

2m11. 2852.9

Université de Montréal

Expression des protéinases aspartiques sécrétées de *Candida albicans*, détectées par *RT-PCR*, chez de souches cliniques et des isolats frais de la plaque prothétique.

Par

Areti Karadimos

**Programme de sciences biomédicales
Faculté des études supérieures**

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

Décembre 31, 2000

©Areti Karadimos, 2000



2011 2224 P

Université de Montréal

Expédition des postaux...
E-7-773, chez les vendeurs...
de la région...

Par

Alexis...

W
4

N58

2.00 |
N. 050



PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Ce mémoire intitulé:

Expression des protéinases aspartiques sécrétées de *Candida albicans*, détectées par *RT-PCR*, chez de souches cliniques et des isolats frais de la plaque prothétique.

**Présenté par
Areti Karadimos**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Gilles Lavigne	président du jury
Dr Jean Barbeau	directeur de recherche
Dre Noëlla Deslauriers	codirecteur de recherche
Dre Arlette Kolta	membre du jury

Mémoire accepté le : _____

SOMMAIRE

La stomatite prothétique est une condition inflammatoire de la muqueuse palatine présente chez certains porteurs de prothèse mandibulaire. Nombreux sont les facteurs pouvant contribuer à l'étiopathologie de cette condition généralement asymptomatique. La stomatite prothétique est causée de manière prédominante par les facteurs traumatiques associés au port de la prothèse, soit le port d'une prothèse mal adaptée à la cavité buccale. De plus, ceci favorise le développement d'un biofilm prothétique très diversifié sur l'intrados de la prothèse, et par lien de causalité l'expression excessive de *Candida albicans*, une levure polymorphe indigène à la microflore buccale humaine. Il est toutefois estimé que *C. albicans* réside dans la cavité orale d'environ 40% de la population saine. Cependant, en présence de conditions favorisant sa prolifération, le microorganisme commensal peut se transformer rapidement en un pathogène opportuniste et indésirable.

Il est généralement reconnu que la stomatite prothétique représente la forme de candidose orale humaine la plus fréquente. Cependant, l'association entre la présence de *C. albicans* et la stomatite prothétique demeure ambiguë et controversée. *C. albicans* possède la capacité d'exercer sa pathogénicité à travers plusieurs facteurs de virulence, dont la sécrétion de protéinases aspartiques (Saps), soit des enzymes protéolytiques extracellulaires généralement actives à un pH acide. Ces protéinases, codées par la famille des gènes *SAPs* et exprimées de manière différentielle, possèdent la capacité de dégrader plusieurs composantes protéiniques de l'hôte. Les protéinases aspartiques de *C. albicans* ont notamment été impliquées dans l'activation protéolytique du précurseur d'une cytokine pro-inflammatoire, soit l'Il-1 β . L'inflammation chronique de la palatine muqueuse étant une caractéristique de la stomatite prothétique, les protéinases aspartiques pourraient possiblement jouer un rôle au niveau du maintien de l'inflammation.

Le but de cette étude a été de tenter de mettre au point une technique de détection des *SAPS* et de vérifier si un lien existe entre la présence de transcrits de protéinases aspartiques au sein de souches de *C. albicans* isolées de sujets porteurs de prothèses sains et atteints de stomatite prothétique. La méthode de détection d'ARN messagers adoptée a été celle du *RT-PCR*, technique de biologie moléculaire sensible permettant la détection d'ARN messagers.

L'étude a consisté en la détection *in vitro* d'ARN messagers des gènes *SAP 1,2, 3, 4-6, 7, 8* et *9* chez des souches cliniques de *C. albicans* isolées de prothèses dentaires provenant de sujets sains et de sujets atteints de stomatite prothétique. Les profils d'expression de protéinases aspartiques ont été engendrés avec l'ARN total isolé des souches cliniques et cultivées en conditions aérobies et anaérobies. Afin de vérifier l'hétérogénéité des isolats cliniques des empreintes d'ADN, soit des profils d'*AP-PCR* (*Arbitrarily primed PCR*), ont été créés.

La présente étude a généré plusieurs résultats originaux. Nos résultats ont mis en évidence par *RT-PCR* l'expression des protéinases aspartiques *SAP2, SAP4-6, SAP7, SAP8* et *SAP9* de *C. albicans* dans des conditions de culture d'anaérobie ainsi que l'expression en aérobie et anaérobie, jusqu'à maintenant silencieuse *in vitro*, du gène *SAP7*. Toutefois, les résultats obtenus n'établissent aucun lien entre la présence d'aspartyls protéinases de *C. albicans* et le fait que les souches soit associées à l'état sain ou pathologique (stomatite prothétique). Les profils d'expression *in vitro* des souches cliniques isolées de plaque saine et de plaque prothétique, générés en conditions d'aérobie et d'anaérobie, étaient similaires quant aux transcrits des gènes *SAP1-9* de *C. albicans*.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY.....	p.ii
SOMMAIRE	p.iii
LISTE DES FIGURES.....	p.xii
LISTE DES TABLEAUX.....	p.xiv
REMERCIEMENTS.....	p.xviii
DÉDICACE.....	p.xix

INTRODUCTION

1.0. Introduction.....	p. 2
1.1 <i>Candida albicans</i>	p. 2
1.2 Taxonomie et caractéristiques métaboliques.....	p.2
1.3 Polymorphisme.....	p.3
1.3.1 Blastospores.....	p.3
1.3.2 Hype.....	p.4
1.3.3 Pseudohyphes.....	p.6
1.3.4 Chlamydozoospores.....	p.6
1.4 Commutation phénotypique.....	p.7
1.5 Pathogénicité.....	p.7
2.0 PROTÉINASES ASPARTIQUES DE <i>C.albicans</i> : SAPs.....	p.9
2.1 Structure.....	p.9
2.2 Cibles des SAPs.....	p.12
2.3 Famille de gènes <i>SAP1-SAP9</i>	p.13
2.3.1 <i>SAP1 et SAP3</i>	p.13
2.3.2 <i>SAP2</i>	p.14
2.3.3 <i>SAP4-SAP5-SAP6</i>	p.16
2.3.4 <i>SAP7</i>	p.17
2.3.5 <i>SAP8</i>	p.17

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.0	Identifications des souches de <i>C. albicans</i>	p.40
2.0	Culture de <i>C. albicans</i>	p.41
2.1	Culture en aérobiose.....	p.41
2.2	Courbes de croissance en aérobiose.....	p.41
2.3	Culture en anaérobiose.....	p.42
2.4	Milieu de différenciation entre <i>C. albicans</i> et <i>C. dubliniensis</i>	p.42
3.0	Isolation d'acides nucléiques.....	p.44
3.1	Isolement de l'ARN total - Méthode TRIZOL™ modifiée.....	p.44
3.2	Isolement d'ARNm à l'aide de la trousse «QuickPrep®Micro ARNm purification kit» de Pharmacia Amersham Biotech.....	p.45
3.3	Isolation d'ADN - Méthode Hoffman et Winston modifiée.....	p.45
4.0	Réactions d'amplification.....	p.46
4.1	<i>Polymerase chain reaction (PCR)</i>	p.46
4.2	Transcription inverse	p.48
4.3	Cinétique de l'expression des transcrits des gènes <i>SAP 1, 2,3,4-5-6, 7,8</i> et <i>9</i> en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose tel que déterminé par <i>RT-PCR</i>	p.49
4.4	Détermination de la limite de détection des transcrits <i>EFB1</i> par la technique de <i>RT-PCR</i>	p.50
4.5	Détection des transcrits des gènes <i>SAP 1,2,3,4-6,7,8</i> et <i>9</i> et du facteur d'élongation (<i>EFB-1</i>) chez de l'ARN total extrait de souches isolées de prothèses de sujets sains et de patients atteints de stomatite prothétique.....	p.50
4.6	<i>Arbitrarily primed PCR (AP-PCR)</i>	p.50
4.7	<i>Nested RT-PCR</i>	p.53

2.3.6	<i>SAP9</i>	p.18
2.4	Inhibiteurs.....	p.18
3.0	STOMATITE PROTHÉTIQUE.....	p.20
3.1	Définition.....	p.20
3.2	Étiologie.....	p.23
3.2.1	Facteurs associés à l'hôte.....	p.23
3.2.2	Facteurs associés à la prothèse.....	p.25
3.2.2.1	Prothèse mal ajustée.....	p.25
3.2.2.2	Port prolongé.....	p.26
3.2.3	Biofilm prothétique.....	p.26
3.3	Le rôle de <i>Candida albicans</i> dans la stomatite prothétique.....	p.30
3.3.1	Rôle de la pellicule acquise et ses constituants dans l'adhésion de <i>C.albicans</i>	p.30
3.3.2	Co-adhésion avec les streptocoques oraux.....	p.31
3.3.3	Rôle des résines de conditionnement.....	p.32
3.3.4	Rôle des sucres alimentaires.....	p.33
3.3.5	Traitements de la stomatite prothétique.....	p.35
4.0	BUT.....	p.37

4.8	Caractéristiques des amorces utilisées.....	p.55
5.0	Échantillons de plaque <i>in vivo</i>	p.57
5.1	Expression <i>in vivo</i> du <i>EFB-1</i> et <i>SAP1-3</i> dans la plaque prothétique (échantillon frais; n=1).....	p.57
5.2	Expression <i>in vivo</i> du <i>EFB-1</i> et <i>SAP2</i> chez de la plaque prothétique (échantillons congelés; n=2).....	p.58

RÉSULTATS

SECTION A

HÉTÉROGÉNÉITÉ DES SOUCHES CLINIQUES DE *C. albicans* ISOLÉES DE PLAQUES PROTHÉTIQUES SAINES (n=10) ET PATHOLOGIQUES (n=11)

- 1.0 *AP-PCR* effectué avec l'amorce OPA-10 et l'amorce 910-25 sur de l'ADN de souches de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines et pathologiques.....p.60
- 2.0 Temps de génération des souches *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines (n=10) et pathologiques (n=11).....p.73
- 3.0 Morphogenèse des 21 souches cliniques de *C. albicans* cultivées en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose.....p.75

SECTION B

PROFILS D'EXPRESSION *IN VITRO* DE *SAP1*, 2, 3, 4-6, 7, 8 ET 9 CHEZ LES SOUCHES DE *C. albicans* ISOLÉES DE PLAQUES PROTHÉTIQUES SAINES (n=10) ET PATHOLOGIQUES (n =11).

- 4.0 Détermination de la limite de détection de la technique de *RT-PCR* avec les amorces du gène *EFB1*.p.77
- 5.0 Cinétique de l'expression des transcrits des gènes *SAP 1*, 2, 3, 4-5-6, 7, 8 et 9 cultivées en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose tel que déterminé par *RT-PCR*.....p.79

- 6.0 Détection par *RT-PCR* des transcrits des gènes *SAP 1, 2, 3, 4-6, 7, 8* et *9* chez des souches de *C.albicans* isolées de plaques prothétiques saines et pathologiques et cultivées en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose.....p.80

SECTION C

DÉTECTION DES TRANSCRITS DE PROTÉINASES ASPARTIQUES (SAP 1, 2 ET 3) DE *C. albicans* DANS LA PLAQUE PROTHÉTIQUE *IN VIVO*

(n=3)

- 7.0 Détermination de la limite de détection de la technique de *nested RT-PCR* avec les amorces du gène *EFB1*.p.85
- 8.0 Détection des transcrits *EFB1* et *SAP2* dans un biofilm prothétique *in vivo* (n=2).....p.89
- 9.0 Détection des gènes *EFB1* et *SAP1-2-3* dans un échantillon de biofilm prothétique prélevé *in vivo* (n=1).....p.90
- 10.0 Milieu permettant de différencier *C. albicans* de *C. dubliniensis*.....p.92

DISCUSSION

1.0 Détection *in vitro* de transcrits de protéinases aspartiques de *Candida albicans*.....p.94

2.0 Détection *in vivo* de transcrits de protéinases aspartiques de *Candida albicans*.....p.102

RÉFÉRENCES.....xx

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Blastopores de *C. albicans* (Tiré de Oral candidosis ; L.P. Samaranayake et T.W. MacFarlane, Butterworth &Co. Ltd. 1990, pages 12 et 223).....p.4
- Figure 2 : Hyphes de *C. albicans* (Tiré de Oral candidosis ; L.P. Samaranayake et T.W. MacFarlane, Butterworth &Co. Ltd. 1990, page 12).....p.5
- Figure 3 : Chlamydospores et pseudohyphes de *C. albicans* (Tiré de Oral candidosis ; L.P. Samaranayake et T.W. MacFarlane, Butterworth &Co. Ltd. 1990, pages 223).....p.6
- Figure 4 : Structure conservée des protéines aspartyls protéinases de *C.albicans* ; Tiré de Hube 1998 AFMB, p.341.....p.9
- Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la protéine Sap2 de *Candida albicans* complexé avec l'inhibiteur A70450. Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.....p.10
- Figure 6 : *AP-PCR* effectué avec l'amorce 910-25 sur de l'ADN de souches cliniques de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines.....p.61
- Figure 7 : *AP-PCR* effectué avec l'amorce OPA-03 sur de l'ADN de souches cliniques de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines.....p.64
- Figure 8 : *AP-PCR* effectué avec l'amorce 910-25 sur de l'ADN de souches cliniques de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques pathologiques.....p.67

- Figure 9 : AP-PCR effectué avec l'amorce OPA-03 sur de l'ADN de souches cliniques de *C. albicans* isolées plaques prothétiques pathologiques.....p.70**
- Figure 10 : Détermination de la limite de détection de la technique de RT-PCR.....p.77**
- Figure 11 : Détermination de la limite de détection du *nested RT-PCR* avec des dilutions ascendantes de cellules de *C. albicans* souche P2.....p.85**
- Figure 12 : Détermination de la limite de détection du *nested RT-PCR* avec de l'ARN total de la souche *C. albicans* P2.....p.87**
- Figure 13 : Détection des gènes *EFB1* et *SAP1-2-3* dans un échantillon de biofilm prothétique prélevé *in vivo*.....p.90**
- Figure 14 : Milieuensemencé avec deux souches de *C. dubliniensis*, soit *C. dubliniensis* CSP 303 et CSP 303, et trois souches de *C. albicans*, soit *C. albicans* ATCC 33374, *C. albicans* P2 et *C. albicans* LAM-1.....p.92**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Pourcentage de similarité entre les protéines Saps de <i>C.albicans</i> (Tiré de Monod Microbiology 1998).....	p.11
Tableau II : Cibles des aspartyls protéinases chez l'hôte humain.....	p.12
Tableau III : Les trois stades de pathogenèse de la stomatite prothétique selon Newton (1962) Photos tirées de Oral candidosis ; L.P. Samaranayake et T.W. MacFarlane, Butterworth &Co. Ltd. 1990).....	p.21
Tableau IV : Prévalence de stomatite prothétique (Types I, II, III confondus).....	p.22
Tableau V : Présence de <i>C. albicans</i> sur prothèses de sujets atteints de stomatite prothétique (Types I, II, III confondus).....	p.29
Tableau VI : Exemples de divers facteurs influençant l'adhérence de <i>C. albicans</i>	p.34
Tableau VII : Identification des souches de <i>C. albicans</i>	p.40
Tableau VIII : Réactifs et concentration pour 1 réaction de <i>PCR</i>	p.47
Tableau IX: Paramètres de thermocycleur pour <i>PCR</i>	p.47
Tableau X : Réactif pour 1 réaction de digestion à la deoxyribonucléase.....	p.48
Tableau XI : Réactifs et concentration pour 1 réaction RT.....	p.49

Tableau XII : Réactifs et concentration pour 1 réaction d'<i>AP-PCR</i>.....	p.51
Tableau XIII : Amorces employées pour l'<i>AP-PCR</i>.....	p.52
Tableau XIV : Paramètres de thermocycleur pour <i>AP-PCR</i>.....	p.52
Tableau XV : Réactifs et concentration pour 1 réaction de nested <i>PCR</i>.....	p.53
Tableau XVI : Paramètres de thermocycleur pour nested <i>PCR</i>.....	p.54
Tableau XVII : Caractéristiques des amorces employées pour les expériences de <i>RT-PCR</i>.....	p.55
Tableau XVIII : Caractéristiques des amorces employées pour les expériences de <i>nested RT-PCR</i>.....	p.56
Tableau XIX : Matrice de similarité calculée selon les profils d'<i>AP-PCR</i> obtenus avec l'amorce 910-25 chez les souches isolées plaques prothétiques saines.....	p.63
Tableau XX : Matrice de similarité calculée selon les profils d'<i>AP-PCR</i> obtenus avec l'amorce OPA-03 chez les souches isolées de plaques prothétiques saines.....	p.66
Tableau XXI : Regroupement selon profil généré par <i>AP-PCR</i> des isolats cliniques de <i>C. albicans</i> provenant de plaque prothétique de sujets sains.....	p.66
Tableau XXII : Matrice de similarité calculée selon les profils d'<i>AP-PCR</i> obtenus avec l'amorce 910-25 chez les souches isolées de plaques prothétiques pathologiques.....	p.69

- Tableau XXIII : Matrice de similarité calculée selon les profils d'AP-PCR obtenus avec l'amorce OPA-03 chez les souches isolées plaques prothétiques pathologiques.....p.72**
- Tableau XXIV : Regroupement selon profil généré par AP-PCR des isolats cliniques de *C. albicans* provenant de plaques prothétiques pathologiques.....p.72**
- Tableau XXV : Temps de génération pour les souches isolées de plaques prothétiques saines, avec écart-type.....p.73**
- Tableau XXVI : Temps de génération pour les souches isolées de plaques prothétiques pathologiques, avec déviation standard.....p.74**
- Tableau XXVII : Observations microscopiques des souches isolées de plaques prothétiques saines, cultivés 48 heures en conditions d'anaérobiose.....p.75**
- Tableau XXVIII : Observations microscopiques des souches isolées plaques prothétiques pathologiques, cultivés 48 heures en conditions d'anaérobiose.....p.76**
- Tableau XXIX : Cinétique de l'expression des transcrits des gènes *SAP 1, 2, 3, 4-5-6, 7, 8* et *9* chez la souche *Candida albicans* LAM-1 cultivée en conditions en conditions d'aérobiose (O_2) d'anaérobiose (ANA O_2).....p.79**
- Tableau XXX: Présence (+) ou absence (-) des transcrits des gènes *SAP 1, 2, 3, 4-6, 7, 8* et *9* chez des souches isolées de plaques prothétiques saines et cultivées 24 heures en conditions d'aérobiose (O_2) et 48 heures en conditions d'anaérobiose (ANA O_2).....p.82**
- Tableau XXXI: Présence (+) ou absence (-) des transcrits des gènes *SAP 1, 2, 3, 4-6, 7,8* et *9* chez des souches isolées de plaques prothétiques pathologiques et**

cultivées 24 heures en conditions d'aérobiose (O₂) et cultivées 48 heures en conditions d'anaérobiose (ANA O₂).....p.83

Tableau XXXII : Pourcentage des souches cliniques de *C. albicans* positives pour la présence de transcrits des aspartyls protéinases *SAPI-9* suite à une croissance en conditions aérobies et anaérobies.....p.84

Remerciements

À Dr Barbeau et à Dre Deslauriers:

Votre décision en mai de 1997 de m'accepter en tant qu'étudiante graduée a contribué à mon épanouissement, non seulement scientifique, mais personnel. Ma reconnaissance envers vous est incommensurable...

À Annie:

Ton nom, d'origine hébreuse, signifie grâce et tu le portes à perfection. Ta patience et ta gentillesse sans bornes et ton désir constant d'aider sont juste quelques-unes de tes nombreuses qualités. Je ne t'oublierai jamais!

À Jacynthe:

Vous êtes pour moi la définition même du mot 'femme' : épouse, mère, grand-mère, scientifique et cuisinière extraordinaire! Je vous admire avec ardeur !

À Marco:

Tu m'a fais rire tellement souvent que j'exige une compensation monétaire pour l'achat de crèmes anti-rides. Merci du fond du cœur pour tous nos moments inoubliables...

À Benoit:

C'est grâce à ton énorme patience que j'ai complété ma thèse sans pour autant démolir l'ordinateur. Merci cher Ben...

Merci également à Andrée-Anne, Nicolas, Lucie et Bachir pour avoir contribué à créer une atmosphère abondamment amusante!

Merci à Dr Gauthier et à Pierre Rompré pour avoir contribué leur temps et leur expertise!

M E R C I À T O U S !

À mes parents avec amour.

INTRODUCTION

1.0. C. albicans

1.1 Introduction

Candida albicans est une levure polymorphique associée à la microflore indigène vaginale et oro-gastrointestinale de plusieurs espèces animales (Odds 1988). La levure commensale peut cependant se métamorphoser en un important pathogène opportuniste sous l'influence de facteurs prédisposants et de conditions immunodépressives qui s'avèrent favorables à sa prolifération. Avec la population âgée, ainsi que le nombre de traitements immunosuppresseurs rapidement à la hausse, les infections opportunistes dues à cette levure prennent une ampleur alarmante (McCullough et coll. 1996). Des 196 espèces de *Candida* (Meyer et coll. 1984), *C.albicans* est la levure pathogène la plus fréquemment isolée (Beradinelli et coll. 1985). Conséquemment, *C.albicans* est un microorganisme opportuniste d'une grande importance médicale.

1.2 Taxonomie et caractéristiques métaboliques

C. albicans est une levure faisant partie de la classe des Blastomycètes, de la famille des Cryptococcaceae et du genre *Candida*. La levure est classée dans la division des Deuteromycètes (*fungi imperfecti*) car cette espèce ne possède pas de cycle sexué connu (Lodder 1970). Les cellules peuvent tolérer une croissance à des températures variant de 20°C à 45°C et à des pH de 2.0 à 8.0 (Pinjon et coll. 1998). La croissance de *C.albicans* est possible en aérobiose ainsi qu'en anaérobiose, quoique très peu de chercheurs se sont attardés à l'étude de la levure en conditions de micro-aérophilie ou d'anaérobiose (Szawatkowski et coll. 1978).

1.3 Polymorphisme

C. albicans est un microorganisme caractérisé comme étant polymorphique car il possède la capacité d'adopter plusieurs morphologies afin de s'adapter à des conditions nutritives et environnementales constamment changeantes, dont le pH et la température. Les différents morphotypes sont les suivants :

1.3.1 Blastospores

À des températures inférieures à 33°C, *C. albicans* se retrouve préférentiellement sous la forme blastospore (voir Figure 1) (Sheppard 1987). Les blastospores sphériques ou ellipsoïdaux, d'environ 2-5µm de diamètre se reproduisent par bourgeonnement multilatéral (Odds 1988). La paroi cellulaire du blastospore est une structure rigide de 100nm à 300 nm d'épaisseur (Ghannoum 1990). Approximativement 80% à 90% de la paroi cellulaire est de nature glucidique (Sheppard 1987). Les constituants majeurs sont des polymères de glucoses contenant des embranchements β -1,3 et β -1,6, soit des glucans (47%-60% du poids de la paroi), des oligomères de mannose (mannan) associés à des protéines par des liens N-glycosidiques, soit des mannoprotéines (20-30% du poids de la paroi) et des polymères de N-acetyl D-glucosamine (GlcNAc) contenant des embranchements β -1,4, soit de la chitine (0.6%-9% du poids de la paroi). Les lipides ne constituent qu'une faible proportion de la paroi, soit de 1%-7% (Chaffin et coll. 1998, McCullough et coll. 1996).

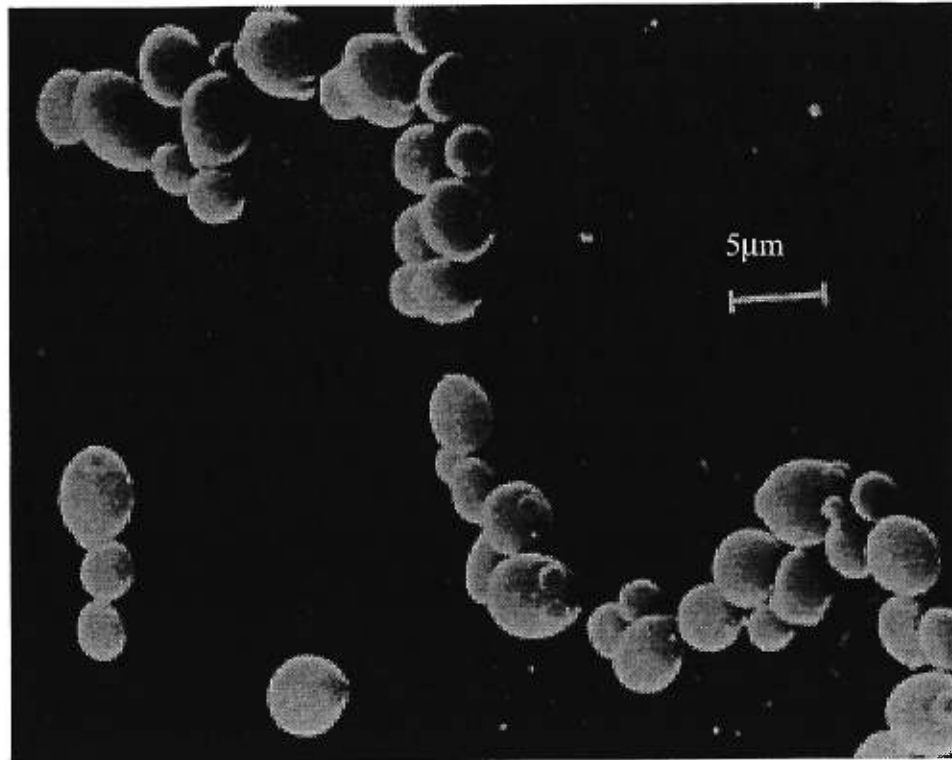


Figure 1 : Blastopores de *C. albicans* (Tiré de Oral candidosis ; L.P. Samaranayake et T.W. MacFarlane, Butterworth & Co. Ltd. 1990, pages 12).

1.3.2 Hyphe

Les hyphes (Figure 2) sont des structures filamenteuses minces de $0.8\mu\text{m}$ à $1.3\mu\text{m}$ de diamètre dont la formation est initiée par le développement de tubes germinaux (“*germ tubes*”) (Ghannoum 1990). Lors de la formation de tubes germinaux jusqu’à cinq protubérances émanent de la cellule mère, quoique généralement seulement un à deux tubes germinaux vont se développer (Odds 1988). La transition de la forme blastospore à la forme hyphe est favorisée à une température supérieure à 33°C et à un pH approximativement neutre. *In vitro*, la formation de tubes germinaux est induite par la présence, entre autres, de sérum, de plasma, de *N*-acétylglucosamine, d’acides aminés et de salive (Berardinelli et coll. 1985, Holmes et coll. 1987). La constitution chimique de la paroi cellulaire est

similaire à celle du blastospore à l'exception d'une présence accrue de chitine, soit approximativement trois fois plus que dans la forme blastospore (Ruiz-Herrera et coll. 1994, Channon et coll. 1999). Au niveau de la paroi cellulaire, il y a formation de septum.

Ce morphotype est caractérisé par un pouvoir invasif des tissus de l'hôte et la transition de la forme blastospore à la forme hyphe semble être liée à une augmentation de la virulence du microorganisme (Kimura et coll. 1980, Samanarayake et coll. 1982, Sandin et coll. 1982, Sobel et coll. 1984, Phan et coll. 2000). D'après une étude de Budtz-Jorgensen et coll. (1975), la forme hyphe, quoique présente chez les sujets ayant un palais sain et chez ceux atteints de stomatite prothétique, était plus fréquemment présente en amas importants chez les patients atteints de stomatite prothétique. Des résultats similaires ont été rapportés par Davenport et coll. (1970) qui démontra que la forme hyphe, présente chez tous les patients atteints de stomatite prothétique, n'était présente que chez un-tiers des sujets sains porteurs de prothèse.

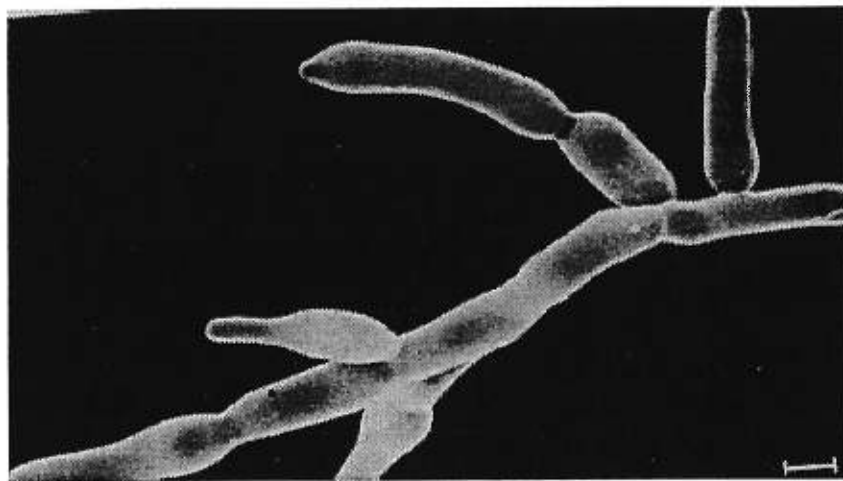


Figure 2 : Hyphes de *C. albicans* (Tiré de Oral candidosis ; L.P. Samaranayake et T.W. MacFarlane, Butterworth & Co. Ltd. 1990, page 12).

1.3.3 Pseudohyphes

Ce sont des blastospores allongés, typiquement $2\mu\text{m}$ à $5\mu\text{m}$ de diamètre et de 26 à $30\mu\text{m}$ de longueur qui demeurent attachés à la cellule mère et continuent de se former par bourgeonnement pour donner l'illusion de structure filamenteuse (voir Figure 3) (Odds 1988). On distingue les pseudohyphes des hyphes par la présence de constriction entre les bourgeons allongés et l'absence de cyclose chez les pseudohyphes. Il peut également avoir formation de bourgeons aux jonctions des cellules.

1.3.4 Chlamydospores

Ce sont des cellules larges à paroi épaisse qui se forment sous l'influence de conditions défavorables et donc possiblement des structures dormantes (voir Figure 3) (Bakerspigel et coll. 1974) ou peut-être une ancienne composante du cycle sexué (Galgoczy et coll.1988). Les espèces *C. albicans*, *C. dublieniensis* et *C. stellatoidea* (cette dernière étant considérée comme une variante de l'espèce *C. albicans*) produisent toutes des chlamydospores dans des milieux inducteurs (Staib et coll. 1999).

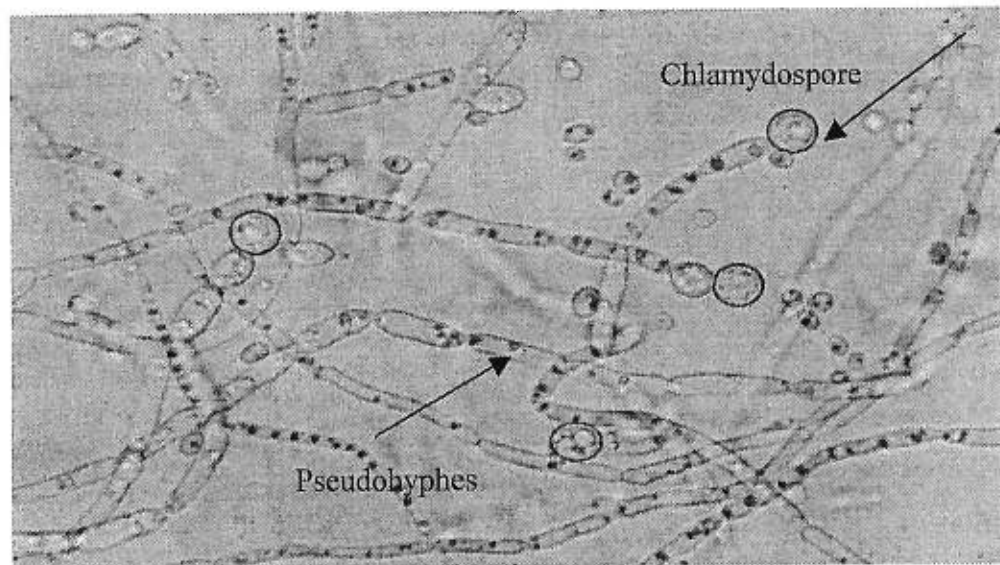


Figure 3 : Chlamydospores et pseudohyphes de *C. albicans* (Tiré de Oral candidosis ; L.P. Samaranayake et T.W. MacFarlane, Butterworth & Co. Ltd. 1990, pages 223).

1.4 Commutation phénotypique

La commutation phénotypique est un système de transition spontané et fréquent ($\approx 10^{-2}$ à 10^{-6}), qui est défini comme étant l'expression par des cellules en provenance de la même progéniture, de colonies morphologiquement différentes (Soll et coll. 1992). La commutation est réversible mais héréditaire. Ce phénomène affecte la physiologie cellulaire, l'antigénécité, le cytosquelette, la sensibilité aux antifongiques, l'adhésion à l'épithélium et l'assimilation des sucres (Soll et coll. 1992b). La commutation est stimulée par l'irradiation à des faibles doses d'UV, la température et l'âge des colonies (Soll et coll. 1992a). Ce système pourrait jouer un rôle dans la virulence de *C. albicans* en étant un moyen de déjouer le système immunitaire (Samaranayake et coll. 1990). Le système de commutation le plus étudié est le système de *white-opaque*. Ce système de commutation est caractérisé par la transition entre les cellules de phénotype *white* formant des colonies blanches hémisphériques, et les cellules de phénotype *opaque*, formant des grandes colonies aplaties de couleur grise (Anderson et coll. 1987).

1.5 Pathogénicité

C. albicans est l'agent étiologique d'un éventail de pathologies variant de la vulvovaginite légère à l'infection systémique mortelle (McCullough et coll. 1996). Au niveau de la cavité orale, la levure pathogène est probablement impliquée dans plusieurs pathologies telle que la candidose pseudomembraneuse, la cheilite angulaire et la stomatite prothétique (Channon et coll. 1999). En effet, la stomatite prothétique est la forme de candidose orale la plus fréquente en occident (Ellepola et coll. 1998b).

C. albicans peut provoquer ces différentes pathologies via un assortiment de facteurs de virulence dont l'adhésion aux surfaces inertes et biologiques de l'hôte, le polymorphisme, la capacité de commutation phénotypique, l'immunomodulation des défenses de l'hôte et la production d'enzymes hydrolytiques sécrétées telles que les phospholipases, les métallopeptidases et les protéinases aspartiques (Chaffin et coll. 1998).

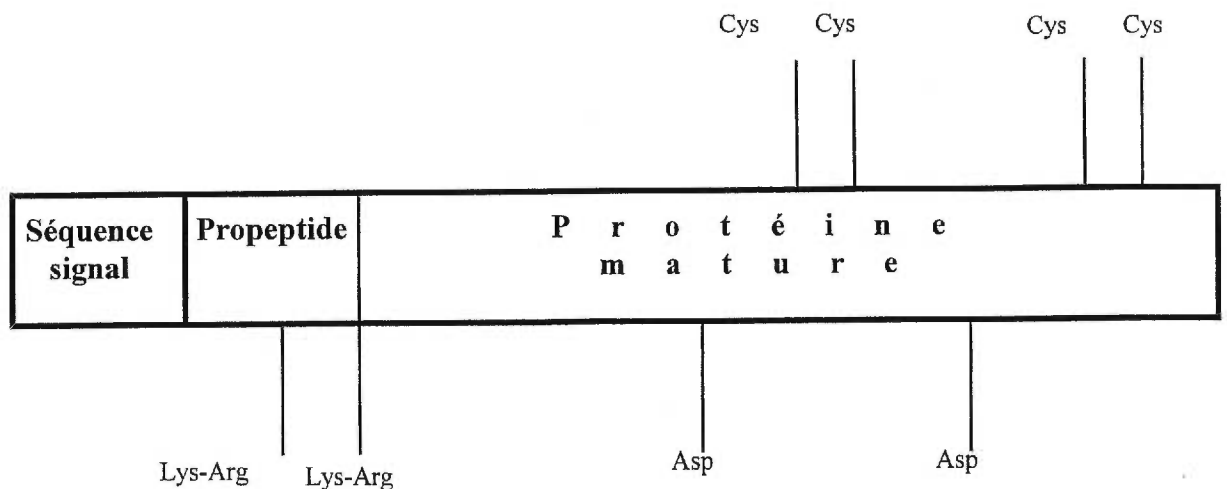
Récemment, suivant l'énorme progrès en biologie moléculaire, il y eu de l'emphase mise sur l'étude du rôle des protéinases aspartiques, nommées SAPs (*secreted aspartyl proteinases*), dans la pathogénicité de *C.albicans*. La section suivante présente en détail les protéinases aspartiques de *C.albicans*.

2.0 PROTÉINASES ASPARTIQUES SÉCRÉTÉES DE *C.albicans* : SAPs

2.1 Structure

La famille des gènes *SAPs* est constituée, jusqu'à présent, de 9 protéinases aspartiques codées par 9 gènes distincts. Ces gènes, tous régulés de manière différentielle, sont exprimés comme des proenzymes intracellulaires (Hoegl et coll. 1996). Les protéines matures contiennent des séquences fidèlement conservées parmi les protéinases aspartiques. Tous les gènes *SAPs* codent pour une séquence signal hydrophobe de 14 à 21 acides aminés et un propeptide d'approximativement 60 acides aminés et constitué de sites de clivages consensus terminant par les dipeptides Lys-Arg. Par exemple, le gène *SAP2* code pour une pré-protéine de 398 acides aminés qui est par la suite clivée, possiblement par une convertase préprotéinique apparentée à KEX2 chez *S. cerevisiae* (Newport et coll. 1997), pour former une protéine mature de 342 acides aminés (Abad-Zapatero et coll. 1998). La protéine mature contient des résidus aspartates et cystéiques conservés (voir Figure 4) (Newport et coll. 1997).

Figure 4 : Structure conservée des protéines protéinases aspartiques de *C.albicans*
(Tiré de Hube 1998 AFMB, p.341).



Les protéines Saps de *C.albicans*, tout comme les autres membres des protéinases aspartiques telle que la pepsine, sont des enzymes bi-lobaires dont le site d'activation se situe entre les deux lobes homologues. La Figure 5 est un schéma de la structure tridimensionnelle de la protéine Sap2.

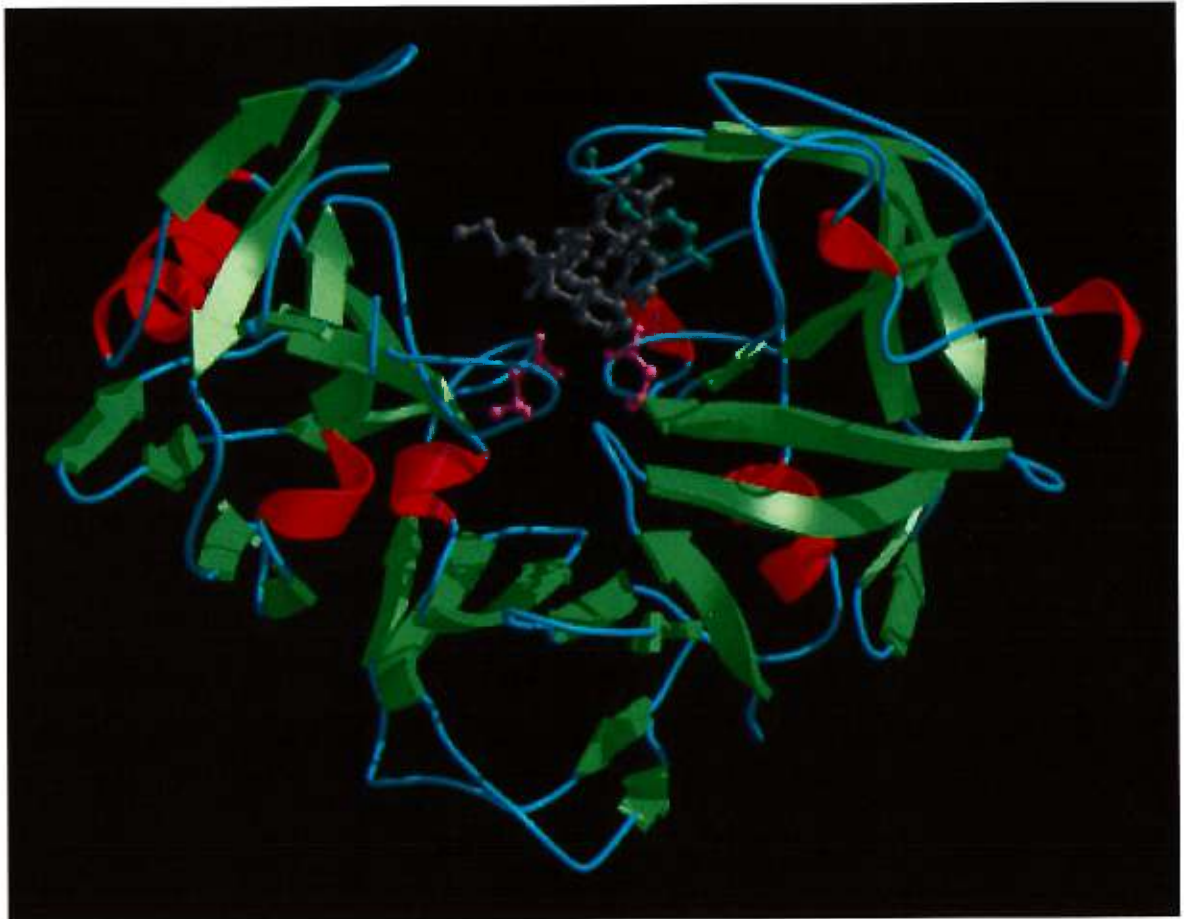


Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la protéine Sap2 de *C. albicans* complexé avec l'inhibiteur A70450. (Tiré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)

Quoique issus de gènes distincts, les neuf gènes des protéinases aspartiques possèdent des similarités variant de 17.1% à 89.9% (Monod et coll. 1998). Les gènes *SAP1-3* ainsi que les gènes *SAP4-6* forment des sous-famille d'isoenzymes tandis que Sap7, Sap8 et Sap9 sont des protéines plus divergentes (Monod et coll. 1998). Le tableau qui suit (voir Tableau I) démontre la similarité existante entre chaque protéine Sap.

Tableau I : Pourcentage de similarité entre les protéines Saps de *C.albicans* (Tiré de Monod et coll. 1998).

	Sap1	Sap2	Sap3	Sap4	Sap5	Sap6	Sap7	Sap8	Sap9
Sap1	-	67.1	67.6	57.4	55.4	56.6	20.4	50.0	28.1
Sap2	-	-	69.8	55.0	52.5	55.0	27.4	50.0	28.6
Sap3	-	-	-	53.0	49.2	52.3	26.9	50.5	22.1
Sap4	-	-	-	-	77.2	89.9	26.4	43.4	29.5
Sap5	-	-	-	-	-	80.4	26.1	41.2	26.8
Sap6	-	-	-	-	-	-	27.3	42.4	26.3
Sap7	-	-	-	-	-	-	-	25.3	17.1
Sap8	-	-	-	-	-	-	-	-	26.3
Sap9	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C. albicans n'est pas la seule espèce à sécréter des protéinases aspartiques. Il a été démontré par la technique d'hybridation de colonies, en conditions de basse stringence, que les levures *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, contrairement aux espèces *C. shehatae* et *C. krusei*, possèdent des gènes homologues aux protéinases aspartiques de *C. albicans* (Ganesan et coll. 1991). Des résultats similaires ont été obtenus par Banarjee et coll. (1991) qui a démontré que les protéinases sécrétées par *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, quoique possédant des masses moléculaires différentes, sont antigéniquement homologues à celles de *C. albicans*. Elles possèdent toutefois une activité protéolytique inférieure à celle de

C. albicans (Schreiber et coll. 1985). Il a déjà été démontré que la protéinase aspartique de *C. parapsilosis*, soit la protéinase #265, n'était pas exprimée dans des modèles d'infection *in vitro* et *in vivo* (Ruchel et coll. 1986).

2.2 Cibles des SAPs

Les protéinases aspartiques de *C. albicans* agissent sur plusieurs substrats et possèdent donc la capacité de dégrader plusieurs protéines de l'hôte humain. Le tableau suivant (voir Tableau II) donne un aperçu des cibles possibles des protéines Saps.

Tableau II : Cibles des protéinases aspartiques.

Substrat	Référence
α -caseine	Negi et coll. (1984)
Azo-call	Negi et coll. (1984)
Azo-caseine	Negi et coll. (1984)
Fibronectine	Morschhauser et coll. (1997)
IgG	Kaminishi et coll. (1995)
Kératine	Negi et coll. (1984)
Matrice extracellulaire humaine sous-endothéliale	Morschhauser et coll. (1997)
Molécules du complément C3	Kaminishi et coll. (1995)
Mucine gastrointestinale	Colina et coll. (1996)
Ongle humain	Negi et coll. (1984)
Ovalbumine	Negi et coll. (1984)
pro-IL-1 β	Beauséjour et coll. (1998)
Stratum corneum	Negi et coll. (1984)

2.3 Famille de gènes *SAP1-SAP9*

2.3.1 *SAP1 et SAP3*

Peu d'études ont été réalisées dans le but de caractériser biochimiquement et physiologiquement les protéines Sap1 et Sap3.

Selon Hube et coll. (1994), les gènes *SAP1* et *SAP3* de *C.albicans* sont uniquement exprimés lorsque la levure adopte la forme opaque durant la commutation phénotypique du système «white-opaque». L'expression, régulée par l'environnement, est réprimée en présence d'acides aminés ou autre source d'azote de faible poids moléculaire. Le niveau d'expression du gène *SAP3*, contrairement à celui de *SAP1* et *SAP2*, ne diminue pas dans la phase stationnaire précoce de croissance.

L'activité maximale de la protéine Sap1 se déroule à un pH de 4.0-4.5 (Borg-von Zepelin et coll. 1998) tandis que Sap3 possède une activité optimale, pour l'albumine bovine (BSA), l'hémoglobine et la caséine comme substrats, à un pH de 2.5-3.5 (Borg-von Zepelin et coll. 1998, Smolenski et coll. 97).

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur la construction de mutants pour élucider le rôle des gènes d'intérêt médical. Par exemple, la construction d'une souche mutante *sap1* (génotype $\delta sap1::hisG / \Delta sap1:: hisG :: URA3::hisG$) et *sap3* (génotype $\delta sap3::hisG/\Delta sap3::hisG::URA3::hisG$) par Debernadis et coll. (1995), a permis de tester la virulence des gènes *SAP1* et *SAP3* dans un modèle murin. La souche mutante *sap1*, comparativement à la souche sauvage (génotype *URA3/URA3*), avait une capacité réduite de coloniser la paroi vaginale de rats oophorectomisés (dont les ovaires ont été enlevés) et donc était éliminée plus rapidement que la souche parentale. La délétion du gène *SAP3* a également mené à une colonisation moins importante que la souche sauvage, mais beaucoup moins prononcée que celle du mutant *sap1*. La délétion du gène *SAP1* et, à un moindre degré, du gène *SAP3* a donc eu comme effet de diminuer le potentiel pathogène de *C. albicans* dans ce modèle animal.

Une autre étude effectuée avec des mutants a été menée par Watts et coll. (1998), qui a trouvé que les mutants *Δsap1* et *Δsap3*, lorsque mis en présence avec des cellules épithéliales buccales humaines pour une durée de 45 minutes à 37°C, sont légèrement moins adhérents à ces dernières comparativement à la souche sauvage.

Shaller et coll. (1998) a été le premier à effectuer une étude sur l'expression temporelle des *SAPs* grâce à un modèle *in vitro* de candidose orale élaboré sur de l'épithélium humain reconstitué formé de kératinocytes stratifiés sans la couche cornée. Les transcrits de *SAP1* et de *SAP3* ont été les premiers à être décelés, 42 heures suivant l'inoculation de *C.albicans*, grâce à la technique de *RT-PCR*.

Les gènes *SAP1* et *SAP3* seraient donc possiblement impliqués dans les stades précoces d'une candidose, possiblement au niveau de l'adhérence du microorganisme.

2.3.2 *SAP2*

La majorité des recherches effectuées sur les protéinases aspartiques de *C.albicans* ont été concentrées sur *SAP2* car, *in vitro*, c'est le transcrit le plus abondamment détecté chez la forme levure (Hube et coll. 1994). De ce fait, les informations disponibles sur son expression, sa régulation et surtout son potentiel virulent, sont nombreuses. Toutefois, plusieurs ambiguïtés subsistent.

L'expression *in vitro* du gène *SAP2* est influencée par les conditions environnementales, dont le pH du milieu. Des transcrits ne sont détectés qu'à des pH acides variant de 3.5 à 5.0, pH auxquels l'activité de l'enzyme est optimale (Rüchel 1981). Il est important de noter que son expression, tout comme celle des gènes *SAP1* et *SAP3*, est réprimée en présence de sources d'azote de faible poids moléculaire tels que les acides aminés ou par un pH trop acide ou neutre (Borg-von Zepelin et coll. 1998). Son expression semble également dépendante de la phase de croissance car la présence de transcrits est limitée à la phase logarithmique (Hube et coll. 1994). La température ne semble pas affecter l'induction du gène *SAP2*. En effet, on observe des patrons d'expression similaires à 25°C ainsi qu'à 37°C (Hube et coll. 1994).

L'étude du pouvoir pathogène potentiel de *SAP2*, tout comme celui des autres *SAPs*, a été étudié via la construction de souches mutantes. Par exemple, la construction d'une souche mutante *sap2* (génotype $\Delta sap2::hisG / \Delta sap2::hisG::URA3::hisG$) par Debernardis et coll. (1995), a permis d'observer que la souche mutante, comparativement à la souche sauvage (génotype *URA3/URA3*), avait une capacité considérablement réduite de coloniser la paroi vaginale de rats oophorectomisés. Une inoculation avec une souche mutante révertante, soit une souche où le gène *SAP2* préalablement déléte est réinséré (génotype $\Delta sap2::hisG / \Delta sap2::hisG / SAP2 :: URA3$), a provoqué une colonisation et évacuation similaire à la souche parentale. Donc, le gène *SAP2* de *C.albicans* pourrait possiblement jouer un rôle dans la vulvo-vaginite dans les premiers stades d'infection, soit au niveau de la colonisation du microorganisme.

La construction de mutants n'est pas l'unique façon de faire des études sur la virulence. Staib et coll. (1999) a employé la technique IVET (*in vivo expression technologies*) afin de détecter l'expression du gène *SAP2* *in vivo* chez deux modèles d'infection systémique dans un modèle murin. *SAP2* a été détecté, non pas durant les premiers stades d'infection disséminée, mais plutôt dans les stades tardifs, appuyant les résultats de Shaller et coll. (1998).

Une autre étude intéressante menée par Ibrahim et coll. (1998) sur l'interaction entre des souches mutantes de *C. albicans*, soit $\Delta sap1$, $\Delta sap2$ et $\Delta sap3$, et des cellules endothéliales humaines a démontré que seul le mutant *sap2* avait un pouvoir inhibiteur sur la sécrétion de E-sélectine, une molécule d'adhésion cellulaire. De plus, les cellules $\Delta sap2$ ont causé, dépendamment du temps d'incubation, de 6% à 31% plus de lésions aux cellules endothéliales que la souche parentale sauvage mais n'ont cependant pas altéré sa capacité d'adhésion.

Certaines études ne démontrent aucun lien entre l'expression du gène *SAP2* et le potentiel virulent du microorganisme. Récemment, DuBois et coll. (1998) ont démontré que la surexpression constitutive de *SAP2* chez *C. albicans* et l'expression de *SAP2* chez *Saccharomyces cerevisiae*, un microorganisme avirulent transformé, n'ont pas augmenté le

potentiel virulent des souches comparativement à la souche sauvage virulente *C. albicans* SC5314, suite à une infection systémique et orale chez un modèle murin.

En résumé, malgré les études abondantes disponibles sur le gène *SAP2*, le rôle de cette protéinase aspartique demeure toujours énigmatique et controversé.

2.3.3 *SAP4-SAP5-SAP6*

Les gènes *SAP4-SAP6* possèdent 76-88% d'homologie entre eux et sont considérés comme étant un groupe distinct des autres *SAPs*. L'expression des isoenzymes Sap4-6 est généralement, mais pas obligatoirement, liée à la transition levure-hyphes à pH neutre (Hube et coll. 1994). Contrairement aux gènes *SAP1-3*, leur expression n'est pas réprimée par la présence d'acides aminés (Hube et coll. 1994). L'activité maximale des isoenzymes est à pH 5.0 (Borg-von Zepelin et coll. 1998).

La construction de mutants s'est encore avérée nécessaire afin de mettre en évidence le potentiel pathogène des gènes *SAP4-SAP6*. Par exemple, Sanglard et coll. (1997) ont démontré chez un modèle murin que les rats infectés avec le mutant triple $\Delta sap4,5,6$, avaient un taux de survie supérieur de 34% (avec un inoculum initial de 4×10^3 CFU) à 76% (avec un inoculum initial de 8×10^3 CFU) comparativement à ceux inoculés avec la souche sauvage.

Quant au rôle de *SAP4-6* au niveau de l'adhérence, les études ont généré des résultats intéressants. Debernardis et coll. ont montré que les mutants *sap4*, *sap5*, *sap6* et *sap4-6*, n'ont pas diminué de manière très significative la colonisation aux parois vaginales. Une autre étude a montré que la capacité d'adhérence du triple mutant $\Delta sap4-6$ pour des cellules épithéliales buccales humaines a été très significativement augmentée par rapport à la souche sauvage, soit de 316 ± 68 % pour les levures cultivées en glucose et de 232 ± 36 % pour les levures cultivées en galactose. Les auteurs ont proposé que l'absence de l'activité protéolytique du triple mutant pourrait être la cause de cette capacité accrue d'adhésion (Watts et coll. 1998).

Lorsque ingérée par des macrophages péritonéaux murins (Borg-von Zepelin et coll. 1998), la souche mutante triple *Δsap4-6* possède une viabilité significativement réduite, soit d'environ 57% comparativement à la souche sauvage. De plus, suivant la phagocytose de *C. albicans* par des macrophages, on observe une production élevée des protéines Sap4, Sap5 et Sap6, conférant possiblement une certaine protection contre la phagocytose. Le type de stimulation intracellulaire pouvant engendrer la synthèse de ces trois isoenzymes n'est pas très bien connu (Borg-von Zepelin et coll. 1998).

La contribution des gènes *SAP4-SAP6* dans la candidose est loin d'être complètement résolue, tout comme celle de *SAP7*, *SAP8* et *SAP9*.

2.3.4 *SAP7*

SAP7 a une séquence d'acides aminés très divergente des autres *SAPs*, soit une similarité de seulement 20.4% comparé à *SAP1* (Monod et coll. 1998). *SAP7* a également une séquence N-terminale plus longue et trois insertions entre les résidus 400 et 461. Naglik et coll. (1999) ont été les premiers à décrire l'expression du gène *SAP7 in vivo*. En effet, des transcrits *SAP7* ont été détectés chez 60% des patients atteints de candidose orale comparativement à 25% des sujets sains. Le rôle de *SAP7* demeure encore inconnu.

2.3.5 *SAP8*

Le gène *SAP8*, localisé sur le chromosome 3, possède un cadre de lecture de 1215pb et code pour une protéine de 405 acides aminés et d'une masse de 35 kDa. D'après Monod et coll. (1998), l'expression de *SAP8* est dépendante de la température. *SAP8* est exprimée préférentiellement durant le stade exponentiel de croissance et cela à 25°C mais à 37°C les transcrits disparaissaient après 3 heures (Monod et coll. 1998). L'expression de *SAP8* pourrait également être influencée par la commutation phénotypique car l'expression de *SAP8* est réduite lorsque la levure adopte la forme "white". Il n'existe aucune donnée sur l'expression *in vivo* de *SAP8*.

2.3.6 *SAP9*

Le gène *SAP9*, localisé sur le chromosome 3, possède un ORF de 1632pb et code pour une protéine de 544 acides aminés et d'une masse de 52 kDa (Monod et coll. 1998). Des transcrits abondants de *SAP9* ont été détectés à une température de 25°C et après 45 heures de croissance *in vitro* (phase stationnaire) (Monod et coll. 1998). La protéine Sap9 possède une similarité avec les autres Saps qui varie de 17.1% (avec Sap7) à 29.5% (avec Sap4) et est donc significativement divergente des autres Saps (Monod et coll. 1998).

2.4 Inhibiteurs

L'inhibiteur spécifique des protéinases aspartiques est la pepstatine-A et son rôle a maintes fois été décrit dans la littérature scientifique. Par exemple, l'administration de pepstatine A, 1 jour avant et 4 jours suivant une inoculation intranasale de *C. albicans*, a eu pour effet de significativement diminuer, d'une manière dose-dépendante, la dissémination et l'accumulation du microorganisme dans les reins, le foie et les poumons (Fallon et coll. 1997). Les souris traitées avec 100µg de pepstatine A lors d'une infection vaginale expérimentale, éliminaient *C. albicans* 2 fois plus rapidement dès le premier jour post-infection. Cette même réduction n'était observée qu'après 15 jours chez les souris n'ayant pas été traitées avec l'inhibiteur (DeBernardis et coll. 1997). Considérant le fait que la pepstatine A est un inhibiteur efficace contre les Saps ces études démontrent, de manière indirecte, l'importance du rôle des protéinases aspartiques lors d'une infection à *C. albicans*.

Cependant, il existe d'autres inhibiteurs qui pourraient cliniquement être d'un grand intérêt: ce sont les inhibiteurs de rétropepsines, i.e. des inhibiteurs des protéines virales du VIH. Ces rétropepsines, tout comme les Saps de *C. albicans*, font partie de la même classe de protéinases aspartiques (Flexner et coll. 1998). Certains inhibiteurs de rétropepsines sont également d'efficaces inhibiteurs de Saps.

Il a déjà été démontré que les inhibiteurs de protéinases du virus VIH, comme le saquinavir (SQV) et indinavir (IDV), possèdent la capacité d'inhiber l'activité des protéinases aspartiques *in vitro*. L'étude de Korting et coll. (1999) a démontré que le SQV,

dépendamment de la dose, avait une capacité de réduction d'activité des Saps de 22 à 85 %, et le IDV une capacité de réduction de 24% à 83%, et cela à des concentrations comparables à celles administrées cliniquement. Les effets des deux médicaments sont similaires à ceux observés en présence de pepstatine A. (Korting et coll. 1999).

Un autre inhibiteur de protéinases de virus VIH, le ritonavir, à des concentrations variant de 1µM à 10µM, est également capable d'inhiber la production de Saps *in vitro*, d'inhiber l'activité des Saps telle que détectée par la présence ou l'absence de l'hydrolyse de l'alumine (Cassone et coll. 1999, Korting et coll. 1999) ainsi que de réduire la croissance de *C.albicans*.

Il est également intéressant de noter que l'être humain possède un inhibiteur naturel des protéinases aspartiques: le lysozyme (Wu et coll.1999). Cette protéine, également nommée muramidase, qu'on retrouve au niveau de la salive humaine, semble avoir des propriétés inhibitrices au niveau de l'activité et de la concentration extracellulaire ainsi qu'intracellulaire des Saps. L'activité des protéines Saps telle que détectée par un essai spectrophotométrique, et sa concentration, telle que détectée par ELISA, ont été diminuées d'approximativement 50% et 75% respectivement en présence de lysozyme.

Les rétropepsines ainsi que la pepstatine A sont des inhibiteurs efficaces contre les protéinases aspartiques et pourraient ultérieurement devenir des voies thérapeutiques intéressantes contre des pathologies telle que la stomatite prothétique que nous verrons en détail dans la section qui suit.



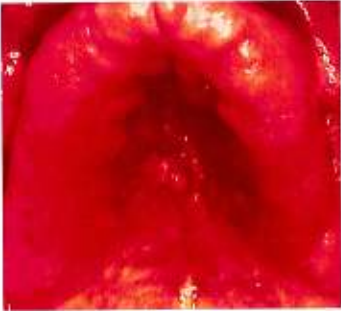
3.0 STOMATITE PROTHÉTIQUE

3.1 Définition

La stomatite prothétique est une condition inflammatoire fréquente qui affecte les muqueuses buccales recouvertes par une prothèse dentaire (Jennings et coll. 1990). Cette condition se manifeste le plus souvent au niveau du palais dur et rarement au niveau mandibulaire, site où la salive exerce un effet mécanique de nettoyage et d'irrigation plus prononcé (Wilson et coll. 1998, Oral Medecine; diagnosis and treatment, 1984). La stomatite prothétique est fréquemment asymptomatique bien que la sensation de brûlure au palais et à la langue, l'halitose, le saignement mucosal et la xérostomie peuvent être associés (Arendorf et coll. 1987, communication personnelle).

Cliniquement, la stomatite prothétique est souvent classifiée selon les trois stades de pathogenèse décrits par Newton (Newton 1962). La stomatite prothétique stade I est caractérisée par la présence d'inflammation localisée au niveau de la muqueuse recouverte par la prothèse. La stomatite prothétique stade II est caractérisée par une inflammation généralisée, diffusée sur au moins les 3/4 de la superficie de la muqueuse en contact avec la prothèse. La stomatite prothétique stade III est caractérisée par une inflammation généralisée ou localisée des surfaces en contact avec la prothèse, accompagnée d'hyperplasie papillaire. L'hyperplasie papillaire, soit la formation de nodules d'apparence granuleuse, nécessite souvent une intervention chirurgicale (Wilson 1998, Renner et coll. 1979, Oral Medecine; diagnosis and treatment, 1984). Les trois stades cliniquement diagnostiqués sont présentés dans le tableau suivant (voir Tableau III).

Tableau III : Les trois stades de pathogenèse de la stomatite prothétique selon Newton (1962) (Photos tirées de Oral candidosis ; L.P. Samaranayake et T.W. MacFarlane, Butterworth & Co. Ltd. 1990).

Stade	Caractéristiques
Stomatite I	Présence d'inflammation localisée
	
Stomatite II	Inflammation généralisée.
	
Stomatite III	Inflammation généralisée ou localisée accompagnée d'hyperplasie papillaire.
	

Il existe des variations au niveau de la littérature en ce qui concerne la prévalence de la stomatite prothétique parmi les porteurs de prothèses (voir Tableau IV). Cette variabilité est probablement due à plusieurs facteurs qui influencent l'apparition de la stomatite prothétique et que nous examinerons dans la prochaine section. Selon Brodeur et coll. (1996), 40% de la population au Québec porte une prothèse partielle ou complète. Tel que mis en évidence par le tableau IV, la stomatite prothétique est une condition qui affecte une proportion très significative de porteurs de prothèses mondialement.

Tableau IV : Prévalence de stomatite prothétique (Types I, II, III confondus).

RÉFÉRENCE	PAYS	ANNÉE	PRÉVALENCE
E. Budtz-Jorgensen et coll.	Danemark	1975	65% (465*)
M.I. MacEntee et coll.	Angleterre	1988	39% (320)
S-C. Öhman et coll.	Suède	1988	56% (100)
C.G. Cumming et coll.	Écosse	1990	54% (121)
Lars Elliason et coll.	Suède	1992	59.2% (184)
L.P. Samaranayake et coll.	Écosse	1995	19% (147)
E. Budtz-Jorgensen et coll.	Suisse	1996	72% (233)
M.I. MacEntee et coll.	Canada	1998	34% (255)
I.M. Kuc et coll.	Canada	1999	33% (63)

* Les chiffres entre parenthèse dans la colonne 'Prévalence' correspondent à la taille de l'échantillon.

3.2 Étiologie

L'étiologie de la stomatite prothétique est complexe et loin d'être élucidée. Il est généralement accepté que les facteurs étiologiques prépondérants sont les facteurs traumatiques reliés au port de la prothèse et la présence de *C. albicans*. Toutefois, il existe une myriade de facteurs étroitement associés à l'apparition, la progression et au maintien de la stomatite prothétique et ces derniers vont être discutés en profondeur dans la section qui suit.

3.2.1 Facteurs associés à l'hôte

Une mauvaise hygiène orale favorise la formation et l'accumulation de la plaque microbienne sur la prothèse et cette dernière agit comme un réservoir d'agents infectieux (Budtz et coll. 1981). Il a fréquemment été démontré que les patients atteints de stomatite prothétique possèdent une routine de nettoyage de prothèse souvent déficiente. Par exemple, 46% des porteurs de prothèse sans stomatite procèdent à un brossage de leur dentier et ont recours à un nettoyant à prothèse, comparativement à seulement 8% chez les patients atteints de stomatite prothétique. La majorité de ces derniers (89%) se limitent à un simple brossage de leur prothèse (Jeganathan et coll. 1997). De plus, en utilisant de l'érythrosine pour mettre en évidence la plaque présente sur la prothèse, il a été démontré que 64% des patients atteints de stomatite prothétique portent une prothèse visiblement maculée comparativement à seulement 18% des sujets sains (Jeganathan et coll. 1997). D'après l'étude de Vigild et coll. (1987), la prévalence de la stomatite prothétique était liée à l'hygiène orale; 54% des sujets ayant une hygiène pauvre souffraient de stomatite prothétique comparativement à seulement 7% des sujets ayant une bonne hygiène.

De mauvaises habitudes alimentaires peuvent également influencer l'apparition de la stomatite prothétique. Par exemple, une alimentation riche en glucides favorise la prolifération des microorganismes (notamment les streptocoques), une baisse du pH entre le palais et la prothèse (Olsen et coll. 1975) ainsi que l'adhésion de *C. albicans* sur des surfaces d'acrylique (Samaranayake et coll. 1980). Chez les patients atteints de diabète insulino-indépendant (type II), la densité et l'adhérence de *C. albicans* sur des cellules

épithéliales du palais, ainsi que la prévalence de la stomatite prothétique étaient supérieures comparativement aux sujets témoins démontrant un métabolisme glucidique normal (Dorocka-Bobkowska et coll. 1996). Une étude menée récemment par Guggenheimer et coll. (2000) a démontré la présence de pseudohyphes de *C. albicans* uniquement chez les patients atteints de stomatite prothétique souffrant de diabète insulino-dépendant et non chez les patients atteints de stomatite prothétique ayant un métabolisme glucidique normal.

La diminution du flux salivaire, et donc, entre autres, de son effet de nettoyage mécanique, favorise le développement de microorganismes. Il a été démontré qu'un plus grand nombre (37%) de patients atteints de stomatite prothétique possèdent un taux de sécrétion de salive inférieur à 4mL/5min que supérieur à 4mL/5min (Sakki et coll. 1997). L'administration des médicaments psychotropes, pouvant causer de la xérostomie comme effet secondaire, est associée avec une fréquence plus élevée d'inflammation palatine, une présence accrue de staphylocoques oraux ainsi qu'une augmentation en densité et en nombre de *Candida albicans* dans la cavité buccale (Lucas et coll. 1993).

Tout facteur affectant le système immunitaire, tel que la prise des médicaments immunosuppresseurs, ou encore la présence de maladie systémique qui diminue le système de défense de l'hôte, tel que l'infection du VIH ou le syndrome de Sjögren (Budtz-Jorgensen 1970), peut contribuer à l'apparition d'une infection causée par de microorganismes opportunistes, tel que *C. albicans* (Ritchie et coll. 1969)

D'autres facteurs prédisposants à la stomatite prothétique pourraient être reliés au sexe de l'individu, à la consommation de tabac et à l'allergie. En ce qui concerne le sexe de l'individu, les études sont contradictoires. McEntee et coll. ont rapporté dans leur étude de 1998 que les hommes étaient 2 fois plus prédisposés à la stomatite prothétique, tandis que d'autres recherches (Arendorf et coll. 1987, Oksala 1990, Dorey et coll. 1985) concluent que la stomatite prothétique est plus fréquente chez les femmes. Pour ce qui est de la consommation de tabac, il semble exister un lien significatif entre le nombre de cigarettes fumées quotidiennement et la présence de stomatite prothétique (Cumming et coll. 1990, Zain et coll. 1989). Finalement, l'allergie aux matériaux de prothèses, autrefois considéré

comme facteur étiologique prépondérant, est que très rarement observée de nos jours (Wilson et coll. 1998).

3.2.2 FACTEURS ASSOCIÉS À LA PROTHÈSE

3.2.2.1 Prothèse mal ajustée

Les facteurs traumatiques reliés au port d'une prothèse désuète ou inadéquatement adaptée au patient, sont des facteurs étiologiques importants dans l'initiation de la stomatite prothétique. L'irritation et l'inflammation des muqueuses causées par le port de prothèses mal adaptées à la cavité buccale du patient semblent être un problème fréquent. La totalité des dentiers examinés par Brunello et coll. (1998), avaient des défauts qui se traduisaient en plaintes par les porteurs de prothèse. Par exemple, 75 des 100 porteurs de prothèse interrogés se plaignaient d'inconfort et de douleur associés au port de prothèse, 59% affirmaient que leur prothèse était instable tandis que 61% éprouvaient de la difficulté à consommer certains aliments. Des résultats similaires ont été rapportés par Slade et coll. (1993) qui a observé que 77.4% des prothèses examinées avaient des défauts d'ajustement et de structure. Un ajustement de la prothèse, éliminant l'irritation mécanique, entraîne une amélioration de la condition inflammatoire (Nyquist 1952). Selon MacEntee et coll. (1988), 60% des sujets étudiés portaient des prothèses instables et lâches, tandis que 21% portaient des prothèses visiblement abîmées. Une prothèse désuète peut parfois exacerber le traumatisme et l'irritation au niveau des muqueuses. Mikkonen et coll. (1984) observa une prévalence significativement supérieure de stomatite prothétique chez les porteurs dont les prothèse étaient âgées de plus d'un an. Au contraire, Jeganathan et coll. (1997) ne nota aucune différence significative entre l'âge de la prothèse et la présence de stomatite prothétique.

3.2.2.2 Port prolongé

Un port prolongé des prothèses peut prédisposer le sujet à la stomatite prothétique en favorisant la formation et le maintien de la plaque prothétique. Par exemple, 61% des sujets du groupe de patients atteints de stomatite prothétique portaient leur prothèse jour et nuit comparativement à seulement 18% du groupe de sujets sains (Jeganathan et coll. 1997). De plus, l'incidence de levures est plus élevée chez les porteurs de prothèses qui gardent leur appareil durant la nuit (Arendorf et coll. 1979).

Les facteurs mécaniques, tels que le port d'une prothèse désuète, mal adaptée ou un port prolongé, jouent un rôle déclenchant dans le développement de la stomatite prothétique. Cependant, l'étiologie de la stomatite prothétique est multifactorielle et d'autres facteurs, tel que la présence de *C.albicans* dans le biofilm prothétique, doivent être examinés.

3.2.3 Biofilm prothétique

La plaque microbienne présente sur l'intrados d'une prothèse, soit le biofilm prothétique, représente un microenvironnement extrêmement diversifié et hautement variable (Theilade et coll. 1983). La flore prothétique est, de manière prédominante, composée de streptocoques, d'actinomycètes, de lacertiliens et de staphylocoques, soit une communauté largement bactérienne et Gram positive (Theilade et coll. 1988, Koopmans et coll. 1988). En effet, 71% la flore prothétique cultivable est constituée de cocci Gram positifs aérobies facultatifs et 7.4% de bâtonnets Gram positifs aérobies facultatifs (Gusberti et coll. 1985). Environ les trois-quarts des microorganismes du biofilm prothétique sont aérobies facultatifs tandis que 23.6% sont des anaérobies stricts. (Gusberti et coll. 1985).

Le profil des microorganismes résidant dans une plaque saine ou dans une plaque présente chez un patient atteint de stomatite prothétique diffère de manière qualitative et quantitative. On observe d'importantes différences entre un biofilm prothétique sain et un biofilm prothétique provenant de patient atteint de stomatite prothétique (Theilade et coll. 1988, Kulak et coll. 1997). Par exemple, on observe une augmentation significative de

Arachnia propionoca, *C. albicans*, *Lactobacillus sp.*, *Neisseria sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Staphylococcus aureus*, et *Streptococcus sp.* α - et β -hémolytique parallèlement à une réduction importante d'*Actynomyces sp.* et de *Veillonella sp.* dans un biofilm prothétique de stomatite prothétique (Kulak et coll. 1997, Theilade et coll. 1988, Gusberti et coll. 1985). L'étude sur la diversité de la plaque microbienne par Koopmans et coll. (1988) a mis en évidence plusieurs différences entre la flore d'une plaque saine et d'une plaque de patient atteint de stomatite prothétique. Notamment, dans la plaque et sur la muqueuse de patients atteints de stomatite prothétique, il a noté une augmentation de cocci Gram positifs anaérobies stricts, une diminution de bactéries facultatives et une augmentation de bâtonnets. *C. albicans*, en particulier, ne constitue que 0.002% des microorganismes dans l'isolat de biofilms prothétiques de sujets sains comparativement à 0.3% des microorganismes dans l'isolat de biofilms de patients atteints de stomatite prothétique, soit une augmentation de 150 fois (Theilade et coll. 1988). Des résultats similaires sont rapportés dans une étude menée par Renner et coll. (1979) qui démontre que les patients atteints de stomatite prothétique ont presque 100 fois plus de *C. albicans* par centimètre carré au niveau du palais dur comparativement aux sujets sains.

Nombreuses sont les études qui démontrent que *C. albicans* est l'espèce du genre *Candida* la plus fréquemment isolée de la plaque prothétique (Budtz-Jorgensen et coll. 1975, Jennings et coll. 1990, Gusberti et coll. 1985, Davenport et coll. 1970). Le Tableau V présente le pourcentage de patients atteints de stomatite prothétique chez lesquels la présence de *C. albicans* a été mise en évidence. La variabilité au niveau des pourcentages que nous observons est due à plusieurs facteurs dont les moyens d'identification disponibles, la diète, l'action salivaire et la prise d'antibiotiques (Närhi et coll. 1973)

Une étude récente (McMullan-Voegl et coll. 1999) a démontré que *C. albicans* représentait 75% des espèces de levures isolées de sujets atteints de stomatite prothétique. Toutefois, *C. albicans* n'est pas la seule espèce de levure présente dans la plaque prothétique. Un assortiment d'autres espèces et genres sont souvent isolés du biofilm prothétique dont notamment *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *Trichosporon sp.* et *Saccharomyces cerevisiae*

(Kuc et coll. 1999, Budtz-Jorgensen et coll. 1975, Budtz-Jorgensen et coll. 2000, Öhman et coll. 1995, Gusberti et coll. 1985, Jennings et coll. 1990).

C. albicans ne représente qu'une composante mineure du biofilm prothétique. Toutefois, *C. albicans* possède plusieurs facteurs morphologiques et maintes propriétés physiologiques qui permettent le développement du microorganisme et son maintien au niveau de la cavité buccale. Par exemple, *C. albicans* possède une surface cellulaire nettement plus élevée (d'environ 50 fois) à une surface bactérienne, ainsi que la capacité de polymorphisme et de commutation phénotypique. De plus, *C. albicans* possède la capacité de production de diverses enzymes hydrolytiques telles les phospholipases, les métallopeptidases et les protéinases aspartiques (Chaffin et coll. 1998). Les protéinases aspartiques en particulier ont récemment été proposées comme facteur dans l'activation et le maintien d'une réponse immunitaire sur des muqueuses buccales mucoales via l'activation protéolytique de la pro-IL-1 β (Beauséjour et coll. 1998) De par cette multiplicité de facteurs, le rôle de *C. albicans* au niveau de l'apparition, de la progression et du maintien de la stomatite prothétique ne doit par être sous-estimé.

Tableau V : Présence de *C. albicans* sur prothèses de patients atteints de stomatite prothétique (Types I, II, III confondus).

RÉFÉRENCE	PAYS	ANNÉE	PRÉSENCE DE <i>C. albicans</i>
J.C. Davenport	Royaume-Uni	1970	70% (50)
I. Olsen	Norvège	1974	76% (100)
E. Budtz-Jorgensen et coll.	Danemark	1975	86.5% (465)
E. Mäkilä et coll.	Finlande	1977	94% (39)
J.W. Little	États-Unis	1982	61% (271)
P.S. Wright et coll.	Royaume-Uni	1985	66% (53)
S-C. Öhman et coll.	Suède	1988	74% (39)
C.G. Cumming et coll.	Écosse	1990	17% (121)
K.J Jennings et coll.	Angleterre	1990	90% (10)
E. Budtz-Jorgensen et coll.	Suisse	1996	84% (233)
Y. Kulak et coll.	Turquie	1997	100% (10)
McMullen-Voegl et coll.	Allemagne	1999	75% (99)
J.K. Pietruski et coll.	Pologne	2000	63.6%

Légende : Les chiffres entre parenthèse dans la colonne 'Prévalence' correspondent à la taille de l'échantillon.

3.3 Le rôle de *C. albicans* dans la stomatite prothétique

C. albicans possède, dans des conditions favorisant son adhérence et sa prolifération, un potentiel virulent important. L'adhérence de *C. albicans* sur un tissu vivant ou sur une surface inerte, par exemple l'intrados d'une prothèse d'acrylique, est une première étape critique qui doit être franchie afin d'assurer le développement d'une infection. Au niveau de la cavité buccale, l'adhésion du microorganisme aux surfaces, telle que l'acrylique, lui permettent de résister à l'action mécanique de nettoyage de la salive. L'adhérence, suivie de la colonisation et de la croissance de *C. albicans* sur l'acrylique le positionne ainsi pour jouer un rôle important dans le développement de la stomatite prothétique (Nikawa et coll. 1995). Le Tableau VI résume certains facteurs qui influencent la capacité d'adhérence de *C. albicans*.

3.3.1 Rôle de la pellicule acquise et ses constituants dans l'adhésion de *C. albicans*

L'adhésion spécifique, soit une interaction adhésine-récepteur, peut être assurée via des molécules d'adhésion d'origine variée. La pellicule acquise adsorbée sur la surface prothétique, représente un riche réservoir de récepteurs spécifiques pour des adhésines de *C. albicans* (Bradway et coll. 1992, Palmer et coll. 1997). La pellicule acquise est formée suite à l'adsorption, tant sur des cellules épithéliales buccales que sur des surfaces inertes de la cavité orale, de mucus, de protéines et glycoprotéines en provenance de l'hôte ou de source alimentaire (Radford et coll. 1999, Edgerton et coll. 1992).

Le rôle de la pellicule et ses constituants protéiques au niveau de l'adhésion de *C. albicans* a déjà été décrit. En 1997, O'Sullivan et coll. ont démontré que les bPRP (*basic proline-rich-proteins*) pourraient jouer un rôle important au niveau de l'adhésion de *C. albicans* et quatre bPRP, présentes dans la salive parotide humaine, ont été identifiées comme étant des récepteurs pour la totalité des souches *C. albicans* testées. De plus, la salive des glandes submandibulaires et sublinguales, constituée de mucines de haut poids (mucine Mg1) et de bas poids (mucine MG2) moléculaire, augmentait de 10 fois l'adhérence de *C. albicans* lorsque appliquée sur des surfaces de polyméthylméthacrylate (Edgerton et coll. 1993).

Une étude menée par Nikawa (2000) a démontré que la formation de biofilm de *C. albicans* sur des languettes d'acrylique était favorisée lorsque les languettes étaient enduites d'une pellicule formée à l'aide de concentrations croissantes de sérum. Toutefois, les languettes enduites de deux protéines sériques isolées, soit d'une pellicule de fibronectine ou de mucines salivaires, réduisaient la formation de biofilm de *C. albicans* (Nikawa 2000).

3.3.2 Co-adhésion avec les streptocoques oraux

Les interactions de *C. albicans* avec des colonisateurs primaires de la pellicule acquise, tels que les streptocoques, influencent l'adhésion et la colonisation subséquente de la levure au sein du biofilm prothétique (Jenkinson et coll. 1990, Holmes et coll. 1995a). Les cellules de *C. albicans* possèdent la capacité de co-adhérer avec plusieurs espèces microbiennes orales (Cannon et coll. 1999). Par exemple, en carence de glucose, les levures et tubes germinaux de *C. albicans* possèdent une haute affinité de coaggrégation *in vitro* avec *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. pyogenes*, *S. sanguis* et *S. anginus*. En effet, *C. albicans* se lie à un polysaccharide de surface constitué des sucres Rha, Glc, GalNAc, GlcNAc et Gal produits par *S. gordonii* (Holmes et coll. 1995b). Chez *S. gordonii*, l'inactivation des gènes *SSA* et *SSB*, codant pour des adhésines salivaires glycoprotéiques, et des gènes *CSHA* et *CSHB*, codant pour des polypeptides de surface de haute masse moléculaire, a provoqué une réduction de co-adhésion de 79% et 40% respectivement. L'expression de ces gènes par une souche d'*Enterococcus faecalis* recombinante conférait aux entérocoques, n'ayant normalement aucune capacité de co-agrégation (Jenkinson et coll. 1990), la capacité de se lier à *C. albicans* (Holmes et coll. 1996).

De plus, en enduisant des échantillons d'acrylique dentaire avec de la salive entière stimulée, ainsi qu'avec des microorganismes colonisateurs tels que *Streptococcus sanguis* NCTC 10904, *Streptococcus mutans* GS-5 ou *Streptococcus sobrinus* ATCC 27352, l'adhérence de *C. albicans* (souche 613p) est significativement augmentée comparativement à l'adhérence sur de l'acrylique non enduit de salive (Vasilas et coll. 1992).

3.3.3 Rôle des résines de conditionnement

Les résines de conditionnement sont employées dans le but de corriger l'usure des prothèses dentaires. Pourtant, la littérature a souvent démontré que certains types de plastifiants qui entrent dans la composition des résines influencent la colonisation par *C. albicans*. Conséquemment, certaines résines agissent comme des réservoirs de microorganismes (Wilson et coll. 1998). Tel que mis en évidence par la microscopie électronique à balayage par Nikawa et coll. (1995), en présence de certains constituants de la résine, tel que le benzyl butyl phtalate, il y avait pénétration de la résine par les hyphes tandis que les blastospores présents sur les échantillons de benzyl nenzoate et dibutyl phtalate étaient parsemés et lâchement associés au matériel. Il est aussi intéressant de noter que *C. albicans* adhère plus aux résines de conditionnement à surface rugueuse que sur de l'acrylique à surface lisse (Radford et coll. 1998). Il est intéressant de noter que certaines résines de conditionnement expérimentales possèdent une moins grande affinité pour *C. albicans* (Waters et coll. 1997).

Selon Iami et coll. (1999), le degré d'adsorption protéinique sur la résine conditionnante est dépendant du type de matériaux employés dans la confection de la résine. Comme les protéines salivaires jouent fort possiblement un rôle au niveau de l'adhésion de *C. albicans*, les matériaux de confection de la résine de conditionnement pourraient influencer cette capacité d'adhésion.

De par ces études récentes, il ressort que les résines de conditionnement, et leurs constituants, jouent un rôle capital quant à l'adhésion de *C. albicans*.

3.3.4 Rôle des sucres alimentaires

L'adhérence de *C.albicans* est hautement influencée par la présence de sucres dans le milieu environnant. Il est connu que l'adhérence à l'acrylique et aux cellules épithéliales *in vitro* ainsi que la virulence de *C.albicans* est augmentée de manière importante par une croissance en 500mM de sucrose ou de galactose, comparativement à une croissance en présence de glucose 50mM (McCourtie et coll. 1981, McCourtie et coll. 1984). Ce phénomène est possiblement dû à une production accrue de polysaccharides extracellulaires chez les levures cultivées en galactose (Mcourtie et coll. 1985). L'adhérence n'est aucunement influencée par les sucres alimentaires xylitol et lactose (Samaranayake et coll. 1980).

L'adhésion de *C. albicans* sur la prothèse est donc un processus influencé par plusieurs facteurs (voir Tableau VI) tels que les sucres alimentaires, la salive et ses diverses composantes, la présence d'antifongiques et d'autres microorganismes tels que les streptocoques.

Tableau VI : Exemples de divers facteurs influençant l'adhérence de *C. albicans*.

Facteur	Exemples
Espèce	- <i>C. albicans</i> et <i>C. tropicalis</i> ont une plus grande capacité d'adhérence comparativement à d'autres espèces de <i>Candida</i> non-pathogènes telles que <i>C. guilliermondii</i> et <i>C. krusei</i> (Rotrosen et coll. 1986, Segal et coll. 1988)
Hydrophobicité	- L'adhérence des cellules de <i>C. albicans</i> augmente avec l'hydrophobicité de la surface (Klotz et coll. 1985).
Interactions Électrostatiques	- Les cations divalents tels que Mg^{2+} et Ca^{2+} réduisent la force de répulsion qui existe entre le microorganisme chargé négativement et le substrat (Fletcher 1980). La présence de Ca^{2+} augmente l'adhérence de <i>C. albicans</i> à l'acrylique (Macura et coll. 1989). L'adhérence était cependant inhibée par la présence d'ions de Fe^{2+} (El-azizi et coll. 1998) - Spötl et coll. (1994) a démontré que l'adhérence au facteur du complément iC3b par la forme pseudohyphé de <i>C. albicans</i> était Ca^{2+} dépendante.
Morphologie	- L'adhérence aux cellules épithéliales buccales <i>in vitro</i> est supérieure lorsque <i>C. albicans</i> est sous la forme hyphe que blastospore (Samaranayake et coll. 1982, Sandin et coll. 1982, Rotrosen et coll. 1986)
pH	- L'adhérence sur des cellules épithéliales de deux isolats cliniques de <i>C. albicans</i> a été testée à des pH variant de pH 3.0- 8.0 et l'adhérence maximale était à pH 3.0 (Samaranayake et coll. 1982).
Phase de croissance	- D'après Cutler et coll. (1990) et King et coll. (1980), les blastospores adhèrent mieux lorsqu'en phase stationnaire qu'en phase logarithmique.
Sucres	- La croissance de <i>C. albicans</i> en 500mM de sucrose ou de galactose favorise considérablement l'adhérence à l'acrylique et aux cellules épithéliales <i>in vitro</i> ainsi que la virulence <i>in vivo</i> chez un modèle murin, comparativement à une croissance en présence de glucose 50mM (McCourtie et coll. 1981, McCourtie et coll. 1984).
Température	- L'adhérence de <i>C. albicans</i> est supérieure à 37°C qu'à 20 °C ou 25 °C avec une capacité d'adhérence maximale obtenue à 40 °C (El-Azizi et coll.1998). Il est important de noter que l'adhérence est influencée par le degré d'hydrophobicité et de germination qui eux sont influencés par la température (El-azizi et coll. 1998).

3.3.5 Traitements de la stomatite prothétique

Malgré le fait que la stomatite prothétique demeure le plus souvent asymptomatique, il est fortement recommandé de prendre les mesures nécessaires afin de maintenir un palais sain, et de réduire le risque d'apparition d'hyperplasie papillaire qui n'est remédié que par une intervention chirurgicale (Wilson 1998, Renner et coll. 1979). Suite à un diagnostic de stomatite prothétique, le dentiste doit essentiellement examiner la prothèse et ajuster tout défaut structural. Il doit également tenter de convaincre le patient de l'importance d'une bonne hygiène orale, de décourager le port nocturne et, lorsque nécessaire, administrer un traitement antifongique.

Plusieurs nouvelles études se sont attardées sur l'influence de divers antifongiques sur l'adhérence de *C. albicans*. Par exemple, suivant une exposition de 1 heure aux antifongiques nystatine, amphotéricine B, 5-fluorocytosine, ketoconazole et fluconazole, Ellepola et coll. (1998b) ont observé que l'adhérence de *C. albicans* sur de l'acrylique dentaire était réduite de 47.42% (pour le fluconazole) à 90.85% (pour l'amphotéricine B). De plus, une exposition à 6 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) de nystatine et 8 fois la CMI de l'amphotéricine B a inhibé la formation de tubes germinaux de 97.68% et 97.52% respectivement. D'autre part, en présence de ketoconazole la formation de tubes germinaux a été réduite d'approximativement du tiers en comparaison à la condition témoin (Ellepola et coll. 1998a).

Dans une étude récente menée par Budtz-Jorgensen et coll. (2000), il a été démontré qu'un groupe de 122 porteurs de prothèse résidant dans un foyer d'accueil a bénéficié d'un programme de santé buccale assumé par le personnel infirmier. Des mesures d'hygiène préventive ont été implantées telles que la non-recommandation du port nocturne des prothèses, des visites régulières du dentiste et l'entraînement du personnel infirmier par un hygiéniste dentaire. Chez le groupe ayant suivi les mesures d'hygiènes proposées, une diminution significative de la sévérité de l'érythème du palais, une baisse du nombre de sujets avec des cultures positives de levures ainsi qu'une diminution de la colonisation des prothèses par *Candida* a été observée.

C.albicans, quoiqu'une composante mineure du biofilm prothétique, pourrait, de par ces multiples facteurs de virulence, être un pathogène relié à l'étiologie de la stomatite prothétique.

4.0 BUT

La stomatite prothétique est fréquemment associée à la présence de *C. albicans*. Cependant, la manière avec laquelle *C. albicans* exerce sa pathogénicité et contribue au développement de la stomatite prothétique demeure incertaine. Les protéinases aspartiques seraient-elles un facteur de virulence relié au développement de la stomatite prothétique? Selon l'étude effectuée par Beauséjour et coll. (1997) les protéinases aspartiques participeraient à l'activation de la pro-IL-1 β , soit le précurseur d'une cytokine impliquée au niveau de la réponse inflammatoire. Est-ce-que les protéinases aspartiques de *C. albicans* seraient un facteur dans le maintien de la condition inflammatoire chez les patients atteints de stomatite prothétique? Est-ce-que certains gènes *SAPs* seraient plus impliqués que d'autres? Le but de cette recherche a été de tenter d'établir un lien entre l'expression des protéinases aspartiques par des souches cliniques de *C. albicans* isolées à partir du site des prothèse de sujets sains et de ceux de patients atteints de stomatite prothétique.

Nous avons tenté de déceler *in vitro* par *RT-PCR*, la présence ou l'absence de transcrits des gènes *SAP1* à *SAP9* chez 10 souches de *C. albicans* provenant de sujets édentés sains et 11 souches de patients atteints de stomatite prothétique Newton III. Le *RT-PCR* (*Reverse transcription PCR*), une technique de biologie moléculaire hautement sensible, a permis la synthèse de copie d'ADN (cADN) à partir d'ARNm à l'aide de la transcriptase inverse, soit une ADN polymérase-ARN dépendante. Un *RT-PCR* a été effectué sur de l'ARN total isolé de chacune des 21 souches cliniques de *C. albicans* dans le but ultime de pouvoir détecter les transcrits des gènes *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP4-6*, *SAP7*, *SAP8* et *SAP9*. Nous avons jugé essentiel de tester l'expression des protéinases aspartiques en conditions d'anaérobiose car la plaque prothétique *in vivo* est soumise à un microenvironnement hautement diversifié quant à sa composition microbienne mais également quant aux conditions physico-chimiques qui règnent. Il s'agit de la première étude qui examine l'expression des protéinases aspartiques de *C. albicans* en conditions de culture d'anaérobiose.

La découverte d'une relation entre les gènes *SAPs* et la stomatite prothétique pourrait, non seulement élucider l'étiologie de la stomatite prothétique, mais stimuler des études sur des inhibiteurs de protéinases aspartiques comme voie thérapeutique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.0 Identifications des souches de *C. albicans*

Vingt-et-un souches de *C. albicans* (Budtz et coll. 2000) ont été isolées et caractérisées comme étant *C. albicans* par galeries API (Biomérieux), par milieu de différenciation CHROMagar (Hardy Diagnostics, Santa Maria, California), ainsi que par croissance à une température de 45⁰C sur milieu SGA (Pinjon et coll. 1998). Le premier groupe est composé de 10 souches de *C.albicans* isolées de plaque de prothèses de sujets sains, soit les souches 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 23 (voir Tableau VII). Le deuxième groupe est composé de 11 souches de *C.albicans* isolées de plaque de patients atteints de stomatite prothétique Newton stade III, soit les souches 1,2,3,4,7,8,10,19,20,21 et 22 (voir Tableau VII).

Tableau VII : Identification des souches de *C. albicans*.

Souches de <i>C.albicans</i> isolées de plaque de patients atteints de stomatite prothétique.	Souches de <i>C.albicans</i> isolées de plaque de prothèses de sujets sains.
1	11
2	12
3	13
4	14
7	15
8	16
10	17
20	18
21	23
22	
n=11	n=10

D'autre part, la souche *C. albicans* Lam-1 (Lacasse et coll. 1990), isolée du sang d'un patient atteint de candidose systémique, la souche *C. albicans* P2 (Bauséjour et coll. 1998), isolée de plaque prothétique de patient atteint de stomatite prothétique, et *Candida glabrata* LSPQ 0212 ont été également employées.

2.0 Culture de *C. albicans*

2.1 Culture en aérobiose

L'équivalent d'un fil à boucle de cellules *C. albicans* Lam-1 est incubé 18h dans du milieu *yeast peptone dextrose* (YPD) constitué de 10% d'extrait de levures (BBL Becton Dickinson), 20% peptone (Difco Laboratories) et 2% dextrose (Difco Laboratories). Cette dernière a été utilisée afin d'inoculer un tube de 50mL contenant 10mL de YPD 2% dextrose. La culture est incubée à 25°C, dans un bain agitateur (Orbit Shaker Bath, Lab-Line) à une vitesse constante de 150rpm. Suite à l'incubation, les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 3500 rotations par minute (rpm) et le surnageant est aspiré. Le culot de cellules est trempé dans de l'azote liquide et congelé à -80°C en attendant l'isolation d'ARN total.

2.2 Courbes de croissance en aérobiose

Le temps moyen de génération, soit le temps de dédoublement, de chacune des souches de *C. albicans* a été déterminé en conditions d'anaérobiose afin de pouvoir déceler si les souches cliniques avaient des temps de génération très divergeants. Vingt-quatre mL de YPD (*yeast-peptone-dextrose*) non-stérile sont déposés dans un erlenmeyer muni d'un tube horizontal (*filoflask*) et le tout est stérilisé. Une fois le milieu refroidi, 1mL de glucose 50% stérile est ajouté au *filoflask* ainsi qu'un inoculum d'une culture de *C. albicans* incubé 18h. La densité optique (DO) est notée à différentes intervalles de temps jusqu'à observation de la phase stationnaire. Le temps de génération a été calculé selon la formule suivante: $1/k$ où $k = \log(DO_i) - \log(DO_0) / \log(2) * (T_i - T_0)$, où DO_i et DO_0 sont deux points sur la courbe de croissance exponentielle, et T_i et T_0 sont leurs temps respectifs.

2.3 Culture en anaérobiose

Afin de s'assurer des conditions d'anaérobiose, des contrôles biologiques et chimiques ont été effectués. Comme contrôle biologique nous avons procédé à la vérification de la présence de croissance sur milieu sélectif réduit de l'espèce *Porphyromonas gingivalis*, un anaérobie strict, ainsi que de l'absence de croissance sur milieu sélectif réduit de l'espèce *Micrococcus luteus*, un aérobie strict. Comme contrôle chimique nous avons employé un indicateur d'anaérobiose, soit le *Dry Anaerobic Indicator strip* (BBL, Becton Dickinson). L'équivalent d'un fil à boucle de cellules *C. albicans* préalablement incubé 18h dans des conditions d'aérobiose a servi d'inoculum pour un tube de 15mL contenant approximativement 14mL de YPD 2% dextrose préalablement réduit dans une jarre à anaérobiose. La culture a été incubée 18h dans une jarre d'anaérobiose. Un inoculum de cette dernière culture 18h est repiqué à un deuxième tube de 15mL contenant approximativement 14mL de YPD 2% dextrose préalablement réduit. La culture est incubée 18h dans une jarre d'anaérobiose. Cette dernière culture est utilisée afin d'inoculer un tube de 15mL contenant environ 14mL de YPD 2% dextrose préalablement réduit. La culture est incubée à 25°C dans une jarre d'anaérobiose (GazPack™ jars, BBL, Becton Dickinson). Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 3500rpm et le surnageant est aspiré. Le culot de cellules est trempé dans de l'azote liquide et congelé à -80°C afin de permettre l'isolation d'ARN total.

2.4 Milieu de différenciation entre *C. albicans* et *C. dubliniensis*

Afin de pouvoir distinguer des souches de *C. albicans* de celles de *C. dubliniensis*, une espèce génétiquement très apparentée, un nouveau milieu de différenciation a été élaboré basé sur la connaissance que *C. albicans*, contrairement à *C. dubliniensis*, n'assimile pas le xylose. Ce milieu a été réalisé dans le but de permettre l'identification de *C. albicans* des autres espèces de *Candida sp.*, dans le cadre de l'étude sur la détection de protéinases aspartiques de *C. albicans* dans la plaque prothétique *in vivo*.

La constitution du milieu est la suivante : *OF Basal medium* 0.94% (Difco Laboratories), Agar 1.8% (Difco Laboratories), Xylose 2% (BDH Inc.). Le *OF Basal*

medium et l'agar sont dissous dans de l'eau distillée et autoclavés. Le xylose (solution stock 25%) est ajouté, à une concentration finale de 2%, une fois le milieu refroidi. Les gélosesensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h.

3.0 Isolation d'acides nucléiques

3.1 Isolement de l'ARN total - Méthode TRIZOL™ modifiée

Toutes les manipulations suivantes ont été effectuées sous une hotte biologique (*Biological safety cabinet* ; Forma scientific Inc.). Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 3500 rotations par minutes (rpm) (IEC Centra-8R centrifuge ; International Equipement Company) et le surnageant est aspiré stérilement. Le volume en mL est estimé grâce à la graduation présente sur les tubes et 20X de ce volume est ajouté en Trizol™ (GibcoBRL Life Technologies). Environ 45mg de grains de sables d'Ottawa (FisherChemicals, Fisher Scientific) sont ajoutés par 100uL de culot. Le tout est agité (Fisher Vortex genie 2 ; Fisher Scientific) à la puissance maximale pendant 30 minutes. Par la suite, 0.2mL de chloroforme (FisherBiotech, Fisher Scientific) sont ajoutés par mL de Trizol™ utilisé initialement. Le tube est agité vigoureusement pendant 15 secondes, incubé à la température de la pièce pendant 2 ou 3 minutes puis centrifugé à 12000g (IEC Micro-MB centrifuge ; International Equipement Company) pendant 15 minutes à une température de 4°C.

La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube stérile et l'ARN est précipité en ajoutant 0.5mL d'isopropanol (GibcoBRL Life Technologies) pour 1mL de Trizol™. Le tube est incubé à la température de la pièce pendant 10 minutes et par la suite centrifugé à 12,000g pendant 10 minutes à 4°C. Par la suite, le tube est doucement décanté afin de se débarrasser du surnageant. Un millilitre d'éthanol 75% par 1mL de Trizol™ est alors ajouté afin de laver le culot d'ARN. Après agitation, le tube est centrifugé à 12,000g pendant 5 minutes. Enfin, le surnageant est enlevé et le culot d'ARN est asséché à l'air ambiant pendant quelques minutes. Le culot d'ARN est ensuite resuspendu dans de l'eau exempte d'ADNase et d'ARNase (GibcoBRL Life Technologies). L'ARN ainsi isolé est entreposé à -80°C jusqu'à analyses futures.

La suspension d'ARN ou d'ADN diluée dans de l'eau est transférée dans une cuvette de spectrophotomètre à UV. La densité optique (DO) est lue à 260nm et 280nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectronic 601, Milton Roy). Le ratio 260/280 est obtenu en

divisant la valeur de DO obtenue à 260nm par celle obtenue à 280nm. Ce ratio devrait idéalement se situer entre 1.8 et 2.0 puisqu'une valeur de 1.8 dénote une suspension d'acides nucléiques dépourvue de protéines et d'autres contaminants tels que le phénol. Une unité de DO à 260nm équivaut à 40µg d'ADN simple brin ou de l'ARN.

3.2 Isolement d'ARNm à l'aide de la trousse «QuickPrep®Micro ARNm purification kit» de Pharmacia Amersham Biotech

Toutes les manipulations suivantes ont été effectuées sous une hotte biologique et le port des gants propres était de rigueur. L'isolement a été effectué tel que décrit par le protocole Pharmacia Amersham Biotech (produit 27-9255-01), à l'exception de l'ajout au culot de cellules déjà centrifugées de 45µg de grains de sable d'Ottawa afin d'assurer la lyse des cellules de *C.albicans*.

3.3 Isolation d'ADN - Méthode Hoffman et Winston modifiée

Les cellules sont centrifugées dans un tube de 1.5mL et le surnageant est aspiré. Par la suite, 200µL de tampon A (2% Triton x-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0), sont ajoutés et le tout est brièvement agité afin de resuspendre le culot. Le tube est incubé dans de l'eau bouillante pendant 2 minutes. Suite à l'incubation, 200µL de phénol:chloroforme:isoamyl alcool (25:24:1) (Gibco BRL Life Technologies) sont ajoutés, le tube est agité 3 minutes à puissance maximale et 200µL de TE (Tris-HCl : EDTA 10mM) sont ajoutés. Le tube est centrifugé pendant 5 minutes à 12000g à la température de la pièce. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et 400µL de chloroforme y est ajoutée. Le tube est doucement inversé pendant quelques secondes et centrifugé pendant 2 minutes à 12000g. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube, 1mL d'éthanol 95% est ajouté et le tout est centrifugé 2 minutes à 12000g. Le surnageant est aspiré et le culot d'ADN resuspendu dans 400µL de TE. Par la suite, 10µL d'acétate d'ammonium 4M et 1mL d'éthanol 95% sont ajoutés. Le tube est placé à -20°C pendant un minimum de 30 minutes et ensuite centrifugé pendant 2 minutes à 12000g. Le surnageant est aspiré et le culot d'ADN est desséché. Le culot est resuspendu dans du tampon TE et la détermination du ratio 260/280 ainsi que la quantification de l'ADN se fait tel que déjà décrit.

4.0 Réactions d'amplification

4.1 *Polymerase chain reaction (PCR)*

Toutes les réactions de *PCR* ont été effectuées dans un volume de 100 μ L ou 50 μ L et dans des tubes de 0.5mL exempts de ARNases et de ADNases (Ultident Scientific). Les réactifs décrits dans le Tableau VIII sont ajoutés dans un tube de 0.5mL exempts d'ADN et d'ARN. Pour des échantillons multiples, il est recommandé de préparer une solution mère avec les réactifs communs afin de réduire au maximum le nombre de manipulations, minimiser les erreurs de pipetage ainsi que la variation entre chaque réaction. Dépendamment du thermocycleur et du type de tubes, l'ajout de l'huile minérale peut s'avérer nécessaire. Quelques gouttes d'huile *PCR* sont ajoutées à la réaction afin de minimiser la condensation et l'évaporation durant les cycles de thermocycleur. Après avoir ajouté tous les réactifs, le tube est centrifugé brièvement (quelques secondes) pour faire descendre tous les réactifs au fond tube et ce dernier est placé dans le thermocycleur (Techne Genius, Mandel Scientific) afin d'exécuter les cycles de *PCR* décrits dans le Tableau IX. Dix microlitres d'amplicons (produit d'amplification) ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose (GibcoBRL Life Technologies) 2% (1 X TBE) coloré au bromure d'éthidium (GibcoBRL Life Technologies) et visionné à une longueur d'onde de 320nm en ultraviolet.

Tableau VIII : Réactifs et concentrations pour 1 réaction de *PCR*.

RÉACTIFS	CONCENTRATION FINALE
10.0µL de tampon <i>PCR</i> 10x	1X
2.0µL d'amorce sens 50mM	1mM
2.0µL d'amorce anti-sens 50mM	1mM
12.0µL de MgCl ₂ 25mM	3mM
0.5unités de Taq ADN polymériser	0.5 unités
Gold	
0.8µL de 2-deoxynucleoside	0.2mM
5-triphosphates (dNTPs) 25mM	
1µg de ADN	1ug
eau exempte d'ADNase et d'ARNase jusqu'à 100uL	

Tableau IX : Paramètres de thermocycleur pour *PCR*.

SEGMENT	TEMPÉRATURE	TEMPS EN MINUTES	NOMBRE DE CYCLES
1- <i>hot start</i>	94°C	10	1
2-synthèse de copies	94 °C	1	35-40
	58 °C	1	
	72 °C	1	
3- extension finale	72 °C	10	1

4.2 Transcription inverse

Avant d'entreprendre la réaction de transcriptase inverse, il faut procéder à une digestion à la désoxyribonucléase I (ADNase I) de l'ARN total. Les réactifs décrits dans le Tableau X sont ajoutés dans un tube de 0.5mL exempt d'ADN et d'ARN sur de la glace. Le tout est incubé dans le thermocycleur 15 minutes à 21°C. Par la suite 1µL d'EDTA 25mM est ajouté et le tube est incubé 10 minutes à 65°C afin d'inactiver l'ADNase. La réaction est immédiatement placée sur glace. L'ARN ainsi traité est prêt pour la réaction de transcription inverse.

Tableau X : Réactifs pour 1 réaction de digestion à la desoxyribonucléase.

RÉACTIFS	QUANTITÉ
Désoxyribonucléase I (<i>Amplification</i> <i>Grade</i> , Gibco BRL, LifeTechnologies.	1µL
Tampon de réaction 10x	1µL
ARN total isolé	1µg
eau exempte d'ADNase et d'ARNase	jusqu'à 10µL

Les réactifs décrits dans le Tableau XI sont ajoutés dans le tube de 0.5mL contenant l'échantillon d'ARN total préalablement traité à l'ADNase I. Après avoir ajouté tous les réactifs, le tube est centrifugé brièvement et placé dans le thermocycleur afin d'exécuter un cycle de 90 minutes à 37 °C suivi par un cycle de 2 minutes à 94 °C afin de dénaturer l'enzyme. Le copie ADN (cADN) peut être soit congelé à -80°C, soit utilisé immédiatement pour une réaction de *PCR*.

Tableau XI : Réactifs et concentrations pour 1 réaction *RT-PCR*.

RÉACTIFS	CONCENTRATION FINALE
4µL de tampon 5x	1X
2µL de dithiothreitol (DTT) 1.0M (Gibco BRL Life Technologies)	10mM
1µL d'oligo dT 50mM (Université Laval)	2.5mM
200unités de <i>M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus)</i>	40 000 unités
0.8µL de dNTPs 25mM (Gibco BRL Life Technologies)	1mM
1µL d'inhibiteur d'ARNases (Gibco BRL Life Technologies)	40 unités
1µg d'ARN total	1µg
Eau exempte d'ADNase et d'ARNase jusqu'à 20µL	

4.3 Cinétique de l'expression des transcrits des gènes *SAP 1, 2,3,4-5-6, 7,8* et *9* en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose tel que déterminé par *RT-PCR*

L'ARN total de 3 cultures de 24, 48 et 72 heures incubées en aérobiose ainsi qu'en anaérobiose, a été isolé et quantifié tel que déjà décrit. Un *RT-PCR* a été effectué sur approximativement 1µg d'ARN total isolé de culture de 24, 48 et 72 heures en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose afin de vérifier à la présence de transcrits des gènes *EFB-1* et *SAP 1, 2, 3, 4-5-6, 7, 8* et *9* avec les amorces appropriées. Dix microlitres d'amplicons ont été résolus par électrophorèse sur un gel d'agarose (GibcoBRL Life Technologies) 2% (1 X

TBE). Le gel a été coloré au bromure d'éthidium et visionné à une longueur d'onde de 320nm en ultraviolet.

4.4 Détermination de la limite de détection des transcrits *EFB1* par la technique de *RT-PCR*

Des dilutions de l'échantillon de l'ARN total de *C.albicans* ont été effectuées dans de l'eau exempte d'ARNases et ADNases afin d'obtenir des concentrations finales de 500ng, 100ng, 10ng et 5ng. Par la suite, un *RT-PCR* a été exécuté avec les amorces *EFB1* et *EFB2* (gène *EFB1*) tel que déjà décrit.

4.5 Détection des transcrits des gènes *SAP 1,2,3,4-6,7,8* et *9* et du facteur d'élongation (*EFB-1*) chez de l'ARN total extrait de souches isolées de prothèses de sujets sains et de patients atteints de stomatite prothétique

Les souches *C. albicans* ont été cultivées en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose tel que déjà écrit. L'ARN total des souches décrites au Tableau VII a été isolé tel que déjà décrit. Un *RT-PCR* a été effectué sur approximativement 1µg d'ARN total isolé des souches *C. albicans* en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose afin de vérifier à la présence de transcrits des gènes *EFB-1* et *SAP 1, 2, 3, 4-5-6, 7, 8* et *9*.

4.6 *Arbitrarily primed PCR (AP-PCR)*

L'*AP-PCR* est une méthode qui permet de créer des profils d'ADN. Contrairement à la technique de *PCR* où les amorces sont choisies pour leur spécificité envers le segment génomique visé, l'amorce employée pour l'*AP-PCR* est arbitraire et donc non-spécifique à une région particulière du génome. L'amorce arbitraire ainsi que la sélection de conditions non-stringentes de *PCR*, permettent la synthèse d'un ensemble de fragments et donc la génération d'empreintes génomiques. Plusieurs segments d'ADN de taille différentes sont générés par l'amplification de différentes régions du génome par une amorce arbitraire (environ 8-10 paires de bases (pb) de longueur). Les empreintes ainsi générées permettent l'étude relationnelle entre différentes espèces ou souches de microorganismes. L'*AP-PCR* s'est avéré nécessaire dans le cadre de cette étude afin de vérifier l'hétérogénéité de souches

cliniques de *C.albicans*. Nous voulions nous assurer que les résultats des expériences subséquentes proviendraient de souches génétiquement différentes.

Étant donné la sensibilité de cette procédure, il est nécessaire de prendre des précautions afin d'éviter toute contamination par de l'ADN étranger. Le port de gants propres, et le changement fréquent de ceux-ci, a été de rigueur. L'ADN des souches de *C. albicans* (Tableau VII) a été extrait et dosé tel que déjà décrit. À l'aide du couple d'amorces présenté au Tableau XVIII, nous avons effectué un *AP-PCR* tel que déjà décrit. À l'aide des profils *d'AP-PCR* générés pour chacun des souches, la matrice de similarité a été calculée. La matrice a été calculée manuellement selon la formule du coefficient de similarité de Dice (Sneath et coll. 1973) : le coefficient $S_{xy} = 2 (N_{xy}/N_x + N_y)$, où N_x = Nombre de bandes générées pour la souche X, N_y = Nombre de bandes générées pour la souche Y, N_{xy} = Paires de bandes identiques pour la souche X et la souche Y.

Toutes les réactions *d'AP-PCR* ont été effectuées dans un volume de 25µL. Les réactifs décrits dans le Tableau XII sont ajoutés dans un tube exempt d'ADN et d'ARN. Par la suite, le contenu est bien mélangé, centrifugé brièvement et soumis aux cycles décrits au Tableau XIV.

Tableau XII: Réactifs et concentrations pour 1 réaction d'AP-PCR.

RÉACTIFS	CONCENTRATION FINALE
2.5µL de tampon <i>PCR</i> 10x (Perkin-Elmer)	1X
3.0µL d'amorce 10mM (Université de Montréal)	1.2mM
3.0µL de MgCl ₂ 25mM (Perkin-Elmer)	3mM
0.5unités de Amplitude Gold (Perkin-Elmer)	0.5 unités
0.2µL de dNTPs 25mM	0.2mM
1µg de ADN	1µg
eau exempte d'ADNase et d'ARNase jusqu'à 25µL	

Tableau XVIII : Amorces employées pour l'*AP-PCR*.

NOM DE L'AMORCE	SEQUENCE	SOURCE
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	
910-25	5'-GCCCGGCAG-3'	Université Laval, Recherches en Sciences de la Vie et de la Santé

Tableau XIV : Paramètres de thermocycleur pour *AP-PCR*.

SEGMENT	TEMPÉRATURE	TEMPS EN MINUTES	NOMBRE DE CYCLES
1- <i>hot start</i>	94°C	10	1
2-synthèse de copies	94°C	1	40
	30°C	1	
	72°C	1	
3- extension finale	72°C	10	1

4.7 *Nested RT-PCR*

Le *nested RT-PCR* est une méthode d'amplification utilisée lorsque le nombre de cellules de départ est limité ou lorsque nous désirons amplifier un ARNm rare. Cette technique augmente la sensibilité du *RT-PCR* en effectuant une deuxième amplification utilisant les amplicons générés lors d'une première amplification comme matrice. Cette méthode a été mise au point afin de pouvoir maximiser la détection des transcrits de protéinases aspartiques de *C.albicans* chez des échantillons de plaque prothétique *in vivo*.

Les réactifs décrits dans le Tableau XV sont ajoutés dans un tube de 0.5mL exempt d'ADN et d'ARN. Par la suite, le tube est bien mélangé, centrifugé brièvement (quelques secondes), et finalement placé dans le thermocycleur afin d'exécuter les cycles décrits au Tableau XVI.

Tableau XV : Réactifs et concentrations pour 1 réaction de *nested PCR*.

REACTIFS	CONCENTRATION FINALE
2.5µL de tampon <i>PCR</i> 10x (Perkin-Elmer)	1X
1.0µL d'amorce 10mM	1.0µM
3.0µL de MgCl ₂ 25mM (Perkin-Elmer)	3mM
0.5unités de AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer)	0.5 unités
0.2µL de dNTPs 25mM	0.2mM
0.5µL d'amplicon de <i>PCR</i>	-
eau exempte d'ADNase et d'ARNase jusqu'à 50µL	

Tableau XVI : Paramètres de thermocycleur pour *nested PCR*.

SEGMENT	TEMPÉRATURE	TEMPS	NOMBRE DE CYCLES
1- <i>hot start</i>	94°C	10 minutes	1
2-synthèse de copies	94 °C	30 secondes	35
	50 °C	30 secondes	
	72 °C	1 minute	
3- extension finale	72 °C	10 minutes	1

4.8 Caractéristiques des amorces utilisées

Tableau XVII : Caractéristiques des amorces employées pour les expériences de RT-PCR.

Gène ciblé	Amorce	Séquence	Taille de produit RT-PCR	Position des amorces	Référence
<i>EFB-1</i>	EFBIA	5'- AITGAAGGAATCTTGGCTGAC-3'	526pb	69-90	Scaller 1998
	EFB-1B	5'- CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG-3'		966-987	Scaller 1998
<i>SAP1</i>	SAP1A	5'- AGGGAAGGTATTTACACT-3'	1003pb	458-476	Schaller 1998
	SAP1B	5'- GATTTGCTTACATAGTAAGTAC-3'		1439-1460	Scaller 1998
<i>SAP2</i>	SAP2A	5'- AACAAACAACCCACTAGACATCACC-3'	178pb	94-117	Nagliik 1999
	SAP2B	5'- TGACCATTAGTAACCTGGGAATGCTTTAGGA-3'		242-271	Nagliik 1999
<i>SAP3</i>	SAP3A	5'- TGGATTGGAACATTTCTAAATTC-3'	1285pb	166-187	Schaller 1998
	SAP3B	5'- CAATCTCCAGAGGAGTACTTCC-3'		1429-1450	Schaller 1998
<i>SAP4</i>	SAP4A	5'- CATTCAATCCTTTAATACCGACTATC-3'	156pb	69-94	Nagliik 1999
	SAP4B	5'- GGTAACAAAACCCCTGTAGATCTTTTAAAC-3'		198-224	Nagliik 1999
<i>SAP5</i>	SAP5A	IDEM QUE POUR SAP4A	156,181,206	149-174,174-199, 199-224	Nagliik 1999
	SAP5B	IDEM QUE POUR SAP4B		328-354	Nagliik 1999
<i>SAP6</i>	SAP6A	IDEM QUE POUR SAP4A	156,181,206	105-130,130-155, 155-180	Nagliik 1999
	SAP6B	IDEM QUE POUR SAP4B		284-310	Nagliik 1999
<i>SAP7</i>	SAP7A	5'- CCATCTCCACTGATAATAAAGG-3'	251	601-622	-
	SAP7B	5'- AGTGAAGAAGAAGAAGATGCCCG-3'		830-851	-
<i>SAP8</i>	SAP8A	5'- TTATGAGCCTCTTTACCACCG-3'	649	47-67	-
	SAP8B	5'- GAGATGTTGTGGAAGAAGAAGG-3'		673-694	-
<i>SAP9</i>	SAP9A	5'- TAGAGTGTGGAAGATACCG-3'	452	488-507	-
	SAP9B	5'- CAATGGCACTGGTATCATCAGC -3'		918-939	-

Tableau XVIII : Caractéristiques des amorces employées pour les expériences de *nested RT-PCR*.

Gène ciblé	Amorce	Séquence	Taille de produit <i>RT-PCR</i>	Position des amorces	Référence
<i>EFB-1</i> (produit <i>nested RT-PCR</i>)	E1A	5'-ACGAAGATGTCG -3'	249pb	650-661	-
	E1B	5'-CAACTGGAATCC -3'		887-898	-
<i>SAP2</i> (produit <i>RT-PCR</i>)	SAP2C	5'-ATCAGCTGGTTCGTTGCTT-3'	401	200-219	-
	SAP2D	5'-CACCAAATCCAAACGGTAATCC-3'		581-600	-
<i>SAP2</i> (produit <i>semi-nested RT-PCR</i>)	SAP2C	5'-ATCAGCTGGTTCGTTGCTT-3'	350pb	200-219	-
	NS3	5'-CATCAGGAACCCATAAA-3'		404-420	-

5.0 Échantillons de plaque *in vivo*

5.1 Expression *in vivo* du *EFB-1* et *SAPI-3* dans la plaque prothétique (échantillon frais; n=1)

Les manipulations suivantes ont été effectuées à la clinique de prothodontie, salle C-113 de la Faculté de Médecine dentaire à l'Université de Montréal. Dr Gilles Gauthier a effectué un examen du patient et s'est prononcé sur un diagnostic. Pendant l'examen, la prothèse supérieure du patient a été retirée et rincée à trois reprises avec 10mL de PBS stérile. La prothèse rincée a été placée dans un petit pot de cueillette contenant 100mL de PBS stérile, muni d'un bouchon hermétique, pour être soumis aux ultrasons pour une durée de 5 minutes. La prothèse a été enlevée du pot de cueillette et ensuite redonnée au patient.

Les manipulations suivantes ont été effectuées au laboratoire. La suspension contenue dans le pot de cueillette est agitée pendant 15 secondes. Des aliquots ont été prélevés afin d'effectuer des dilutions de l'échantillon dans du PBS stérile pour énumérer les levures présentes dans la plaque dentaire. Un volume de 100µL de chaque dilution ont été étalés sur des milieux Sabouraud et incubés à 37°C. Un décompte des colonies présentes sur les milieux Sabouraud a été effectué afin d'estimer le nombre de levures présentes dans l'échantillon. Le reste de l'échantillon a été centrifugé dans un tube stérile de 50mL à 3800rpm (4°C) pendant 5 minutes. Le surnageant a été aspiré et le culot contenant les cellules a été congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C. L'isolation de l'ARNm a été exécutée tel que décrite précédemment.

5.2 Expression *in vivo* du *EFB-1* et *SAP2* chez de la plaque prothétique (échantillons congelés; n=2)

Le laboratoire de Microbiologie du Dr Jean Barbeau est en possession de 30 échantillons de plaque prothétique de prothèses de sujets sains et atteints de stomatite prothétique I, II et III, recueilli par ultrasons dans 30mL d'eau saline stérile. Ces échantillons ont été recueillis à l'Institut Gériatrique de Montréal et ont été prélevés en été 1999. Les échantillons ont été congelés sur place dans l'azote liquide et transférés dans un congélateur à -80°C . Seulement les échantillons identifiés comme PATIENT 20 et PATIENT 21 ont été utilisés pour les expérimentations suivantes (n=2). L'échantillon PATIENT 20 provenait d'un patient diabétique ayant une plaque prothétique saine et l'échantillon PATIENT 21 provenait d'un patient sain ayant une plaque prothétique saine.

Les échantillons ont été décongelés sur glace et agités brièvement. Environ 8mL de l'échantillon non-dilué a été transféré dans un contenant stérile de 15mL pour énumérer les levures et mis de côté. Le restant a été centrifugé à 3500rpm à 4°C pendant 8minutes. Le surnageant a été transféré dans un contenant stérile de 50mL et mis de côté. Le culot de cellules obtenu suite à la centrifugation a été resuspendu dans 1mL de Trizol™ et l'ARN total a été isolé tel que déjà décrit. L'ARN isolé a été congelé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C .

Des dilutions sérielles de 10^{-1} à 10^{-6} ont été effectuées dans du PBS stérile et les géloses Sabouraud, CHROMagar et sang ont étéensemencés en triplicata et incubées pendant 72 heures à 37°C .

RÉSULTATS

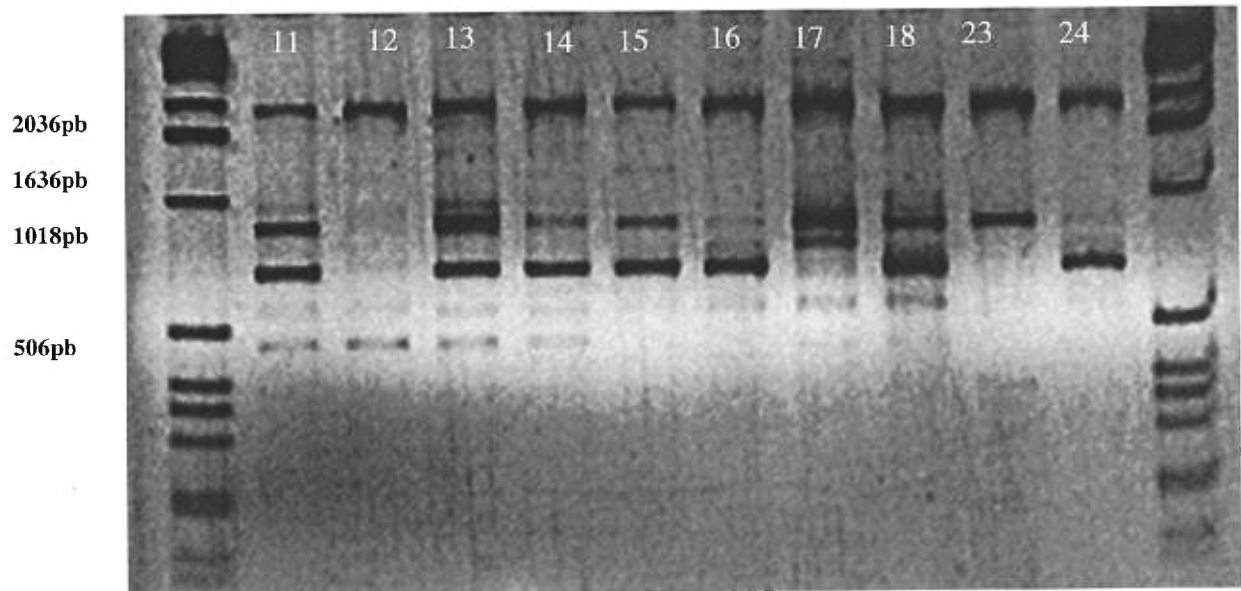
SECTION A
HÉTÉROGÉNÉITÉ DES SOUCHES CLINIQUES DE *C. albicans* ISOLÉES DE
PLAQUES PROTHÉTIQUES SAINES (n=10)
ET PATHOLOGIQUES (n=11).

1.0 AP-PCR effectué avec l'amorce OPA-10 et l'amorce 910-25 sur de l'ADN de souches de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines et pathologiques.

Un AP-PCR a été effectué avec les amorces arbitraires 910-25 et OPA-03 sur 1µg d'ADN de chacune des souches isolées de la plaque prothétique de sujets sains (n=10 ; voir Tableau VII). Les profils génomiques générés par les amorces 910-25 et OPA-03 sont présentés aux Figures 6 et 7 respectivement. La matrice de similarité correspondante a été calculée manuellement selon la formule du coefficient de similarité Sxy et les résultats sont présentés aux Tableaux XIX et XX. Un regroupement des souches cliniques (voir Tableau XXI) a été effectué selon les résultats de ces matrices de similarité et montre que les amorces arbitraires 910-25 et OPA-03 ont discerné parmi les souches de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines, 50% et 20% de profils différents respectivement (voir Tableau XXI).

Un AP-PCR a également été effectué avec les amorces arbitraires 910-25 et OPA-03 sur 1µg d'ADN des souches isolées de la plaque prothétique de patients atteints de stomatite prothétique stade III (n=11 ; voir Tableau VII). Les profils génomiques générés par l'amorce 910-25 et OPA-03 sont présentés aux Figures 8 et 9 respectivement. La matrice de similarité a été calculée manuellement selon la formule du coefficient de similarité Sxy et les résultats sont présentés aux Tableaux XXII et XXIII. Un regroupement des souches cliniques (voir Tableau XXIV) effectué selon les résultats des matrices de similarité a été effectué. Les amorces arbitraires 910-25 et OPA-03 ont discerné parmi les souches de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines, 72.7% et 36.4% de profils différents respectivement (voir Tableau XXIV).

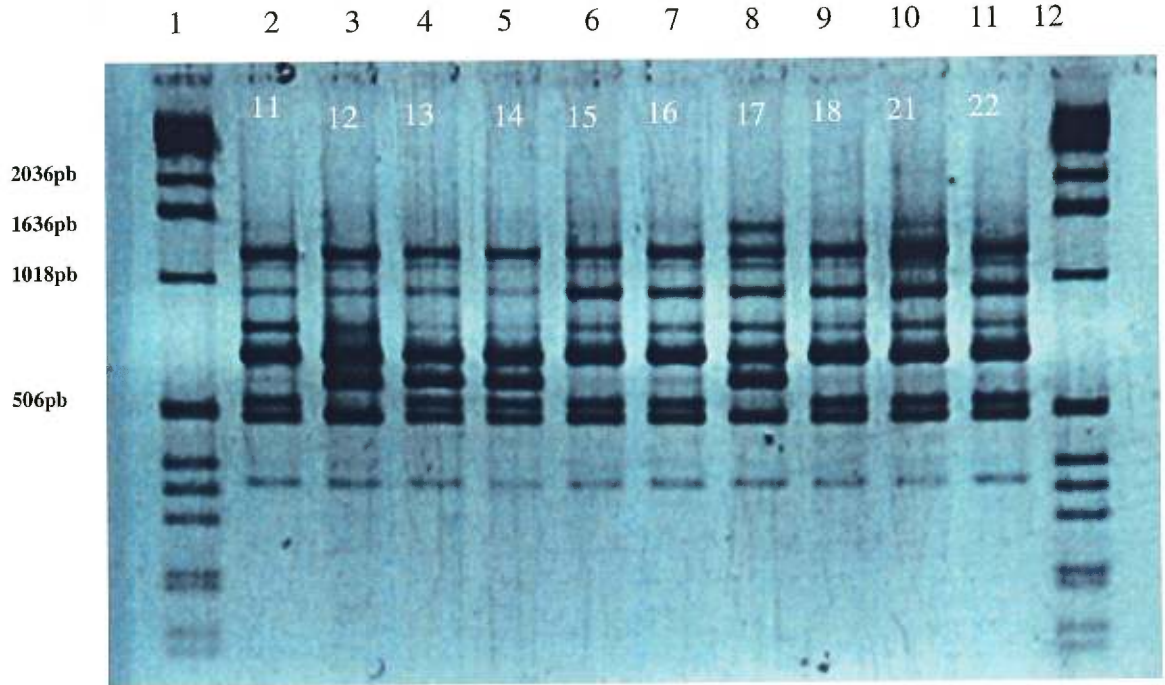
Figure 6 : AP-PCR effectué avec l'amorce 910-25 sur de l'ADN de souches cliniques de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines.



Légende :

NUMERO DE PUIITS	LE PUIITS CONTIENT :
1	Marqueur 1kb (Gibco Life Technologies)
2	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 11
3	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 12
4	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 13
5	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 14
6	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 15
7	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 16
8	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 17
9	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 18
10	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 23
11	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 24
12	Marqueur 1kb (Gibco Life Technologies)

Figure 7 : AP-PCR effectué avec l'amorce OPA-03 sur de l'ADN de souches cliniques de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines.



Légende :

NUMERO DE	LE PUIITS CONTIENT :
PUIITS	
1	Marqueur 1kb (Gibco Life technologies)
2	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 11
3	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 12
4	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 13
5	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 14
6	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 15
7	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 16
8	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 17
9	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 18
10	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 23
11	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 24
12	Marqueur 1kb (Gibco Life technologies)

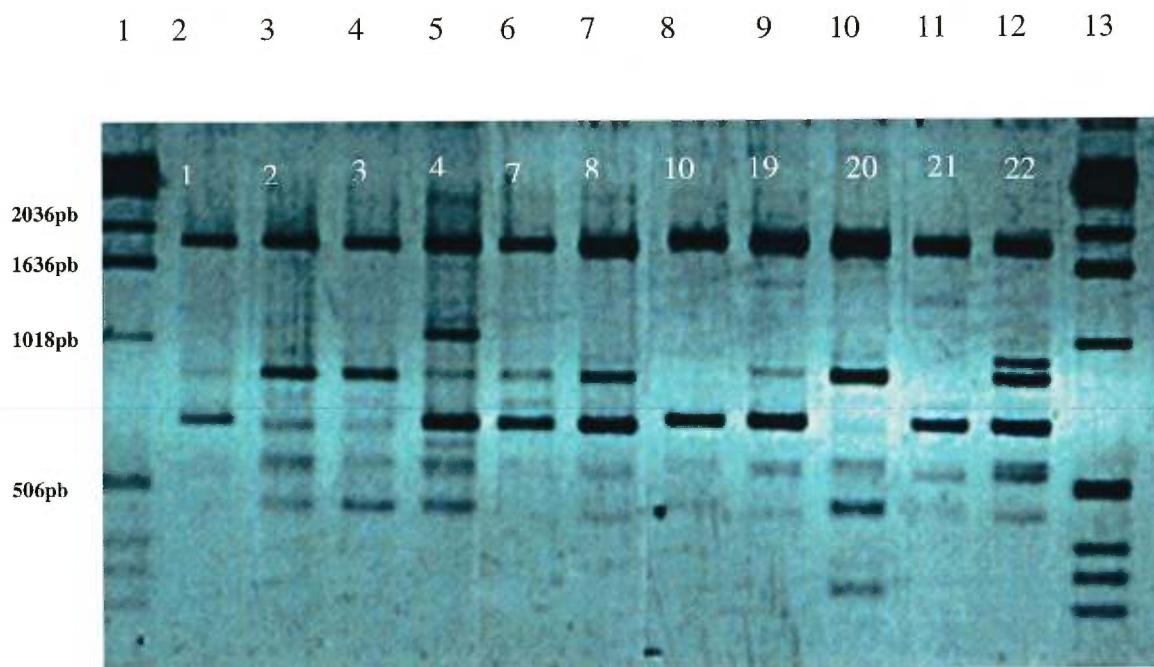
Tableau XX : Matrice de similarité calculée selon les profils d'AP-PCR obtenus avec l'amorce OPA-03 chez les souches isolées de plaques prothétiques saines.

Souche	11	12	13	14	15	16	17	18	23	24
11	100	85.7	93.3	93.3	100	100	80	100	100	100
12		100	93.3	93.3	85.7	85.7	93.3	85.7	85.7	85.7
13			100	100	93.3	93.3	87.5	93.3	93.3	93.3
14				100	93.3	93.3	87.5	93.3	93.3	93.3
15					100	100	80	100	100	100
16						100	80	100	100	100
17							100	80	80	80
18								100	100	100
23									100	100
24										100

Tableau XXI : Regroupement selon profil généré par AP-PCR des isolats cliniques de *C. albicans* provenant de plaques prothétiques saines.

Amorce 910-25	Amorce OPA-03
11-13	11-15-16-18-23-24
15	13-14
16	12
17	17
12-14-18	
23	
24	
Pourcentage de profils différents : 50%	Pourcentage de profils différents : 20%

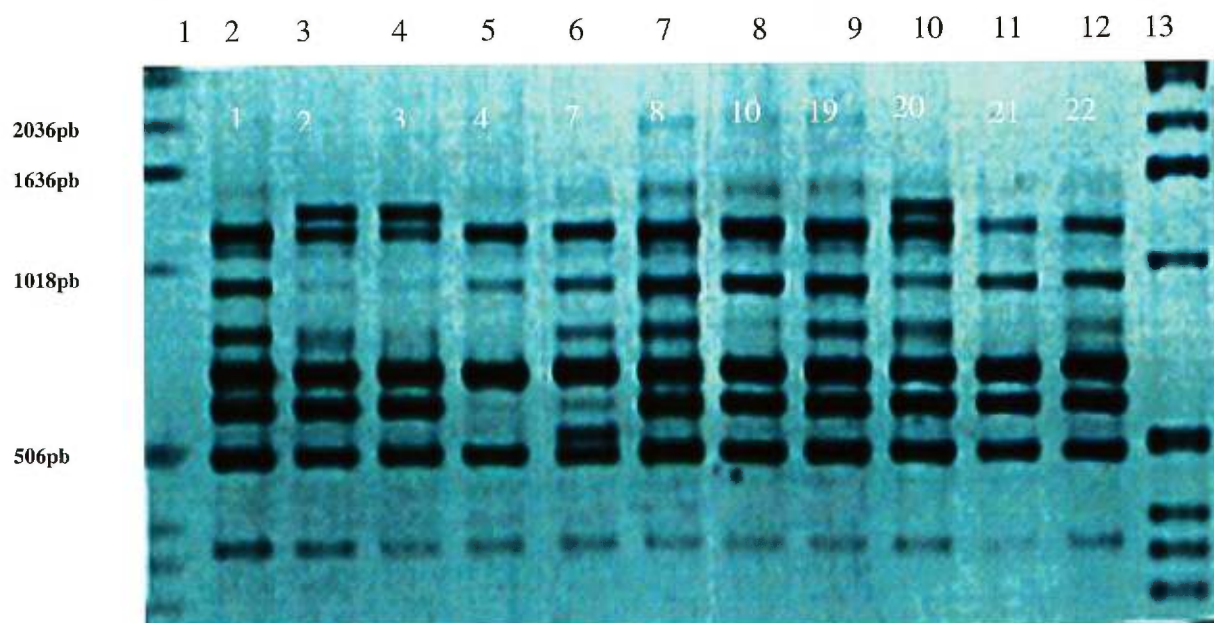
Figure 8 : AP-PCR effectué avec l'amorce 910-25 sur de l'ADN de souches cliniques de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques pathologiques.



Légende :

NUMERO DE PUIITS	LE PUIITS CONTIENT :
1	Marqueur 1kb (Gibco Life technologies)
2	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 1
3	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 2
4	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 3
5	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 4
6	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 7
7	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 8
8	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 11
9	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 19
10	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 20
11	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 21
11	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 22
13	Marqueur 1kb (Gibco Life technologies)

Figure 9 : AP-PCR effectué avec l'amorce OPA-03 sur de l'ADN de souches cliniques de *C. albicans* isolées de plaques prothétiques pathologiques.



Légende :

NUMERO DE PUIITS	LE PUIITS CONTIENT :
1	Marqueur 1kb (Gibco Life technologies)
2	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 1
3	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 2
4	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 3
5	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 4
6	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 7
7	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 8
8	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 11
9	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 19
10	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 20
11	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 21
11	<i>AP-PCR</i> effectué avec 1µg d'ADN de la souche <i>C. albicans</i> 22
13	Marqueur 1kb (Gibco Life technologies)

Tableau XXIII : Matrice de similarité calculée selon les profils d'AP-PCR obtenus avec l'amorce OPA-03 chez les souches isolées plaques prothétiques pathologiques.

Souche	1	2	3	4	7	8	10	19	20	21	22
1	100	80.1	80	85.7	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	71.4	100
2		100	87.5	80	88.8	88.8	88.8	88.88	100	66.6	94.1
3			100	76.9	75	75	75	75	87.5	76.9	80
4				100	80	80	80	80	80	66.6	85.7
7					100	88.8	88.8	88.8	88.8	66.6	94.1
8						100	100	100	88.8	66.6	94.1
10							100	100	88.8	66.6	94.1
19								100	88.8	66.6	94.1
20									100	66.6	94.1
21										100	71.4
22											100

Tableau XXIV : Regroupement selon profil généré par AP-PCR des isolats cliniques de *C. albicans* provenant de plaques prothétiques pathologiques.

Amorce 910-25	Amorce OPA-03
1	1-22
2-3-8	2-20
4	4
7	7
10	8-10-19
19	3
20	
21	21
22	
Pourcentage de profils différents :	Pourcentage de profils différents :
72.7%	36.4%

2.0 Temps de génération des souches *C. albicans* isolées de plaques prothétiques saines (n=10) et pathologiques (n=11).

Le temps de génération a été calculé pour chacune des souches isolées de plaques prothétiques saines (voir Tableau XXV) et pathologiques (voir Tableau XXVI) en conditions d'aérobiose. Le temps de génération moyen (résultat de trois expériences indépendantes), l'écart type pour chacune des souches sont présentés dans les Tableaux XXV et XXVI. Le temps moyen de génération pour les souches isolées de plaques prothétiques saines est de 111,02 minutes et de 103,70 minutes pour les souches isolées de plaques prothétiques pathologiques. Selon le test de comparaison de Mann-Whitney U , il n'y a pas de différence significative entre les temps de génération des deux groupes de souches ($P=0.0783$). Le seuil de signification a été fixé à $P \leq 0.05$.

Tableau XXV : Temps de génération pour les souches isolées de plaques prothétiques saines (n=10) avec écart type.

Souche	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Écart type
11	95,46	106,46	116,19	106,04	10,37
12	114,03	97,04	103,06	104,71	8,61
13	115,43	114,00	114,18	114,54	0,78
14	110,00	114,76	118,45	114,40	4,24
15	98,43	100,68	91,00	96,70	5,07
16	104,71	89,73	107,94	100,79	9,72
17	116,97	109,21	97,39	107,86	9,86
18	113,37	112,20	116,22	113,93	2,07
23	131,53	143,93	138,07	137,84	6,20
24	117,61	116,59	105,94	113,38	6,46
n=10			Moyenne	111.02	3.56

Tableau XXVI : Temps de génération pour les souches isolées de plaques prothétiques pathologiques (n=11) avec écart type.

Souche	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moyenne	Écart type
1	109,51	94,98	102,89	102,46	7,27
2	109,19	108,62	112,88	110,23	2,31
3	91,66	104,28	99,00	98,31	6,34
4	88,25	89,06	85,17	87,49	2,05
7	104,06	101,44	96,00	100,50	4,11
8	110,98	105,83	121,97	112,93	8,24
10	106,83	96,00	100,18	101,00	5,46
19	115,40	104,73	114,98	111,70	6,04
20	112,91	105,85	114,72	111,16	4,69
21	114,18	100,21	95,17	103,19	9,85
22	105,34	103,35	97,79	102,16	3,91
n=11			Moyenne	103.70	2.26

3.0 Morphogénèse des 21 souches cliniques de *C. albicans* cultivées en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose.

Des observations microscopiques des cellules ont été effectuées avant l'isolation de l'ARN total pour les expériences 3.0 et 4.0. Chez les 21 souches cultivées 24 heures en aérobiose, les cellules étaient uniquement sous la forme blastospore (forme levure) à l'exception de la souche *C. albicans* 19 chez laquelle il y avait présence d'une faible quantité de pseudohyphes et chez *C. albicans* 23 pour laquelle nous avons remarqué la présence d'hyphes et de pseudohyphes. Chez chacune des 21 souches cultivées 48 heures en anaérobiose (voir Tableaux XXVII et XXVIII), les cellules étaient sous les formes blastospores et hyphes. La médiane du rapport blastospore : hyphe est de 68 chez les cellules isolées de plaque saine, et de 24 pour chez les cellules isolées de plaque pathologique, cultivées en anaérobiose. Selon le test de comparaison de Mann-Whitney *U* il y a une différence significative entre les rapports des deux groupes de souches cultivées en anaérobiose ($P = 0.0265$). Le seuil de signification a été fixé à $P \leq 0.05$.

Tableau XXVII : Observations microscopiques des souches isolées de plaques prothétiques saines, cultivés 48 heures en conditions d'anaérobiose.

Souche	Nombre de blastospores par rapport au nombre d'hyphe
11	40 : 1
12	86 : 1
13	70 : 1
14	117 : 1
15	33 : 1
16	989 : 1
17	53 : 1
18	66 : 1
23	0.5 : 1
24	135 : 1
n=10	Minimum = 0.5 ; Maximum = 989
	Médiane = 68 ; Écart type = 294

Tableau XXVIII : Observations microscopiques des souches isolées de plaques prothétiques pathologiques, cultivés 48 heures en conditions d'anaérobiose.

Souche	Nombre de blastospores par rapport au nombre d'hyphe
1	5 : 1
2	59 : 1
3	65 : 1
4	20 : 1
7	67 : 1
8	4 : 1
10	10 : 1
19	1 : 1
20	39 : 1
21	40 : 1
22	24 : 1
n=10	Minimum = 1.0 ; Maximum = 67 Médiane = 24 ; Écart type = 25

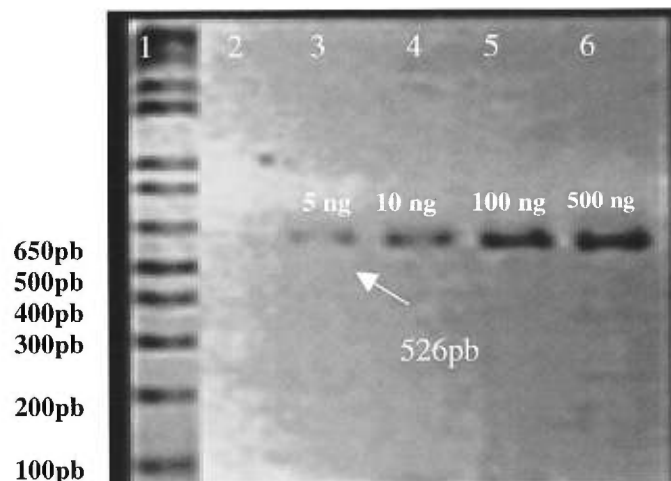
SECTION B

PROFILS D'EXPRESSION *IN VITRO* DE *SAP1*, 2, 3, 4-6, 7, 8 ET 9 CHEZ LES SOUCHES DE *C. albicans* ISOLÉES DE PLAQUES PROTHÉTIQUES SAINES (n=10) ET PATHOLOGIQUES (n=11).

4.0 Détermination de la limite de détection de la technique de *RT-PCR* avec les amorces du gène *EFBI*.

La limite de détection de la technique de *RT-PCR* a été évaluée avec les amorces du gène *EFBI* avec 500ng (puits 6), 100ng (puits 5), 10ng (puits 4) et 5ng (puits 3) d'ARN total isolé de *C.albicans* souche P2 cultivé en aérobiose (voir Figure 10). Chacun des puits 1 à 4 possède une bande à 526pb ce qui correspond au produit de réaction d'une amplification d'un segment du gène *EFBI*. Le puits 6 représente le contrôle effectué avec 100ng d'ARN total en absence d'enzyme transcriptase et ne possède pas de produit de réaction. Le dernier produit de réaction visible aux ultraviolets suite à une coloration du gel avec du bromure d'éthidium est celle du puits 3, soit la réaction de *RT-PCR* effectuée avec 5ng. Selon la Figure 11, la limite de détection du *RT-PCR* avec les amorces du gène *EFBI* est de 5ng (puits 3).

Figure 10 : Détermination de la limite de détection de la technique de *RT-PCR*.



Légende:

Numéro de Puits	Le puits contient :
1	Marqueur 1kb GibcoBRL LifeTechnologies
2	<i>RT-PCR</i> effectué en absence de transcriptase inverse avec 100ng d'ARN total
3	<i>RT-PCR</i> effectué avec 5ng d'ARN total
4	<i>RT-PCR</i> effectué avec 10ng d'ARN total
5	<i>RT-PCR</i> effectué avec 100ng d'ARN total
6	<i>RT-PCR</i> effectué avec 500ng d'ARN total

5.0 Cinétique de l'expression des transcrits des gènes *SAP 1, 2, 3, 4-5-6, 7, 8 et 9* cultivées en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose tel que déterminé par RT-PCR.

Un microgramme d'ARN total isolé de la souche clinique *C.albicans* LAM-1, cultivée 24, 48 et 72 heures en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose, a été employé comme matrice pour un RT-PCR avec les amorces des gènes *SAP1-SAP9*. Les transcrits des gènes *SAP1* et *SAP3* n'ont été détectés qu'en condition d'aérobiose et cela après 24 heures d'incubation, les transcrits n'étant par détectables ensuite (voir Tableau XXIX). Les transcrits des gènes *SAP2, SAP4-6, SAP7* et *SAP9* sont détectés en de 24 à 72 heures en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose. Les transcrits du gène *SAP8* sont détectés après 24-72 heures d'incubation en aérobiose et après 48 et 72 heures d'incubation en anaérobiose. Le Tableau XXIX résume les résultats d'une seule expérience.

Tableau XXIX : Cinétique de l'expression des transcrits des gènes *SAP 1, 2, 3, 4-5-6, 7, 8 et 9* chez la souche *C. albicans* LAM-1 cultivée en conditions d'aérobiose (O₂) et d'anaérobiose (ANA O₂).

	<i>SAP1</i>		<i>SAP2</i>		<i>SAP3</i>		<i>SAP4-6</i>		<i>SAP7</i>		<i>SAP8</i>		<i>SAP9</i>	
	O ₂	ANA O ₂	O ₂	ANA O ₂	O ₂	ANA O ₂	O ₂	ANA O ₂	O ₂	ANA O ₂	O ₂	ANA O ₂	O ₂	ANA O ₂
24 heures	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
48 heures	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
72 heures	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Légende :

- = absence de transcrits
- + = présence de transcrits

6.0 Détection par RT-PCR des transcrits des gènes SAP 1, 2, 3, 4-6, 7, 8 et 9 chez des souches de *C.albicans* isolées de plaques prothétiques saines et pathologiques et cultivées en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose.

De l'ARN total (1-2µg) de souches cliniques de *C.albicans* isolées de plaques prothétiques saines (cultivées 24 heures en aérobiose et 48 en anaérobiose) a été employé pour un RT-PCR avec les amorces des gènes *SAP1-SAP9* (voir Tableau XXX). Les transcrits des gènes *SAP1* et *SAP3* ont été détectés chez les souches 11, 13, 15, 18, 23 et 24 lorsque ces dernières ont été cultivées en aérobiose mais jamais en anaérobiose. Les transcrits des gènes *SAP2*, *SAP4-6*, *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* ont été tous détectés chez chacune des souches cliniques de *C. albicans* cultivées en conditions d'aérobiose. Les transcrits du gène *SAP8* sont exprimés en anaérobiose seulement chez les souches 12, 14, 15 et 18. Les transcrits du gène *SAP9* sont exprimés en anaérobiose seulement chez les souches 12, 14, 15, 17 et 18.

De l'ARN total (1-2µg) de souches cliniques de *C.albicans* isolées de patients atteints de stomatite prothétique et cultivées 24 heures en aérobiose et 48 en anaérobiose, a été employé pour un RT-PCR avec les amorces des gènes *SAP1-SAP9* (voir Tableau XXXI). Les transcrits des gènes *SAP1* et *SAP3* ont été détectés chez les souches 1, 2, 3, 7, 8, 10, 19 et 22 lorsque ces dernières ont été cultivées en aérobiose, mais jamais en anaérobiose. Les transcrits des gènes *SAP2*, *SAP4-6*, *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* ont été tous détectés chez chacune des souches cliniques de *C. albicans* cultivées en conditions d'aérobiose. Les transcrits du gène *SAP8* sont exprimés en anaérobiose seulement chez les souches 7, 20 et 21. Les transcrits du gène *SAP9* sont exprimés en anaérobiose seulement chez les souches 2, 7, 19, 20 et 21.

En condition de culture d'aérobiose, les transcrits des gènes *SAP2*, *SAP4-6*, *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* ont été détectés chez 100% des souches isolées de plaque de sujets sains ainsi que celles isolées de la plaque de patients atteints de stomatite prothétique (voir Tableau XXXII). Les transcrits des gènes *SAP1* et *SAP3* n'ont été détectés que chez les

souches cultivées en conditions d'aérobiose, soit chez 60% des souches isolées de plaques prothétiques saines et 75% des souches isolées de plaques prothétiques pathologiques. En conditions d'anaérobiose les transcrits du gène *SAP7* ont été détectés chez 100% des souches isolées de plaques prothétiques saines comparativement à 83.3% des souches isolées de plaques prothétiques pathologiques. Les transcrits du gène *SAP8* ont été détectés chez 40% des souches isolées de plaques prothétiques saines et chez 83.3% des souches isolées de plaques prothétiques pathologiques. Les transcrits du gène *SAP9* ont été détectés chez 50% des souches isolées de plaques prothétiques saines et 41.6% des souches isolées de plaques prothétiques pathologiques.

Le test de Fisher a été employé pour l'analyse statistique des données sur les profils d'expression des protéinases aspartiques. Le seuil de signification a été fixé à $P \leq 0.05$. Aucune différence statistiquement significative n'a été décelée entre les profils du groupe de souches, cultivées en aérobiose, provenant de sujets sains et celui provenant de patients atteints de stomatite prothétique pour *SAP1* ($P=0.6594$) et *SAP3* ($P=1.000$), ni pour *SAP7* ($P=0.4762$), *SAP8* ($P=0.6595$) et *SAP9* ($P=1.000$) en conditions d'anaérobiose. Aucune différence statistiquement significative a été décelée entre les profils du groupe sain et celui des patients pour *SAP2*, *SAP4-6*, *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* en conditions d'aérobiose (Pearson $\chi^2 = 1.000$), ni pour *SAP1*, *SAP2*, *SAP3* et *SAP4-6* en conditions d'anaérobiose (Pearson $\chi^2 = 1.000$).

Les 21 souches cliniques de *C.albicans* ont été regroupées selon son profil d'expression des gènes *SAPs* généré en conditions d'anaérobiose et ce profil a été comparé à celui généré en aérobiose. Quatre profils d'expression différents ont été mis en évidence en conditions d'aérobiose ; soit l'expression de la totalité des protéinases aspartiques, l'expression des *SAPs* 2, 4-6, 7, 8 et 9, l'expression des *SAPs* 1, 2, 4-6, 7, 8 et 9, et l'expression des *SAPs* 2, 3, 4-6, 7, 8 et 9. Quatre profils d'expression ont été également générés en conditions d'anaérobiose dont l'un se retrouve également en aérobiose. L'expression des *SAPs* 2, 4-6, 7, 8 et 9, l'expression des *SAPs* 3, 4-6 et 7, l'expression des *SAPs* 2, 4-6, 7 et 9, et l'expression *SAPs* 2 et 4-6 forment les 3 autres profils.

Tableau XXX: Présence (+) ou absence (-) des transcrits des gènes *SAP 1, 2, 3, 4-6, 7, 8* et *9* chez des souches isolées de plaques prothétiques saines et cultivées 24 heures en conditions d'aérobiose (O₂) et 48 heures en conditions d'anaérobiose (ANA O₂).

Souche	<i>SAP1</i>		<i>SAP2</i>		<i>SAP3</i>		<i>SAP4-6</i>		<i>SAP7</i>		<i>SAP8</i>		<i>SAP9</i>	
	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂
11	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
12	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
14	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
16	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
17	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
18	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
24	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-

Tableau XXXI: Présence (+) ou absence (-) des transcrits des gènes *SAP 1, 2, 3, 4-6, 7, 8 et 9* chez des souches isolées de plaques prothétiques pathologiques et cultivées 24 heures en conditions d'aérobiose (O₂) et cultivées 48 heures en conditions d'anaérobiose (ANA O₂).

Souche	<i>SAP1</i>		<i>SAP2</i>		<i>SAP3</i>		<i>SAP4-6</i>		<i>SAP7</i>		<i>SAP8</i>		<i>SAP9</i>	
	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂	O ₂	AN AO ₂
1	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
2	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
3	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
4	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
7	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
10	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
19	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
20	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
21	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-

Tableau XXXII : Pourcentage des souches cliniques de *C. albicans* positives pour la présence de transcrits des protéinases aspartiques *SAP1-9* suite à une croissance en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose.

Souches cliniques testées en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose	ARN messagers des gènes de protéinases aspartiques détectés						
	<i>SAP1</i>	<i>SAP2</i>	<i>SAP3</i>	<i>SAP4-6</i>	<i>SAP7</i>	<i>SAP8</i>	<i>SAP9</i>
Souches cultivées 24h en conditions d'aérobiose isolées de sujets sains	60% (6/10)	100% (10/10)	60% (6/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)
Souches cultivées 24h en conditions d'aérobiose isolées de prothèses de patients atteints de stomatite prothétique III	73% (8/11)	100% (11/11)	64% (7/11)	100% (11/11)	100% (11/11)	100% (11/11)	100% (11/11)
Souches cultivées 48h en conditions d'anaérobiose isolées de sujets sains	0% (0/10)	100% (10/10)	0% (0/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	40% (4/10)	50% (5/10)
Souches cultivées 48h en conditions d'anaérobiose isolées de prothèses de patients atteints de stomatite prothétique III	0% (0/11)	100% (11/11)	0% (0/11)	100% (11/11)	82% (9/11)	27% (3/11)	45% (5/11)

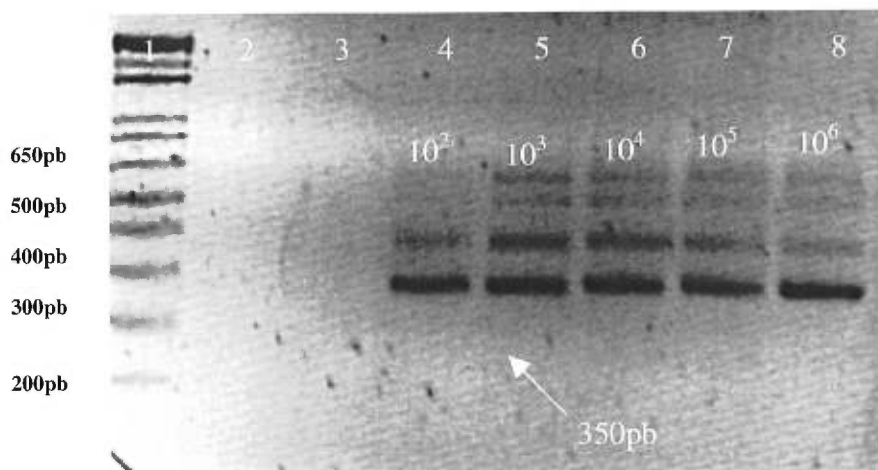
SECTION C

DÉTECTION DES TRANSCRITS DE PROTÉINASES ASPARTIQUES (SAP 1, 2 ET 3) DE *C. albicans* DANS LA PLAQUE PROTHÉTIQUE *IN VIVO* (n=3)

7.0 Détermination de la limite de détection de la technique de *nested RT-PCR* avec les amorces du gène *EFB1*.

Un *nested RT-PCR* (amorces EFB1A/EFB1B et E1/E2) a été effectué avec des dilutions d'ARN total (isolé de *C.albicans* souche P2) variant de 100ng à 1fg (voir Figure 12). Un *nested RT-PCR* (amorces SAP2C/SAP2D et SAP2C/NS3) a été effectué avec des dilutions croissantes de *C.albicans* souche P2, soit de 10^2 à 10^6 cellules, cultivée en aérobiose (voir Figure 11). Le *nested RT-PCR* a été effectué en absence de transcriptase inverse (puits 3) ainsi qu'en absence d'ADN (puits 2) et aucun produit de réaction n'a été obtenu. La limite de détection de la technique du *nested RT-PCR* est de 10fg ou de 100 cellules pour les amorces EFB1A/EFB1B et E1/E2.

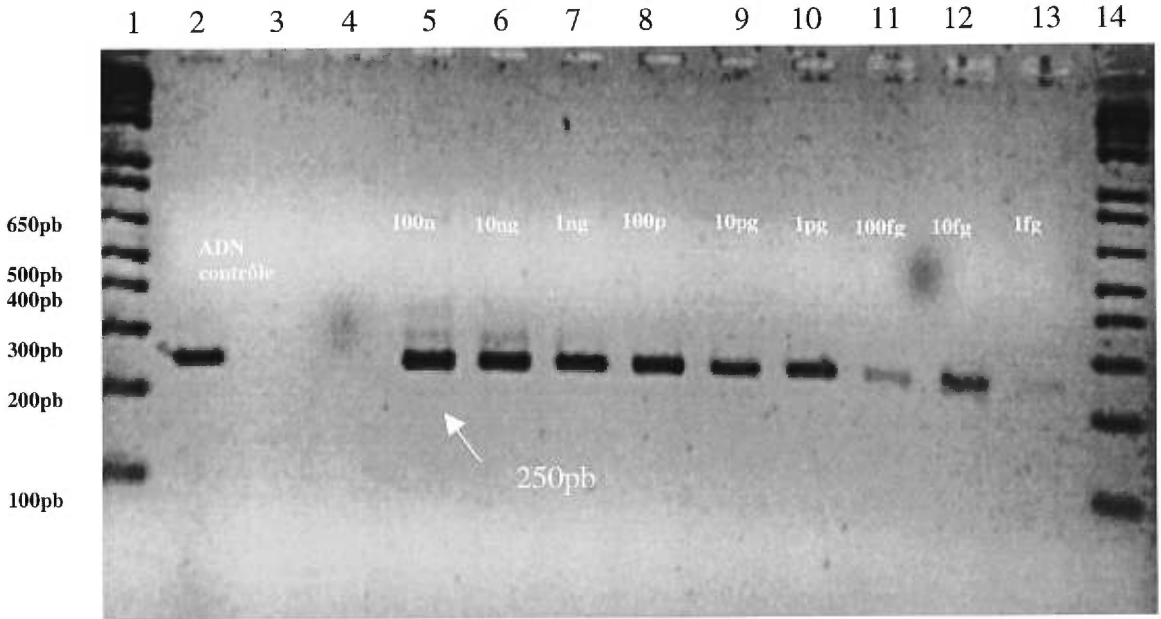
Figure 11 : Détermination de la limite de détection du *nested RT-PCR* avec des dilutions croissantes de cellules de *C. albicans* souche P2.



Légende :

Numéro de Puits	Le puits contient :
1	Marqueur 1kb GibcoBRL LifeTechnologies
2	<i>nested RT-PCR</i> en absence d'ADN
3	<i>nested RT-PCR</i> , effectué en absence de transcriptase inverse, avec 100ng d'ARN total
4	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 10^2 cellules
5	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 10^3 cellules
6	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 10^4 cellules
7	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 10^5 cellules
8	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 10^6 cellules

Figure 12 : Détermination de la limite de détection du *nested RT-PCR* avec de l'ARN total de la souche *C. albicans* P2.



Légende:

Numéro de Puits	Le puits contient :
1	Marqueur 1kb GibcoBRL LifeTechnologies
2	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 100ng d'ADN
3	<i>nested RT-PCR</i> en absence d'ADN
4	<i>nested RT-PCR</i> effectué en absence de transcriptase inverse
5	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 100ng d'ARN total
6	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 10ng d'ARN total
7	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 1ng d'ARN total
8	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 100pg d'ARN total
9	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 10pg d'ARN total
10	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 1pg d'ARN total
11	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 100fg d'ARN total
12	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 10fg d'ARN total
13	<i>nested RT-PCR</i> effectué avec 1fg d'ARN total
14	Marqueur 1kb GibcoBRL LifeTechnologies

8.0 Détection des transcrits *EFB1* et *SAP2* dans un biofilm prothétique *in vivo* (n=2).

Un *RT-PCR* suivi d'une étape *nested* a été effectué avec l'ARN total isolé des échantillons PATIENT 20 et PATIENT 21. Les transcrits des gènes *EFB1* et *SAP2* n'ont pas été détectés pour l'échantillon PATIENT 20 ni pour l'échantillon PATIENT 21.

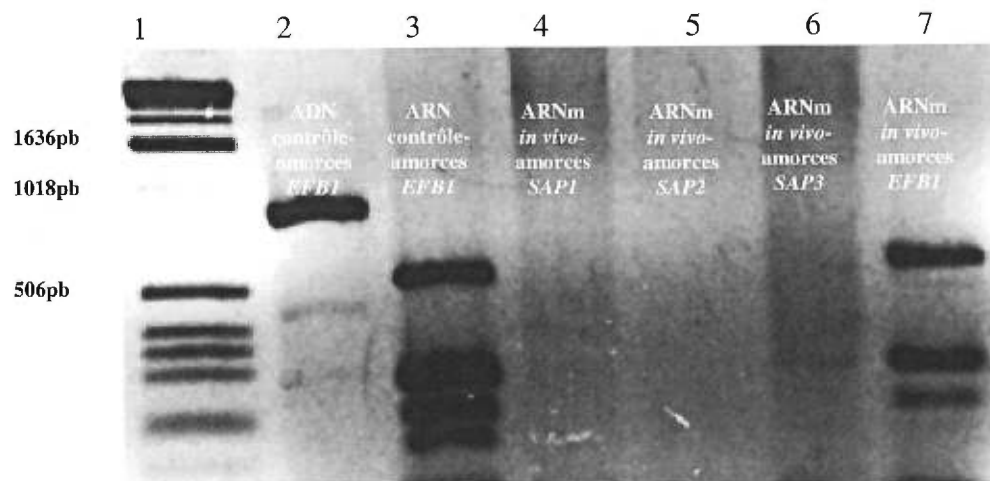
Des dilutions de deux échantillons de plaques prothétiques saines, soit l'échantillon PATIENT 20 et PATIENT 21, ont étéensemencées sur Sabouraud et CHROMagar. Pour l'échantillon PATIENT 20, nous avons noté sur les géloses Sabouraud, suite à une incubation de 72h, la présence de colonies de forme irrégulière et mucoïdes. Des observations à l'état frais ont confirmé que les colonies présentes sur le milieu Sabouraud n'étaient pas des colonies de levures. Pour l'échantillon PATIENT 21, nous avons noté sur les géloses Sabouraud, suite à une incubation de 72h, la présence de colonies de forme régulière et crémeuse. Des observations à l'état frais ont confirmé que les colonies présentes sur le milieu Sabouraud étaient des colonies de levures. Il a été calculé que l'échantillon PATIENT 21 possédaient approximativement 41 000 UFC de levures au total. Les colonies présentes sur milieu CHROMagar était en totalité de couleur mauve-pâle et donc pas des colonies de *C.albicans* qui deviennent vertes sur ce milieu de différenciation. Selon les critères d'identification du milieu CHROMagar, les colonies mauves-pâles sont présumément *C.glabrata*. Les observations microscopiques à l'état frais des colonies mauves-pâles viennent appuyer cette supposition car les blastospores étaient petits, caractéristique morphologique typique de *C.glabrata* (Fidel et coll. 1999). Nous avons donc testé un échantillon, soit le PATIENT 20, dépourvu de *C.albicans*.

Un *PCR* subséquent a confirmé que les amorces du gène *SAP2* ne s'hybridaient pas avec la souche *C.glabrata* LSPQ 0212. Toutefois les amorces du facteur d'élongation (*EFB1*) ont réussi à amplifier un segment de la 826pb, soit de la même taille que l'amplicon généré par *C.albicans*.

9.0 Détection des gènes *EFBI* et *SAPI-2-3* dans un échantillon de biofilm prothétique prélevé *in vivo* (n=1).

Un échantillon de plaque prothétique a été isolé d'une prothèse d'un patient atteint d'une stomatite stade I et a également été testé. Suite à des ensemencements sur milieu Sabouraud de l'échantillon de la plaque prothétique, la concentration a été calculée comme étant approximativement 1.85×10^6 UFC de levures. Un *RT-PCR* a été effectué sur de l'ADN et de l'ARN total contrôle de *C.albicans* souche LAM-1 ainsi que sur l'ARN messager isolé de la plaque prothétique de ce patient (voir Figure 13). Les réactions de contrôle de *PCR* (puits 2) ainsi que de *RT-PCR* (puits 3) effectués avec les amorces du gène *EFBI* ont généré des bandes d'une taille de 856pb et de 526pb respectivement. Nous observons que les réactions de l'ARNm isolé de plaque prothétique effectuées avec les amorces des gènes *SAPI* (puits 4), *SAP2* (puits 5) et *SAP3* (puits 6) n'ont pas généré d'amplicons détectables sur gel d'agarose. L'ARNm isolé de plaque prothétique produit cependant un amplicon détectable avec les amorces du gène *EFBI*.

Figure 13 : Détection des gènes *EFBI* et *SAPI-2-3* dans un échantillon de biofilm prothétique pathogène prélevé *in vivo*.



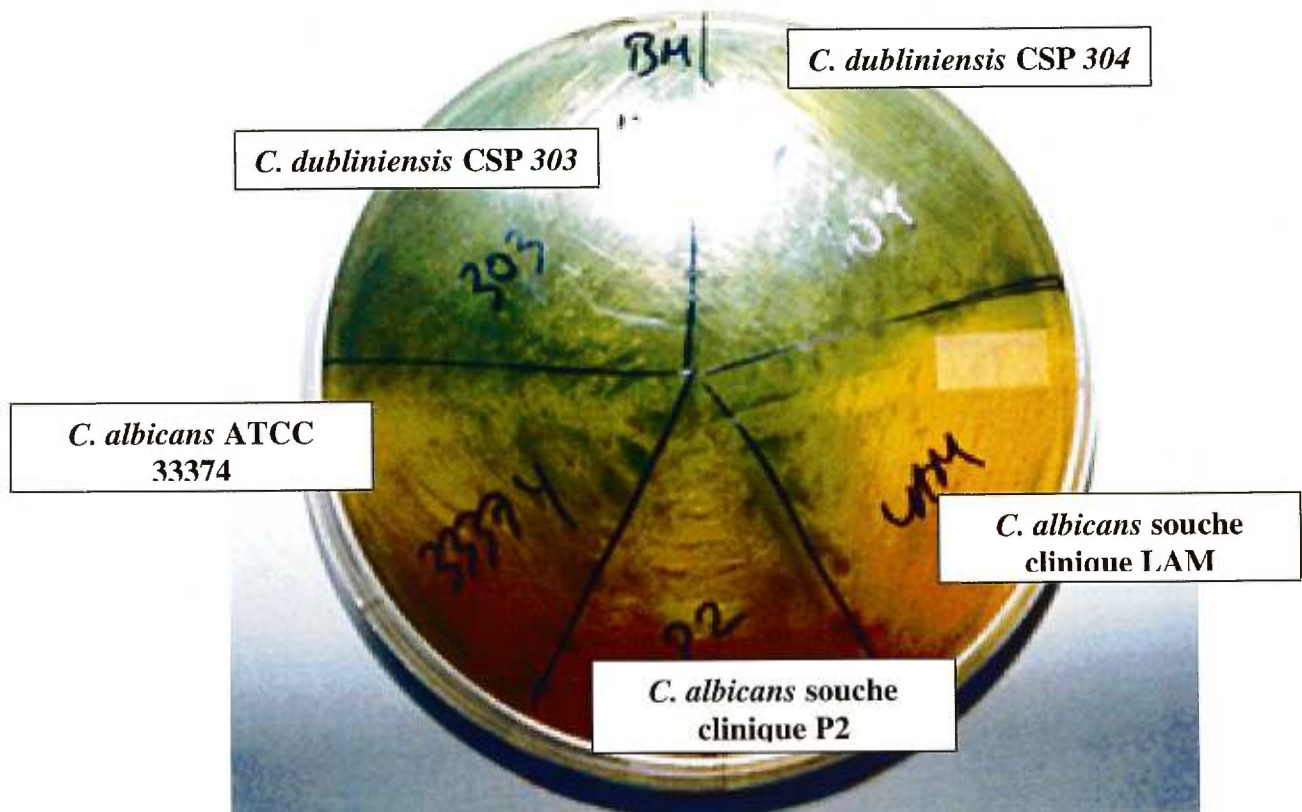
Légende :

Numéro de Puits	Le puits contient :
1	Marqueur 1kb GibcoBRL LifeTechnologies
2	<i>RT-PCR</i> effectué avec 1000ng d'ADN de <i>C.albicans</i> LAM-1 avec les amorces du gène <i>EFB1</i>
3	<i>RT-PCR</i> effectué avec 1000ng d'ARN total de <i>C.albicans</i> LAM-1 avec les amorces du gène <i>EFB1</i>
4	<i>RT-PCR</i> effectué avec amorces du gène <i>SAP1</i>
5	<i>RT-PCR</i> effectué avec amorces du gène <i>SAP2</i>
6	<i>RT-PCR</i> effectué avec amorces du gène <i>SAP3</i> <i>RT-PCR</i> effectué avec amorces du gène <i>EFB1</i>

10.0 Milieu permettant de différencier *C. albicans* de *C. dubliniensis*.

La Figure 14 présente les résultats d'une incubation de 24 heures des espèces *C. dubliniensis* CSP 303 et *C. dubliniensis* CSP 304 et *C. albicans* ATCC 33374, *C. albicans* P2 et *C. albicans* LAM-1, sur milieu OF Basal Medium supplémenté de 2% xylose. Les trois souches de *C. albicans* ont assimilé le xylose et la couleur du milieu a viré de vert au jaune. Les 2 souches de *C. dubliniensis* n'ont pas assimilé le xylose et le milieu de croissance est demeuré vert.

Figure 14 : Milieuensemencé avec deux souches de *C. dubliniensis*, soit *C. dubliniensis* CSP 303 et CSP 304, et trois souches de *C. albicans*, soit *C. albicans* ATCC 33374, *C. albicans* P2 et *C. albicans* LAM-1.



DISCUSSION

1.0 Détection *in vitro* de transcrits de protéinases aspartiques de *C. albicans*.

Le rôle de la levure *C. albicans* dans l'étiologie de la stomatite prothétique demeure controversé et ambigu. Notre but ultime a été de tenter de mettre en évidence une association entre la présence de protéinases aspartiques de *C. albicans* et la stomatite prothétique. En vue de satisfaire ce but plusieurs autres objectifs ont été comblés. Un premier objectif fondamental a été d'adapter une technique de biologie moléculaire reproductible et sensible de détection de transcrits, soit le *RT-PCR*. Deuxièmement, nous avons déterminé, via le *RT-PCR*, les profils d'expression *in vitro* des transcrits des gènes des protéinases aspartiques *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP4-6*, *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* entre deux groupes d'isolats cliniques de *C. albicans*, soit 10 souches isolées de prothèses de sujets sains et 11 souches isolées de prothèses de patients atteints de stomatite prothétique. En troisième lieu, nous avons examiné les profils générés afin de pouvoir déceler une relation possible entre le profil des protéinases aspartiques et l'origine des souches. Plusieurs études ont démontré qu'il existe des différences quant à l'expression *in vitro* des protéinases aspartiques chez des souches isolées de sujets sains et atteints de candidose orale (Ollert et coll. 1995, DeBernardis et coll. 1996). De plus, DeBernardis et coll. (1995) avaient démontré qu'une souche isolée de patiente atteinte de vaginite exprimait *SAP1* et *SAP2* lors d'une infection expérimentale chez un modèle murin (DeBernardis et coll. 1995). Deux études ont récemment reporté des variations dans les profils d'expression des *SAPs in vivo* selon la présence de candidose orale pseudomembraneuse (Naglik et coll. 1999) ou d'infection mucoale ou systémique (Schaller et coll. 1999). L'ensemble des études semble donc avancer qu'il existe des différences d'expression de protéinases aspartiques spécifiques aux souches de *C. albicans*.

L'évaluation de l'expression des protéinases aspartiques des 21 isolats cliniques de *C. albicans* a été effectuée dans deux conditions de culture différentes, soit en aérobiose et en anaérobiose. Le biofilm prothétique *in vivo* est un environnement extrêmement diversifié quant aux conditions environnementales présentes; des microorganismes aérobies, facultatifs et anaérobies sont fréquemment isolés (Koopmans et coll. 1988, Theilade et coll. 1988, Gusberty et coll. 1985, Theilade et coll. 1983). L'étude de Koopmans et coll. (1988) a

même démontré une augmentation des microorganismes anaérobies stricts isolés chez les prothèses de patients atteints de stomatite prothétique comparativement aux prothèses de sujets sains. De plus, la phagocytose et la destruction de *C. albicans* par les polymorphonucléaires (PMN) et les monocytes du système immunitaire, s'effectue moins efficacement en conditions d'anaérobiose que d'aérobiose (Thompson et coll. 1992). Conséquemment, si *C. albicans* est présent dans un microenvironnement anaérobie, tel que l'intrados d'une prothèse, le pouvoir anti-fongique de ces cellules de défense est limité et l'infection est alors possiblement exacerbée (Thompson et coll. 1992). Il nous a alors semblé pertinent d'évaluer l'expression des *SAPs* de *C. albicans* en conditions d'anaérobiose considérant les différentes microniches environnementales présentes au sein du biofilm prothétique. Cette étude est la première, au meilleur de notre connaissance, réalisée sur l'expression *in vitro* de protéinases aspartiques de *C. albicans* en conditions d'anaérobiose.

Avant d'entreprendre l'exécution de *RT-PCR* pour évaluer l'expression en aérobiose et anaérobiose des protéinases aspartiques de souches cliniques de *C. albicans*, nous avons jugé nécessaire de mettre en évidence l'hétérogénéité des souches cliniques de *C. albicans*. La vérification de la diversité des souches cliniques de *C. albicans* a été une étape expérimentale essentielle afin de nous assurer que les résultats d'expériences subséquentes découleraient de souches différentes de *C. albicans* et non pas de clones de la même souche. Afin de combler cet objectif, nous avons premièrement mis au point et deuxièmement exécuté un *AP-PCR*. Plusieurs amorces arbitraires ont été testées afin d'évaluer leur pouvoir discriminatoire et les amorces arbitraires OPA-03 et 910-25 ont été choisies pour leur capacité de générer des fragments permettant la distinction entre deux souches différentes de *C. albicans*. A l'aide de cette paire d'amorces, les souches cliniques isolées de plaques prothétiques saines et pathologiques ont été testées afin de s'assurer que les résultats d'expériences subséquentes ne découleraient pas de souches identiques. Selon les résultats présentés aux Tableaux XXI et XXIV obtenus par *AP-PCR*, nous notons qu'un minimum de 50% (5/10) et de 72.7% (8/11) des souches isolées de plaques prothétiques saines et pathologiques respectivement, ont généré des profils distincts. Le coefficient de similarité a été calculé selon Dice (Sneath et coll. 1973), une formule de comparaison

souvent employée pour évaluer le degré de similarité génétique dans des études relationnelles. L'élaboration d'un dendrogramme ne s'est pas avéré nécessaire car le but de cette expérience n'a pas été de faire une étude relationnelle mais bien de s'assurer de la diversité des souches cliniques isolées afin de pouvoir pertinemment discuter des résultats.

Tenant compte du fait que le but ultime du travail de recherche a été d'examiner les variations des profils d'expression des protéinases aspartiques, il a été primordial de procéder à une observation microscopique de l'état morphologique des cellules préalablement à l'isolation d'ARN total et le *RT-PCR* subséquent. Nous avons considéré cette étape essentielle car selon la littérature, l'expression des protéinases aspartiques est souvent en fonction du morphotype de *C. albicans*. Par exemple, Hube et coll. (1994) a démontré que l'expression des gènes *SAP4-SAP5-SAP6*, était influencé par la transition blastospore-hyphes tandis que les transcrits du gène *SAP2* (Hube et coll. 1994), *SAP8* et *SAP9* (Monod et coll.1998) ne sont présents que lorsque les cellules de *C. albicans* sont sous la forme blastospore. Aussi, Beauséjour et coll. (1998) ont démontré que la forme blastospore ainsi que la forme hyphes étaient responsables du clivage de la pro-IL-1 β en fragment de taille comparable à l'IL-1 β biologiquement active.

Tel que décrit à la section 3.0 des résultats, la totalité des souches cultivées 24 heures en aérobiose étaient uniquement sous la forme blastospore, à l'exception de la souche *C. albicans* 19 chez laquelle il y avait présence d'une faible quantité de pseudohyphes et chez *C. albicans* 23 pour laquelle nous avons remarqué la présence d'hyphes et de pseudohyphes. Cependant, pour la totalité des 21 souches cultivées 48 heures en anaérobiose, des blastospores ainsi que des hyphes étaient présents, en proportion différente pour chacune des souches. Il s'agit d'une différence intéressante entre les deux conditions de culture. Nous savons que la transition de blastospore à hyphes est un processus stimulé par différents facteurs environnementaux tel que la température et le pH ainsi que par la présence de substances telles que le sérum (Berardinelli et coll. 1985, Holmes et coll. 1987). Normalement nous observons cette transition à des températures supérieures à 33°C, car des températures inférieures sont propices à la formation de blastospores (L.P. Samaranayake et coll. 1990). Cependant, nos observations des souches

ont été effectuées suivant une incubation de 24 heures en aérobiose et de 48 heures en anaérobiose à une température de 25°C. Les conditions de cultures étant identiques dans les deux conditions de culture, soit en aérobiose et en anaérobiose, il découle que la présence d'une atmosphère d'anaérobiose est un facteur hautement favorable à la transition blastospore-hyphe. Notre hypothèse vient appuyer les résultats obtenus par Webster et coll. (1986), Kaminishi et coll. (1994) et Dahle et coll. (1991) qui avaient démontré la présence de mycélium chez *C. albicans* en conditions d'anaérobiose et cela sur différents milieux et à différentes températures de culture. Malheureusement, rares sont les chercheurs qui se sont attardés sur l'étude de *C. albicans* en conditions d'anaérobiose, même que certaines études antérieures ont reporté que *C. albicans* était dans l'impossibilité de croître en anaérobiose (Montplaisir 1976).

D'importantes variations ont été observées quant au rapport de blastospores-hyphes en conditions d'anaérobiose entre les deux groupes des souches cliniques, soit le groupe de souches isolées de plaques prothétiques saines et le groupe de souches isolées de plaques prothétiques pathologiques. Selon le test de comparaison de Mann-Whitney *U* il y a une différence significative entre les rapports des deux groupes de souches cultivées en anaérobiose ($P = 0.0265$). Une plus grande proportion d'hyphes a plus fréquemment été observée pour les souches cliniques isolées de plaques prothétiques pathologiques que pour les souches isolées de plaques prothétiques saines. Nos résultats démontrent alors que les souches isolées de plaques prothétiques pathologiques avaient une tendance de transition blastospores-hyphes plus fréquente. Cette observation vient appuyer les études de Butdz-Jorgensen et coll. (1975) et de Davenport (1970) qui ont mis en évidence une fréquence plus élevée du morphotype hyphe de *C. albicans* chez les patients atteints de stomatite prothétique. La forme hyphe a souvent été rapportée comme étant un morphotype associé au potentiel pathogénique de *C. albicans* de par sa capacité accrue d'adhérence (Kimura et coll. 1980, Samanarayake et coll. 1982, Sandin et coll. 1982) et son potentiel invasif (Sobel et coll. 1984, Phan et coll. 2000). Le pouvoir accru de formation d'hyphes serait donc une caractéristique des souches cliniques de *C. albicans* isolées de patients atteints de stomatite prothétique.

Nous avons également jugé nécessaire de déterminer le temps de génération des souches cliniques de *C. albicans*. Cette étape a été importante car l'expression des *SAPs* est souvent en fonction de la phase de croissance (Hube et coll. 1994, Monod et coll.1998) et donc nous voulions nous assurer que les souches cliniques de *C. albicans* n'avaient pas des temps de génération variables. Nos résultats ont donc confirmé l'absence de variabilité significative entre les temps de génération des deux groupes de souches cliniques de *C. albicans*. Selon le test de comparaison de Mann-Whitney *U* il n'y a pas de différence significative entre les temps de génération des deux groupes de souches ($P=0.0783$).

Une fois l'hétérogénéité et l'état morphologique des souches confirmé, le *RT-PCR* a été employé afin de détecter les transcrits des protéinases aspartiques des 21 souches cliniques de *C. albicans* cultivées en aérobiose et anaérobiose. Dans le cadre de cette étude, le *RT-PCR* n'a pas été effectué de manière quantitative mais qualitative. Notre but n'a pas été de quantifier le niveau d'expression des différentes protéinases aspartiques mais bien de démontrer leur présence ou absence. Le *RT-PCR*, une technique de biologie moléculaire permettant la détection d'ARN messagers, a été mise au point afin d'obtenir une sensibilité de 5ng. Pour la détection de transcrits de protéinases aspartiques *in vitro*, cette sensibilité a été suffisante car nous n'étions pas limités par la quantité d'ARN total.

En conditions de culture d'aérobiose ainsi que d'anaérobiose, nous avons détecté pour la totalité des 21 souches, les transcrits des gènes *SAP2* et *SAP4-6*. Il est important de noter qu'il s'agit de la première étude qui met en évidence la présence de protéinases aspartiques en conditions d'anaérobiose. La détection du transcrit *SAP2* chez la totalité des souches cliniques est un résultat conforme à la littérature car plusieurs études affirment qu'il s'agit du transcrit de protéinase aspartique le plus abondamment détecté (Hube et coll.1994). Nos résultats appuient ceux obtenus par Naglik et coll. (1999) qui ont démontré que les transcrits des gènes *SAP2* et *SAP4-6* étaient les protéinases aspartiques détectés *in vivo* de manière prédominante chez des sujets sains porteurs de *C. albicans* et des patients atteints de candidose orale pseudomembraneuse. Des études récentes ont réussi à démontrer un rôle pour *SAP2* durant les stades tardifs d'infection dans un modèle murin (Staib et coll. 1999, Staib et coll. 2000). En effet, Schaller et coll. (1998) ont détecté par *RT-PCR* la

présence de transcrits de *SAP2 in vivo* chez un patient atteint depuis une année d'une candidose orale, tandis qu'aucun transcrit de *SAP2* n'a été détecté chez un sujet récemment atteint de candidose orale.

La détection des transcrits *SAP4-6* chez l'ensemble de la population des souches cultivées en aérobiose est un résultat très intéressant considérant le fait que les cellules des 21 souches cliniques avant l'isolation d'ARN total étaient sous la forme de blastospores. La plupart des études maintiennent que ces gènes sont généralement induits lors de la transition du morphotype blastospore au morphotype hyphe (Hube et coll. 1994, White et coll.1995). Cependant, une étude récente menée par Staib et coll. (2000) a démontré que l'expression de *SAP5* de *C. albicans* dans un modèle murin d'infection ne corrélait aucunement avec la présence de tubes germinaux ou d'hyphes, tandis que l'expression de *SAP6*, uniquement détecté en présence d'hyphes, pourrait être spécifique à ce morphotype. En guise d'information, répétons que dans le cadre de cette étude, un seul couple d'amorces a été employé pour la détection des transcrits des gènes *SAP4*, *SAP5* et *SAP6*, car ceux-ci partagent un haut degré d'homologie génomique (Schaller et coll.1999). De ce fait, nous étions dans l'impossibilité de distinguer lequel ou lesquels des trois transcrits des gènes *SAP4*, *SAP5* et *SAP6* nous détectons. Il est alors très possible que nos résultats, ainsi que des résultats d'études antérieures, reflètent l'expression d'une seule ou plusieurs protéinases aspartiques du sous-groupe *SAP4*, *SAP5* et *SAP6*.

Les mêmes profils, quant à l'expression *in vitro* des gènes *SAP2* et *SAP4-6* ont été obtenus dans le cas des souches isolées de la plaques prothétiques saines et pathologiques. Ces résultats n'impliquent pas que les protéinases aspartiques *SAP2* et *SAP4-6* ne jouent pas de rôle dans le développement de la stomatite prothétique. Nos résultats supposent seulement que les souches récoltées de patients atteints de stomatite prothétique ne possèdent pas de capacité d'expression qualitativement différente, quant aux gènes *SAP2* et *SAP4-6*, des souches isolées de porteurs de prothèses sains.

Les transcrits des gènes *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* ont été détectés chez la totalité des souches cultivées en conditions d'aérobiose. Tout comme l'expression des gènes *SAP2* et

SAP4-6, il découle de nos résultats qu'il n'existe pas de différence quant à l'expression *in vitro* de protéinases aspartiques entre les 10 souches isolées de plaques prothétiques saines et les 11 souches isolées de plaques prothétiques pathologiques. Il est notable de mentionner que l'expression du gène *SAP7*, récemment détecté plus fréquemment chez des patients atteints de candidose orale que chez des sujets porteurs de *C. albicans* sains (Schaller et coll. 1999), n'avait jamais été détecté dans des conditions *in vitro* (Hube et coll. 1994). Nous remarquons qu'il y a eu une réduction quant au nombre de souches qui expriment des transcrits de *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* en conditions d'anaérobiose par rapport au pourcentage d'expression en aérobiose. Ceci est une différence intéressante considérant le fait qu'en aérobiose, 100% des souches isolées de plaques prothétiques saines et de pathologiques expriment *SAP8* et *SAP9*. Nous savons que l'expression des gènes *SAP8* et *SAP9*, jusqu'à maintenant uniquement détectée en aérobiose, se fait préférentiellement lors de la phase exponentielle et stationnaire, respectivement (Monod 1998). Nous détectons possiblement ces deux transcrits chez moins de souches en anaérobiose car si l'expression de ces deux gènes est effectivement dépendante de la phase, il est possible que l'expression soit réduite en anaérobiose par une vitesse de croissance légèrement inférieure que celle en aérobiose (Webster et coll. 1987). De plus, les systèmes de régulation des gènes *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* demeurent toujours ambigus et donc nous pourrions supposer qu'en anaérobiose l'expression de ces gènes est limitée.

Contrairement aux autres protéinases aspartiques, les transcrits des gènes *SAP1* et *SAP3* ont été détectés uniquement lorsque les cellules étaient cultivées en condition d'aérobiose. Ces deux gènes de protéinases aspartiques sont exprimés lors d'une transition de phase phénotypique chez la souche *C. albicans* WO-1 (White et coll. 1993, Hube et coll. 1994) quoique récemment ils aient été détectés chez une souche n'effectuant pas la commutation du phénotype white à opaque (Staib et coll. 2000).

Les transcrits des gènes *SAP1* et *SAP3* ont été détectés dans des proportions très similaires chez les deux groupes de souches. En anaérobiose, aucun transcrit des gènes *SAP1* et *SAP3* n'a été détecté pour les souches et donc l'expression des gènes a été inhibée chez les 21 souches. On peut avancer comme hypothèse que les mécanismes de régulation

de l'expression de *SAP1* et *SAP3*, soient un ou plusieurs systèmes de commutation phénotypique possiblement dépendants d'un apport d'oxygène, sont silencieux en anaérobiose.

Conséquemment, il découle de nos résultats qu'il n'existe pas de différence quant à l'expression *in vitro* de protéinases aspartiques de *C. albicans* entre les 10 souches isolées sujets sains et les 11 souches isolées de patients atteints de stomatite prothétique stade III, tant en aérobie qu'en anaérobiose. Il est intéressant de mentionner qu'une étude récente (McMullen-Vogel et coll. 1999), n'a pas réussi à démontrer par tests enzymatiques de différence quantitative pour la sécrétion de protéinases aspartiques chez des souches isolées de patients atteints de stomatite prothétique comparativement aux sujets non-porteurs de prothèses. Nous aurions pu nous attendre à obtenir des profils d'expression distincts pour les deux groupes de souches afin de pouvoir possiblement déceler un lien entre la présence de certains transcrits de protéinases aspartiques chez des souches de *C. albicans* isolées de sujets porteurs de prothèses sains et atteints de stomatite prothétique. Cependant, nous avons obtenu des profils d'expression de protéinases aspartiques qualitativement similaires pour les deux groupes de souches de *C. albicans*. Évidemment, nous ne pouvons écarter la possibilité que les protéinases aspartiques de *C. albicans* pourraient effectivement être une composante étiologique de la stomatite prothétique car cette étude effectuée *in vitro* ne reflète pas nécessairement la réalité *in vivo*. Les interactions microbiennes et les conditions écologiques variables qui existent *in vivo* peuvent difficilement être reproduites *in vitro* car le biofilm prothétique *in vivo* est un micro-environnement hautement complexe et diversifié (Theilade et coll. 1988).

2.0 Détection *in vivo* de transcrits de protéinases aspartiques de *C. albicans*.

Dans ce second volet d'expérimentation, nous visions ultimement la détection *in situ* d'ARN messagers des gènes de protéinases aspartiques de *C. albicans* dans des échantillons de plaque prothétique récoltés *in vivo*. Aucune étude n'a été effectuée jusqu'à présent sur la détection *in situ* des protéinases aspartiques de *C. albicans* dans la plaque prothétique, quoiqu'une étude a réussi à détecter *in situ* des protéinases aspartiques dans des échantillons de levures récoltés chez des patients atteints de candidose orale pseudomembraneuse (Naglik et coll. 1999).

Plusieurs défis ont dû être surmontés avant d'entreprendre la détection des protéinases aspartiques *in situ*. En effet, un premier objectif a été d'optimiser une méthode de détection douée d'une sensibilité maximale afin de permettre la détection de transcrits rares ou présents en infime quantité. Si on se fie aux résultats présentés aux Figures 13 et 14, on peut conclure que le premier objectif a été atteint. La technique d'isolation d'ARN total et de nested *RT-PCR* qui a été laborieusement mise au point a permis la détection de 100 cellules de *C. albicans* ou de 10 fentogrammes d'ARN total. La sensibilité de notre technique est comparable à d'autres méthodes déjà décrites. Notre méthode est facilement applicable à la détection d'autres transcrits ou, en omettant l'étape de transcription inverse, à la détection de gènes.

Un essai de détection d'ARN messagers des gènes de protéinases aspartiques de *C. albicans* a été effectué dans deux des échantillons de plaque prothétique récoltés *in vivo* de sujets porteurs de prothèses sains et atteints de stomatite prothétique. Toutefois, la détection *in situ* par nested *RT-PCR* de *SAP2* ainsi que du gène contrôle *EFB1* n'a résulté en aucun produit détectable. Quoique nous n'ayons pas pu détecter les transcrits du gène de la protéinase aspartique *SAP2* ni du gène contrôle *EFB1*, les contrôles de *RT-PCR* nécessaires ont toutefois été effectués avec succès. Les résultats des ensemencements sur milieu Sabouraud et sur milieu CHROMagar ont mis en évidence deux faits qui expliquent ce résultat : l'échantillon du PATIENT 20 n'avait pas de levures cultivables détectables tandis que la totalité des levures présentes dans l'échantillon du PATIENT 21 n'étaient pas des

cellules de *C. albicans* mais fort possiblement du *C. glabrata*. Un *PCR* subséquent a confirmé que les amorces du gène contrôle *EFBI* de *C. albicans*, reconnaissaient le génome de *C. glabrata*. De ce fait, nous aurions théoriquement du obtenir un résultat positif pour la détection du transcrit du gène *EFBI* chez l'échantillon du PATIENT 21 considérant le fait que l'échantillon possédait approximativement 40 000 CFU de levures, quantité nettement supérieure à notre limite de détection. Deux explications sont possibles : Les échantillons congelés à -80°C se trouvaient en notre possession depuis approximativement une année. Malgré le fait que les échantillons aient été congelés dans l'azote liquide immédiatement suivant la collecte, la dégradation des ARNm était possible. De plus, les échantillons de plaque étant obtenus en délogeant le biofilm prothétique par ultrasons, la probabilité d'avoir des molécules inhibitrices pour le *RT-PCR* était aussi à envisager.

Quoique cette tentative de détection *in situ* de protéinases aspartiques de *C. albicans* n'a pas été un succès, il importe de réaliser que nous avons mis au point une méthode de détection très sensible et rapide qui pourrait être appliquée à d'autres fins expérimentales. Cependant pour des raisons possiblement hors de notre contrôle, telle que la dégradation de l'ARN, la présence d'inhibiteurs de *RT-PCR* ou l'absence de levures dans l'échantillon de départ, nous n'avons pas réussi à détecter des protéinases aspartiques de *C. albicans in situ*.

Une deuxième tentative de détection *in vivo* des protéinases aspartiques de *C. albicans* a été effectuée sur un échantillon frais de biofilm prothétique isolé d'une prothèse d'un patient atteint d'une stomatite stade I. Les deux expériences effectuées *in situ* diffèrent selon quatre points importants : la quantité de levure présente dans l'échantillon étant appréciable un *RT-PCR* a été exécuté et non pas un *nested RT-PCR* ; l'ARNm et non pas l'ARN total a été isolé ; l'échantillon de plaque a été traité immédiatement suivant la collecte et n'a pas été congelé. Nous avons réussi à détecter les transcrits du gène contrôle *EFBI* chez l'échantillon de plaque *in vivo*. Toutefois, aucun produit de réaction n'a été obtenu pour les transcrits des gènes *SAP1*, *SAP2* et *SAP3*. Étant donné que nous avons obtenu un résultat positif quant à la présence du gène contrôle *EFBI*, nous sommes en mesure d'avancer comme hypothèse que l'absence de produit de *RT-PCR* pour les protéinases aspartiques *SAP1*, *SAP2* et *SAP3* signifie fort probablement que ces transcrits

étaient absents dans la plaque prothétique prélevée *in vivo*. Considérant le fait que notre expérience a été effectuée chez un seul patient, il serait déraisonnable de déduire que les protéinases aspartiques *SAP1*, *SAP2* et *SAP3* ne seraient pas impliqués au niveau de la stomatite prothétique. Il a déjà été démontré que les gènes *SAP1*, *SAP2* et *SAP3* contribuent au potentiel virulent de *C. albicans* (Hube et coll. 1997, DeBernardis et coll. 1995) et récemment ces transcrits ont été détectés par *RT-PCR in vivo* chez des patients atteints de candidose orale (Schaller et coll. 1999). Il serait donc intéressant d'envisager répéter cette expérience dans le futur avec un plus grand échantillon de sujets.

Dans le cadre de l'étude sur la détection *in situ* de transcrits de protéinases aspartiques de *C. albicans* un milieu de culture (voir Figure 14) a été élaboré dans le but de pouvoir différencier *C. albicans* de *C. dubliniensis*. Ce milieu de culture a été créé dans l'éventualité que l'identification des différentes espèces de *Candida sp.* présentes dans les échantillons de plaque prothétique ait été nécessaire. L'identification des autres espèces de *Candida sp.*, telle que *Candida tropicalis* ou *Candida glabrata*, n'est aucunement problématique car plusieurs différences métaboliques les différencient. Toutefois, *C. dubliniensis* est une levure pathogène génétiquement proche de *C. albicans* ce qui rend son identification plus difficile (Pinjon et coll. 1998). Quoique le milieu de différenciation n'ait pas été utilisé dans le cadre de cette étude, il représente un outil d'identification intéressant car il est à la fois nouveau, simple, très rapide et économique.

En guise de conclusion, répétons que nous avons réussi à mettre au point des techniques de détection de transcrits *in vitro* et *in situ*, rapides et sensibles. Suite à la détection de transcrits de protéinases aspartiques de *C. albicans* nous concluons qu'il n'existe pas de différence quant à l'expression *in vitro* de protéinases aspartiques entre les 10 souches isolées de sujets sains et les 11 souches isolées de patients atteints de stomatite prothétique stade III, tant en aérobiose qu'en anaérobiose. Nous n'avons donc pas établi de relation entre les profils de protéinases aspartiques générés *in vitro* et l'origine des souches cliniques de *C. albicans*.

Il est notable de mentionner que nous avons obtenu plusieurs résultats originaux. Cette étude est la première à mettre en évidence par *RT-PCR* l'expression des protéinases aspartiques *SAP2*, *SAP4-6*, *SAP7*, *SAP8* et *SAP9* de *C. albicans* dans des conditions de culture d'anaérobiose. La détection du transcrit de la protéinase aspartique *SAP7*, jusqu'à aujourd'hui détecté uniquement *in vivo*, a été pour la première fois mis en évidence dans des conditions *in vitro*. Mentionnons également que cette étude vient solidement appuyer les rares publications qui soutiennent depuis longtemps que *C. albicans* est un microorganisme capable de croissance en conditions d'anaérobiose.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

Abad-Zapatero C, Goldman R, Muchmore SW, Hutchins C, Oie T, Stewart K, Cutfield SM, Cutfield JF, Foundling SI, Ray TL. Structure of secreted aspartic proteinases from *Candida*. Implications for the design of antifungal agents. *Adv Exp Med Biol*. 1998;436:297-313. Review.

Anderson JM, Soll DR. Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*. 1987;169(12):5579-88.

Arrendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *British Dental Journal* 1979;147:267-272.

Arrendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1987;14(3):217-27.

Bakerspigel A, Burke S. A possible function of the chlamydospores of *Candida albicans*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 1974;54(1):147-52.

Banerjee A, Ganesen K, Datta A. Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *Journal of general microbiology*. 1991;137:2455-2461.

Beauséjour et coll. Proteolytic activation of the interleukin 1-beta precursor by *C. albicans*. *Infection and Immunity*. 1998; 66(2):676-681.

Berardinelli S, Opheim DJ. New germ tube induction medium for the identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985;22(5):861-2.

Borg-von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol Microbiol.* 1998 May;28(3):543-54.

Bradway SD, Bergey EJ, Scannapieco FA, Ramasubbu N, Zawacki S. Formation of salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase *Biochemical Journal.* 1992 Jun 1;284 (Pt 2):557-64,.

Brunello DL, Mandikos MUNICIPALE. Construction faults, age, gender and relative medical health : Factors associated with complaints in complete denture patients. *Journal of Prosthet. Dent.* 1998;79: 545-554.

Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dentistry & Oral Epidemiology.* 2000 Apr ;28(2):141-9.

Budtz-Jorgensen E et coll. Oral candidosis in long-term hospital care : comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral diseases* 1996;2:285-290.

Budtz-Jorgensen E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *Journal of Oral Pathology.* 1981 Apr; 10(2):65-80,.

Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 1975;3:115-119.

Budtz-Jorgensen E. Denture stomatitis. 3. Histopathology of trauma- and candida-induced inflammatory lesions of the palatal mucosa. *Acta Odontol Scand.* 1970 Nov;28(5):551-79.

Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 1999;10(3):359-83.

Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis.* 1999 Aug;180(2):448-53.

Chaffin W et coll. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans* : Identification, Function and Expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1998;62(1):130-180.

Channon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Med.* 1999;10(3):353-383.

Collina et coll. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *C. albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infection and Immunity.* 1996;64(11):4514-4519.

Cumming CG et coll. Denture stomatitis in the elderly. *Oral Microbiol Immunol.* 1990;5:82-85.

Cutler JE. Brawner DL. Hazen KC. Jutila MA. Characteristics of *Candida albicans* adherence to mouse tissues. *Infection & Immunity.* 1990 Jun;58(6):1902-8.

Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1991;45 :187-218.

Dahle UR, Olsen I. Anaerobiosis and serum promote mycelium formation by *Candida albicans* in colonies on TSBV agar. *Acta Odontol Scand.* 1991;49:41-45.

Davenport JC. The oral distribution of candida in denture stomatitis. *Br Dent J.* 1970 Aug 18;129(4):151-6.

De Bernardis F, Boccanera M, Adriani D, Spreghini E, Santoni G, Cassone A. Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun*. 1997 Aug;65(8):3399-405.

De Bernardis F, Cassone A, Sturtevant J, Calderone R. Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. *Infect Immun*. 1995 May;63(5):1887-92.

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 Feb;64(2):466-71.

Dorey JL, Blasberg B, MacEntee MI. Oral mucosal in denture wearers. *J Prosthet Dent*. 1985;53: 210-213.

Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin-dependant diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol. Med*. 1996 25; 411-415.

Edgerton M et coll. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infection and Immunity* 1993 61(6) : 2644-2652.

Edgerton M, Levine MJ. Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent*. 1992;68 :693-691.

El-Azizi M, Khardori N. Factors influencing adherence of *Candida* spp. To host tissues and plastic surfaces. *Indian Journal of experimental Biology*. 1999 October;37: 941-951.

El-Azizi M et coll. Factors influencing adherence of *Candida albicans*, paper presented to the 98th general meeting of American Society for Microbiology, Atlanta, Georgia, 17-21, May 1998.

Eliasson L et coll. The predominant microflora of the palatal mucosa in an elderly island population. *Acta Odontol Scand.* 1992;50:163-169.

Ellepola AN, Samaranayake LP. The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *Candida albicans*. *J Oral Pathol Med.* 1998a May;27(5):213-9.

Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of oral *C. albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch Oral Biol.* 1998b (43) :999-1007.

Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E, Tamburini P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun.* 1997 Feb;65(2):551-6.

Fidel et coll. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews.* 1999 Jan;12(1): 80-96

Fletcher M. Bacterial adherence receptors and recognition, EH Beachy (Chapman and Hall, London), 1980.

Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med.* 1998; 338 (18):1281-1292.

Galgoczy J. Daroczy J. Simon G. The chlamyospore of *Candida albicans*. *Mycoses.* 1988 Oct;31(10):515-22.

Ganesen K, Banerjee A, Datta A. Molecular cloning of the secretory acid proteinase gene from *C. albicans* and its uses as a species-specific probe. *Infection and Immunity.* Sept. 1991; 59(9): 2972-2977.

Girard B, Landry RG, Giasson L La stomatite prothétique : étiologie et considérations cliniques. *Clinique Oct.* 1996;62(10) : 808-812.

Guggenheimer J et coll. Insulin-dependant diabetes mellitus and oral pathologies. Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod. 2000;89:570-576.

Gusberti FA et coll. Cultivable microflora of plaque from full denture bases and adjacent palatal mucosa. Jour. Biol. Buccale 1985;13:227-236.

Hoegl L, Ollert M, Korting HC. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. J Mol Med. 1996 Mar;74(3):135-42. Review.

Holmes AR, Cannon RD, Jenkinson HF. Intercations of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. Journal of Industrial Microbiology. 1995a;15 :208-213.

Holmes AR, Gopal PK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharid recpetor on *Streptococcus gordonii*. Infection and Immunity. 1995b;63(5) :1827-1834.

Holmes AR, McNab R, Jenkinson HF. *Candida albicans* binfing to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin-receptor interactions. Infection and Immunity. 1996;64(11) :4680-4685.

Holmes AR, Shepherd MG. Proline-induced germ-tube formation in *Candida albicans* : role of proline uptake and nitrogen metabolism. Journal of General Microbiology 1987;133 :3219-3228.

Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Monod M, Schafer W, Brown AJ, Gow NA. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. Infect Immun. 1997 Sep;65(9):3529-38.

Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol*. 1996 Dec;7(1):55-69. Review. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 1994 Oct;14(1):87-99.

Ibrahim AS, Filler SG, Sanglard D, Edwards JE Jr, Hube B. Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):3003-5.

Imai Y, Tamaki Y. Measurement of adsorption of salivary proteins onto soft denture lining materials. *J Prosthet Dent*. 1999 Sep;82(3):348-51.

Jeganathan S, Payne JA, Thean HPY. Denture stomatitis in an elderly edentulous Asian population. *Journal of Oral Rehabilitation* 1997;24 :468-472.

Jennings KJ, MacDonald DG. Histological, microbiological and haematological investigations in denture-induced stomatitis. *J. Dent*. 1990;18:102-106.

Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. *Infection & Immunity*. 1990 May;58(5):1429-36.

Kaminishi H et coll. Spiral hyphae of *Candida albicans* formed in anaerobic culture. *Mycoses* 1994;37:349-352.

Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H, Hagihara Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun*. 1995 Mar;63(3):984-8.

Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun.* 1980 May;28(2):464-8.

King RD. Lee JC. Morris AL. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infection & Immunity.* 1980 Feb ;27(2):667-74.

Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun.* 1985 Oct;50(1):97-101.

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 Aug;43(8):2038-42.

Kuc IM, Samaranayake LP, van Heyst EN. Oral health and microflora in an institutionalised elderly population in Canada. *International Dental Journal* 1999;49:33-40.

Kulak Y. Arikian A. Kazazoglu E. Department of Prosthetic Dentistry, Faculty of Dentistry, Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *Journal of Oral Rehabilitation.* 1997 Oct.; 24(10):788-90.

Lacasse et coll. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiological and histological aspects. *J Oral Pathol Med.* 1990;19:136-141.

Little JW. A retrospective study of microbiologic samples from oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;53(3):250-255.

Lodder J. *The Yeasts; A taxonomic study*, Amsterdam: Noth Holland, 1970.

Lucas VS. Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1993;21:313-316.

Makila E. Hopsu-Havu VK. Mycotic growth and soft denture lining materials. *Acta Odontologica Scandinavica.* 1977;35(4):197-205.

Macura AB. Tondyra E, Influence of some carbohydrates and concanavalin A on the adherence of *Candida albicans* in vitro to buccal epithelial cells *Zentralblatt für Bakteriologie.* 1989 Dec.;272(2):196-201.

McCourtie J. Douglas LJ. Extracellular polymer of *Candida albicans*: isolation, analysis and role in adhesion. *Journal of General Microbiology.* 131 (Pt 3):495-503, 1985 Mar.

McCourtie J, Douglas JL. Relationship between cell surface composition, adherence and virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity.* 1984 ;45 (1)32: 6-12.

McCourtie J, Douglas JL. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infection and Immunity.* 1981;32:1243-1241.

McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans* : a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence, attributes and methods of differentiation. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1996;25:136-144.

McEntee MI, Glick N, Stolar E. Age, gender, dentures and oral mucosal disorders. *Oral diseases* 1998;4:32-36.

McMullan-Vogel CG, Jude HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1999 Jun;14(3):183-9.

Meyer SA, Ahearn DG, Yarrow DG. The genus *Candida* Berkhout. In : The Yeasts: A taxonomy study. Amsterdam, Elsevier. pp.585-844.

Mikkonen M et coll. Oral Hygiene, dental visits and age of denture for prevalence of denture stomatis. Community Dent Oral Epidemiol 1984;12:402-405.

Monod M, Borg-von Zepelin M, Telenti A, Sanglard D. The inhibition of *Candida-albicans*-secreted aspartic proteases by three different HIV protease inhibitors. Dermatology. 1999;198(4):412-4.

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 Oct;144 (Pt 10):2731-7.

Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. Mol Microbiol. 1994 Jul;13(2):357-68.

Morschhauser J, Virkola R, Korhonen TK, Hacker J. Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett. 1997 Aug 15;153(2):349-55.

Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, Sweet SP, Challacombe SJ, Agabian N. *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. Infect Immun. 1999 May;67(5):2482-90.

Narhi TO, Ainamo A, Meurman JH. Salivary yeasts, saliva, and oral mucosa in the elderly. J Dent Res 1993 Jun;72(6):1009-14.

Negi M, Tsuboi R, Matsui T, Ogawa H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. J Invest Dermatol. 1984 Jul;83(1):32-6.

Newport G, Agabian N. KEX2 influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. J Biol Chem. 1997 Nov 14;272(46):28954-61.

Newton AV. Denture sore mouth. British Dental Journal, 112, 357-360.

Nikawa H. Effect of serum concentrations on *Candida albicans* biofilm formation on acrylic surfaces. Mycoses. 2000;43:139-143.

Nikawa H, Yamamoto T, Hamada T. Effect of components of resilient denture-lining materials on the growth, acid production and colonization of *Candida albicans*. Journal of Oral Rehabilitation. 1995;22:817-824.

Nyquist G. A study of denture sore mouth. An investigation of traumatic, allergic and toxic lesions of the oral mucosa arising from the use of full dentures. Acta Odont Scand. 1952;10:Suppl 9:11-14.

O'Sullivan JM et coll. Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptors for *Candida albicans* adhesion. Microbiology 1997;143:341-348.

Odds FC. *Candida and Candidosis*. London Baillière Tindall. 1988.

Öhman SC et coll. The prevalence of *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* species, and *Candida* species and their relation to oral mucosal lesions in a group of 79-year-olds in Göteborg. Acta Odontol Scand. 1995;53:49-54.

Oral Medicine: Diagnosis and Treatment. Eight Edition. J.B. Lippincott company. 1984

Olsen I, Birkeland JM. Assessment of denture plaque pH in subjects with and without denture stomatitis. Scand J Dent Res. 1975 Nov;83(6):370-4.

Olsen I. Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol Scand.* 1974;32(5):329-33.

Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990;48:71-74.

Palmer RJ Jr. White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology.* 1997 Nov.;5(11):435-40.

Phan QT. Belanger PH. Filler SG. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infection & Immunity.* 2000 Jun.;68(6):3485-90.

Pichova I, Brozkova K, Pavlickova L, Fusek M, Krizova I, Ruml T, Soucek M. Development and testing of inhibitors of *Candida* aspartic proteinases. *Adv Exp Med Biol.* 1998;436:329-33.

Pietruski JK. Pietruska MD. Jablonska E. Sacha P. Zaremba M. Stokowska W. Interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and their soluble receptors in the blood serum of patients with denture stomatitis and fungal infection. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* 2000;48(2):101-5.

Pinjon E. Sullivan D. Salkin I. Shanley D. Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998 Jul;36(7):2093-5.

Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of phenotypically switched *Candida albicans* to denture base materials. *Int J Prosthodont.* 1998 Jan-Feb;11(1):75-81.

Radford DR. Challacombe SJ. Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 1999;10(1):99-116.

Renner RP, Lee M, Andors L, McNamara TF, Brook S. The role of *C. albicans* in denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1979 Apr;47(4):323-8.

Ritchie GM, Fletcher AM, Main DM, Prophet AS. The etiology, exfoliative cytology, and treatment of denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1969 Aug;22(2):185-200.

Rotrosen D, Calderone RA, Edwards JE Jr. Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. *Reviews of infectious diseases.* 1986;8(1):73-85.

Ruchel R. Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1981 May 14;659(1):99-113.

Ruchel R, Boning B, Borg M. Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection in vitro. *Infect Immun.* 1986 Aug;53(2):411-9.

Ruiz-Herrera J et coll. Structural organization of the components of the cell wall from *Candida albicans*. *Microbiology* 1994;140:1513-1523.

Sakki TK, Knuutila MLE, Laara E, Anttila S. The association of yeasts and dentures stomatitis with behavioral and biological factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1997, 84 (6):624-629.

Samaranayake LP, MacFarlane TW. An *in vitro* study of the adherence of *C. albicans* to acrylic surfaces. *Archives of oral biology* 1980;25:603-609.

Samaranayake LP, MacFarlane TW. Factors affecting the *in vitro* adherence of the fungal oral pathogen *C. albicans* to epithelial cells of human origin. *Arch. Oral Biol.* 1982;27: 869-873.

Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the *in vitro* adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. Arch. Oral Biol. 1980;25:611-615

Samaranayake LP, Wilkieson CA, MacFarlane TW. Oral diseases in the elderly in long-term hospital care. Oral diseases. 1995;1:141-151.

Sandin RL et coll. Evidence for mannose-mediated adherence of *Candida albicans* to human buccal cells *in vitro*. Infection and Immunity. 1982;35(1):79-85.

Sanglard D, Hube B, Monod M, Odds FC, Gow NA. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. Infect Immun. 1997 Sep;65(9):3539-46.

Schaller M, Korting HC, Schafer W, Bastert J, Chen W, Hube B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. Mol Microbiol. 1999 Oct;34(1):169-80.

Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E, Hube B. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. J Invest Dermatol. 2000 Apr;114(4):712-7.

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 Jul;29(2):605-15.

Shepard MG. Cell envelope of *Candida albicans*. CRC Critical reviews in microbiology, 15, pp7-25, 1987.

Schreiber B. Lyman CA. Gurevich J. Needham CA. Proteolytic activity of *Candida albicans* and other yeasts. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease. 1985 Jan.;3(1):1-5.

Smolenski G, Sullivan PA, Cutfield SM, Cutfield JF. Analysis of secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes. *Microbiology*. 1997 Feb;143 (Pt 2):349-56.

Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy, the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco, Calif.

Sobel JD. Muller G. Buckley HR. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infection & Immunity*. 1984 Jun; 44(3):576-80.

Soll DR. High-frequency switching in *C. albicans*. *Clin. Micro. Rev. Par.* 1992a 5(2): 183-203.

Soll DR, Anderson J, Bergen M. The developmental biology of the white-opaque transition in *Candida albicans*. *Clin.Microbiol.Rev.* 1992b; 5:183-203.

Spotl L. Most J. Dierich MP. Ca ions stabilize the binding of complement factor iC3b to the pseudohyphal form of *Candida albicans*. *Infection & Immunity*. 1994 Mar;62(3):1125-7.

Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhauser J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 23;97(11):6102-7.

Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Kohler G, Michel S, Hof H, Hacker J, Morschhauser J. Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol Microbiol*. 1999 May;32(3):533-46.

Staib P. Morschhauser J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 42(9-10):521-4, 1999.

Szawatkowski M, Hamilton-Miller JMT. Anaerobic growth and sensitivity of *Candida albicans*. Microbios Letters, 1978;5:61-66.

Theilade E, Budtz-Jorgensen E. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with denture-induced stomatitis. Oral Microbiol Immunol 1988;3:8-13.

Theilade E, Budtz-Jorgensen E, Theilade J. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with healthy oral mucosa. Archs Oral Biol. 1983;28(8):675-680.

Vassilas A et coll. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture *in vitro*. Arch. Oral Biol. 1992 37(8) : 613-622.

Vigild M. Oral mucosal lesions among institutionalized elderly in Denmark. Community Dent Oral Epidemiol. 1987;15:309-313.

Waters MG, Williams DW, Jagger RG, Lewis MA. Adherence of *Candida albicans* to experimental denture soft lining materials. J Prosthet Dent. 1997 Mar;77(3):306-12.

Watts HJ, Cheah FS, Hube B, Sanglard D, Gow NA. Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. FEMS Microbiol Lett. 1998 Feb 1;159(1):129-35.

Webster CE, Odds FC. Growth of pathogenic *Candida* isolates anaerobically and under elevated concentrations of CO₂ in air. Journal of Medical & Veterinary Mycology. 1987 Feb.;25(1):47-53.

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 Sep;177(18):5215-21.

White TC, Miyasaki SH, Agabian N. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. J Bacteriol. 1993 Oct;175(19):6126-33.

Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. British Dental Journal 1998;185:380-384.

Wright PS, Clark P, Hardie JM. The prevalence and significance of yeasts in persons wearing complete dentures with soft-lining materials. J Dent Res. 1985 Feb;64(2):122-5.

Wu T, Samaranayake LP, Leung WK, Sullivan PA. Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme. J Med Microbiol. 1999 Aug;48(8):721-30.

Zain RB, Razak IA. Association between cigarette smoking and prevalence of oral mucosal lesions among Malaysian army personnel. Community Dent Oral Epidemiol. 1989;17:148-149.