaucoup plus longtemps que les animaux ayant reçu la souche sauvage (Hube et al., 1997). Le même travail a été effectué pour les SAPs 4 à 6. Un mutant où les trois SAPs (4-6) ont été mutées, dans la même cellule, a été généré. Ce mutant montrait une croissance normale dans un milieu riche mais une faible croissance dans un milieu où des protéines étaient la seule source d'azote. Il a donc été proposé que ces trois Saps avaient un effet sur la production de la Sap2 puisque la présence de cette enzyme est requise pour une croissance optimale dans ce milieu. Lorsque le mutant $\Delta sap4-6$ a été inoculé par la voie intraveineuse chez des souris et des cobayes, les animaux ont survécu plus longtemps comparativement à la souche parentale (Sanglard et al., 1997). Ces deux études montrent l'importance de ces Saps dans l'infection systémique par le *C. albicans*. L'impact de ces mutations sur l'adhérence a été mesuré sur trois surfaces différentes, des billes enrobées de poly-L-lysine, des billes enrobées de Matrigel et des cellules buccales épithéliales humaines. L'ajout de pepstatine A a réduit l'adhérence à toutes les surfaces. Les mutants $\Delta sap1$, 2 et 3 n'ont montré aucun changement de leur adhérence aux billes, alors que le mutant $\Delta sap4-6$ a montré une réduction de celle-ci par rapport à la souche parentale. L'adhérence des mutants $\Delta Sap1$, 2 et 3 aux cellules buccales était réduite alors qu'elle était augmentée pour le mutant $\Delta sap4-6$ (Watts et al., 1998). Donc, certaines Saps seraient impliquées dans l'adhésion du *Candida* à certains tissus humains, soit seules ou en synergie.

La présence des différentes Saps a été détectée lors de l'interaction du *Candida* avec les tissus de l'hôte. Il a été démontré qu'il y a une forte

production des Saps 4, 5 et 6 après la phagocytose du *C. albicans* par des macrophages péritoniaux murins. Lorsque le mutant $\Delta sap4-6$ est mis en contact avec ces macrophages, il est tué 53 % plus efficacement que la souche sauvage. Ces Saps semblent donc intervenir dans la pathogénicité en permettant au *Candida* de résister aux mécanismes antimicrobiens des macrophages (Borg-von Zepelin et al., 1998). L'interaction entre les cellules endothéliales et les mutants $\Delta sap1$, 2 et 3 a été étudiée. Seule la Sap2 contribue à endommager ces cellules et aucune de ces trois Saps ne joue un rôle dans l'adhérence du *C. albicans* à ces cellules (Ibrahim et al., 1998). Dans le cas d'une péritonite murine causée par le *C. albicans*, l'activité de l'alanine aminotransférase ainsi que celle de l' α -amylase ont été mesurées dans le sérum des souris pour évaluer les dommages au foie et au pancréas. Lors de l'administration de la pepstatine A aux souris, il y avait une réduction de l'activité des deux enzymes, indiquant que les Saps jouent un rôle dans le développement de cette infection. Les différents mutants mentionnés plus haut ($\Delta sap1$, 2, 3 et 4-6) ont été étudiés dans ce modèle et seul le mutant $\Delta sap4-6$ amenait une réduction de l'alanine aminotransférase dans le sérum. Après l'administration de la pepstatine A aux animaux infectés avec ce mutant, l'activité ne pouvait être réduite davantage. Ceci indique donc que les Saps 4 à 6 jouent un rôle dans ce modèle de la candidose (Kretschmar et al., 1999). Par ailleurs, en utilisant un modèle de la candidose systémique chez la souris infectée par la voie intranasale, les souris injectées avec de la pepstatine A, avant l'infection et au cours de celle-ci, ont survécu, indiquant que les Saps jouent un rôle dans les premiers moments de l'infection et dans la dissémination de la levure (Fallon et al., 1997). La pepstatine A ne peut cependant pas être utilisée chez l'humain car plusieurs réactions métaboliques dépendent de protéases et la pepstatine est rapidement métabolisée par le foie, ce qui la retire rapidement de la circulation sanguine (Hoegl et al., 1996).

Dans un modèle faisant appel à l'épiderme humain reconstitué *in vitro*, l'ordre chronologique d'expression suivant des SAPs a été observé par RT-PCR : Sap1 et Sap2, Sap8, Sap6 et Sap3. L'apparition des Saps concordait de façon temporelle avec la pénétration en profondeur du *Candida*, et l'apparition de la Sap6 survenait lors de l'apparition de tubes germinatifs et d'hyphes. La détection des Saps avec des anticorps a démontré une expression prédominante des Saps 1 à 3. L'ajout de la pepstatine A ainsi que l'utilisation des mutants nuls des Saps a atténué les dommages au modèle. Donc, les Saps participent à la candidose cutanée et les dommages causés aux tissus sont corrélés avec l'expression de celles-ci (Schaller et al., 2000). Dans une étude récente, une méthode de recombinaison génétique basée sur le principe de fusion entre le gène étudié et un gène rapporteur a été utilisée pour évaluer l'expression des Saps *in vivo* (Staib et al., 2000). Cette étude démontre que l'expression des Saps dépend du type d'infection et du stade de progression de l'infection. Ainsi, les SAPs 5 et 6 sont exprimées activement lors de l'invasion expérimentale de l'oesophage par les hyphes de *C. albicans*. La SAP5 est exprimée immédiatement après l'inoculation de la cavité péritoniale lorsqu'il n'y a que des blastoconidies présentes. L'expression de la SAP6 apparaît lors de la formation des hyphes. L'expression de la SAP2 apparaît quant à elle au stade tardif des infections expérimentales, lorsque le *Candida* envahit les organes profonds. Les autres gènes codant pour les SAPs sont faiblement exprimés. Les Saps 5 et 6 seraient donc impliquées lors de l'invasion et lorsque le *Candida* est en petit nombre alors que la Sap2 interviendrait lors de la destruction des tissus et lorsque les cellules sont en grand nombre (Staib et al., 2000).

Le rôle des SAPs dans la candidose vaginale est très étudié aussi car celle-ci constitue avec la candidose buccale les principaux sites d'infection par le *C. albicans*. La présence de protéases aspartyles sécrétées a été détectée en concentration plus grande dans les sécrétions vaginales de

femmes porteuses de *C. albicans*. Une seule protéine de 43 kDa a été identifiée dans les sécrétions vaginales. De plus, une souche productrice de Saps causait des infections plus dommageables et plus persistantes qu'un mutant déficient en protéases lors de l'infection expérimentale chez le rat (De Bernardis et al., 1990). Par ailleurs, il a été démontré que les souches de *C. albicans* provenant de patientes atteintes d'une candidose vaginale étaient plus protéolytiques que celles provenant de porteurs asymptomatiques (Cassone et al., 1987). À l'aide d'un modèle de vaginite chez le rat, il a été démontré que les souches vaginopathogènes exprimaient les Saps 1 et 2 pendant la première semaine d'infection et adhéraient mieux aux cellules vaginales épithéliales (De Bernardis et al., 1995). Lorsque les mutants nuls des Saps mentionnés ci-haut ont été introduits dans le modèle de la vaginite chez le rat, les mutants $\Delta sap1$ à 3 étaient moins virulents, ce qui n'était pas le cas pour le mutant $\Delta sap4-6$. Le mutant $\Delta sap2$ s'est montré particulièrement avirulent et aucune activité protéolytique n'a été trouvée dans les sécrétions vaginales des rats infectés avec ce mutant. Ceci indique que différentes Saps jouent un rôle dans la vaginite causée par le *C. albicans* (De Bernardis et al., 1999a). Il a également été démontré que les souches isolées des patientes atteintes d'infection au VIH et d'une candidose vaginale produisaient de plus grandes quantités de Saps *in vitro*. Lorsque ces souches isolées de patientes atteintes d'infection au VIH ont été inoculées chez le rat, elles se sont avérées plus virulentes (De Bernardis et al., 1999b).

L'ensemble de ces études démontre que les Saps sont impliquées dans la virulence du *C. albicans*, puisqu'elles sont présentes aux sites d'infections causées par cette levure. De plus, les résultats suggèrent que l'expression différentielle des SAPs est fonction des sites et des étapes de l'infection, reflétant ainsi les conditions environnementales où se retrouve le *Candida*.

4.6 L'implication des Saps dans la candidose orale.

4.6.1 Les Saps impliquées dans la candidose orale chez les sidéens.

La croissance du *C. albicans* a été démontrée dans la salive humaine, et c'est l'espèce qui a la plus forte activité protéolytique dans cet environnement (Wu et Samaranayake, 1999). Chez les patients atteints d'infection au VIH, la candidose orale est très fréquente. Le *C. albicans* est l'espèce qui est rencontrée dans 86 % des cas. Plus les stades de l'infection au VIH progressent, plus les patients semblent prédisposés à la candidose orale. Chez toutes les souches de *C. albicans* isolées de ces patients, la présence d'une activité protéolytique a été détectée. Les souches isolées aux phases plus avancées du SIDA semblent produire plus de Saps que celles provenant de patients aux stades moins avancés (De Bernardis et al., 1992). Dans une autre étude, les souches isolées des patients infectés au VIH produisaient aussi plus de Saps, mais il n'y avait pas de relation avec le stade de l'infection au VIH. Cependant, les souches produisant le plus de Saps étaient moins sensibles aux antifongiques utilisés, démontrant qu'il semble y avoir une sélection des souches produisant davantage de protéases chez les patients atteints du SIDA (Ollert et al., 1995).

Il a également été démontré que les souches isolées des patients atteints du SIDA sont plus virulentes chez la souris, et que les gènes SAPs 1 et 2 se retrouvent dans le génome de toutes les souches de *C. albicans*, même celles isolées chez des individus normaux. Ceci démontre encore qu'il semble y avoir une sélection de souches plus virulentes chez les personnes séropositives (De Bernardis et al., 1996). L'épithélium oral de trois patients atteints d'infection au VIH et de candidose orale ont été récoltés. Grâce à un anticorps dirigé contre les Saps 1 à 3, il a été démontré

qu'au moins une des trois Saps était exprimée dans chacun des échantillons. De plus, les Saps ont été détectées chez le *Candida* qui adhère aux cellules épithéliales, au site de contact entre les deux cellules, ce qui démontre bien l'importance des Saps dans la pathogenèse de la candidose orale (Schaller et al., 1999a). Il a aussi été démontré que les inhibiteurs de protéases utilisés dans le traitement de l'infection au VIH seraient capables d'inhiber l'activité des Saps du *Candida* et diminueraient l'adhérence de celui-ci (Borgvon Zepelin et al., 1999). Ces données montrent donc que les Saps interviennent dans la candidose buccale et ce, chez un groupe de patients où le *Candida* cause beaucoup de problèmes.

4.6.2 L'expression *in vivo* des Saps au cours de la candidose orale.

Plus récemment, trois études ont été entreprises afin d'examiner l'expression *in vivo* des SAPs au cours de la candidose orale. La première étude a été effectuée en utilisant un modèle *in vitro* de la candidose orale réalisé à l'aide d'un épithélium buccal humain reconstitué et qui reproduit les conditions *in vivo* à l'exception de la réponse humorale et cellulaire. Deux échantillons cliniques ont également été évalués. Pendant les 36 premières heures suivant l'inoculation du *C. albicans in vitro*, aucune SAP n'a été exprimée. L'expression des SAPs 1 et 3 a été tout d'abord détectée par RT-PCR, 42 heures après l'inoculation, associée à de faibles altérations morphologiques de l'épithélium. À 48 heures, l'expression de la SAP6 est apparue en même temps que la formation de tubes germinatifs et l'épithélium comportait plusieurs lésions. L'expression des SAPs 2 et 8 est apparue plus tardivement, 60 heures après l'inoculation. Aucune expression des SAPs 4 et 5 n'a été observée dans ce modèle. Lorsque l'analyse RT-PCR a été effectuée sur les prélèvements buccaux provenant des deux patients, le premier, qui était au stade précoce de la candidose orale, a permis d'identifier l'expression des SAPs 1, 3 et 6, correspondant aux SAPs

exprimées plus tôt dans le modèle *in vitro*. Le deuxième patient, qui présentait une candidose chronique, a révélé l'expression des SAPs 1, 2, 3 et 6, correspondant aux résultats obtenus au stade tardif du modèle *in vitro* (Schaller et al., 1998).

La deuxième étude a permis d'approfondir les observations de la première, puisqu'elle a été réalisée à l'aide du même modèle. Les Saps ont été localisées à l'aide d'anticorps, et de grandes quantités des Saps 1 à 3 ont été détectées dans les parois cellulaires des blastoconidies et des hyphes, au point de contact entre le *Candida* et les cellules épithéliales. De plus faibles quantités des Saps 4 à 6 ont été détectées, exclusivement dans les parois des hyphes. Après l'ajout de la pepstatine A, il y a eu réduction des lésions observées. Les mutants $\Delta sap 1, 2, 3, 4-5-6$ et $1-3$ ont tout de même produit des dommages. Le mutant $\Delta sap1-3$ a causé le moins de dommages, suivi des trois mutants individuels. Le mutant $\Delta sap4-6$ a produit autant de dommages que la souche sauvage. Ceci indique que ces Saps ne semblent pas jouer de rôle dans la candidose orale. Il est important de noter qu'il n'y a eu seulement que des réductions des lésions causées par les mutants, ce qui suggère, que d'autres facteurs participent à la virulence du *C. albicans*. L'expression des SAPs a été modifiée lors de l'infection avec les mutants nuls. Lors de l'infection avec le mutant $\Delta sap1-3$, l'expression de la SAP5 a été détectée et dans l'infection avec les mutants $\Delta sap1$ et $\Delta sap1-3$, une expression plus forte des SAPs 2 et 8 a été détectée. Ceci indique que le *C. albicans* pourrait augmenter l'expression des autres SAPs pour compenser certaines SAPs qui sont non fonctionnelles (Schaller et al., 1999b).

La dernière étude a démontré l'expression des SAPs dans la salive de dix patients ayant une candidose orale et de huit porteurs sains de *C. albicans*. L'expression des SAPs 4 à 6 a été détectée par RT-PCR chez tous

les patients et celle de la SAP2 chez des sujets des deux groupes. L'expression des SAPs 1 et 3 a été détectée seulement chez les patients atteints de candidose. L'expression de la SAP7 a été détectée pour la première fois chez plusieurs patients des deux groupes. L'expression simultanée de toutes les SAPs a été démontrée chez certains patients atteints de candidose. Sept sujets ont servi de témoins négatifs et chez aucun de ceux-ci, il n'y a eu d'expression de SAPs. Cette étude a démontré chez un nombre limité de patients l'expression différentielle des SAPs au cours de l'infection (Naglik et al., 1999). Ceci montre bien l'importance des SAPs dans la candidose orale. Toutefois, puisque l'étude a été réalisée à l'aide d'un seul prélèvement provenant de chacun des patients, aucune information n'a pu être générée concernant l'évolution temporelle de l'expression des SAPs *in vivo*.

5. Les phospholipases.

Un autre type d'enzyme extracellulaire a été identifié chez le *C. albicans*. Il s'agit des phospholipases (Muhlschlegal et al., 1998 ; Ghannoum 2000). Ces enzymes jouent un rôle dans la virulence de plusieurs microorganismes. Elles ont été identifiées pour la première fois chez le *Candida* dans les années 60 par deux groupes différents. Le terme phospholipase réfère à un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent un ou plusieurs liens ester des glycérophospholipides (Ghannoum, 2000). Une distinction est cependant faite entre celles-ci puisque chaque phospholipase coupe un lien ester particulier des phospholipides. Les phospholipases sont donc divisées en quatre groupes (A, B, C et D), selon le lien qu'elles coupent. Au début, seule l'espèce *albicans* du genre *Candida* semblait avoir la possibilité de sécréter des phospholipases. Cependant, la présence de ces enzymes a récemment été démontrée chez les espèces non-*albicans*

chez qui les quantités sécrétées étaient beaucoup moins importantes que chez le *C. albicans* (Ghannoum, 2000).

Chez le *C. albicans*, trois types de phospholipases ont été identifiés : la lysophospholipase, la lysophospholipase-transacylase et la phospholipase B (Banno et al., 1985). La lysophospholipase agit en coupant les acides gras sur les lysophospholipides ; la lysophospholipase-transacylase permet l'ajout d'un acide gras sur un lysophospholipide, ce qui permet la formation d'un phospholipide ; et la phospholipase B est plus complexe puisqu'elle possède une activité hydrolase, qui peut cliver des acides gras sur des phospholipides et sur des lysophospholipases, et une activité transacylase qui lui permet de former des phospholipides (Ghannoum, 2000). La présence de deux formes de lysophospholipase-transacylase a été mise en évidence chez le *C. albicans* (Takahashi et al., 1991). Un autre groupe a purifié une autre lysophospholipase-transacylase, différente de celles trouvées dans l'autre étude, qui avait été identifiée chez une souche ayant une activité phospholipase B. Cette enzyme possédait les deux activités hydrolases ainsi que l'activité transacylase (Mirbod et al., 1995). Pour cette raison, la définition de phospholipase B est plus complexe que celle des autres types de phospholipase.

Deux gènes codant pour des phospholipases ont été clonés chez le *C. albicans* : *PLB1* (Hoover et al., 1998) et *PLB2* (Sugiyama et al., 1999). Le gène de la *PLB1* code pour une préprotéine de 605 résidus, ce qui correspond aux grandeurs retrouvées chez les phospholipases des autres levures. À la portion amino-terminale de la protéine mature, il faut noter l'absence de 17 acides aminés codés par le gène, ce qui indique probablement la présence d'une séquence-signal qui dirige l'enzyme vers la voie de sécrétion extracellulaire de la cellule. Il a été démontré que les blastoconidies et les pseudohyphes produisaient de grandes quantités de la

Plb1p et que les hyphes en produisaient moins, suggérant un rôle dans l'adhérence du *Candida* (Hoover et al., 1998). La *PLB2* est très semblable à la *PLB1*, avec 65 % d'homologie au niveau de sa séquence en acides aminés, et elles possèdent des séquences en nucléotides semblables. Très peu d'études ont été faites sur les gènes *PLB1* et *PLB2* et beaucoup restent encore à découvrir. La présence d'un gène codant pour une phospholipase D a également été mise en évidence chez le *Candida* (Kano et al., 1998). Cette enzyme semble jouer un rôle dans la régulation du changement entre blastoconidies et hyphes chez cette levure (McLain et Dolan, 1997). La présence de plusieurs gènes codant pour des phospholipases a donc été démontrée chez le *C. albicans*.

Plusieurs études ont permis de démontrer le rôle des phospholipases dans la virulence du *C. albicans*. Lorsque le *Candida* est placé sur une membrane chorio-allantoïque, les blastoconidies se développent en hyphes et une activité phospholipase est retrouvée, concentrée à l'extrémité des hyphes. L'activité est plus forte lorsque les hyphes ont passé la membrane cellulaire et qu'elles sont en contact avec le cytoplasme des cellules (Pugh et Cawson, 1977). Il a été démontré que les souches de *C. albicans* qui ont une forte production de phospholipases, sont plus adhérentes aux cellules épithéliales buccales et sont plus virulentes lorsqu'elles sont inoculées par la voie intraveineuse à des souris (Barrett-Bee et al., 1985). La comparaison entre 11 souches de *C. albicans* isolées d'hémocultures de patients et de 11 souches commensales, a montré que les premières avaient une plus grande production de phospholipase extracellulaire (Ibrahim et al., 1995). Une plus forte production de phospholipase a été démontrée chez une souche qui était davantage virulente dans un modèle murin (Ibrahim et al., 1995). Une augmentation du taux de mortalité a été mise en corrélation avec la forte production de phospholipase (Ibrahim et al., 1995).

Chez 66 souches isolées de patients, 57 ont présenté une activité phospholipase et 55 de ces 57 souches se sont montrées virulentes dans un modèle murin (Kothavade et Panthaki, 1998). Un mutant nul du gène *PLB1* a été généré et la virulence de celui-ci était atténuée dans un modèle murin de la candidose systémique. La délétion de ce gène ne semblait pas affecter l'adhérence du *Candida* mais réduisait la pénétration des cellules, ce qui pourrait ainsi diminuer la dissémination du *Candida* (Leidich et al., 1998). Le même mutant a également été utilisé chez la souris infectée par la voie intragastrique. Le mutant causait beaucoup moins de dommage que la souche parentale et celui-ci ne pénétrait pas la muqueuse gastrique, qui constitue une porte d'entrée de l'infection systémique dans ce modèle (Ghannoum, 2000). Les phospholipases semblent donc jouer un rôle important dans les infections causées par le *C. albicans*. Armé des Saps et des phospholipases, le *C. albicans* est capable d'hydrolyser les peptides ainsi que les phospholipides, les principaux constituants des membranes cellulaires des cellules. Il faut également noter que les phospholipases interviennent dans les autres facteurs de virulence proposés chez cette levure, entre autre dans l'adhérence et possiblement dans le dimorphisme cellulaire, ce qui montre bien la complexité de l'infection causée par le *C. albicans*.

6. Les modèles animaux dans l'étude des candidoses orales.

Les modèles animaux sont grandement utilisés pour l'étude des différentes infections causées par le *C. albicans*. L'utilisation de ces modèles s'est vite montrée essentielle pour la compréhension des candidoses orales. En effet, les humains peuvent être peu coopératifs et assez variables au niveau des habitudes alimentaires, des habitudes sociales, du statut du système immunitaire et de l'usage de drogues et/ou médicaments (Allen, 1994). Les modèles animaux constituent des

environnements contrôlés où les paramètres, tel que la diète, l'usage d'antibiotiques, la microflore, le statut du système immunitaire, peuvent être manipulés pour l'étude de phénomènes particuliers. Une variété d'espèces animales a été utilisée dans l'étude de ce type de candidose (Allen, 1994). Comme il a été mentionné dans les études résumées plus haut, la souris est l'espèce la plus souvent utilisée. La souris est peu dispendieuse, facile à obtenir, ainsi qu'à manipuler et est disponible dans une variété de souches qui sont très bien caractérisées quant à leur système immunitaire et leurs habitudes de vie. Le seul problème vient du fait que la cavité buccale de cet animal est très petite. Son utilisation par contre est retenue grâce à ses nombreux avantages.

Il a été démontré que suite à l'inoculation orale d'une souris adulte normale avec des blastoconidies de *C. albicans*, il y avait une colonisation reproductible de la cavité buccale durant les premiers jours puis élimination du *Candida*. De plus, l'analyse temporelle a démontré des réactions inflammatoires distinctes aux stades successifs de la colonisation (Lacasse et al., 1990). Il a également été démontré que la résistance acquise lors d'une première infection ainsi que la persistance en petit nombre du *Candida* dans la bouche des souris, mimeraient la situation de porteur qu'on rencontre chez certains humains (Lacasse et al., 1993). Ces données suggèrent donc que l'utilisation d'un modèle murin permettrait l'étude de la candidose orale car ce modèle mime bien l'infection rencontrée chez l'humain.

Avec l'avènement de la biologie moléculaire, il y a eu l'apparition des organismes génétiquement modifiés qui, en recherche, permettent l'étude de phénomènes particuliers. Récemment, une souris transgénique exprimant, de façon stable, le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 dans ces cellules T CD4 ainsi que dans celles de la lignée dendritique/macrophage,

les cellules cibles de ce virus chez l'humain, a été mise au point (Hanna et al., 1998a). Ces souris ont développé des dommages physiologiques comparables à ceux observés chez les patients atteints du VIH. Plusieurs lignées de souris ont été générées, chacune exprimant des patrons de gènes différents du VIH-1, et il a été démontré que le gène *NEF* constitue le déterminant majeur permettant au virus de causer la maladie (Hanna et al., 1998b). Ces souris constituent donc un organisme simple, où les paramètres d'expérimentation sont facilement contrôlables, permettant une étude temporelle des phénomènes survenant au cours de l'infection par le VIH.

Malgré toutes les informations caractérisant les enzymes extracellulaires du *C. albicans*, les détails concernant leur apparition au cours de la candidose orale, dans des conditions *in vivo*, ne sont pas bien connus. Le but de nos expériences est donc de montrer l'apparition des différentes *SAPs* et de la phospholipase B au cours du développement de la candidose orale réalisée expérimentalement chez des souris normales, où il y a élimination du *Candida*, et chez des souris transgéniques exprimant le VIH dans leurs cellules, où il y a une phase de porteur du *Candida* avant la mort des individus comme chez les sidéens. Pour ce faire, les cellules de *C. albicans* ont été recueillies dans les cavités buccales des souris à différents moments au cours de l'infection et l'ARN a été extrait de celles-ci. Des réactions de RT-PCR ont alors été effectuées sur l'ARN total avec des amorces spécifiques pour chacune des *SAPs* et pour la phospholipase B. Par la suite, la présence de produits amplifiés pour chacun des gènes a été détectée. Nous avons pour la première fois montré l'expression différentielle des *SAPs* et de la *PLB1* lors du développement de la candidose orale chez des souris C3H et DBA/2 normales et chez des souris C3H transgéniques. Les détails des expériences et les résultats sont présentés dans l'article qui suit.

ARTICLE

Veillez noter que l'article qui suit à été envoyé pour fin de publication. Pour des fins de compréhension et d'homogénéisation, la pagination et la numérotation des figures ont été modifiées et différeront donc de celles retrouvées dans l'article publié.

Rôles des différents coauteurs de l'article : Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and HIV-1 transgenic mice.

Jean-Sébastien Ripeau

Responsable de la conceptualisation et de la réalisation expérimentale du projet.

Marie Fiorillo

Participation à la mise au point de l'extraction de l'ARN chez *Candida albicans*.

Francine Aumont

Agente de recherche et chargée de l'encadrement des étudiants gradués au laboratoire.

Paul Jolicoeur

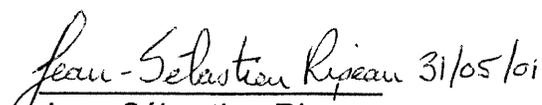
Collaborateur au projet et fournisseur des souris transgéniques exprimant des gènes du VIH.

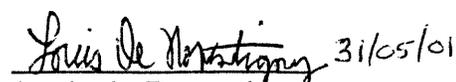
Pierre Belhumeur

Codirecteur du projet.

Louis de Repentigny

Directeur du projet.


Jean-Sébastien Ripeau 31/05/01
Jean-Sébastien Ripeau


Louis de Repentigny 31/05/01
Louis de Repentigny

**Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes
during oral infection in intact and HIV-1 transgenic mice**

Jean-Sébastien Ripeau¹, Marie Fiorillo¹, Francine Aumont¹, Paul Jolicoeur²,
Pierre Belhumeur¹ and Louis de Repentigny¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine,
University of Montreal and Sainte-Justine Hospital, Montreal;

²Laboratory of Molecular Biology, Clinical Research Institute of Montreal,
Montreal, Quebec, Canada.

Running head: Expression of *Candida albicans* virulence genes

Word count: Abstract **166** ; Text **5,197**

FOOTNOTES

Presented in part : 5th ASM Conference on Candida and Candidiasis, Charleston, SC, March 1999 (abstract A17).

All animal experiments were approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal.

Financial support : Medical Research Council of Canada/Pharmaceutical Manufacturers Association of Canada Health Program, and Pfizer Inc. (PA-14592).

Reprints or correspondence: Dr. Louis de Repentigny, Department of Microbiology and Immunology, Sainte-Justine Hospital, 3175 Côte-Ste-Catherine, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5 (louisr@globale.net).

ABSTRACT

In order to comprehensively assess the *in vivo* expression of *C. albicans* hydrolytic enzyme genes during the development and maintenance of oropharyngeal candidiasis (OPC), we conducted a controlled sequential analysis of the temporal expression of individual members of the *SAP* gene family and *PLB1* in a murine model of OPC. Acute infections in intact C3H and DBA/2 mice were terminated by clearance of *C. albicans* within 7 days after oral inoculation, but transgenic (Tg) mice expressing HIV-1 were persistently colonized until a final outgrowth before death. In contrast to the sustained expression of other *SAPs* and *PLB1*, *SAP7* and *SAP8* were conspicuously distinguished by their transient expression in both intact and Tg mice. *SAP5* and *SAP9* were most strongly expressed throughout the course of infection in the Tg mice. These findings indicate that expression of individual members of the *C. albicans* *SAP* gene family is differentially regulated during experimental OPC, and that specific *SAPs* may degrade distinct host substrates at successive steps in progression of disease.

INTRODUCTION

Candida spp. are the most frequent cause of mucosal and invasive fungal infections. Oropharyngeal candidiasis (OPC), a common mucosal infection, occurs in the majority of human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients [1], although decreases have recently been observed with highly-active antiretroviral therapy (HAART) [2]. *Candida* spp. are also responsible for 10% of all nosocomial bloodstream infections [3]. The leading cause of candidiasis, *Candida albicans*, is an imperfect diploid dimorphic fungus which resides as a commensal of the mucosae and the gastrointestinal tract. Intraoral *C. albicans* is found in approximately 40% of normal humans [4]. However, colonization often leads to opportunistic mucosal or life-threatening deep organ infection in the immunocompromised host. The ability of *C. albicans* to colonize, penetrate and damage host tissues depends upon imbalances between *Candida* virulence attributes and specific defects in host immune defenses; however, the exact pathways leading to this imbalance are still unclear. *C. albicans* possesses a multiplicity of properties including adhesins, dimorphism, phenotypic switching, molecular mimicry of mammalian integrins, and secretion of hydrolytic enzymes, each with a low propensity for enhancing fungal infection and none necessarily dominant, and all even in combination unable to overcome fully intact host defenses [5]. Hydrolytic enzymes are probable virulence factors in pathogenic *Candida* species [reviewed in 6-10]. Among these, *C. albicans* secretory aspartyl proteinases (Saps), under the control of a multigene family (*SAP1-SAP9*) expressing distinct isoenzymes which are regulated differentially at the mRNA level in vitro [11-13], are implicated in the breakdown of several host substrates [8]. Evidence has been presented that phospholipase B expressed by at least two genes (*PLB1* and *PLB2*) [14,15], also contributes to the pathogenesis of candidiasis by the degradation of host tissues [16,17]. As a highly evolved pathogen capable of colonizing and infecting a multiplicity of body sites, each representing a distinct ecological

niche, *C. albicans* must have the ability to selectively express the required specific sets of virulence attributes at each step of host invasion. In this regard, reverse transcription PCR (RT-PCR) analysis of *in vivo* expression of *SAP1-SAP7* genes on single samples of saliva, collected from a limited number of HIV-positive and – negative patients with OPC, revealed that *SAP2* and *SAP4-SAP6* were uniformly expressed, and that all seven *SAP* genes were simultaneously expressed in some patients [18]. A temporal progression of *SAP* expression in the order *SAP1* and *SAP3*, *SAP6*, *SAP2* and *SAP8* was observed in an *in vitro* model of OPC using reconstituted human epithelium [19]. Finally, assessment of expression of *SAP1-SAP6* genes using *in vivo* expression technology (IVET) revealed that *SAP5* and *SAP6* genes were strongly activated at a single time point examined during infection of the esophageal mucosa in experimentally infected, immunocompromised mice, whereas only low-level expression of *SAP1-SAP4* occurred [20]. In order to comprehensively assess the *in vivo* expression of *C. albicans* extracellular hydrolytic enzyme genes during the development and maintenance of OPC and to further our understanding of their role in pathogenesis, we conducted for the first time a controlled sequential analysis of the temporal expression of individual members of the *SAP* gene family and *PLB1*, in a model of OPC in intact and transgenic mice expressing HIV-1.

MATERIALS AND METHODS

Candida strains

Sap-producing [21] *C. albicans* LAM-1 (serotype A) was originally isolated from the blood of a patient with systemic candidiasis [22]. Sap-and phospholipase-producing [16] *C. albicans* CA30, a vaginal isolate [23], was obtained from G.T. Cole, Medical College of Ohio, Toledo. Cultures were maintained at 4°C on Sabouraud dextrose agar (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD).

Culture conditions

In order to optimize the RT-PCR procedure and to generate positive controls, *C. albicans* LAM1 was grown with rotary agitation under conditions known to induce the expression of the following *SAP* genes : *SAP2*, Yeast Carbon Base (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 1% (w/v) dextrose and 0.5% (w/v) BSA (fraction V; Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) (YCB – BSA), for 24 h at 25°C [11]; *SAP4-SAP6*, modified Lee's medium for 48 h at 37°C, and resuspended in 5% (v/v) fetal calf serum for 1 h at 37°C [11]; *SAP8* and *SAP9*, in YCB-BSA medium for 8 h and 45 h, respectively, at 25°C [13]. Positive controls for expression of the remaining individual *SAP* genes and *EFB1* were obtained by growing *C. albicans* LAM-1 blastoconidia in Sabouraud dextrose broth (SDB; Difco) for 15 h at 37°C with rotary agitation. For expression of *PLB1*, *C. albicans* LAM-1 and CA30 were grown in SDB at 37°C for 3.5 h with rotary agitation.

For experimental infection, the *C. albicans* LAM-1 inoculum was prepared from late-log-phase blastoconidia grown in SDB for 18 h at 30°C with rotary agitation.

Mice

C3H and DBA/2 male and female mice, 5 to 6 weeks old, were obtained from Charles River Canada (St-Constant, QC) and housed at the University of Montreal Animal Care Unit.

The generation of CD4C/HIV^{MutA} transgenic (Tg) mice and control non-Tg littermates was done as previously described [24]. CD4C/HIV^{MutA} mutant DNA was constructed using the mouse CD4 enhancer and the human CD4 promoter to drive the expression of the transgene. Founder mouse F21388 was bred on the C3H background, and progeny mice were genotyped and routinely examined for signs of disease. Animals from this line express moderate levels of the transgene, with 50% survival at 3 months [24]. Several HIV-1 genes (gag, pol, vif, vpr, tat and vpu) in the CD4C/HIV^{MutA} mice are dispensable to elicit AIDS-like disease, characterized by failure to thrive, wasting, severe atrophy and fibrosis of lymphoid organs, loss of CD4⁺ T cells, interstitial pneumonitis, and tubulointerstitial nephritis [24]. These changes are not observed in control non-Tg littermates [24]. Specific pathogen-free male and female Tg mice and non-Tg littermates were housed in a protective environment, in sterilized individual cages equipped with air filter hoods. The animals were supplied with sterile water and were fed with sterile mouse chow.

Animal model of mucosal candidiasis

Oral inoculation with *C. albicans* LAM-1 was done as described previously [25, 26]. Briefly, *C. albicans* blastoconidia were washed twice in sterile PBS (0.01 M phosphate-buffered saline, pH 7.4) and counted in a hemacytometer. Mice were anesthetized with 0.1 ml of a solution containing 1 ml of Hypnorm[®] (fentanyl citrate 0.315 mg/ml and fluanisone 10 mg/ml; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), 1 ml of Versed[®] (midazolam 5 mg/ml; Hoffmann-LaRoche Limited, Mississauga, Ontario), and 2 ml of water, by

intraperitoneal injection. They were then inoculated by topical application of 10^8 pelleted blastoconidia recovered on sterile calcium alginate swabs (Fisher Scientific Ltd, Nepean, ON).

A longitudinal quantification of *C. albicans* in the oral cavities of individual mice was done from day 1 until sacrifice of the animals by CO₂ inhalation. Swabs used for sampling were dissolved in 2 ml volumes of Ringer's citrate buffer [27], and a portion of the cell suspension (1.8 ml) was immediately used for RNA isolation. Serial dilutions of the remaining cells (0.2 ml) were prepared in 0.05 M phosphate-buffered saline (pH 7.4) and plated on Sabouraud dextrose agar supplemented with chloramphenicol (0.05 g/l). Plates were incubated for 24h at 37°C.

RNA isolation

In order to lyse murine cells and bacteria, the *C. albicans* cell suspension (1.8 ml) was treated with 180 µl of a solution containing 5% (v/v) of Tween-20 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), Nonidet P-40 (Biopharm, Montreal, QC) and Triton X-100 (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ), and incubated for 15 min at 37°C. The cells were centrifuged for 5 min at 16,000 g, washed once with PBS, and the pellets were stored at -80°C. For RNA isolation, the pelleted cells from individual mice were thawed, resuspended in 50 µl of PBS, pooled to a maximum of 3.7×10^4 cells in 2-ml screw-cap microtubes (Gordon Technologies, Mississauga, ON), and centrifuged. Total RNA was isolated from the cell pellet using the RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON) Mechanical Disruptor Protocol, employing 0.5 mm glass beads (Sigma) and three successive 30 sec runs in a FP120 Fast Prep Cell Disruptor (Savant Instruments Inc., Holbrook, NY) set at a speed of 6.5 m/sec. Microscopic examination demonstrated complete disruption of *in vitro*-grown *C. albicans* blastoconidia and hyphae by this treatment. The RNA, contained in 50 µl of

RNase-free water (Qiagen), was treated with 7.68 μ l of 10 x DNase I Reaction Buffer (Gibco BRL, Burlington, ON), 7.68 μ l of Dnase I (1 U/ μ l; Gibco BRL), 7.68 μ l of 0.001 M dithiothreitol (Gibco), 2.2 μ l of Rnase OUT™ recombinant ribonuclease inhibitor (1 U/ μ l; Gibco BRL), and 1.47 μ l of RNase-free water, and incubated for 15 min at 22°C. The DNase I was inactivated by the addition of 7.68 μ l of 25 mM EDTA to the reaction mixture and heating for 10 min at 65°C. The sample volume was adjusted to 100 μ l with RNase-free water, and the RNA preparation was cleaned using the RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup (Qiagen). The experimental conditions for producing an optimal yield and purity of RNA were determined by measuring the A_{260} and A_{280} of RNA isolated from *C. albicans* LAM-1 blastoconidia grown in SDB for 15 h at 37°C. The integrity and size distribution of the isolated RNA were confirmed by agarose gel electrophoresis.

Reverse transcription PCR

In order to assess gene expression independently of the rise and fall of oral burdens of *C. albicans* during the course of infection, RT-PCR for each gene and time after infection was conducted using an amount of RNA originating from 170 CFU of *C. albicans*.

Primers for *SAP_s* and *PLB1* were selected from their respective gene sequences in GenBank. Amplification of the predicted products for each of the primer sets was verified by PCR using *C. albicans* genomic DNA as template.

The Sensiscript™ Reverse Transcriptase kit (Qiagen) was used for cDNA synthesis, as recommended by the manufacturer, with the following specific pairs of upstream and downstream primers: 5'-AGGGAAAGGTATTTACT-3' and 5'-CAATTCAGCTTGGAAGGCATC-3' for *SAP1*; 5'-TGATTGTCAAGTCACTTATAGT-3' and 5'-CTTAGGTCAAGGCAGAAATACTG-

3' for *SAP2*; 5'-GACAAGCCACTAGTGGAC-3' and 5'-CAATCTCCAGAGGAGTACTTCC-3' for *SAP3*; 5'-GTGCTGGTTCTTATTCCCCAGCAT-3' and 5'-TGTTTGGAAAAGGAATTCGG-3' for *SAP5*; 5'-GCCAACTTTGCCGTTATTGATAACAC-3' and 5'-ACTATCTACGTTTGGGGGTATTC-3' for *SAP7*; 5'-GCTACCATCACTGTTGGTTCAAAC-3' and 5'-CGAGAACACAGAACATTC-3' for *SAP8*; 5'-CGCTGATGATACCAGTGCCAT-3' and 5'-GCGAAAGCAACAACCCATACAC-3' for *SAP9*; and 5'-TGAACGTCAATTCTCATCACAGGG-3' and 5'-CCTCGGCTGGGTTGTTTTGTGCAC-3' for *PLB1*. The primer pair 5'-ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC-3' and 5'-CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG-3' was used to amplify the *EFB1* gene as a positive mRNA control, and to detect any contaminating genomic DNA by the presence of a 365 bp intron [19]. After incubation at 37°C for 1 h, the cDNA was amplified by the Standard PCR Protocol using Taq DNA polymerase (Qiagen) and the Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). After initial denaturation for 3 min at 94 °C, the samples were subjected to 35 cycles (denaturation for 30 sec at 94°C, annealing for 30 sec at 59°C and extension for 1 min at 72°C), and final extension for 10 min at 72°C. In order to generate digoxigenin-labeled probes for the detection of the individual RT-PCR products, the DNA amplified from each gene was purified from an agarose gel using the QIAEXII Gel Extraction Procedure (Qiagen), and cloned using the pSTBlue-1 Perfectly Blunt kit (Novagen, Madison, WI). The plasmid DNA was purified using the QIA prep Miniprep kit (Qiagen), products excised using EcoR1 and purified using the QIAEXII Gel Extraction Procedure, and labeled with digoxigenin using the DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim, Germany). For the detection of gene expression, the individual digoxigenin-labeled probes were used to specifically detect each of the RT-PCR products by Southern blotting [28]. Predicted sizes of the RT-PCR products (bp)

were: *SAP1*, 544; *SAP2*, 896; *SAP3*, 566; *SAP5*, 668; *SAP7*, 841; *SAP8*, 969; *SAP9*, 944; *PLB1*, 587; *EFB1*, 526.

Positive controls for expression of each of the individual genes were included in the RT-PCR assay, using RNA from *C. albicans* LAM-1 grown *in vitro* under conditions known to induce their expression. A negative control for expression of each gene was obtained by omitting the RNA in the RT-PCR assay.

RESULTS

Sensitivity and reproducibility of the RT-PCR assay

Because of the small numbers of *C. albicans* CFUs recovered from the oral cavities of the experimentally infected mice, the sensitivity of detection of gene expression using the RT-PCR assay was determined. Expression of *SAP2* was reproducibly detected from as little as 10^1 to 10^2 blastoconidia or 1 pg of RNA isolated from *C. albicans* grown under inducing conditions *in vitro* (Fig. 7A, B). The RT-PCR assay also repeatedly detected the expression of the *EFB1* gene, used as an internal mRNA control, from 1 pg of RNA isolated from *C. albicans* grown under these same conditions (Fig. 7B). The RT-PCR employing digoxigenin-labeled probes thus provided sensitivity for expression of *SAP2* equivalent to that obtained using radioactive labeling [18], and sufficient to detect expression from the 170 CFU of *in vivo*-harvested *C. albicans* used in individual RT-PCR reactions.

In order to confirm the ability to detect expression of the individual genes and to determine the reproducibility of the RT-PCR procedure, gene expression was assessed in three independent experiments conducted using *C. albicans* grown *in vitro* under conditions inducing the expression of each gene. Expression of *SAPs* 1-3, 5 and 7-9, *PLB1* and *EFB1* was reproducibly detected in all three experiments (data not shown). However, expression of *SAPs* 4 and 6 was undetectable using specific pairs of upstream and downstream primers (5'-TTTTTCATTAACAACCAACCATTC-3' and 5'-GTCCTGGTGGCTTCGTTGC-3' for *SAP4*; 5'-TTCTTCAAACGTTTTAATTCTCT-3' and 5'-CATAAATGACTTCAAATATAAAT-3' for *SAP6*), although the predicted products (739 and 1516 bp, respectively) were generated by PCR from genomic DNA of *C. albicans*. Because *SAPs* 4-6 are all expressed by the

hyphal form of *C. albicans* at neutral pH *in vitro* [11], expression of *SAP5* was used as a marker for this *SAP* gene subfamily [11].

Animal model of oral candidiasis

Oral carriage of *C. albicans* during primary infection was quantitated in immunocompetent C3H and DBA/2 mice, as well as in Tg mice expressing HIV-1. Mice were free of *C. albicans* before inoculation and developed acute infections after oral inoculation (days 1 to 5), which in intact mice were terminated by clearance of *C. albicans* in less than 7 days (Fig. 8). In C3H mice (Fig. 8A), the infection was of shorter duration and reached a single peak on day 2 after inoculation, similar to the kinetics of acute infection in CD-1 and BALB/C mice [22,29]. In contrast, in DBA/2 mice the infection was more sustained with a reproducible second peak of *Candida* proliferation on day 5 post-inoculation [29] (Fig. 8B). As predicted, the kinetics of acute infection in the non-Tg littermates (Fig. 9A) were strikingly similar to those in the C3H mice (Fig. 8A). Interestingly, however, sustained enhancement of infection was maintained during acute infection in the Tg mice (Fig. 9B), compared to the control non-Tg animals (Fig. 9A). In addition, the Tg mice failed to clear *C. albicans* after acute infection, and persistent oral colonization was established (Fig. 9C) culminating in a final outgrowth preceding death, 83-125 days after infection (Fig. 9D). A progressive increase in oral burdens of *C. albicans* occurred during the period of persistent oral colonization, as evidenced by mean CFUs (range) of 252 (30-520), 1038 (60-8820) and 1666 (80-7200) on days 14-35, 42-55, and 59-69 after infection.

To assess the morphology of *C. albicans in vivo*, direct microscopic examination of samplings obtained by swabbing the oral cavities demonstrated abundant blastoconidia and hyphae of *C. albicans*, beginning 24h post-inoculation.

In vivo expression of *C. albicans* SAP and PLB1 genes

Unless otherwise indicated, *in vivo* gene expression was assessed by conducting the RT-PCR assay for each gene on duplicate samples of RNA, both originating from an identical pool of *C. albicans* harvested from one of two subsets of orally infected mice within the same experiment. Four RT-PCR reactions were thus conducted for each gene and time of sampling after infection. Positive controls for expression of individual *SAP* genes and *PLB1* were uniformly detected for all RT-PCR reactions, and amplification of the *EFB1* gene revealed an absence of contaminating genomic DNA.

In immunocompetent C3H mice (Fig. 8A), *SAPs* 1-3, 5 and 9 were all expressed 24h after infection with *C. albicans*, and their expression was sustained through day 5. *SAP5* was most reproducibly expressed in this group, while the expression of *SAP3* became more variable beginning day 2 after infection. Interestingly, expression of *SAP7* was maintained from day 1 to day 3, but then became completely silent. In contrast, expression of *SAP8* only appeared three days after infection and ended on day 4. Finally, expression of *PLB1* was sustained during the first four days after infection.

A similar temporal pattern of gene expression was found in the DBA/2 mice (Fig. 8B,C), with the exception of earlier expression of *SAP8* which occurred transiently within the first two days after infection. Expression of *SAP7* was mainly restricted to the first three days after infection, similar to that observed in the C3H mice. The other genes (*SAP1-3*, 5 and 9 and *PLB1*) were all expressed early and throughout the temporal course of acute oral candidiasis, also in accordance with the pattern of expression in the C3H animals.

In the non-Tg littermates (Fig. 9A), the pattern of gene expression closely matched that found in the C3H mice (Fig. 8A), in accordance with breeding on the C3H background [24] and similar kinetics of *C. albicans* burdens during acute oral candidiasis (Fig. 8A, 9A). Gene expression during acute infection in the Tg mice (Fig. 9B,E) again produced a similar pattern, with transient expression of *SAP7* and *SAP8*, but distinguished by less sustained expression of

PLB1. Strikingly, however, *SAP7* and *SAP8* became transcriptionally silent during persistent colonization (Fig. 9C, E), but were again transiently expressed shortly before death of the Tg mice (Fig. 9D, E). In contrast, *SAP5* and *SAP9* were most strongly and reproducibly expressed throughout the course of infection in the Tg mice.

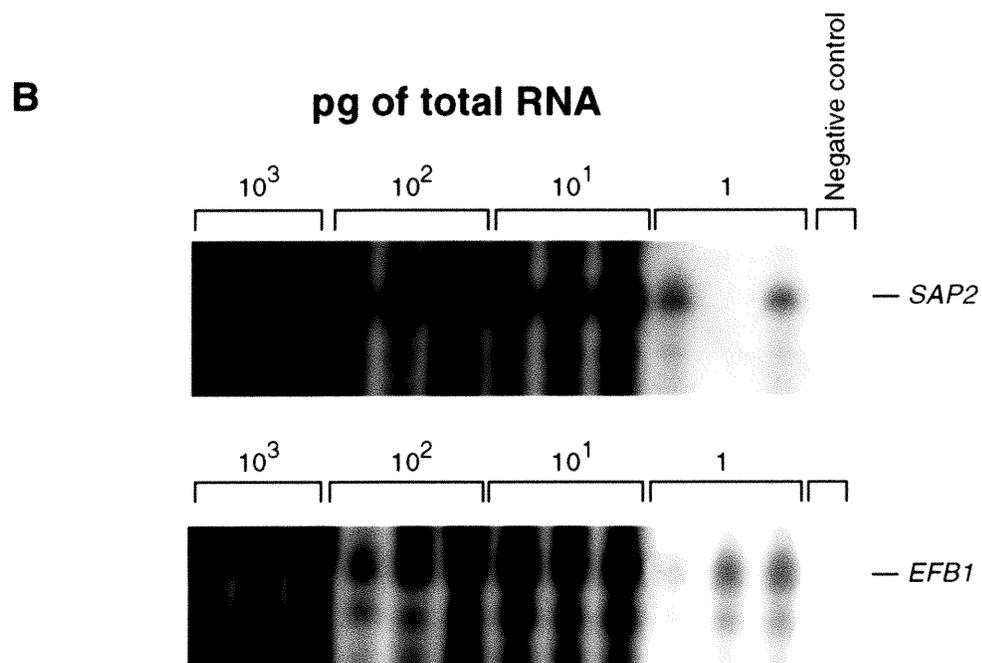
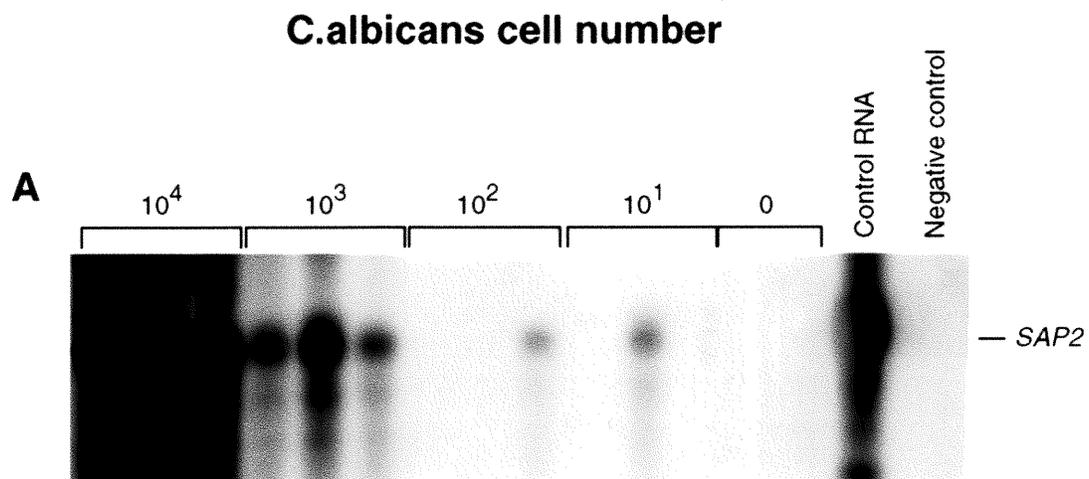
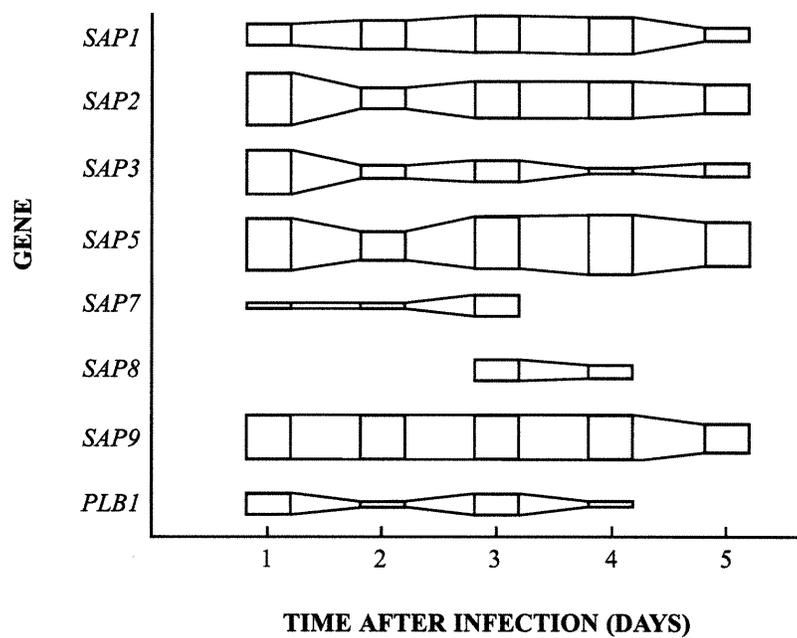
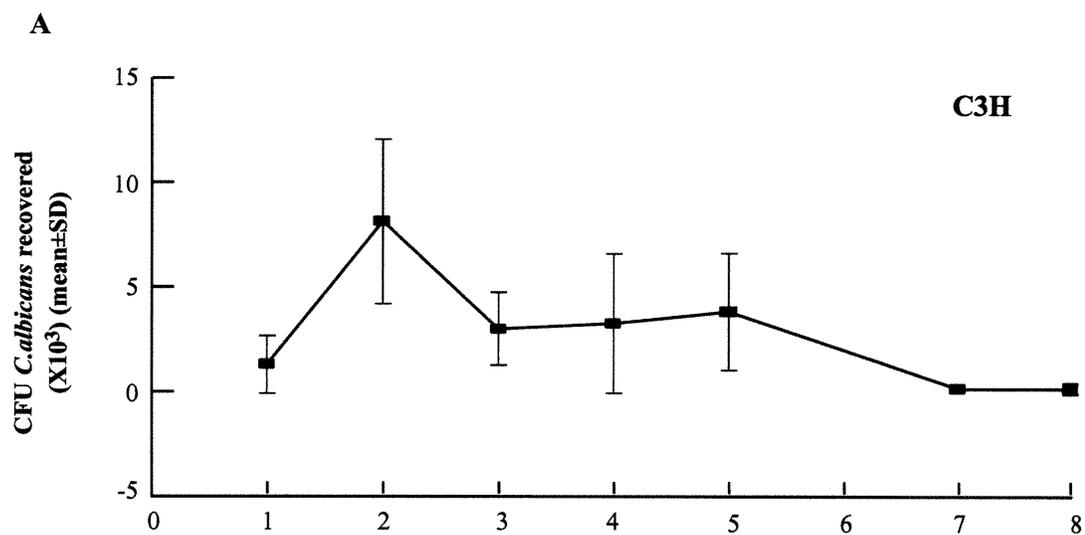
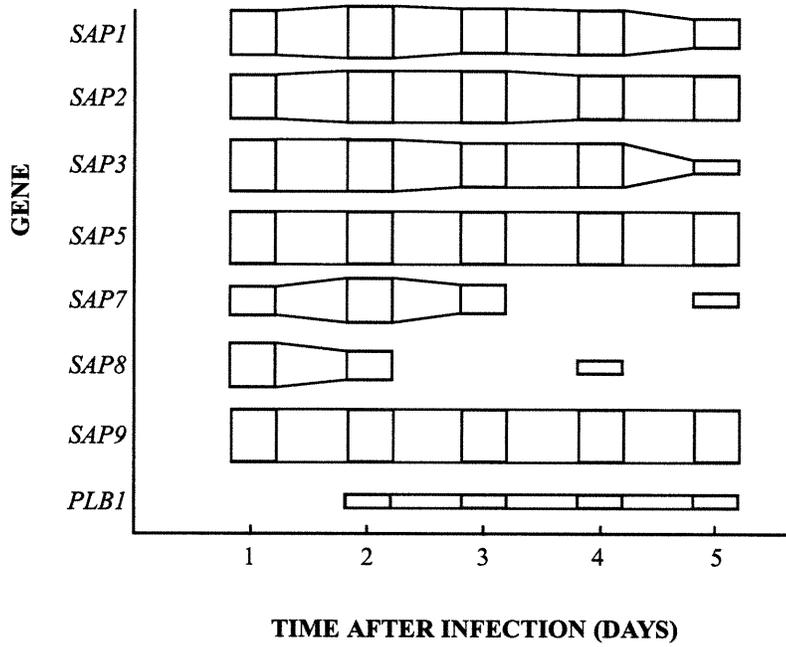
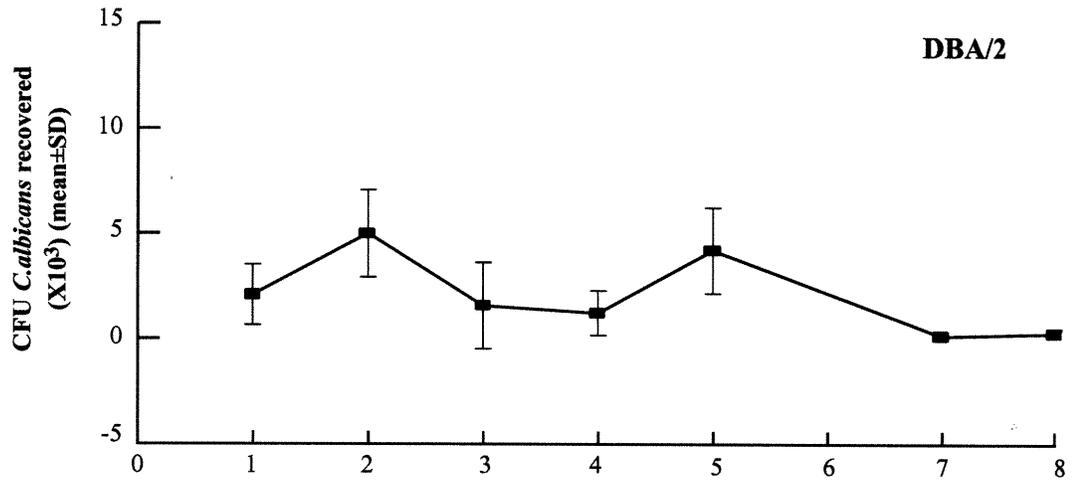


Fig. 7. Sensitivity of the RT-PCR assay for detection of gene expression. Expression of *SAP2* was reproducibly detected in the same experiment from triplicate samples of as little as 10^1 to 10^2 blastoconidia (A), or 1 pg of RNA (B) isolated from *C. albicans* LAM-1 grown in SDB for 15h at 37°C. The RT-PCR assay also repeatedly detected the expression of the *EFB1* gene, used as an internal mRNA control, from 1 pg of RNA isolated from *C. albicans* grown under these same conditions (B).



B



C

TIME AFTER INFECTION (DAYS)

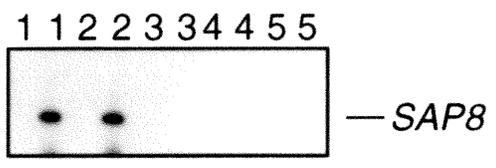
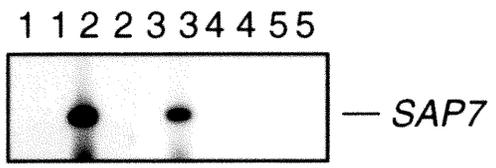
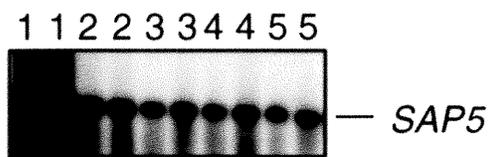
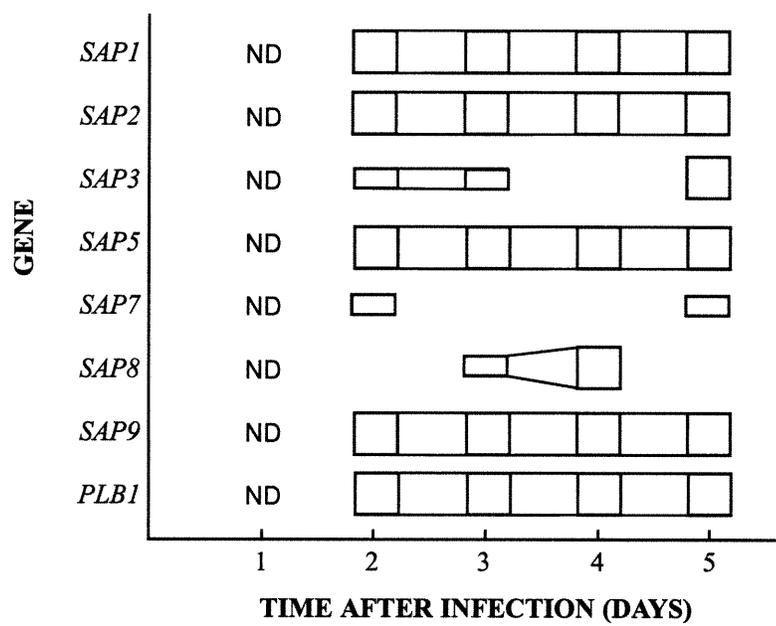
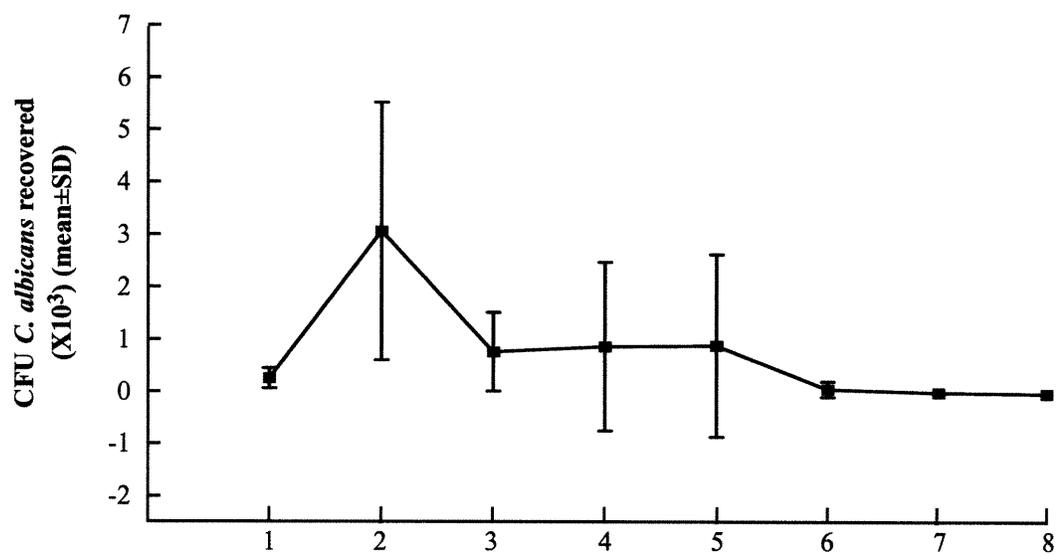
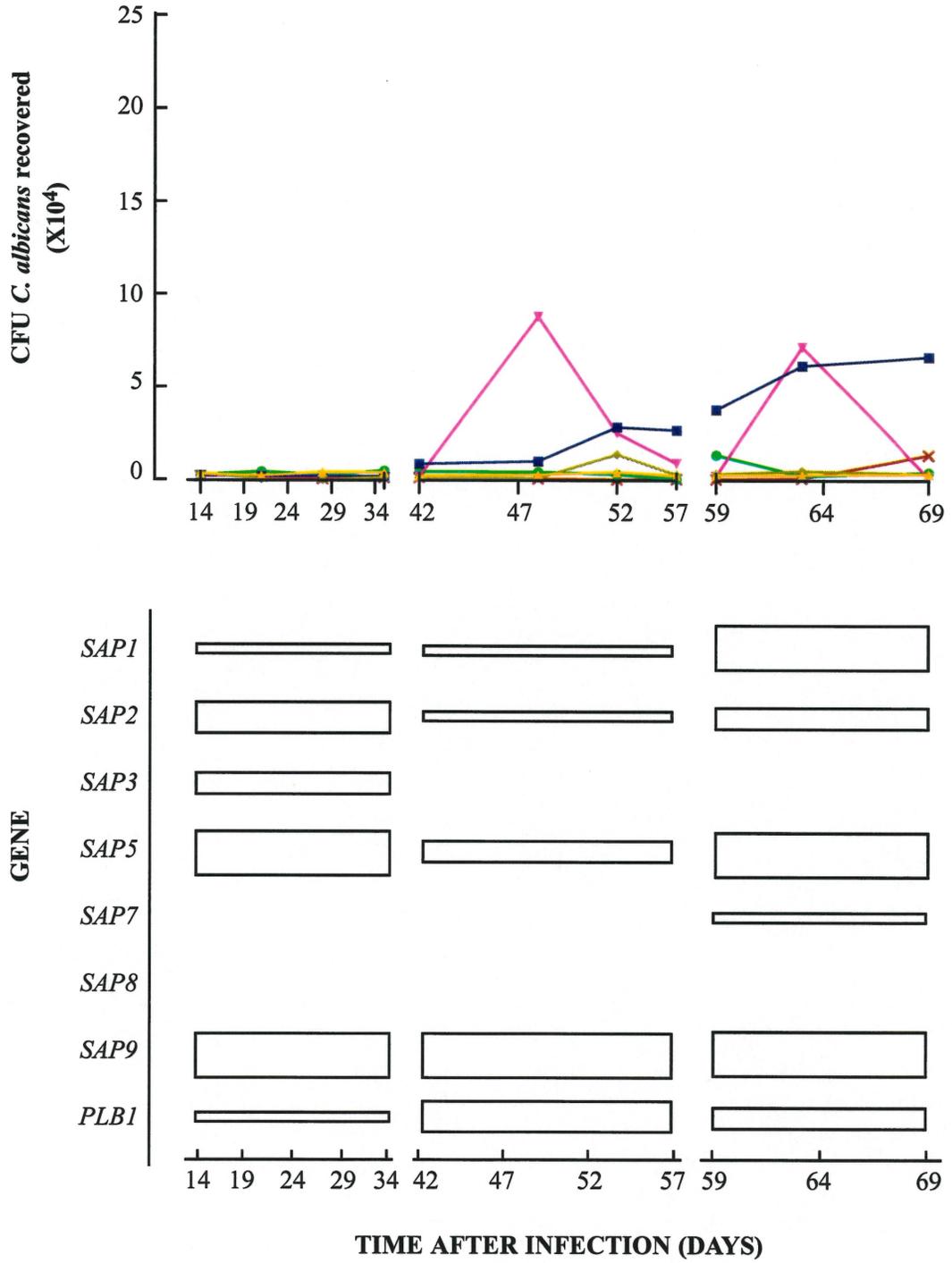


Fig. 8. (A,B) Oral burdens (upper panels) and longitudinal expression of virulence genes (lower panels) in intact mice orally infected with *C. albicans*. Assessments were conducted in immunocompetent C3H (A) and DBA/2 (B) mice. The temporal expression of each gene (lower panels) is represented by an open bar, and the width indicates the frequency of detection of expression. Numbers of mice: C3H, 13; DBA/2, 6. (C) Detection of RT-PCR products of *C. albicans* *SAP5*, *7* and *8* mRNAs during primary acute oral candidiasis in DBA/2 mice. Representative results are presented from duplicate samples of RNA, both originating from an identical pool of *C. albicans* harvested from one of two subsets of orally infected mice.

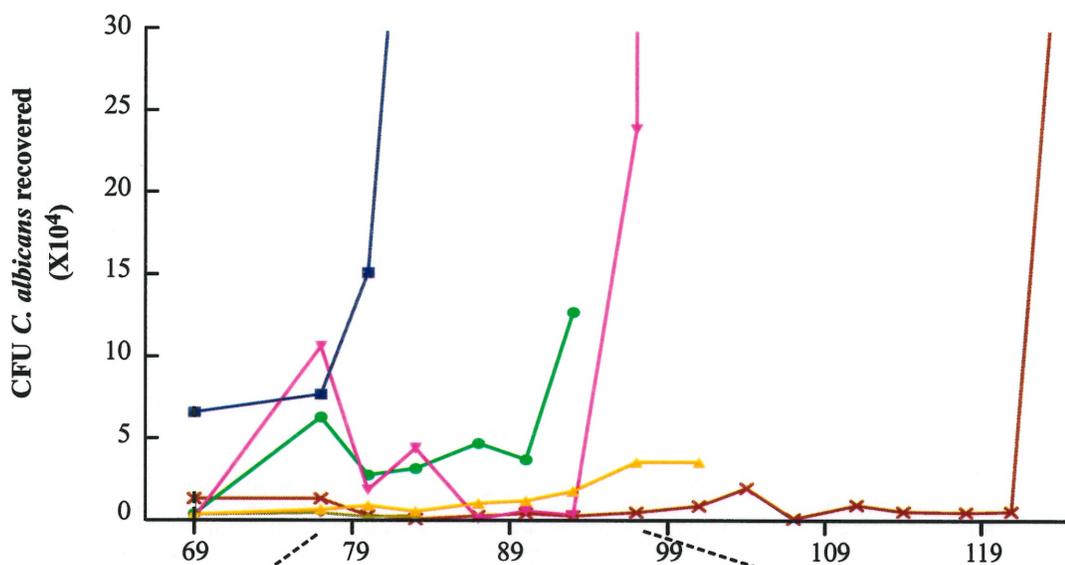
A



C



D



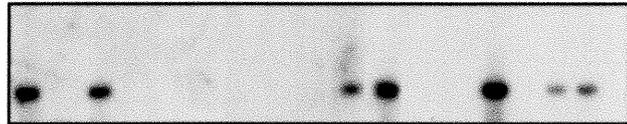
GENE	77	80	84	87	90	93	97 98
<i>SAP1</i>	+++	+	+ -	+	+	+	+++
<i>SAP2</i>	+++	+	--	+	+	+	+++
<i>SAP3</i>	+ --	+	+ -	+	+	-	++ -
<i>SAP5</i>	+++	+	++	+	+	+	+++
<i>SAP7</i>	+ --	-	+ -	+	-	+	+ --
<i>SAP8</i>	+ --	-	--	+	+	+	+ - +
<i>SAP9</i>	+++	+	++	+	+	+	+++
<i>PLB1</i>	+ --	-	+ -	+	+	+	++ -

E**TIME AFTER INFECTION (DAYS)**

2 3 4 5 6 7 8 14 42 59
35 55 69 77 80 84 87 90 93 97 98



2 3 4 5 6 7 8 14 42 59
35 55 69 77 80 84 87 90 93 97 98



2 3 4 5 6 7 8 14 42 59
35 55 69 77 80 84 87 90 93 97 98



Fig. 9. (A-D) Oral burdens (upper panels) and longitudinal expression of virulence genes (lower panels) in non-transgenic littermates (A) and HIV-1 transgenic mice (B-D) orally infected with *C. albicans*. Color lines (B-D, upper panels) represent individual mice. The temporal expression of each gene (lower panels) is represented by an open bar, the width indicating the frequency of detection of expression (A-C), or by a positive (+) or negative (-) duplicate RT-PCR reaction on RNA from surviving individual mice (D). Because of the low burdens of *C. albicans* during persistent oral colonization (C), *C. albicans* harvested on days 14-35, 42-55 and 59-69 were pooled. Numbers of mice: non-transgenic, 4; transgenic, 6. (E) Detection of RT-PCR products of *C. albicans* *SAP5*, 7 and 8 mRNAs during acute oral candidiasis (days 2-8), persistent oral colonization (days 14-69) and a final outgrowth preceding death (days 77-98). Representative results are presented from duplicate samples of RNA, both originating from an identical pool of *C. albicans* harvested from one (C) or two (B) subsets of orally infected mice, or from the same individual mouse (D). ND, not determined.

DISCUSSION

This is the first report demonstrating the sustained differential expression of individual members of the *SAP* gene family and *PLB1* during the development and maintenance of OPC. A novel experimental model of OPC in transgenic mice expressing HIV-1 was employed, which closely mimics the clinical and pathological features of candidal infection in human AIDS [24,30]. The model provides a powerful new tool for controlled longitudinal studies of pathogenesis in a small laboratory animal. In striking contrast to immunocompetent C3H and DBA/2 mice, the transgenic animals failed to clear *C. albicans* from the oral cavities after primary infection, and chronic carriage culminated in a marked terminal outgrowth three to four months after infection. The model in transgenic mice thus allowed a comprehensive sequential assessment of the *in vivo* expression of *C. albicans* hydrolytic enzyme genes, during a protracted course of oral candidiasis.

In comparison to the strong and sustained expression of other members of the *SAP* gene family, *SAP7* and *SAP8* were conspicuously distinguished by their reproducibly transient expression during primary oral candidiasis in both immunocompetent and transgenic mice. Expression of both genes was silent during persistent colonization but resumed during the terminal outgrowth of *C. albicans*. These results were not caused by the low oral burdens recovered during persistent colonization, since the amounts of RNA in all samples used in the RT-PCR assay were adjusted to equivalent numbers of *C. albicans* cells. In addition, *SAP1*, *SAP2*, *SAP5* and *SAP9* were all strongly and reproducibly expressed throughout the course of infection in both the immunocompetent and transgenic mice. The amino acid sequence of Sap7p is divergent from the other Saps [13] and its function is unknown. In previous studies, no *SAP7* mRNA was detected during growth of *C. albicans in vitro* [11], and *SAP7* transcripts were detected in only 60% of oral candidiasis patients (6 of 10 patients), and 25% of *Candida* carriers

assessed at single time points [18]. Although the expression of the *SAP* genes is known to be differentially regulated at the mRNA level *in vitro* (11, 12), the precise mechanisms which govern the discontinuous expression of *SAP7 in vivo* remain to be determined. Assuming that *SAP7* mRNA is translated and that active Sap7p is produced, the transient expression of this gene suggests that it may play a minor role in the pathogenesis of OPC. Isolation of the mature enzyme and the construction of *C. albicans* strains harbouring a targeted disruption of *SAP7* will be required to determine if it is associated with *C. albicans* infection. Sap8p also has a divergent amino acid sequence [13], and its role in the virulence of *C. albicans* has not yet been elucidated. *In vitro*, *SAP8* is expressed preferentially during the early exponential phase of growth of *C. albicans* yeast cells at 25°C. However, *SAP8* mRNA is detected more transiently and at lower levels during the exponential phase at 37°C [8, 13], which may at least partially explain its intermittent *in vivo* expression by *C. albicans* at the physiological temperature of the oral cavity. This is the first study to detect *in vivo* expression of *SAP8* during candidiasis. In an *in vitro* model of OPC using reconstituted human epithelium [19], *SAP8* was expressed only late during the temporal progression of *SAP* expression. An assessment of the role of *SAP8* in the pathogenesis of candidiasis will require an approach similar to that for *SAP7*, with the notable exception that mature Sap8p has been isolated [31].

Strong and sustained *in vivo* expression of *SAP9*, which we also report for the first time, was unexpected on the basis of *in vitro* studies which revealed prominent *SAP9* transcripts only in later growth phases of cultures at 25°C [13]. Unknown stimuli thus up-regulate the expression of *SAP9 in vivo* and this gene consequently may be involved in the pathogenesis of candidiasis. Although the mature enzyme has not yet been directly isolated, the deduced Sap9p amino acid sequence is more related to the glycoprophosphatidylinositol (GPI) – anchored aspartic proteinase Yap3p of *Saccharomyces cerevisiae* than to any other *Candida* Saps [13]. Because of

its homology to Yap3p, it has been suggested that Sap9p may be involved in the processing of Sap2p in *C. albicans* [13]. Although *SAP9* is expressed, the precise role of Sap9p in the onset, progression and maintenance OPC remains to be determined.

In vivo expression of the remaining *SAP* genes (*SAP1-SAP3*, *SAP5*) was nearly uninterrupted throughout infection, with the exception of a more sporadic expression of *SAP3* which became silent during persistent colonization. *In vitro*, *SAP3* is expressed by the yeast form of *C. albicans* at 37°C, but more weakly than *SAP2*, and also by the opaque form of the switching strain W0-1 at 25°C [8, 11]. Interestingly, our findings concur with those of Naglik *et al.* [18], obtained at a single time point, in which *SAP3* mRNA transcripts were detected in only 6 of 10 patients with OPC and in none of 8 asymptomatic *C. albicans* carriers. A change from oral colonization to active infection by *C. albicans* thus appears to up-regulate the expression of some members of the *SAP* gene family, perhaps in response to differing microenvironments in the oral cavity.

SAP5 was strongly and constantly expressed during the entire course of infection in intact and transgenic mice. These findings further support the dominance of *SAP5* mRNA transcripts during infection *in vivo*, as previously demonstrated at single time points using *in vivo* expression technology (IVET) in a murine model of esophageal candidiasis [20], and in patients with oral *C. albicans* colonization or OPC [18]. The presence of both blastoconidia and hyphae in the oral cavities of the mice concurred with the *in vitro* expression of *SAP5* and *SAP6* by the hyphal form of *C. albicans* at neutral pH [11, 12], although *SAP5* expression *in vivo* has surprisingly also been found when only blastoconidia are observed [20]. The sustained expression of *SAP5* found in the present study, combined with the attenuated virulence of a Δ sap 4, 5, 6 triple homozygous null mutant in a model of systemic candidiasis [32], supports a central role for the *SAP4-SAP6* gene subfamily in the pathogenesis of oral candidiasis. However, direct evidence

in support of this hypothesis will require the demonstration of attenuated virulence of the Δ sap4, 5, 6 null mutant in an experimental model of OPC. The requirement for specific SAPs in the pathogenesis of mucosal candidiasis may differ according to the microenvironment at individual anatomic sites, as exemplified by the loss of virulence of null sap1 to sap3 but not sap4 to sap6 mutants in an estrogen-dependent rat vaginitis model [33].

SAP2 mRNA is the major transcript of the yeast form of *C. albicans* under inducing conditions *in vitro* at 37°C [11, 12], and was also predictably strongly expressed during the full course of oral candidiasis in experimentally infected mice. These results are in agreement with the findings of Naglik *et al.* [18], who showed that SAP2 and the SAP4 to SAP6 subfamily are the predominant proteinase genes expressed in the oral cavities of both *Candida* carriers and patients with OPC. Because sap2 null mutants have attenuated virulence in systemic infection [34] and experimental vaginitis [33], it is likely that SAP2 plays an important role in the onset and maintenance of candidiasis. However, again, a direct role for SAP2 in the pathogenesis of OPC will require assessment of the virulence of sap2 null mutants at this specific mucosal site.

The strong expression of SAP1 found in this study is at variance with infrequent detection on single specimens obtained from patients with OPC [18], and its lack of expression in experimental candidiasis using the recombination-based IVET [20]. *In vitro*, SAP1 is expressed only by the opaque phase of *C. albicans* strain W0-1 at 25°C [11, 12, 35]. *C. albicans* strain LAM-1 used in this study displays phenotypic switching *in vitro* after recovery from orally infected mice (N. Deslauriers, personal communication), which may explain the expression of SAP1 *in vivo*. Since the virulence of sap1 null mutants is attenuated [34], SAP1 may also under conditions of phenotypic switching contribute to the development of candidiasis.

Taken together, the sustained expression of selected members of the *SAP* gene family in the Tg mice provides further evidence implicating Saps in the pathogenesis of OPC in the setting of HIV-infection. Sap antigens have been detected on the surface of blastoconidia and hyphae adhering to human oral mucosa [36], and *C. albicans* isolates from HIV-infected patients with OPC produce higher Sap levels *in vitro* compared to strains isolated from an HIV-negative control group [37-39]. During primary infection, expression of the *SAP* genes was comparable in the immunocompetent C3H and DBA/2 mice, the non-Tg controls and the Tg mice, indicating that presence of the HIV transgene did not in itself alter *SAP* expression at comparable times after infection. Expression of specific *SAP* genes was also comparable in a limited number of HIV-positive and – negative patients with OPC [18]. It has been suggested that the decreased prevalence of OPC in HIV-infected patients treated with HIV-1 protease inhibitors may result not only from immune reconstitution but also from inhibition of Sap activity [40-42]. Knowledge of the expression of specific infection-related *SAP* genes will be instrumental in designing more potent and specific Sap inhibitors which may play a role in prevention and treatment of candidiasis.

PLB1 mRNA transcripts were detected during the entire course of OPC, with the exception of primary infection in the transgenic mice. This is the first report of *PLB1* expression at the mRNA level *in vivo*, and corroborates caPlb1p secretion in the stomach [17] and kidneys [14] of experimentally infected mice. *In vitro*, blastoconidia, pseudohyphae and hyphae of *C. albicans* expressed higher levels of *PLB1* mRNA than germ tube-forming cells, suggesting that expression of *caPLB1* is regulated as a function of morphogenic transition [43]. The presence of both blastoconidia and hyphae in the oral cavities of the mice was therefore consistent with detection of expression of *PLB1*. In addition, the optimal activity of caPlb1 at pH 6.0 [17] makes it likely that the enzyme is functional in oral candidiasis. The present findings, combined with the attenuated virulence of *plb1* null

mutants [14] and the involvement of *PLB1* in the penetration and damage of host tissues [14, 17], indicate that *C. albicans* phospholipases also contribute to fungal virulence.

The most important questions concerning the expression of *C. albicans* secretory hydrolytic enzymes genes are which genes are expressed *in vivo*, under what conditions they are expressed and how each gene contributes to the development of clinical disease [12]. Because this is the first study to examine the longitudinal expression of *SAPs* and *PLB1* *in vivo*, it is also the first to demonstrate that some *SAPs* are expressed throughout the infectious process, while others are expressed only transiently. Some *SAP* gene products may thus be involved in specific steps in disease onset, progression and maintenance, by their ability to degrade particular host substrates. This possibility has been recently strengthened by the observation that although recombinant *Sap1p*, *Sap2p*, *Sap3p* and *Sap6p* cleave peptide bonds between larger hydrophobic amino acids, substrate specificities differ among the four *Saps* [44]. The results further demonstrate that *in vivo* expression is determined by factors distinct from those *in vitro*, since all *SAPs* are at least transiently expressed by *C. albicans* in the oral cavity at neutral pH. Expression of some *SAPs* may occur in acidic microniches, optimal for enzyme activity. Further studies will be required to identify at the molecular level the regulatory mechanisms which govern differential expression of *C. albicans* hydrolytic enzyme genes *in vivo*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Gaston Lambert and Elisabeth Pérès for preparation of the illustrations, and Claire St-Onge for preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Samaranayake LP, Holmstrup P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J Oral Pathol Med* 1989;18:554-64.
2. Martins MD, Lozano-Chiu M, Rex JH. Declining rates of oropharyngeal candidiasis and carriage of *Candida albicans* associated with trends toward reduced rates of carriage of fluconazole-resistant *C. albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1998;27:1291-4.
3. Beck-Sagué CM, Jarvis WR, and the NNIS. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 1993;167:1247-51.
4. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol* 1980;25:1-10.
5. Odds FC. *Candida* and candidosis. A review and bibliography. 2nd ed. London: Baillière Tindall, 1988.
6. White T, Köhler GA, Miyasaki SH, Agabian N. Expression of virulence factors in *Candida albicans*. *Can J Bot* 1995;73(Suppl 1):S1058-S1064.
7. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans* *Annu Rev Microbiol* 1991;45:187-218.
8. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* 1996;7:55-69.
9. Hube B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 1998;15:68-71.
10. Cole GT. Biochemistry of enzymatic pathogenicity factors. *In*: Howard DH, Miller JD, eds. *The Mycota VI. Human and animal relationships*. Berlin: Springer-Verlag, 1996:31-65.

11. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJP, Gow NAR. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 1994;14:87-99.
12. White TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol* 1995;177:5215-5221.
13. Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 1998;144:2731-2737.
14. Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, Fonzi W, Mirbod F, Nakashima S, Nozawa Y, Ghannoum MA. Cloning and disruption of a *caPLB1* a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998;273:26078-26086.
15. Sugiyama Y, Nakashima S, Mirbod F, Kanoh H, Kitajima Y, Ghannoum MA, Nozawa Y. Molecular cloning of a second phospholipase B gene, *caPLB2* from *Candida albicans*. *Med Mycol* 1999;37:61-67.
16. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE, Nozawa Y, Ghannoum MA. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995;63:1993-1998.
17. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:122-143.
18. Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, Sweet SP, Challacombe SJ, Agabian N. *In vivo* analyses of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun* 1999;67:2482-2490.

19. Schaller M, Schafer W, Korting HC, Hube B. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* 1998;29:605-615.
20. Staib P, Kretschmar M, Michterlein T, Hof H, Morschhauser J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6102-6107.
21. Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, Belhumeur P, de Repentigny L. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* 1996;64:4514-4519.
22. Lacasse M, Fortier C, Trudel L, Collet AJ, Deslauriers N. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiological and histological aspects. *J Oral Pathol Med* 1990;19:136-141.
23. Mahrous M, Lott TG, Meyer SA, Sowart AD, Ahearn DG. Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1990;28:876-881.
24. Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, Jolicoeur P. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in Tg mice. *Cell* 1998;95:163-175.
25. Deslauriers N, Côté L, Montplaisir S, de Repentigny L. Oral carriage of *Candida albicans* in murine AIDS. *Infect Immun* 1997;65 :661-667.
26. Dubois N, Colina AR, Aumont F, Belhumeur P, de Repentigny L. Overexpression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase 2 and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* do not augment virulence in mice. *Microbiology* 1998;144:2299-2310.
27. Rodrigue L, Marion D, Trudel L, Barthe C, Lavoie MC. Comparison of methods for the evaluation of the oral microbiota of mice. *J Microbiol Methods* 1989;10:71-82.

28. Belhumeur P, Lee A, Tom R, Di Paolo T, Fortin N, Clark MW. *GSP1* and *GSP2*, genetic suppressors of the *prp20-1* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol Cell Biol* 1993;13:2152-2161.
29. Chakir J, Côté L, Coulombe C, Deslauriers N. Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 mice. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:88-94.
30. de Repentigny L, Aumont F, Ripeau JS, Fiorillo M, Jolicoeur P. Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. Submitted for publication.
31. Morrison CJ, Hurst SF, Bragg SL, Kuykendall RJ, Diaz H, Pohl J, Reiss E. Heterogeneity of the purified extracellular aspartyl proteinase from *Candida albicans*: characterization with monoclonal antibodies and N-terminal amino acid sequence analysis. *Infect Immun* 1993; 61:2030-2036.
32. Sanglard D, Hube B, Monod M, Odds FC, Gow NAR. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun* 1997; 65:3539-3546.
33. De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schafer W, Cassone A. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular *SAP2*, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* 1999; 179:201-208.
34. Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Monod M, Schafer W, Brown AJP, Gow NAR. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* 1997; 65:3529-3538.

35. Morrow B, Srikantha T, Soll DR. Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white- opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 1992; 12:2997-3005.
36. Borg M, Ruchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* 1988; 56:626-631.
37. Ollert MW, Wende C, Gorlich M, McMullan-Vogel CG, Borg-von Zepelin M, Vogel CW, Korting HC. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2543-2549.
38. De Bernardis F, Chiani P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, D'Offizzi G, Quinti I, Sullivan PA, Cassone A. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun* 1996; 64:466-471.
39. Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. *J Med Microbiol* 1996; 44:311-316.
40. Diz Dios DP, Ocampo A, Otero I, Iglesias I, Martinez C. Changes in oropharyngeal colonization and infection by *Candida albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2001; 183:355-356.

41. Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2038-2042.
42. Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cuda R. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis* 1999; 180:448-453.
43. Hoover CI, Jantapour MJ, Newport G, Agabian N, Fisher SJ. Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (*PLB1*) gene. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 167:163-169.
44. Koelsch G, Tang J, Loy JA, Monod M, Jackson K, Foundling SI, Lin X. Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1480:117-131.

DISCUSSION

Dans cette étude, l'expression des *SAPs* et de la *PLB1* a été caractérisée pour la première fois, au cours de l'évolution temporelle d'une candidose orale *in vivo*. Puisque la régulation de l'expression des *SAPs* se fait au niveau de l'ARNm (Banerjee et al., 1991 ; White et Agabian, 1995 ; Homma et al., 1993), ce sont ces molécules qui ont été détectées grâce à une réaction de RT-PCR. L'étude a été effectuée chez plusieurs souches murines différentes afin de déterminer l'effet du bagage génétique des animaux sur la candidose orale causée par le *C. albicans* LAM-1. Les souris C3H et les souris DBA/2 ont montré des courbes de CFUs semblables à ce qui a été décrit dans la littérature (Lacasse et al., 1990 ; Chakir et al., 1994), avec un seul pic d'infection chez la première souche et deux pics d'infection au cours de l'infection primaire chez la souche DBA/2. Le système immunitaire de ces souris normales élimine ensuite complètement le *Candida* de la gueule de ces animaux, en moins de sept jours après l'inoculation. Cette situation ressemble à celle que l'on retrouve chez un humain sain où le *Candida* est soit éliminé, soit contrôlé par les défenses de l'hôte en entretenant alors une relation de type commensale.

Les souris C3H transgéniques contenant des gènes du VIH (Hanna et al., 1998b) ont, quant à elles, montré un premier pic d'infection, suivi d'une phase de porteur, où le *Candida* est en petit nombre, suivi d'une augmentation des unités viables de cet organisme lorsque l'animal approche de la mort. Ces souris transgéniques exprimant le VIH-1 miment bien les effets pathologiques de l'infection causée par le virus du SIDA chez l'humain (Hanna et al., 1998b). Le développement de la candidose orale chez ces souris est très similaire à ce que l'on rencontre chez l'humain où il y a une phase de porteur asymptomatique suivie d'épisodes récurrents de candidose au cours de la progression de l'infection au VIH (de Repentigny et al., soumis pour publication). Ces souris offrent donc un puissant outil permettant de caractériser les mécanismes de la candidose orale et en

particulier, l'expression des facteurs de virulence de *C. albicans* au cours du développement temporel de la maladie.

L'expression de la *SAP1* et de la *SAP3* a principalement été démontrée *in vitro* lors du changement phénotypique de la souche WO-1, de la forme blanche à la forme opaque lors de sa croissance dans un milieu YCB / BSA à une température de 25 °C (Hube et al., 1994 ; White et Agabian, 1995). Lors de nos expériences, nous avons détecté de façon constante l'expression de ces deux *SAPs* lors des infections chez les souris normales et pendant les pics d'infection chez les souris transgéniques, alors que leur expression a été plus sporadique dans la phase de porteur chez ces mêmes souris. Ces *SAPs* semblent donc surtout impliquées dans l'établissement et le développement de l'infection causée par le *C. albicans*. La présence de ces *SAPs* pourrait être expliquée par la capacité de la souche LAM-1 à changer son phénotype (N. Deslauriers, communication personnelle). Ce phénomène permettrait donc à cette souche de changer de phénotype lorsqu'elle rencontre certaines conditions environnementales et d'exprimer alors des gènes différents probablement importants pour se fixer et endommager les muqueuses de l'hôte, comme les gènes *SAPs 1* et *3*. Plusieurs études ont déjà montré l'importance de ces *SAPs* dans la candidose orale. Schaller et al. (1998) ont démontré que les *SAPs 1* et *3* étaient les deux premières *SAPs* exprimées dans un épithélium humain reconstitué *in vitro* infecté avec le *C. albicans*, et qu'elles étaient exprimées chez des patients séropositifs atteints de candidose orale. Naglik et al. (1999) ont montré la présence des ARNm codant pour ces *SAPs* seulement dans la salive des patients séropositifs atteints de candidose orale. Il a également été démontré que les mutants nuls de ces deux gènes étaient beaucoup moins virulents chez les animaux (Hube et al., 1994) ainsi que sur l'épithélium humain reconstitué *in vitro* (Schaller et al., 1999b). Nos résultats confirment donc ceux obtenus précédemment, montrant que les *SAPs 1* et *3*

auraient un rôle à jouer au cours de la candidose orale. Nos résultats appuient bien ceux de Schaller montrant que ces SAPs joueraient un rôle à des moments précis de l'infection et à des stades assez précoces de celle-ci. La présence des protéines Sap 1-3 a d'ailleurs été démontrée, à l'aide d'un anticorps, chez des patients séropositifs atteints de candidose orale, chez les cellules de *Candida* en contact avec les cellules épithéliales de l'hôte (Schaller et al., 1999a).

La SAP2 est le transcrit majeur retrouvé au cours de la phase logarithmique lorsque le *Candida* est cultivé dans des conditions d'induction *in vitro* (Hube et al., 1994). Nous avons démontré l'expression de ce gène tout au long de la candidose chez les différentes souris. Cette SAP semble donc jouer un rôle important dans la candidose. Il a d'ailleurs été démontré que le mutant nul de ce gène est très affecté au niveau de sa virulence et de son activité protéolytique au cours des infections chez les animaux (Hube et al., 1997), et que ce même mutant était avirulent au cours d'une candidose vaginale expérimentale chez le rat (de Bernardis et al., 1999a). Il a été suggéré que l'expression de la SAP2 serait même plus importante lorsque les cellules de *Candida* sont en grand nombre et que les dommages cellulaires sont sévères (Staib et al., 2000). Dans l'épithélium humain reconstitué *in vitro*, Schaller et al. (1998) ont montré que la SAP2 intervient à des moments plus tardifs dans l'infection et son apparition est corrélée avec celle de dommages sévères au niveau de l'épithélium. L'expression prédominante de cette SAP a été montrée dans la salive de patients atteints de candidose ainsi que dans celle de porteurs sains de *Candida* (Naglik et al., 1999). La SAP2 permettrait au *Candida* de traverser la barrière formée par les muqueuses et ainsi de pénétrer plus profondément les tissus de l'hôte.

Nous avons détecté l'expression de la *SAP5* de façon constitutive au cours de l'infection chez les différentes souris. L'expression des *SAPs* 4 à 6 a principalement été démontrée *in vitro* lorsque le *Candida* forme des hyphes dans un milieu à pH neutre en présence de sérum (Hube et al., 1994). Ces *SAPs* sont donc, en général, associées à cette forme cellulaire. Dans nos expériences, nous avons remarqué la présence d'hyphes autant que de blastoconidies dans les échantillons récoltés, ce qui peut expliquer la présence de ces *SAPs*. Il faut cependant ajouter que l'expression de la *SAP5* a été détectée lorsqu'il n'y avait la présence que de blastoconidies chez des animaux, et la présence d'hyphes ne serait donc pas obligatoire pour l'expression de ces *SAPs* (Staib et al., 2000). Le rôle des *SAPs* 4 à 6 dans la candidose orale a été incertain pendant un certain temps. Le mutant nul $\Delta sap4-6$ s'est montré moins virulent lorsqu'inoculé à des animaux (Sanglard et al., 1997). Schaller et al. (1998) ont montré la production de *SAP6*, dans l'épithélium humain reconstitué *in vitro*, 48 heures après l'inoculation et a corrélé l'apparition de cette *SAP* avec celle des hyphes. Cependant, lorsque le mutant $\Delta sap4-6$ a été utilisé pour causer l'infection dans ce modèle, des lésions aussi sévères que celles observées avec la souche parentale ont été retrouvées (Schaller et al., 1999b). Cette donnée remettait en doute l'implication de ces *SAPs* dans la candidose orale. Naglik et al. (1999) ont cependant bien mis en évidence une expression prédominante de ces *SAPs* chez tous les patients, les porteurs sains ainsi que ceux atteints de candidose orale. Staib et al. (2000) ont, quant à eux, montré une forte expression des *SAPs* 5 et 6 dans la candidose oesophagienne. Nos données confirment donc celles montrant que la *SAP5* a un rôle majeur et important à jouer tout au long de la candidose orale. Plusieurs points restent à être élucidés sur ce groupe de *SAPs*, dont le rôle précis de celles-ci puisque leur présence est constante dans la candidose, ainsi que l'impact de la forme cellulaire sur l'expression de celles-ci *in vivo*.

Les infections chez les différentes souris, ont montré une très faible expression des SAPs 7 et 8, à des moments bien précis de l'infection. L'expression de la SAP7 n'a jamais été démontrée dans des conditions de culture *in vitro*. Il faut ajouter que cette SAP code pour une protéine prédite qui est assez différente de celles codées par les autres SAPs (Hube et al., 1994), ce qui pourrait suggérer un rôle différent pour celle-ci lors de l'infection *in vivo*. Notre étude a pour la première fois détecté l'expression de la SAP7 dans des conditions de culture *in vitro*, après 15 heures de croissance à 37 °C. L'expression de la SAP7 a cependant été détectée *in vivo* chez plusieurs patients porteurs du *C. albicans* ainsi que chez des patients atteints de candidose orale (Naglik et al., 1999). Cette SAP semble donc jouer un rôle mineur à des moments particuliers dans ce type de candidose. La SAP8 a été détectée pour la première fois *in vivo* dans l'étude actuelle. *In vitro*, son expression a été démontrée lors de la croissance des cellules à une température de 25 °C et plus faiblement à une température de 37 °C. Son expression apparaît tôt dans la croissance et disparaît rapidement (Monod et al., 1998). Schaller et al. (1998) ont été les premiers à montré son expression tardive dans l'épithélium humain reconstitué, lorsque les dommages cellulaires sont importants. Étant donné le peu d'informations disponible sur ces deux SAPs, notre étude est la première à suggérer que ces SAPs interviennent à des moments bien précis au cours de l'infection et ont probablement des rôles spécifiques.

L'expression de la SAP9 a été démontrée pour la première fois *in vivo* lors de nos expériences et très peu d'études ont été réalisées concernant ses conditions d'expression. *In vitro*, la SAP9 est détecté tardivement dans les milieux de culture (Monod et al., 1998). Cette SAP, comme la SAP7, possède une séquence assez différente de celle des autres SAPs, ce qui suggère un rôle particulier pour celle-ci. Dans sa séquence, des motifs

ancrée au GPI, lui donnant un rôle différent et inconnu dans l'infection (Monod et al., 1998). Nous avons démontré que lors des infections chez les différentes souris, la *SAP9* était fortement exprimée pendant toute la durée de l'infection. Cette *SAP* semble donc jouer un rôle primordial dans la candidose orale. Les *SAPs* 7, 8 et 9 semblent donc être différentes, tant au niveau de leur séquence qu'au niveau de leur fonction, des six premières *SAPs*. Des études les caractérisant mieux apporteront plus de lumière sur leur fonction lors de l'infection *in vivo*. La génération de mutants nuls pour ces gènes pourra donner de précieuses informations sur leur rôle dans la virulence.

L'expression de la phospholipase a été moins étudiée que celle des *SAPs*, tant *in vitro* que *in vivo*. Les caractéristiques de la protéine ne sont pas encore bien connues. Nous avons démontré l'expression de la *PLB1* au cours de l'infection *in vivo* chez les différentes souris, sauf lors du premier pic d'infection chez les souris transgéniques. Cette observation concorde avec l'observation que le mutant nul de la *PLB1* est beaucoup moins virulent chez la souris et que sa capacité de pénétrer les cellules épithéliales est grandement réduite (Leidich et al., 1998). Il faut ajouter que les phospholipases sont bien actives à un pH de 6, ce qui suggère que ces enzymes pourraient jouer un rôle au cours de la candidose orale. D'autres études devront être effectuées pour caractériser le rôle exact de ces enzymes au cours de l'infection. Entre autres, la découverte récente d'un gène codant pour une seconde phospholipase devra mener à la construction d'un mutant nul, et l'évaluation de sa virulence au cours de l'infection (Sugiyama et al., 1999). Étant donné le peu d'informations sur les phospholipases, des études complémentaires seront nécessaires pour identifier et caractériser les raisons expliquant l'absence d'expression de la *PLB1* au cours du premier pic d'infection lors de la candidose orale chez les souris transgéniques exprimant des gènes du VIH. Parmi celles-ci, la

première constituerait à identifier les substrats *in vivo* des phospholipases, ce qui indiquerait dans quelles situations et à quels moments ces enzymes peuvent être retrouvées au cours de la candidose orale.

Depuis la découverte de la famille des SAPs, plusieurs questions ont été posées : quels gènes interviennent *in vivo*, et à quels moments de l'infection sont-ils exprimés ? Quel est le rôle de chaque gène dans l'infection ? et surtout pourquoi le *Candida* possède-t-il au moins neuf gènes codant pour des protéases semblables ? Nos expériences ont apporté quelques réponses en montrant pour la première fois l'expression temporelle des gènes codant pour les SAPs et la *PLB1* au cours d'une candidose orale *in vivo*. Nous avons montré que certaines SAPs étaient toujours exprimées, alors que d'autres l'étaient de façon transitoire. Nos résultats nous amènent à penser que cette expression différentielle pourrait être due à une spécificité de substrats pour chacune des différentes Saps. En effet, aucune raison particulière ne permet d'expliquer l'expression différentielle de neuf protéases qui auraient les mêmes propriétés. Il a été démontré que les Saps 1, 2, 3 et 6 avaient des spécificités au niveau des acides aminés flanquant le site de coupure de la protéine (Koelsch et al., 2000). Il a cependant été montré que la Sap2p pouvait hydrolyser plusieurs protéines différentes *in vitro* (Hube, 1996). On peut donc penser que certaines Saps pourraient avoir des substrats spécifiques alors que d'autres pourraient hydrolyser une plus grande variété de substrats, ou encore que les différentes Saps hydrolyseraient des liens peptidiques différents. Des études plus approfondies sur cette spécificité de substrats devront être effectuées pour clarifier ce point.

Nous avons également réussi à montrer que les conditions d'expression *in vivo* sont parfois assez différentes de celles retrouvées *in vitro*. Il faut ajouter que nos expériences ne tenaient pas compte de la

quantité relative des deux types cellulaires retrouvés lors de la récolte des cellules de *Candida* dans la cavité buccale, du lieu exact d'où provenait les cellules dans la cavité buccale ainsi que des faibles niveaux d'expression qui n'étaient pas détectables avec notre expérimentation. Le point majeur à être élucidé demeure le mode de régulation des ces différents gènes. Il a été suggéré que les SAPs 4 à 6 seraient nécessaires à l'induction de la SAP2 (Sanglard et al., 1997) et que la SAP2 serait activée par la SAP9 (Monod et al., 1998). Nos résultats, ainsi que ceux de Naglik et al. (1999), ont démontré que plusieurs SAPs pouvaient être exprimées en même temps par les différentes cellules présentes au lieu d'infection, à un moment précis de celle-ci. Quelle interaction y a-t-il entre toutes ces SAPs et comment agit chacune d'elles sur les autres ? Beaucoup de points sont encore inconnus. Cependant, il a maintenant été bien démontré que les Saps et les phospholipases forment des armes majeures permettant au *C. albicans* de traverser les barrières formées par les muqueuses et ainsi de causer des candidoses systémiques. Une meilleure compréhension de ces facteurs de virulence pourrait permettre la découverte d'inhibiteurs de protéases pour prévenir et traiter la candidose chez les patients à risque.

BIBLIOGRAPHIE

Allen, C. M. (1994). Animal models of oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **78** : 16-21.

Anaissie, E. (1992). Opportunistic mycoses in the immunocompromised host : experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* **14(Suppl 1)** : S43-53.

Antley, P. P. and Hazen, K. C. (1988). Rôle of yeast cell growth temperature on *Candida albicans* virulence in mice. *Infect Immun* **56** : 2884-2890.

Banerjee, A., Ganesan, K. and Datta, A. (1991). Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **137** : 2455-2461.

Banno, Y., Yamada, T. and Nozawa, Y. (1985). Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans* : separation of three enzymes and some biological properties. *J Med Vet Mycol* **23** : 47-54.

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

Beck-Sagué, C. M., Jarvis, W. R. and 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.

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

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

Borg-von Zepelin, M., Meyer, I., Thomssen, R., Würzner, R., Sanglard, D., Telenti, A. and Monod, M. (1999). HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol* **113** : 747-751.

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

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

Chakir, J., Côté, L., Coulombe, C. and Deslauriers, N. (1994). Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 mice. *Oral Microbiol Immunol* **9** : 88-94.

Critchley, I. A. and Douglas, L. J. (1985). Differential adhesion of pathogenic *Candida* species to epithelial and inert surfaces. *FEMS Microbiol Lett* **28** : 199-203.

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

Davies, D. R. (1990). The structure and function of aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Chem* **19** :189-215.

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

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

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

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

De Bernardis, F., Mühlischlegel, F. A., Cassone, A. and Fonzi, W. A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **66** : 3317-3325.

De Bernardis, F., Arancia, S., Morelli, L., Hube, B., Sanglard, D., Schäfer, W. and Cassone, A. (1999a). 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., Mondello, F., Scaravelli, G., Pachi, A., Girolamo, A., Agatensi, L. and Cassone, A. (1999b). High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected woman. *J Clin Microbiol* **37** : 1376-1380.

De Repentigny, L., Aumont, F., Ripeau, J-S., Fiorillo, M. and Jolicoeur, P. (Submitted for publication). Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1.

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

Douglas, L. J. (1988). *Candida* proteinases and candidosis. *Crit Rev Biotechnol* **8** : 121-129.

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

Fonzi, W. A., Saporito-Irwin, S., Chen, J.-Y. and Sypherd, P. (1993). Genetic basis for dimorphism and pathogenicity in *Candida albicans*. Dans Bossche, H. V., Odds, F. C. and Kerridge, D., ed. Dimorphic fungi in biology and medicine. Plenum Press, New York, pp. 37-50.

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

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

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

Greenfield, R. A. (1992). Host defense system interactions with *Candida*. *J Med Vet Mycol* **30** : 89-104.

Hanna, Z., Kay, D. G., Cool, M., Jothy, S., Rebai, N. and Jolicoeur, P. (1998a). Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cell develop a severe AIDS-like disease. *J Virol* **72** :121-132.

Hanna, Z., Kay, D. G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S. and Jolicoeur, P. (1998b). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* **95** :163-175.

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

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

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

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

Hoover, C. I., Jantapour, M. J., Newport, G., Agabian, N. and Fisher, S. J. (1998). Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (*PLB1*) gene. *FEMS Microbiol Lett* **167** : 163-169.

Howlett, J. A. and Squier, C. A. (1980). *Candida albicans* ultrastructure : colonization and invasion of oral epithelium. *Infect Immun* **29** :252-260.

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

Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. P. and 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. and 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.

Hube, B., Rùchel, R., Monod, M., Sanglard, D. and Odds, F. C. (1998). Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. Dans James, ed. Aspartic proteinases. Plenum Press, New York, pp 339-344.

Hube, B. (1998). Possible rôle of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* **15** : 68-71.

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

Ibrahim, A. S., Filler, S. G., Sanglard, D., Edwards, J. E., Jr and Hube, B. (1998). Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. *Infect Immun* **66** : 3003-3005.

Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. and Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell* **37** : 1075-1089.

Kanoh, H., Nakashima, S., Zhao, Y., Sugiyama, Y., Katajima, Y. and Nozawa, Y. (1998). Molecular cloning of a gene encoding phospholipase D from the pathogenic and dimorphic fungus, *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1398** : 359-364.

Kerridge, D. (1993). Fungal dimorphism : a sideways look. Dans Bossche, H. V., Odds, F. C. and Kerridge, D., ed. Dimorphic fungi in biology and medicine. Plenum Press, New York, pp. 3-10.

Kimura, L. H. and Pearsall, N. N. (1980). Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* **28** : 464-468.

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

Koelsch, G., Tang, J., Loy, J. A., Monod, M., Jackson, K., Foundling, S. I. and Lin, X. (2000). Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1480** : 117-131.

Kondoh, Y., Shimizu, K. and Tanaka, K. (1987). Proteinase production and pathogenicity of *Candida albicans*. II Virulence for mice of *C. albicans* strains of different proteinase activity. *Microbiol Immunol* **31** : 1061-1069.

Kothavade, R. J. and Panthaki, M. H. (1998). Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. *J Med Microbiol* **47** : 99-102.

Kretschmar, M., Hube, B., Bertsch, T., Sanglard, D., Merker, R., Schröder, M., Hof, H. and Nichterlein, T. (1999). Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infect Immun* **67** : 6637-6642.

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

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

Lacasse, M., Fortier, C., Chakir, J., Côté, L. and Deslauriers, N. (1993). Acquired resistance and persistence of *Candida albicans* following oral candidiasis in the mouse : a model of the carrier state in humans. *Oral Microbiol Immunol* **8** : 313-318.

Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Fonzi, W., Mirbod, F., Nakashima, S., Nozawa, Y. and 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.

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

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

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

McCullough, M. J., Ross, B. C. and 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. and Dolan, J. W. (1997). Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microbiology* **143** : 3521-3526.

Mirbod, F., Banno, Y., Ghannoum, M. A., Ibrahim, A. S., Nakashima, S., Kitajima, Y., Cole, G. T. and Nozawa, Y. (1995). Purification and characterization of lysophospholipase-transacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1257** : 181-188.

Miyasaki, S. H., White, T. C. and 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, H. and Sanglard, D. (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* **13** : 357-368.

Monod, M., Hube, B., Hess, D. and 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.

Muhlschlegel, F., Fonzi, W., Hoyer, L., Payne, T., Poulet, F. M., Clevenger, J., Latgé, J-P., Calera, J., Beauvais, A., Paris, S., Monod, M.,

Sturtevant, J., Ghannoum, M., Nozawa, Y. and Calderone, R. (1998). Molecular mechanisms of virulence in fungus-host interactions for *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Med Mycol* **36**(Suppl. 1) : 238-248.

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

Odds, F. C. (1988). *Candida and candidosis : a review and bibliography*, 2nd edn. London : Ballière Tindall, pp. 7-59, 68-123, 153-155 et 252-278.

Odds, F. C. (1994). *Candida* species and virulence. *ASM News* **60** : 313-318.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sanglard, D., Hube, H., Monod, M., Odds, F. C. and 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.

Schaller, M., Schäfer, W., Korting, H. C. and 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.

Schaller, M., Hube, B., Ollert, M. W., Schäfer, W., Borg-von Zepelin, M., Thoma-Greber, E. and Korting, H. C. (1999a). *In vivo* expression and localisation of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol* **112** : 383-386.

Schaller, M., Korting, H. C., Schäfer, W., Bastert, J., Chen, W. and Hube, B. (1999b). Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* **34** : 169-180.

Schaller, M., Schackert, C., Korting, H. C., Januschke, E. and Hube, B. (2000). Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol* **114** : 712-717.

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

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

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

Soll, D. R. (1993). Switching and the regulation of gene transcription in *Candida albicans*. Dans Bossche, H. V., Odds, F. C. and Kerridge, D., ed. Dimorphic fungi in biology and medicine. Plenum Press, New York, pp. 73-82.

Staib, F. (1965). Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Saboraudia* **4** : 187-193.

Staib, F. (1969). Proteolysis and pathogenicity of *Candida albicans* strains. *Mycopathol Mycol Appl* **37** : 346-348.

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

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

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

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

Watts, H. J., Cheah, F. S. H., Hube, B., Sanglard, D. and Gow, N. A. R. (1998). Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol Lett* **159** : 129-135.

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

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

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

Wu, T. and Samaranayake, P. (1999). The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. *J Med Microbiol* **48** : 711-720.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le docteur Louis de Repentigny ainsi que le docteur Pierre Belhumeur qui ont cru en moi et qui m'ont donné la chance de réaliser ce projet. Merci pour vos nombreux conseils et pour votre patience.

Merci à Francine pour tous les conseils et pour son amitié ainsi que Marie pour son amitié et les nombreuses fois où son aide a permis l'avancement du projet.

Merci à Martin ainsi que tous ceux au département qui ont contribué à ce projet par leurs conseils ainsi que par leur disponibilité.

Merci finalement à Josée pour son soutien et sa présence, mes parents qui ont permis et su motiver mon éducation ainsi que tous mes proches qui ont cru en moi.