

Université de Montréal

**Caractérisation génétique, phénotypique et formation de biofilm des
souches de *Candida albicans* répondant ou non au farnésol**

par

Cristina Irimes

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en Microbiologie et Immunologie

Décembre, 2010

©, Cristina Irimes, 2010

IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation génétique, phénotypique et formation de biofilm des souches de *Candida albicans* répondant ou non au farnésol

présenté par :
Cristina Irimes

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Pierre Belhumeur
président-rapporteur

Docteur Jean Barbeau
directeur de recherche

Docteur Stéphane Roy
codirecteur

Docteur Marc C. Lavoie
membre du jury

RÉSUMÉ

Candida albicans, le pathogène opportuniste le plus commun, peut subir des transitions morphologiques entre la forme levure et la forme hyphe, jouant un rôle dans la formation de biofilm. Le farnésol, un lipide endogène produit par *C. albicans*, est une molécule de *quorum sensing* qui inhibe cette transition morphologique. Certaines souches ne répondent pas au farnésol et nous avons vérifié les hypothèses que : 1) l'isolat clinique SC5314, la souche la mieux caractérisée, est un répondeur au farnésol; 2) la germination, la croissance et la formation de biofilm des non répondeurs diffèrent des répondeurs; 3) l'absence de la réponse au farnésol se manifeste en dehors de conditions de culture précises; 4) le farnésol agit via un récepteur nucléaire qui présente des altérations chez les non répondeurs; 5) la différence de la réponse au farnésol entre les souches s'explique par des variations au niveau transcriptionnel de certains gènes (*CHK1*, *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *RAM2* et *DPP3*).

Les non répondeurs produisent un plus grand nombre d'hyphes, forment 60% plus de biofilm et croissent 50% moins vite que les répondeurs. La souche SC5314 se comporte comme un répondeur. L'absence de la réponse au farnésol se manifeste indépendamment des conditions de culture. Cependant, elle ne s'explique pas par une différence dans le niveau d'expression des gènes proposés, excepté pour *DPP3* qui est surexprimé chez le non répondeur ATTC[®] 36802, suggérant ainsi une surproduction de farnésol chez cette souche. De plus, si le farnésol agit via un récepteur nucléaire, il sera d'un type non décrit précédemment.

Mots clés: *Candida albicans*, biofilm, *quorum sensing*, farnésol, Chk1, Hst7, Cph1, Gap1, Ram2, Dpp3

ABSTRACT

Candida albicans, the most common fungal pathogen, can undergo morphological transitions between yeast and hyphal forms, which are associated with biofilm formation. Farnesol, an endogenous lipid produced by *C. albicans*, is a quorum sensing molecule that inhibits this transition. Previous work identified two clinical isolates that didn't respond to farnesol in colony morphology and biofilm assays. Our goal is to better understand *C. albicans* response to farnesol using these natural farnesol non responders. We have hypothesized that : 1) clinical isolate SC5314, the most characterized strain, is a farnesol responder; 2) non responders' germination, growth and biofilm formation are different from those of responders; 3) lack of response to farnesol occurs even outside specific culture conditions; 4) farnesol acts through a nuclear receptor that is altered in non responders; 5) difference in farnesol response between strains is explained by transcriptional variations of specific genes (*CHK1*, *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *RAM2* and *DPP3*), that were previously shown to be potentially involved in farnesol's mechanism of action.

Non responders produce more hyphae, form 60 % more biofilm and grow 50% slower than responders. The SC5314 strain acts like a responder. Lack of response to farnesol occurs regardless of culture conditions. However, the refractory response to farnesol is not explained by a difference in the proposed genes expression level, except for *DPP3* that is upregulated in ATTC[®] 36802 non responder, suggesting an overproduction of farnesol by this strain. Furthermore, if farnesol acts through a nuclear receptor, it will be a type not previously described.

Key words: *Candida albicans*, biofilm, quorum sensing, farnesol, Chk1, Hst7, Cph1, Gap1, Ram2, Dpp3

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiii
DÉDICACE	xv
REMERCIEMENTS	xvi
Chapitre 1. INTRODUCTION	1
1.1. LE MONDE D'UNE LEVURE OPPORTUNISTE – <i>CANDIDA ALBICANS</i> .1	
1.1.1. Généralités	1
1.1.2. Histoire et taxonomie.....	3
1.1.3. Croissance.....	4
1.1.4. Formes morphologiques	5
1.1.5. Transition morphologique forme levure – formes filamenteuses.....	10
1.1.6. Morphologie coloniale et commutation phénotypique.....	16
1.1.7. Virulence	19
1.1.8. Génome.....	21
1.2. LE BIOFILM, UN STYLE DE VIE.....	24
1.2.1. Généralités	24
1.2.2. Le biofilm de <i>C. albicans</i>	28
1.3. UN « LANGAGE » CELLULAIRE – LE QUORUM SENSING.....	33
1.3.1. Généralités	33
1.3.2. Le <i>quorum sensing</i> chez <i>C. albicans</i>	36

1.4.	LE FARNÉSOL, PLUS QU'UN PARFUM.....	40
1.4.1.	Généralités	40
1.4.2.	Multiplés rôles joués par le farnésol chez <i>C. albicans</i>	42
1.4.3.	Voie de synthèse, production et inhibiteurs chez <i>C. albicans</i>	46
1.4.4.	Récepteur nucléaire	48
1.4.5.	Voies potentielles de signalisation du farnésol chez <i>C. albicans</i>	49
1.4.6.	Variations de la réponse au farnésol chez <i>C. albicans</i>	53
Chapitre 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....		55
2.1.	HYPOTHÈSES.....	55
2.2.	OBJECTIFS.....	57
Chapitre 3. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....		58
3.1.	CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES SOUCHES ET FORMATION DE BIOFILM.....	58
3.1.1.	Souches.....	58
3.1.2.	Produits et milieux de culture.....	59
3.1.3.	Culture de <i>C. albicans</i>	61
3.1.4.	Évaluation de la croissance et de l'expression phénotypique sur milieu solide 62	
3.1.5.	Évaluation du profil de germination en culture liquide.....	63
3.1.6.	Évaluation de la croissance en culture liquide.....	63
3.1.7.	Évaluation de la formation de biofilm.....	64
3.2.	CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES SOUCHES	66
3.2.1.	Extraction de l'ARN total.....	66
3.2.2.	Purification et dosage de l'ARN.....	68
3.2.3.	<i>Reverse Transcription</i> (RT).....	70
3.2.4.	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) semi-quantitative	70
3.3.	ANALYSES STATISTIQUES.....	75

Chapitre 4. RÉSULTATS	76
4.1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES SOUCHES ET FORMATION DE BIOFILM.....	76
4.1.1. Évaluation de la croissance et de l'expression phénotypique sur milieu solide 76	
4.1.2. Évaluation du profil de germination en culture liquide.....	85
4.1.3. Évaluation de la croissance en culture liquide.....	91
4.1.4. Évaluation de la formation de biofilm.....	96
4.2. CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES SOUCHES.....	107
4.2.1. Recherche du récepteur nucléaire du farnésol.....	107
4.2.2. Évaluation du niveau d'expression des gènes <i>CHK1</i> , <i>HST7</i> , <i>CPHI</i> , <i>GAP1</i> , <i>RAM2</i> et <i>DPP3</i>	109
Chapitre 5. DISCUSSION	117
5.1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES SOUCHES ET FORMATION DE BIOFILM.....	118
5.1.1. Évaluation de la morphologie coloniale et du profil de germination.....	118
5.1.2. Évaluation de la formation de biofilm.....	121
5.1.3. Évaluation de la croissance.....	125
5.1.4. Évaluation de la réponse au farnésol de la souche SC5314.....	126
5.1.5. Conclusion sur la caractérisation phénotypique des souches et la formation de biofilm.....	127
5.2. CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES SOUCHES.....	129
5.2.1. Recherche du récepteur nucléaire du farnésol.....	129
5.2.2. Évaluation du niveau d'expression des gènes <i>CHK1</i> , <i>HST7</i> , <i>CPHI</i> , <i>GAP1</i> , <i>RAM2</i> et <i>DPP3</i>	129
5.2.3. Conclusion sur la caractérisation génétique des souches.....	133
5.3. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	135

SOURCES DOCUMENTAIRES	136
ANNEXE I	xvii
ANNEXE II	xviii
ANNEXE III	xix
ANNEXE IV	xx
ANNEXE V	xxi
ANNEXE VI	xxii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Facteurs majeurs favorisant l'infection candidosique (Odds, 1988; Perloth <i>et al.</i> , 2007)	2
Tableau II : Identification des souches de <i>C. albicans</i> utilisées.....	59
Tableau III : Taille des amplicons et séquences des amorces utilisées dans les réactions de RT-PCR semi-quantitatives.....	72
Tableau IV : Conditions d'amplification des gènes par PCR semi-quantitative.....	73
Tableau V : Phénotype colonial (pourcentage des colonies lisses, poilues et chevelues) de la souche SC5314, des répondeurs (BL007 et LAM1) et des non répondeurs (ATCC [®] 36802 et HM1), en présence et en absence de farnésol, en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation	79
Tableau VI : Taille moyenne des colonies (mm) de la souche SC5314, des répondeurs (BL007 et LAM1) et des non répondeurs (ATCC [®] 36802 et HM1), en présence et en absence de farnésol, en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemples de candidose orale humaine.....	2
Figure 2 : Différentes formes morphologiques de <i>C. albicans</i>	6
Figure 3 : Régulation du dimorphisme chez <i>C. albicans</i>	11
Figure 4 : Les étapes de la farnésylation de la protéine Ras1 (McGeady <i>et al.</i> , 2002)...	15
Figure 5 : Morphologies coloniales de <i>C. albicans</i>	17
Figure 6 : Exemples de biofilms	25
Figure 7 : Les étapes du développement du biofilm bactérien	26
Figure 8 : Biofilms de <i>C. albicans</i> – exemples.....	28
Figure 9 : Les étapes du développement du biofilm de <i>C. albicans</i>	29
Figure 10 : Différents systèmes de <i>quorum sensing</i> rencontrés chez les bactéries.....	35
Figure 11 : Molécule de <i>E,E</i> -farnésol	40
Figure 12 : Voie de biosynthèse du farnésol chez <i>C. albicans</i>	46
Figure 13 : Voies hypothétiques de signalisation du farnésol chez <i>C. albicans</i>	49
Figure 14 : Variations de la réponse au farnésol en milieu solide chez <i>C. albicans</i>	54
Figure 15 : Types de morphologie coloniale, avec leur morphologie cellulaire correspondante, observés pour toutes les souches de <i>C. albicans</i> étudiées	77

- Figure 16:** Morphologies coloniales observées pour la souche SC5314, pour les répondeurs (souche BL007) et les non répondeurs (souche ATCC[®] 36802) dans diverses conditions d'incubation, sur les milieux de culture RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 μ M farnésol80
- Figure 17:** Effet du sucre sur la morphologie coloniale et la réponse au farnésol des répondeurs (souche BL007) et des non répondeurs (souche ATCC[®] 36802)84
- Figure 18 :** Profils de germination des 5 souches de *C. albicans* étudiées, en présence et en absence de farnésol, en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation88
- Figure 19 :** Morphologies cellulaires observées pour la souche SC5314, pour les répondeurs (souche BL007) et les non répondeurs (souche ATCC[®] 36802) à 37°C, dans les milieux de culture RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 μ M farnésol89
- Figure 20 :** Morphologies cellulaires observées pour la souche SC5314, pour les répondeurs (souche BL007) et les non répondeurs (souche ATCC[®] 36802) à 37°C avec 2.5% CO₂, dans les milieux RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 μ M farnésol.....90
- Figure 21 :** Courbes de croissance des 5 souches de *C. albicans* étudiées, en présence et en absence de farnésol, en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation92
- Figure 22 :** Croissance des 5 souches de *C. albicans* étudiées, après 24 heures d'incubation à 37°C en présence ou en absence de 2.5% CO₂, dans les milieux RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 μ M farnésol (F).....93
- Figure 23 :** Formation de biofilm des 5 souches de *C. albicans* étudiées, après 24 heures d'incubation à 37°C en présence ou en absence de 2.5% CO₂, dans les milieux RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 μ M farnésol (F).....97

Figure 24 : Biofilms de la souche SC5314, des répondeurs (souche BL007) et des non répondeurs (souche ATCC [®] 36802) colorés au CV dans des plaques à 24 puits, après 24 heures d'incubation à 37°C en présence ou en absence de 2.5% CO ₂ , dans les milieux de culture RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 µM farnésol.....	99
Figure 25: Évaluation de la formation de biofilm des 5 souches de <i>C. albicans</i> étudiées, par coloration au CV et réduction du XTT.....	103
Figure 26: Recherche du récepteur nucléaire du farnésol chez le répondeur BL007 par RT-PCR.....	108
Figure 27: Quantification du niveau d'expression du gène <i>CHK1</i> chez les 5 souches de <i>C. albicans</i> étudiées.....	110
Figure 28: Quantification du niveau d'expression du gène <i>RAM2</i> chez les 5 souches de <i>C. albicans</i> étudiées.....	111
Figure 29: Quantification du niveau d'expression du gène <i>DPP3</i> chez les 5 souches de <i>C. albicans</i> étudiées.....	112
Figure 30: Influence du farnésol sur le niveau d'expression des gènes <i>HST7</i> , <i>CPH1</i> , <i>GAP1</i> , <i>CHK1</i> et <i>RAM2</i> chez le répondeur BL007.....	114
Figure 31: Influence du farnésol sur le niveau d'expression des gènes <i>HST7</i> , <i>CPH1</i> , <i>GAP1</i> , <i>CHK1</i> et <i>RAM2</i> chez le non répondeur ATCC [®] 36802	115

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATTC [®]	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CV	Crystal violet
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase I	Désoxyribonucléase I
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EcR	Récepteur de l'ecdysone
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (latin), par exemple
F	30 μ M farnésol
FPP	Pyrophosphate de farnésyle
FTase	Farnésyle transférase
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
GlcNAc	N-acétylglucosamine
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl co-enzyme A
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MARS	<i>Morphogenic autoregulatory substance</i>
MOPS	Acide 3-(N-morpholino)-propane sulfonique
NCBI	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>
pb	Paire de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase)

PM	Marqueur de poids moléculaire
RNases	Ribonucléases
RNaseOUT	<i>Recombinant ribonuclease inhibitor</i>
RT	<i>Reverse transcription</i> (Transcription inverse)
SD	Sabouraud dextrose
TAE	Tris-acétate-EDTA
TYE	<i>Trypticase yeast extract</i>
Tm	Température d'hybridation
UFC	Unités formatrices de colonies
XTT	2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5 [(phenylamino) carbonyl]-2-tetrazolium hydroxide
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>

DÉDICACE

À la mémoire de mon père

REMERCIEMENTS

La maîtrise représente une expérience marquante de ma vie, qui laissera sûrement une trace profonde dans mon âme. Elle m'a permis non seulement de développer mes capacités pour la recherche scientifique, mais aussi a contribué au modelage de mon caractère et de ma personnalité. En réalisant mon projet entièrement à l'étranger, j'ai eu l'occasion de découvrir un nouveau monde, qui m'a fascinée avec ses particularités linguistiques et culturelles. J'ai appris à m'intégrer dans cet environnement tout en essayant de garder mon identité nationale et de la partager avec les autres. Je tiens ainsi à remercier à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette expérience enrichissante de ma vie :

- Dr Jean Barbeau (mon directeur de recherche) et son équipe (Jacynthe, Annie, Daniel, Jean-François, Sabrina, Zohra et tous les stagiaires)
- Dr Stéphane Roy (mon codirecteur de recherche) et son équipe (Mathieu, Jean-Charles, Samuel, Éric, Sophie, Cara et tous les stagiaires)
- M. Pierre Rompré, pour son aide avec les analyses statistiques des données
- Dr Martine Raymond, pour ses conseils indispensables
- Le Département de Microbiologie et Immunologie et la Faculté de Médecine Dentaire
- Mes amis que j'ai connus au Canada
- Ma famille, pour tout son support.

Également mes sincères remerciements à Dr Pierre Belhumeur et Dr Marc C. Lavoie pour avoir accepté de participer au jury de mon mémoire et y avoir consacré le temps nécessaire.

Chapitre 1. INTRODUCTION

1.1. LE MONDE D'UNE LEVURE OPPORTUNISTE – *CANDIDA ALBICANS*

1.1.1. Généralités

Candida albicans, une levure polymorphe opportuniste, est le pathogène fongique le plus commun chez l'humain. Il est responsable, entre autres, de diverses candidoses orales (Figure 1) et de vaginites, deux infections très répandues. Cette levure possède des mécanismes d'adaptation complexes, lui permettant de survivre dans diverses conditions environnantes et de causer une grande variété d'infections : superficielles (candidoses mucocutanées) ou profondes (candidoses systémiques, souvent mortelles) (Segal, 2005).

C. albicans fait partie de la microflore indigène vaginale et oro-gastrointestinale de l'humain et de nombreuses espèces animales (Odds, 1988). Elle est détectée chez au moins 70% de la population humaine saine (Ruhnke & Maschmeyer, 2002). Normalement, un équilibre existe entre l'hôte et la microflore endogène, favorisant l'état commensal de *C. albicans*. Par contre, certains facteurs (Tableau I) contribuent à dévoiler son caractère pathogène opportuniste, notamment dans des conditions d'affaiblissement du système immunitaire ou de diminution des populations bactériennes indigènes.

C. albicans est l'agent nosocomial fongique le plus commun à l'heure actuelle et arrive en troisième place comme facteur étiologique des septicémies aux États-Unis. Les études américaines estiment l'incidence annuelle de candidémies à 24 cas sur 100 000 patients, avec une mortalité d'environ 40% (Perlroth *et al.*, 2007).



Figure 1 : Exemples de candidose orale humaine

A – Candidose chronique hyperplasique, qui apparait sous forme de plaques blanches, localisées généralement proches de l’angle de la bouche et sur la muqueuse jugale (Regezi *et al.*, 2000); **B** – Candidose nodulaire sur le palais dur (Johnson & Bain, 2000); **C** – Stomatite prothétique, inflammation de la muqueuse palatine sous une prothèse ou un appareil dentaire amovible (Barbeau *et al.*, 2003).

Tableau I : Facteurs majeurs favorisant l’infection candidosique (Odds, 1988; Perlroth *et al.*, 2007)

Facteurs	Exemples
Déficits immunitaires	Physiologiques (nouveau-nés, personnes âgées) ou acquis (infections à VIH, malignités)
Facteurs endocriniens	Grossesse, contraceptifs oraux, diabète, hypothyroïdie, maladie d’Addison
Facteurs nutritifs	Hydrates de carbone, déficits en fer et en vitamines
Hyposialies endogènes	Syndrome de Sjögren
Facteurs génétiques	Candidoses chroniques familiales
Agents antimicrobiens	Antibiotiques à large spectre, antiseptiques
Traitements immunosuppresseurs	Corticothérapie, thérapie antitumorale
Hyposialies exogènes	Toxicomanies, radiothérapies, traitements psychotropes
Facteurs mécaniques	Traumatismes, prothèses dentaires
Implants médicaux	Cathéters, tubes endothoraciques, valves cardiaques artificielles, prothèses articulaires
Tabagisme	

Les traitements actuels sont souvent très coûteux (2 à 4 milliards de dollars par année uniquement aux États-Unis) et manquent d'efficacité (Perlroth *et al.*, 2007). Parmi les causes de ce manque d'efficacité, on peut citer la résistance de la levure aux antifongiques employés, les doses plutôt fongostatiques que fongicides et les graves effets secondaires engendrés par la thérapie, dus aux cibles visées qui sont communes au pathogène eucaryote et l'homme (Berman & Sudbery, 2002).

L'incidence des candidémies a augmenté considérablement dans les dernières années (Perlroth *et al.*, 2007). Il est donc nécessaire de mieux comprendre l'épidémiologie et la physio-pathologie des candidoses, et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques si l'on veut, à terme, être en mesure de réduire l'incidence et les conséquences de ces infections.

1.1.2. Histoire et taxonomie

Au cinquième siècle avant Jésus Christ, Hippocrate fut le premier à parler d'infection fongique en décrivant le muguet (Ainsworth, 1986). Ce ne fut qu'en novembre 1839, en Allemagne, que le jeune conférencier Bernhard (von) Langenbeck publia pour la première fois la description d'une levure, de type mycète, comme agent étiologique d'une candidose orale (Knoke & Bernhardt, 2006). Pendant un siècle après sa découverte, la levure du muguet fut le sujet d'une étude taxonomique controversée. Le mycète connut divers noms, dont les plus proches de la nomenclature actuelle furent *Oidium albicans* (Robin, 1853), *Saccharomyces albicans* (Reess, 1877) ou *Monila albicans* (Zopf, 1890). Sa position taxonomique fut clarifiée en 1923 par les travaux de Christine Marie Berkhout qui introduira dans sa thèse le terme *Candida albicans* (Berkhout, 1923). Ainsi, elle différencie pour la première fois les levures médicales de celles végétales. Le nom est dérivé de l'expression latine *toga candida* qui était utilisée pour décrire les robes blanches portées par les membres du Sénat romain (Calderone, 2002). Depuis, cette classification est devenue *nomen conservandum* et fut adoptée internationalement en 1939 dans le cadre du 3^{ème} Congrès International de Microbiologie de New York (Samson, 1990).

C. albicans, levure considérée asexuelle jusqu'à récemment, fut classée au début dans la division des deutéromycètes (*fungi imperfecti*). En effet, la présence des caractéristiques sexuelles était nécessaire pour l'appartenance à la division des ascomycètes. Cependant, la comparaison des séquences des acides nucléiques, ainsi que des caractéristiques phénotypiques non sexuelles, ont permis de l'intégrer ultérieurement dans la division des ascomycètes (Taylor, 1995). Les deutéromycètes ne sont plus reconnus présentement comme un taxon. De plus, en 2000, deux laboratoires de recherche ont démontré, par des approches expérimentales différentes, l'existence d'un cycle sexuel (*mating*) chez *C. albicans* (Hull *et al.*, 2000; Magee & Magee, 2000).

La classification actuelle de *C. albicans* est la suivante :

Empire : Eucaryote (*Eukaryota*)

Rang/Règne : Champignon (*Fungi*)

Embranchement/Division/Phylum : Ascomycètes (*Ascomycota*)

Sous-embranchement/Sous-division/Sous-phylum : Saccharomycotina

Classe : Saccharomycetes

Ordre : Saccharomycetales

Famille : Saccharomycetaceae

Genre : *Candida*

Espèce : *albicans* (Jones *et al.*, 2004)

1.1.3. Croissance

Notoire pour sa grande capacité d'adaptation, *C. albicans* croît sur des milieux de culture définis, riches ou pauvres, contenant des sources de sel (e.g. chlorure de sodium), de carbone (e.g. glucose), d'azote (e.g. sels d'ammonium) et de phosphate, et nécessite la présence de biotine. La levure se développe dans des conditions de pH variant entre 2 et 8 et dans un intervalle de température de 20 à 40°C, sa température optimale étant

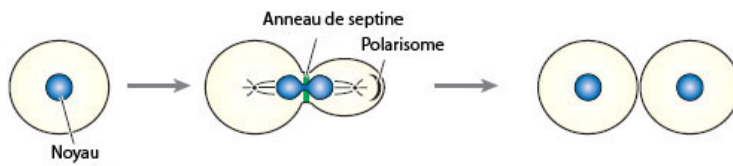
37°C. Son temps de génération maximal est de 0.3 à 0.4 heures⁻¹, dans un milieu de culture synthétique (Shepherd, 1990).

Étant donné que chez les mammifères la concentration en CO₂ est presque 150 fois (5%) plus élevée que dans l'air atmosphérique (0.036%), *C. albicans* est exposée à des concentrations très variables de dioxyde de carbone pendant son cycle de vie (Bahn & Muhlschlegel, 2006). Lors d'infections superficielles cutanées, comme la peau est en équilibre avec l'atmosphère, la levure doit s'adapter à des taux de CO₂ plus bas que lors d'invasions d'autres tissus de l'hôte (Frame *et al.*, 1972). Le pathogène est un anaérobie facultatif et il est au moins quatre fois plus résistant au traitement antifongique en condition anaérobie qu'en aérobiose (Dumitru *et al.*, 2004).

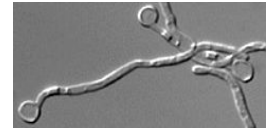
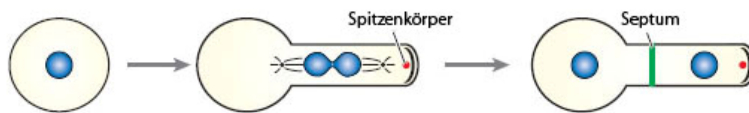
1.1.4. Formes morphologiques

Une caractéristique importante de cette levure est sa capacité à croître sous plusieurs formes morphologiques : levure (blastospore), hyphe, pseudohyphe, projection sexuelle (*shmoo*), chlamydospore et bourgeon hyperpolarisé (Whiteway & Bachewich, 2007) (Figure 2). Cette diversité morphologique est considérée comme étant une stratégie de survie, permettant sa croissance et sa dissémination dans l'hôte (Berman & Sudbery, 2002). Les blastospores, les hyphes et les pseudohyphes sont les formes les plus fréquemment rencontrées. Elles coexistent souvent dans les cultures végétatives et dans les foyers d'infections (Sudbery *et al.*, 2004). Pourtant, des conditions de culture permettant le développement de *C. albicans* majoritairement sous une seule forme morphologique ont été définies en laboratoire. De plus, en réponse aux signaux externes, ce pathogène est capable de commuter rapidement et de manière réversible entre la forme blastospore, hyphe et pseudohyphe (Whiteway & Bachewich, 2007).

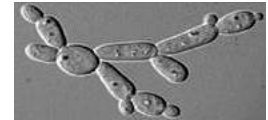
Levure



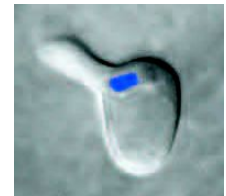
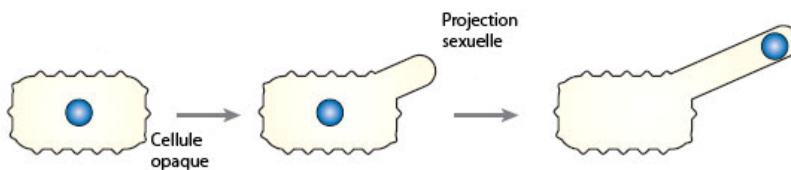
Hyphe



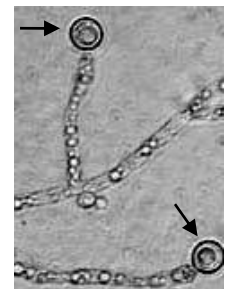
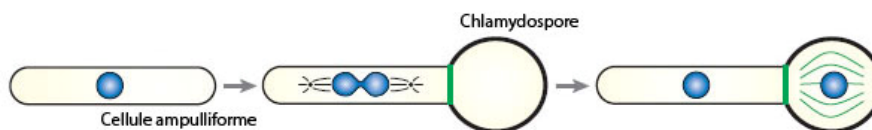
Pseudohyphe



Projection sexuelle (*shmoo*)



Chlamyospore



Bourgeon hyperpolarisé



Figure 2 : Différentes formes morphologiques de *C. albicans*

Adapté de : (Bachewich *et al.*, 2003; Soll *et al.*, 2003; Berman, 2006; Staib & Morschhauser, 2007; Whiteway & Bachewich, 2007)

Les blastospores (levures) : sont des cellules ovoïdes d'environ 3 à 5 μm qui se reproduisent par bourgeonnement multilatéral (asymétrique) (Figure 2). La sélection des sites de bourgeonnement est dépendante de la température. La cellule mère produit un bourgeon (blastoconidie), qui va se séparer après formation d'une cloison (anneau de septine) et donner naissance à une cellule fille. Les cellules se séparent après la cytokinèse, lorsque la cellule fille n'a pas encore atteint la taille de la cellule mère. Le noyau se divise dans la jonction formée entre la cellule mère et le bourgeon. Les cellules alternent entre une croissance polarisée et une isotropique. La croissance polarisée est définie par le polarisome, complexe protéique situé à l'extrémité du bourgeon (Berman, 2006; Whiteway & Bachewich, 2007). Les constituants majeurs de la paroi cellulaire sont les glucanes, les mannanes et la chitine, et ceux-ci varient en proportion selon la forme morphologique (Chaffin *et al.*, 1998). La présence de glucose comme unique source de carbone, un pH inférieur à 6.5 – 7.0, une température d'incubation inférieure à 35°C et un inoculum supérieur à 10^6 cellules/mL sont des facteurs qui favorisent la croissance de *C. albicans* sous forme de blastospores *in vitro* (Odds, 1988).

Les hyphes : sont des tubes microscopiques, longs et minces (environ 2 μm de diamètre), qui contiennent plusieurs unités cellulaires, divisées par des septa (Figure 2). Les hyphes possèdent des parois parallèles, sans constriction visible au site de séparation. Elles naissent d'une blastospore ou d'une hyphe déjà existant. Leur formation est initiée par le développement des tubes de germination; des évaginations cylindriques précédant l'apparition du premier septum. Ce processus est connu sous le nom de germination. Le noyau se divise dans le tube de germination allongé, à l'endroit de l'apparition du septum. Par la suite, un noyau retourne par migration dans la cellule mère et le second avance dans le tube de germination. Contrairement aux blastospores, les hyphes montrent un niveau de polarisation plus important. Les cellules possèdent exclusivement une croissance polarisée apicale, définie par le polarisome et le *Spitzenkörper*, les deux situés à l'extrémité du tube de germination (Odds, 1988; Berman, 2006; Whiteway & Bachewich, 2007). Le *Spitzenkörper* est une organelle spécifique des hyphes, qui fonctionne en conjugaison avec le polarisome (Crampin *et al.*, 2005). En ce qui concerne la composition de la paroi cellulaire, les hyphes

contiennent aux moins trois fois plus de chitine que les blastospores (Chaffin *et al.*, 1998). Les hyphes peuvent donner naissance soit aux blastospores qui vont bourgeonner latéralement, soit aux nouvelles branches hyphales. L'agrégat cellulaire contenant les hyphes, leurs branches et les bourgeons latéraux porte le nom de mycélium (Odds, 1988). Une carence en nutriments, un ratio CO₂ : O₂ supérieur à 2 : 1, un pH supérieur à 6.5 – 7.0, une température d'incubation supérieure à 35°C, un inoculum inférieur à 10⁶ cellules/mL et la présence de sérum ou de N-acétylglucosamine (GlcNAc) comme source d'azote sont les principaux facteurs nécessaires au développement d'hyphes (Odds, 1988). D'ailleurs, la filamentation en présence de sérum à 37°C, a été utilisée longtemps comme technique d'identification de cette levure pathogène. Pourtant, une nouvelle espèce de *Candida* a été décrite récemment : *C. dubliniensis*, très similaire à *C. albicans* et capable de germer en présence de sérum (Sullivan *et al.*, 1995). Ainsi, de nouvelles méthodes d'identification plus spécifiques ont été développées par la suite.

Les pseudohyphes : étaient vues auparavant comme une forme intermédiaire entre les blastospores et les hyphes, mais des études récentes les considèrent comme une forme totalement distincte (Sudbery *et al.*, 2004). Les pseudohyphes ressemblent aux blastospores au niveau du cycle cellulaire, les seules différences étant la forme cellulaire plus allongée ($\geq 2.8 \mu\text{m}$ de diamètre), le bourgeonnement unipolaire et l'attachement des cellules après la cytokinèse (Figure 2). Ceci conduit à la formation des chaînes embranchées, constituées des bourgeons allongés. Cette structure facilite la recherche de nutriments loin de la cellule parentale (Berman, 2006; Whiteway & Bachewich, 2007). Les pseudohyphes bourgeonnent à partir d'une blastospore ou d'une hyphe. Les bourgeons peuvent être tellement allongés qu'ils ressemblent morphologiquement aux hyphes, mais ils se distinguent de ceux-ci par la présence des constriction à l'endroit du septum entre les bourgeons. À cause de cette forte ressemblance, les pseudohyphes et les hyphes sont souvent retrouvées sous le nom des formes filamenteuse de *C. albicans* (Odds, 1988; Sudbery *et al.*, 2004). Un pH de 6.0 et une température d'incubation de 35°C, une carence en azote (Sudbery *et al.*, 2004) ou une concentration élevée en phosphate (Hornby *et al.*, 2004) sont des conditions qui favorisent une croissance sous forme de pseudohyphes.

Les projections sexuelles (*shmoos*): sont des élongations des cellules en phase opaque, en réponse aux phéromones sexuelles (Figure 2). Les cellules opaques sont des cellules allongées, avec une paroi cellulaire ondulée, qui forment des colonies de phénotype opaque (plus de détails à la section 1.1.6.). Les *shmoos* sont des formes caractéristiques des cellules compétentes pour le cycle sexuel (*mating-competent cells*). Ils ont été observés uniquement dans des mélanges cellulaires contenant les deux types sexuels opposés (a/a et α/α) (Whiteway & Bachewich, 2007). Les études montrent que le noyau migre dans la projection et, après la fusion de la projection sexuelle avec une cellule du type sexuel opposé (formation d'un pont de conjugaison), il s'associe au deuxième noyau. Par la suite, une cellule fille prend naissance à partir du pont de conjugaison et les noyaux retournent dans les cellules parentales et se divisent de manière asynchrone. À la fin, un noyau migre dans la cellule fille, qui se sépare par septation. La cellule fille continue de se multiplier par bourgeonnement (Lockhart *et al.*, 2003). La régulation de la polarité des *shmoos*, ainsi que celle de la structure spécifique de leur paroi cellulaire, sont des processus encore non élucidés (Whiteway & Bachewich, 2007).

Les chlamydospores : sont de grosses cellules sphériques de 8 à 12 μm , avec une paroi cellulaire épaisse (Figure 2). Elles apparaissent *in vitro* dans des conditions de culture défavorables, de longue durée, et sont observées très rarement *in vivo* (Chabasse *et al.*, 1988; Cole *et al.*, 1991). Leur fonction biologique demeure encore un mystère. Les chlamydospores se forment par bourgeonnement sur des éléments hyphales ou pseudohyphales, à l'extrémité des cellules ampulliformes (*suspensor cells* – structures allongées sous forme d'amphore qui sont un embranchement des formes filamenteuses). Le noyau se divise dans la cellule ampulliforme. Par la suite, un noyau reste dans la cellule ampulliforme et le deuxième migre dans la chlamydospore, à travers le septum qui sépare les deux cellules. À la fin du développement, la chlamydospore mature possède une structure élaborée à base de septine. Contrairement aux autres formes morphologiques de *C. albicans*, la paroi cellulaire des chlamydospores contient peu de chitine et est en contact avec la paroi des cellules ampulliformes (Martin *et al.*, 2005; Staib & Morschhauser, 2007; Whiteway & Bachewich, 2007). Les chlamydospores sont

produites uniquement par *C. albicans* et *C. dubliniensis*, deux espèces pathogènes très proches. Cependant, la formation des chlamydospores suit un patron spécifique pour chacune des deux espèces, permettant ainsi leur identification (Staib & Morschhauser, 2007). Une carence en nutriments, une température d'incubation de 25-30°C, un inoculum faible, une concentration faible en oxygène, l'absence de la lumière et un supplément en détergent (Tween-80) sont des conditions propices au développement des chlamydospores (Jansons & Nickerson, 1970; Staib & Morschhauser, 2007).

Les bourgeons hyperpolarisés : sont des structures similaires aux hyphes, les seules différences étant la présence d'une constriction entre la blastospore et le bourgeon allongé et l'absence de la réplication de l'ADN dans le bourgeon germé (Figure 2). De ce fait, les bourgeons hyperpolarisés meurent éventuellement car ils sont incapables de continuer le cycle cellulaire. Leur rôle biologique reste à l'heure actuelle encore non compris (Whiteway & Bachewich, 2007). Les conditions qui favorisent l'apparition des bourgeons hyperpolarisés sont un stress cellulaire spécifique ou l'absence des certains gènes essentiels du cycle cellulaire. Comme exemple on peut citer le traitement des blastospores avec l'hydroxyurée, un inhibiteur de la synthèse de l'ADN (Bachewich *et al.*, 2003) ou avec le nocodazole, une substance chimique qui bloque la progression du cycle cellulaire (Bai *et al.*, 2002) ou bien l'inactivation des gènes du cycle cellulaire, comme le gène du polo kinase *CDC5* (Bachewich *et al.*, 2003) ou le gène de réparation *RAD52* (Andaluz *et al.*, 2006).

1.1.5. Transition morphologique forme levure – formes filamenteuses

Pour aboutir à son degré complexe d'adaptabilité, *C. albicans* a dû développer des mécanismes sophistiqués pour sentir et répondre aux signaux environnementaux. Ainsi, la levure active des commutations développementales qui résultent en des changements coordonnés dans la physiologie, la morphologie et l'adhérence cellulaire (Biswas *et al.*, 2007). Le pathogène a la capacité de passer de la forme levure aux formes filamenteuses (hyphes et pseudohyphes), et *vice versa*. Cette transition morphologique est induite par

divers signaux environnementaux et chimiques tel que le pH, la concentration en O₂, les carences nutritionnelles (e.g. carbone, azote), la densité cellulaire, le GlcNAc, les morphogènes (e.g. sérum, certaines hormones humaines), le *quorum sensing* (plus de détails aux sections 1.3. et 1.4.) et l'environnement physique (e.g. matrice d'agar). De plus, la majorité de ces stimuli nécessitent une température de croissance supérieure à 35°C pour activer le développement des hyphes (Brown, 2002; Hall *et al.*, 2009). Ces conditions induisent des changements morphologiques via un réseau complexe des voies de transduction de signaux dont l'activité est coordonnée par des régulateurs transcriptionnels (Figure 3) (Biswas *et al.*, 2007).

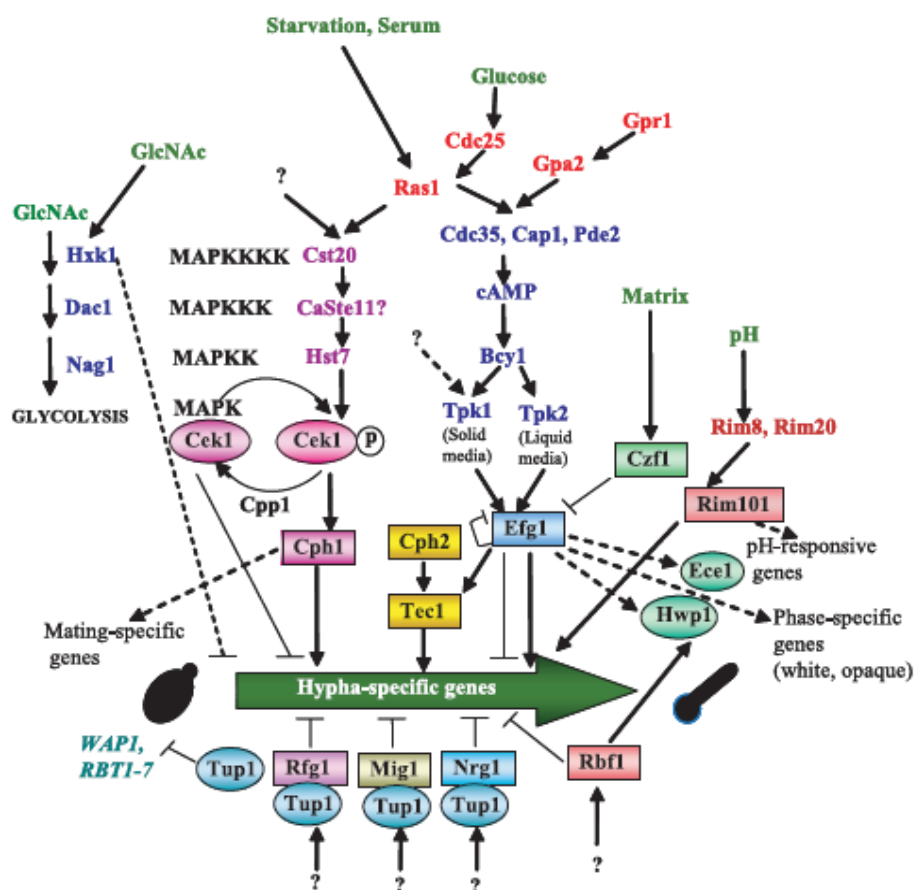


Figure 3 : Régulation du dimorphisme chez *C. albicans*

Multiples voies de signalisation régulant la transition de la forme levure à la forme hyphale. Les facteurs de transcription sont encadrés par des rectangles (Biswas *et al.*, 2007).

Il existe un grand degré de variabilité entre les souches quant à leur compétence à répondre aux signaux environnementaux et donc, à former des hyphes. Certains isolats cliniques sont particulièrement sensibles aux stimuli et présentent une vigoureuse croissance hyphale. Cependant, d'autres souches forment naturellement moins d'hyphes (Merson-Davies & Odds, 1989). Ces différences entre les souches pourraient s'expliquer par des variations présentes au niveau des sentiers morphogénétiques qui mènent à la transition morphologique de *C. albicans* ou par des modifications situées au niveau du cycle cellulaire et de son organisation structurale (Gow, 2002).

Même s'il y a eu du progrès dans les dernières années, les mécanismes moléculaires gouvernant les conversions morphogénétiques ne sont pas encore totalement compris. Ce fait est dû en partie aux difficultés rencontrées lors des manipulations génétiques avec *C. albicans* (plus de détails à la section 1.1.8.). Jusqu'à présent plusieurs voies de signalisation ont été décrites (Figure 3), dont les mieux caractérisées sont la voie des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) et celle de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), les deux régulées par la protéine Ras1 (Biswas *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2009).

La voie des MAPKs : dans les cellules eucaryotes, les cascades des MAPKs sont des éléments clés intervenant dans la transduction des divers signaux externes. Comme chez la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae*, la voie des MAPKs est impliquée dans la filamentation chez *C. albicans*. La cascade est formée des kinases Cst20 (homologue de la protéine kinase activée par p21 (PAK) Ste20), Hst7 (homologue de la MAPK kinase Ste7), et Cek1 (homologue des MAPKs Fus3 et Kss1) (Figure 3) (Clark *et al.*, 1995; Kohler & Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996; Csank *et al.*, 1998; Biswas *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2009). La MAPK kinase Ste11 n'a pas été encore caractérisée en détail chez *C. albicans*, quoique, chez *C. glabrata*, son homologue complète en fonction le mutant du gène *STE11* de *S. cerevisiae* (Calcagno *et al.*, 2005). La cascade des MAPKs agit au niveau des gènes spécifiques de la filamentation via le facteur de transcription Cph1, homologue du facteur de transcription Ste12 de *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 1994). Des mutations nulles dans *CPH1*

ou dans n'importe quel autre gène de la voie des MAPKs (*CST20*, *HST7* ou *CEK1*) conduisent à un défaut de filamentation en milieu solide. Cependant, tous ces mutants sont capables de germer normalement en présence de sérum (Liu *et al.*, 1994; Kohler & Fink, 1996; Csank *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2008). Par contre, la délétion de *CPHI* retarde la filamentation et sa surexpression la stimule suggérant ainsi que Cph1 est important, mais pas essentiel, dans la transition morphologique (Huang *et al.*, 2008). De plus, les mutants des gènes *CST20* et *CEK1* possèdent des défauts de virulence dans un modèle murin de candidose systémique. Par contre, aucun effet sur la virulence n'a été observé pour les mutants des gènes *HST7* et *CPHI* (Leberer *et al.*, 1996; Csank *et al.*, 1998). L'activation de la cascade des MAPKs semble se produire via la petite GTPase Cdc42, qui se lie avec forte affinité à la kinase Cst20 (Su *et al.*, 2005). Cdc42 fait partie de la famille Rho, une famille des GTPases intracellulaires très conservée.

GAP1, gène régulé par la voie des MAPKs : *GAP1* code pour la protéine Gap1 (63.95 kDa), homologue de la perméase générale des acides aminés Gap1 de *S. cerevisiae* (Biswas *et al.*, 2003). Chez *S. cerevisiae*, Gap1 n'est pas uniquement un transporteur des acides aminés, mais aussi un senseur des acides aminés (Donaton *et al.*, 2003). Le groupe de recherche de Biswas a découvert que Gap1 est aussi un transporteur-récepteur chez *C. albicans*, avec un rôle important dans l'initiation des voies de signalisation impliquées dans la morphogénèse et la virulence (Biswas *et al.*, 2003; Biswas *et al.*, 2007). Chez *C. albicans*, l'expression du gène *GAP1* est induite par GlcNAc et elle est fortement réprimée dans des milieux de culture contenant l'ammoniaque comme source d'azote. Les mutants nuls de *GAP1* présentent des défauts de filamentation dans des conditions de carence d'azote et aussi après l'addition de GlcNAc (Biswas *et al.*, 2003). Par contre, l'ajout de sérum rétablit la germination de ces mutants (Biswas *et al.*, 2007). Comment le transport et/ou la perception des acides aminés par Gap1 conduisent à la formation des hyphes reste encore à être déterminé. Jusqu'à présent les études montrent que l'induction de l'expression de *GAP1* par GlcNAc est supprimée dans les mutants des gènes *CPHI* et *RAS1*. Ainsi, la filamentation médiée par Gap1 semble être régulée via la voie des MAPKs (Biswas *et al.*, 2003; Biswas *et al.*, 2007).

La voie de l'AMPc : le sentier de l'AMPc joue un rôle très important dans la filamentation chez *S. cerevisiae*, *C. albicans* et d'autres champignons (Lengeler *et al.*, 2000; Hogan & Sundstrom, 2009). Chez *C. albicans*, la transition morphologique est accompagnée par une augmentation dans les niveaux de l'AMPc et elle est induite par les inhibiteurs de l'AMPc phosphodiesterase (Sabie & Gadd, 1992). La voie de l'AMPc comporte l'adénylate cyclase Cdc35 (homologue de l'adénylate cyclase Cyr1 de *S. cerevisiae*) et la sous-unité régulatrice Bcy1 (homologue de Bcy1), et les sous-unités catalytiques Tpk1/Tpk2 (homologues de Tpk1/Tpk2) de la protéine kinase A (Figure 3) (Bockmuhl *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2001; Cassola *et al.*, 2004). Les deux sous-unités catalytiques ou isoformes de la protéine kinase A agissent positivement sur la régulation de la formation des hyphes, mais ils ont des effets différents sur le phénotype en milieu solide ou en milieu liquide (Bockmuhl *et al.*, 2001). Le sentier de l'AMPc se termine avec le facteur de transcription Efg1 (homologue des facteurs de transcription Sok2 et Phd1 de *S. cerevisiae*) (Stoldt *et al.*, 1997; Biswas *et al.*, 2007). Efg1 est un facteur de transcription hélice-boucle-hélice et fait partie de la famille APSES contenant des régulateurs transcriptionnels fongiques qui contrôlent la différenciation cellulaire (Doedt *et al.*, 2004). En fonction des conditions environnementales et du profil génétique des souches, Efg1 peut agir comme un activateur ou un répresseur de la morphogénèse (Giusani *et al.*, 2002; Biswas *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2009). Le mutant du gène *EFG1* présente un défaut modéré de filamentation, tandis que le double mutant *efg1 cph1* est incapable de former des hyphes (Lo *et al.*, 1997). Efg1 joue un rôle central dans la transition morphologique, régulant l'activité des plusieurs autres gènes (Figure 3). Parmi ces gènes on peut citer le gène codant pour le facteur de transcription Tec1 impliqué lui aussi dans la morphogénèse (Lane *et al.*, 2001) ou les gènes codant pour des protéines de la paroi cellulaire des hyphes (*HYRI* et *HWPI*) (Sharkey *et al.*, 1999; Braun & Johnson, 2000). De plus, Efg1 est impliqué dans la formation des chlamydospores (Sonneborn *et al.*, 1999a) et dans la commutation phénotypique *white-opaque* (plus de détails à la section suivante) (Sonneborn *et al.*, 1999b).

Ras1, le maître régulateur de la transition morphologique : la voie de MAPKs et celle de l'AMPc sont toutes les deux régulées par la GTPase Ras1 (21 kDa),

homologue de la GTPase Ras2 de *S. cerevisiae* (Figure 3). Son activité est induite par des stimuli externes comme le sérum, les carences nutritionnelles et les faibles concentrations en glucose. Les mutants du gène *RAS1* sont viables mais incapables de germer. Leur défaut de morphogénèse est par contre supprimé par l'ajout de l'AMPc exogène ou par la surexpression des gènes de la voie des MAPKs (Feng *et al.*, 1999; Leberer *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2007). Pour confirmer encore plus le fait que Ras1 agit en amont des deux sentiers morphogénétiques, l'interaction entre Ras1 et Cdc35 a été récemment démontrée (Fang & Wang, 2006), ainsi que la forte ressemblance des mutants *ras1* et *efg1 cph1* au niveau de leur filamentation (Biswas *et al.*, 2007). En plus de son rôle principal dans la transition morphologique, Ras1 est impliquée aussi dans la virulence, l'apoptose et la commutation phénotypique *white-opaque* (Leberer *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2010). La protéine Ras1 est active uniquement après avoir été farnésylée par la farnésyle transférase (FTase). La farnésylation de Ras1 implique l'attachement d'un groupement farnésyl (un isoprénoïde à 15 atomes de carbone), à partir du pyrophosphate de farnésyle (FPP). Cet attachement covalent se fait sur le résidu cystéine localisé à 4 acides aminés du C-terminal de la protéine. Par la suite, Ras1 subit encore deux modifications post-traductionnelles : le détachement de 3 derniers acides aminés par protéolyse et la méthylation (Figure 4). La nature lipidique du farnésyl permet l'ancrage de la protéine Ras1 à la membrane et l'accomplissement de ses fonctions (McGeady *et al.*, 2002; Song & White, 2003).

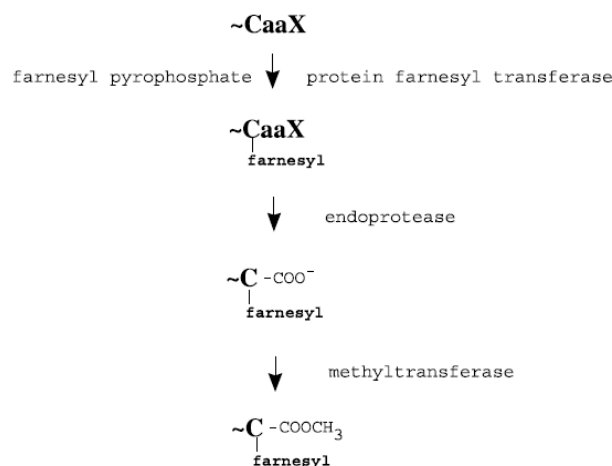


Figure 4 : Les étapes de la farnésylation de la protéine Ras1 (McGeady *et al.*, 2002)

En ce qui concerne la protéine FTase qui catalyse la farnésylation de Ras1, elle est une enzyme métallique hétérodimérique, dépendante des ions de zinc et de magnésium. La FTase est formée de deux sous-unités : α et β . La sous-unité α (codée par le gène *RAM2*) est la sous-unité catalytique, tandis que β (codée par le gène *RAM1*) contient les sites de liaison au substrat et au zinc (Reiss *et al.*, 1992; Andres *et al.*, 1993). *RAM2* code aussi pour la sous-unité α de la géranylgeranyl transférase I. Chez *S. cerevisiae* on retrouve les homologues de deux sous-unités de la FTase avec la même nomenclature et fonction. Ces deux sous-unités sont régulées indépendamment, étant donné que la surexpression de *RAM2* n'entraîne pas une augmentation du niveau transcriptionnel de *RAM1*. De plus, les études ont montré récemment que *RAM2* est nécessaire pour la viabilité de *C. albicans* (Mazur *et al.*, 1999; Song & White, 2003).

Les régulateurs transcriptionnels négatifs : les principaux régulateurs négatifs de la transition morphologique sont Rbf1 et Tup1 (Figure 3). Rbf1 est un facteur de transcription qui se lie à la boîte RPG de l'ADN. Contrairement à Rbf1, le répresseur Tup1 n'agit pas seul mais en complexe avec les facteurs de transcription Rfg1, Mig1 et Nrg1 (Kadosh & Johnson, 2005; Biswas *et al.*, 2007). Les mutants des gènes *RBF1* et *TUP1* sont constitutivement filamenteux (Braun & Johnson, 1997; Ishii *et al.*, 1997). Tup1 réprime aussi l'activité de plusieurs gènes parmi lesquels on peut citer les gènes codant pour des protéines de la paroi cellulaire des hyphes (*HWPI* et *RBT1*) (Braun *et al.*, 2000). Par contre, Rbf1 régule positivement le gène *HWPI* (Sharkey *et al.*, 1999).

1.1.6. Morphologie coloniale et commutation phénotypique

Comme *C. albicans* est capable de croître sous plusieurs formes morphologiques, elle produit sur milieu solide des colonies présentant une grande diversité des phénotypes. On peut rencontrer des colonies lisses, chevelues, plissées, étoilées, en anneau, pointillées, crépelées, en chapeau, etc. Quelques exemples sont montrés dans la Figure 5 (a, b, c et d). Jusqu'à l'heure actuelle 384 morphologies coloniales ont été décrites

(Rustchenko-Bulgac *et al.*, 1990), quoique seulement 5 à 8 phénotypes sont le plus souvent rencontrés (Radford *et al.*, 1994).

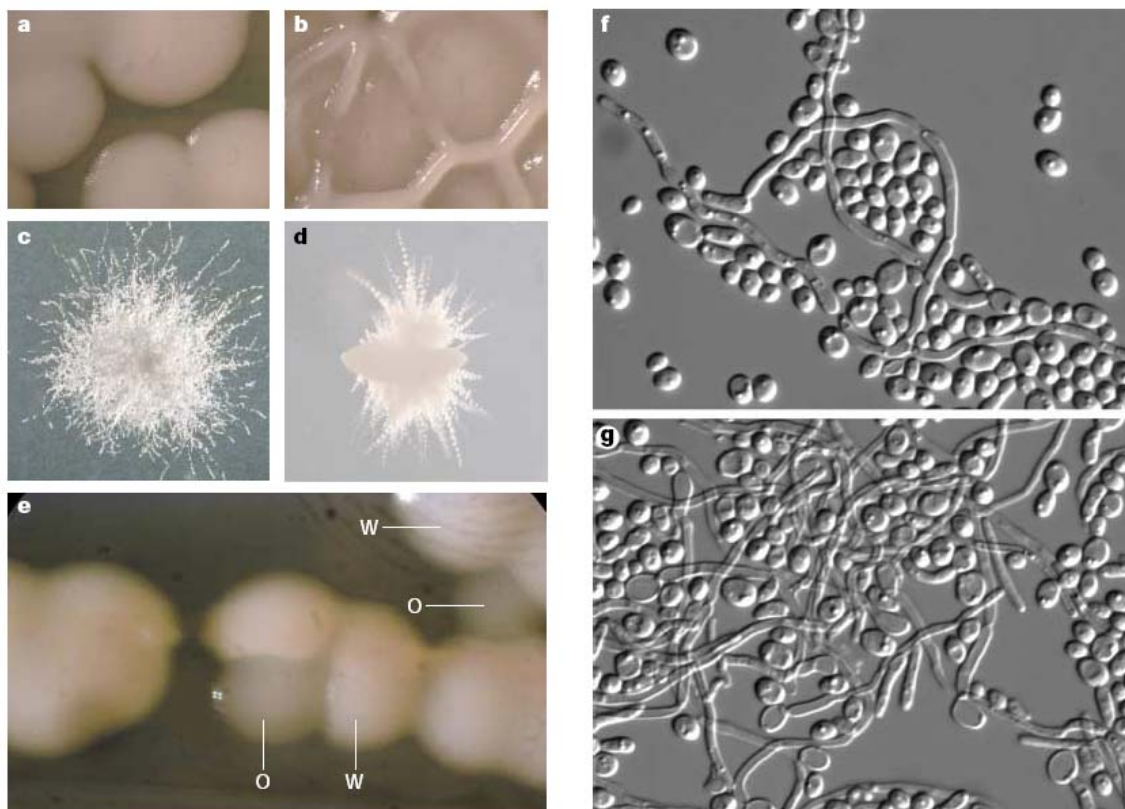


Figure 5 : Morphologies coloniales de *C. albicans*

Une seule souche peut présenter plusieurs morphologies coloniales sur différents milieux ou suite à la commutation phénotypique. **a** – Colonies lisses sur milieu SDC (*Salt-Dextrose Complete*); **b** – Colonie plissée sur milieu Spider; **c** – Colonie chevelue sur milieu lait-Tween; **d** – Colonie incorporée dans une matrice de milieu riche en sucrose; **e** – Commutation phénotypique *white-opaque* sur milieu SDC, W – colonies en phase blanche, O – colonies en phase opaque; **f**, **g** – Les colonies plissées, chevelues et incorporées sont formées d’un mélange des blastospores, pseudohyphes et hyphes. Les photos montrent des populations cellulaires dérivant des différentes portions d’une colonie plissée (Berman & Sudbery, 2002).

Les diverses morphologies coloniales sont la conséquence de la présence de différentes proportions de blastospores, pseudohyphes et hyphes dans les régions de la colonie (Figure 5f et 5g). Une colonie formée uniquement des blastospores a un aspect lisse, tandis que la présence des formes filamenteuses lui donne une apparence plus ou moins chevelue. Les colonies constituées principalement des hyphes envahissent l'agar et des projections poilues irradient à leur périphérie (Radford *et al.*, 1994; Berman & Sudbery, 2002). De plus, les colonies ayant divers phénotypes montrent différents niveaux d'adaptabilité (Vargas *et al.*, 2004). Ainsi, la diversité morphologique coloniale semble jouer un rôle important dans l'adaptabilité et la survie de *C. albicans* dans différentes conditions environnementales.

Le fait que *C. albicans* soit capable de réaliser une transition morphologique de la forme levure aux formes filamenteuses conduit à une autre caractéristique importante de ce pathogène : la commutation phénotypique (*phenotypic switching*). La levure peut commuter spontanément et d'une manière réversible et héréditaire entre différentes morphologies coloniales. La fréquence de cette commutation varie entre 10^{-4} et 10^{-1} (Soll, 2002). Ce phénomène épigénétique est stimulé par divers facteurs comme l'irradiation à des faibles doses d'UV, la température, l'âge des colonies, la présence de leucocytes et d'oxydants (Slutsky *et al.*, 1985; Slutsky *et al.*, 1987; Kolotila & Diamond, 1990; Soll *et al.*, 1991). Bien que la commutation phénotypique ait été à l'origine observée en laboratoire, elle se produit aussi *in vivo* chez des souches isolées de candidoses vaginales (Soll *et al.*, 1987). Le mécanisme qui est à la base de cette commutation n'est pas encore complètement élucidé.

Le système de commutation phénotypique le mieux étudié chez *C. albicans* est le système *white-opaque*. Dans ce système, la levure commute entre deux phénotypes de colonies : le phénotype *white* (colonies standards, blanches et lisses) et le phénotype *opaque* (colonies larges, grises et aplaties) (Figure 5e). Les colonies de phénotype *white* sont formées des levures sous forme blastospore tandis que les cellules en phase opaque ont une forme allongée d'haricot et sont trois fois plus grandes que les cellules en phase blanche (Slutsky *et al.*, 1987). La commutation *white-opaque* est intimement liée au

cycle sexuel de *C. albicans*. Uniquement les cellules qui sont homozygotes pour le locus des gènes *MTL* (*Mating Type-Like*) du cycle sexuel peuvent commuter (Miller & Johnson, 2002). La majorité des cellules de *C. albicans* (97% des souches) sont hétérozygotes pour ce locus (*MTLa/MTLa*) et ainsi sont incapables de commuter (Lockhart *et al.*, 2002). De plus, le mating des cellules en phase opaque est 10^6 fois plus efficace que celui des cellules en phase blanche. Les cellules en phase opaque sont en effet les formes compétentes pour le cycle sexuel de *C. albicans* et le pathogène subit une commutation *white-opaque* comme étape critique dans le processus de mating. L'intérêt de *C. albicans* de lier ces deux systèmes est probablement de limiter la recombinaison à certaines niches environnementales spécifiques, favorables au développement optimal de la levure. Effectivement, dans l'hôte, les cellules en phase opaque sont plus fragiles que les cellules en phase blanche et elles sont instables (Miller & Johnson, 2002; Lohse & Johnson, 2009; Soll, 2009). La commutation *white-opaque* est régulée par le répresseur hétérodimérique $a1/\alpha1$, ainsi que par les facteurs de transcriptions Efg1, Wor1 (rencontré aussi sous le nom de Tos9 ou Eap2), Wor2 et Czf1. Le mécanisme récemment proposée implique un réseau des boucles de rétroaction positive où Wor1 joue le rôle central de maître régulateur (Sonneborn *et al.*, 1999b; Miller & Johnson, 2002; Zordan *et al.*, 2006; Zordan *et al.*, 2007).

1.1.7. Virulence

De nombreux facteurs de virulence sont associés à la pathogénèse de *C. albicans* dont les principaux sont les adhésines, des biomolécules favorisant l'adhérence aux cellules de l'hôte, et les protéases aspartiques et les phospholipases, des enzymes hydrolytiques sécrétées par la levure (Calderone & Fonzi, 2001). De plus, la transition morphologique et la commutation phénotypique jouent aussi un rôle important dans la virulence de ce pathogène (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Tous ces facteurs ne semblent pas pouvoir supplanter les défenses de l'hôte normal, mais permettent plutôt au pathogène de coloniser les muqueuses. Par contre, chez les patients immunosupprimés, l'équilibre

dynamique entre les mécanismes de défense de l'hôte et la levure tourne en faveur de cette dernière, notamment dû à la présence de ces facteurs (Odds, 1988).

La transition morphologique et la virulence : le polymorphisme de *C. albicans* joue un rôle important dans l'invasion et l'évasion des cellules de l'hôte. Les blastospores semblent initier l'infection, tandis que les hyphes sont impliqués dans sa propagation. Les hyphes sont phagocytés plus difficilement (du à leur morphologie et taille) et peuvent provoquer éventuellement la mort des macrophages. Ils sont aussi capables de pénétrer facilement les couches épithéliales et endothéliales (Leberer *et al.*, 1997; Roman *et al.*, 2007; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Il n'est donc pas surprenant que les mutants incapables de filamenter soient avirulents dans un modèle murin (Lo *et al.*, 1997). Cependant, les mutants constitutivement filamenteux sont aussi avirulents (Bendel *et al.*, 2003). Ces résultats sont en concordance avec les données cliniques, car aucune morphologie cellulaire n'a été associée à la virulence *in vivo* (Roman *et al.*, 2007). Récemment, une équipe de chercheurs a évalué le rôle de la transition morphologique dans la pathogénèse de *C. albicans* en construisant une souche dont la transition a été placée sous un contrôle externe. Leur étude montre que la forme blastospore permet à la levure de se disséminer dans la circulation sanguine et ainsi d'initier l'infection, tandis que les hyphes sont plutôt nécessaires à l'invasion tissulaire, qui conduit éventuellement à la mort de l'hôte (Saville *et al.*, 2003). En conséquence, les deux formes morphologiques ont des rôles importants mais complémentaires dans l'infection. Les analyses moléculaires génétiques confirment l'implication de la transition morphologique dans la virulence de *C. albicans* en démontrant que les gènes gouvernant la morphologie cellulaire sont co-régulés avec les gènes codant pour les facteurs de virulence conventionnels, comme les protéases et les adhésines (Kumamoto & Vences, 2005b). De plus, la transition morphologique est aussi impliquée dans le développement du biofilm (forme d'organisation cellulaire qui confère aux levures une résistance accrue aux traitements antifongiques; la section 1.2. est entièrement consacrée à la description de ce mode de croissance) (Baillie & Douglas, 1999).

La commutation phénotypique et la virulence : la majorité des souches de *C. albicans* commutent phénotypiquement *in vivo* au site de l'infection, mais les études montrent que les souches pathogènes commutent plus fréquemment que les souches commensales (Soll *et al.*, 1987; Soll, 1992; Hellstein *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994). La commutation phénotypique affecte, d'une manière réversible, plusieurs traits de virulence de la levure : la formation des hyphes, la sécrétion des protéases acides, l'adhérence à l'épithélium, la susceptibilité aux agents antifongiques, le changement d'antigénicité et la sensibilité aux neutrophiles et aux oxydants (Soll, 1992; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). De plus, les cellules en phase opaque semblent contribuer à la virulence, car elles sont plus invasives que les cellules en phase blanche dans les infections cutanées (Tsuboi *et al.*, 1994; Kvaal *et al.*, 1999). Cependant, dans les autres types d'infection, les cellules en phase blanche sont beaucoup plus virulentes (Kvaal *et al.*, 1999).

1.1.8. Génome

Malgré son importance médicale et scientifique, le progrès dans l'élucidation du génome de *C. albicans* a été relativement lent comparé aux autres microorganismes. Ce fait est dû en partie aux difficultés rencontrées lors de l'utilisation de la génétique comme approche expérimental d'étude. Comme ce pathogène est diploïde et possède un cycle sexuel incomplet, les analyses génétiques conventionnelles ne sont simplement pas applicables. Malgré tous ces obstacles, les chercheurs ont développé, pendant les derniers 20 ans, des stratégies alternatives. Ainsi, à l'heure actuelle, plusieurs approches expérimentales sont disponibles pour l'étude de *C. albicans*, y compris les profilages génétiques à grande échelle (Noble & Johnson, 2007; Kabir & Hussain, 2009).

La séquence complète du génome diploïde de *C. albicans* a été récemment publiée (Jones *et al.*, 2004). La levure possède 8 paires de chromosomes, le plus grand étant appelé R et les suivants étant numérotés de 1 à 7 selon une taille décroissante. Son génome correspond approximativement à 16 Mb (haploïde) et code environ 6 400 gènes

dont 774 sont spécifiques au *Candida*, avec une fonction majoritairement inconnue (van het Hoog *et al.*, 2007; Kabir & Hussain, 2009). Le code génétique de *C. albicans* présente une particularité : le codon CUG code une sérine et non pas une leucine et il est retrouvé au moins une fois dans environ deux tiers des gènes (Odds *et al.*, 2004). Beaucoup de gènes sont conservés chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* et basé sur cette similarité, les mécanismes de plusieurs processus biologiques ont été découverts chez *C. albicans* (Biswas *et al.*, 2007). Cependant, le génome de *C. albicans* est très dynamique, avec des translocations, délétions et duplications chromosomiques courantes, ce qui rend difficile la découverte de la fonction de ses gènes. Ainsi, il n'y a pas deux souches de laboratoire qui possèdent un caryotype identique, même si elles dérivent de la même souche parentale. L'hypothèse courante de l'instabilité du génome de *C. albicans* est qu'elle permet à la levure pathogène d'acquérir la diversité génétique nécessaire pour survivre dans différentes niches environnementales (Rustchenko, 2007; Kabir & Hussain, 2009).

Pour faciliter la recherche sur la biologie moléculaire de cette levure, la communauté scientifique a mis en place une base de données centralisée, accessible via Internet (*The Candida Genome Database*; <http://www.candidagenome.org>). Ici on retrouve une grande quantité d'informations sur les gènes et la séquence génomique de *C. albicans*. Toutes les données sont collectées et organisées à partir de la littérature scientifique actuelle (Costanzo *et al.*, 2006).

L'isolat clinique SC5314 (Fonzi & Irwin, 1993) est la souche de *C. albicans* la mieux caractérisée, utilisée dans la majorité des études de virulence, de susceptibilité antifongique et dans les analyses moléculaires et biochimiques. De ce fait, elle a été choisie pour le projet de séquençage de génome (Jones *et al.*, 2004). SC5314 a été isolée d'un patient présentant une infection généralisée à *C. albicans* (Odds *et al.*, 2004). La levure appartient à la classe prédominante des souches apparentés de *C. albicans*, classification déterminée par l'analyse des empreintes d'ADN des souches (Soll & Pujol, 2003). Cette classe représente environ 40% de tous les isolats du monde entier. SC5314 est hautement susceptible à tous les agents antifongiques cliniques (Odds *et al.*,

2004) et elle est très virulente dans les modèles animaux infectés par *C. albicans* (Odds et al., 2000).

En conclusion, il y a l'espoir que les techniques récemment développées pour manipuler cette levure, ainsi que le séquençage en entier de son génome, conduiront à une meilleure connaissance de sa pathogénèse et de sa biologie, offrant ainsi la possibilité de développer des nouvelles stratégies antifongiques. Grâce à ces avancées, jusqu'à présent plusieurs mécanismes commencent à être élucidés, comme ceux qui sont à la base de la morphogénèse ou de la formation de biofilm. L'arrangement cellulaire de *C. albicans* sous forme de biofilm est à l'étude dans le cadre de ce projet et ainsi il en sera question dans la section suivante.

1.2. LE BIOFILM, UN STYLE DE VIE

1.2.1. Généralités

Le biofilm est une communauté de microorganismes qui sont attachés irréversiblement à une surface ou entre eux-mêmes, et enchâssés dans une matrice exopolymérique composée majoritairement de polysaccharides (Figure 6). La matrice est produite par les cellules composantes du biofilm. Des matériaux non cellulaires comme des cristaux minéraux, des particules de corrosion, de l'argile ou des composantes sanguines peuvent aussi être retrouvées dans la matrice du biofilm, en fonction de l'environnement où cette communauté s'est développée. Les organismes associés aux biofilms sont différents de ceux qui sont en phase planctonique (libres en suspension) en ce qui concerne le phénotype, le taux de croissance et les gènes transcrits (Donlan, 2002; Donlan & Costerton, 2002).

Parmi les microorganismes capables de former des biofilms on peut citer les bactéries, les champignons, les algues et les protozoaires. Les biofilms peuvent être constitués d'une seule espèce mais généralement on retrouve des biofilms mixtes dans la nature. Ces communautés de microorganismes peuvent se développer sur une grande variété de surfaces, incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les canalisations des systèmes d'eau potable ou industriels, ou sur tous autres supports retrouvés dans le sol ou dans les milieux aquatiques (Figure 6) (Donlan, 2002). Les études montrent que la croissance des microorganismes sous forme de biofilm prédomine dans tous les systèmes aquatiques, riches en nutriments, faisant partie des écosystèmes naturels, industriels ou médicaux (Costerton *et al.*, 1995). Par exemple, dans les écosystèmes aquatiques naturels plus de 99.9% des bactéries croissent sous forme de biofilm (Donlan & Costerton, 2002) et non sous forme libre, planctonique. Bien que les biofilms aient été décrits pour la première fois au XVII^{ème} siècle par Antonie van Leeuwenhoek, la théorie des biofilms a été présentée et élaborée uniquement en 1978 par John William Costerton (Costerton *et al.*, 1978).

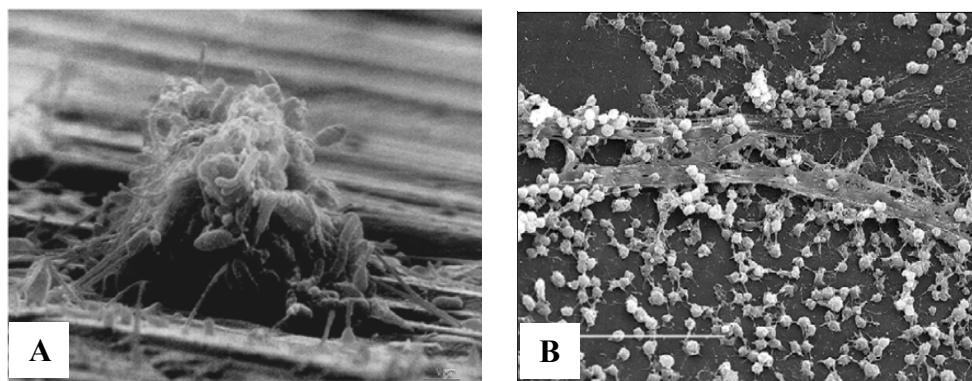


Figure 6 : Exemples de biofilms

A – Micrographie électronique d’un biofilm formé sur une surface métallique d’un système d’eau industriel (Donlan & Costerton, 2002); **B** – Micrographie électronique d’un biofilm de staphylocoque formé sur la surface interne d’un dispositif médical (Donlan, 2002).

Les biofilms peuvent causer de graves problèmes dans de nombreux secteurs de l’activité humaine. Ils sont responsables de 65% des infections bactériennes rencontrées en milieu hospitalier (Lewis, 2007) et peuvent engendrer des dégâts importants dans les domaines industriels, agro-alimentaires et maritimes (Costerton *et al.*, 1995). De nombreuses infections et maladies humaines sont associées au développement des biofilms comme par exemple la carie dentaire, les parodontites, la stomatite prothétique, la fibrose kystique, l’ostéomyélite ou bien les infections nosocomiales liées aux implants médicaux (e.g. lentilles de contact, cathéters, tubes endotrachéaux, valves cardiaques artificielles ou prothèses articulaires) (Costerton *et al.*, 1999; Fux *et al.*, 2003; Richards & Melander, 2009; Filoche *et al.*, 2010). Cependant, ces communautés de microorganismes ont aussi des effets positifs, ou même vitaux en ce qui concerne les biofilms physiologiques (e.g. colonisation de tractus intestinal ou de la surface des racines et des feuilles des plantes). Les biofilms sont utilisés dans les procédés de traitement d’eau usée et sont également des agents géochimiques importants dans les environnements de surface (Nicoletta *et al.*, 2000). Ainsi, l’étude des biofilms et leur contrôle s’avèrent être primordiaux pour notre société et constituent des enjeux de santé publique.

Le développement d'un biofilm bactérien comporte plusieurs étapes illustrées dans la Figure 7. Tout d'abord, les cellules s'attachent aux surfaces ayant des propriétés physicochimiques adéquates, à l'aide des appendices cellulaires (e.g. pili), et y adhèrent irréversiblement en s'enrobant dans une matrice exopolymérique. Par la suite, le rassemblement des cellules forme des microcolonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm (Stoodley *et al.*, 2002). Au sein du biofilm mature, les microcolonies sont séparées par des canaux aqueux qui permettent la circulation des nutriments et des gaz, ainsi que l'élimination des déchets (Stoodley *et al.*, 1994). Dans des conditions de carence nutritionnelle, les cellules se détachent du biofilm et reviennent au mode de croissance planctonique (Stoodley *et al.*, 2002).

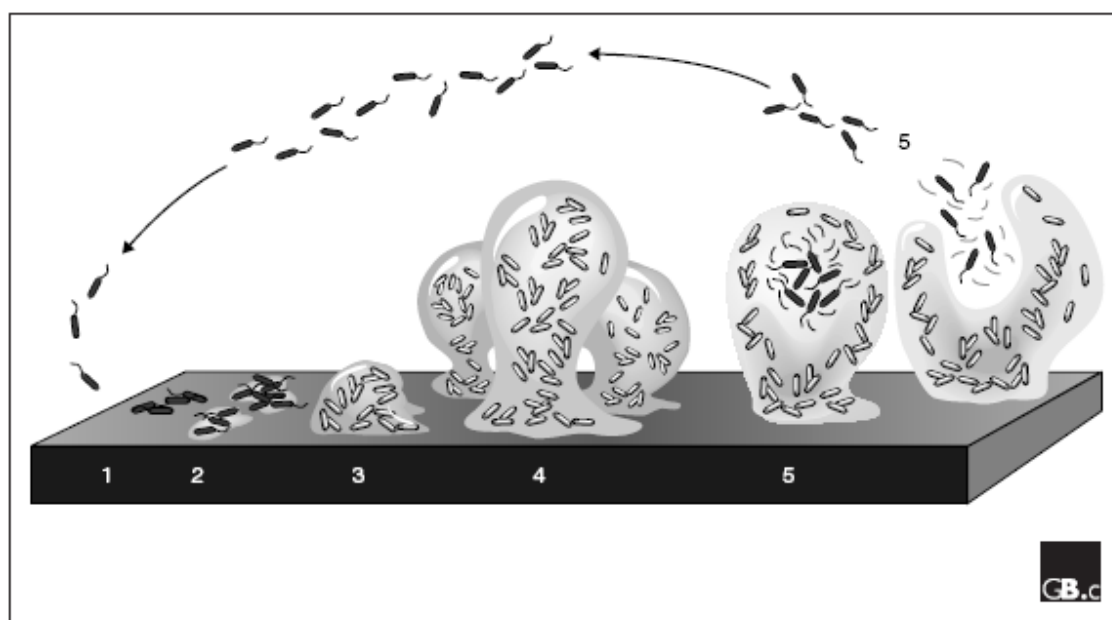


Figure 7 : Les étapes du développement du biofilm bactérien

1 – Attachement des cellules à la surface de manière réversible; **2** – Attachement irréversible des cellules (via les substances exopolymériques) et perte de motilité flagellaire; **3** – Début du développement de l'architecture du biofilm; **4** – Biofilm mature formé de plusieurs microcolonies en forme de champignon; **5** – Dispersion des cellules mobiles des microcolonies. Les cellules mobiles sont illustrées en noir (Stoodley *et al.*, 2002; Sauer, 2003).

La formation de la structure tridimensionnelle du biofilm est un processus dynamique et implique une série d'événements moléculaires coordonnés, qui sont en partie contrôlés par la perception du quorum, le *quorum sensing*, un mécanisme de communication intermicrobienne dépendant de la densité cellulaire (plus de détails à la section 1.3.) (Davies *et al.*, 1998; Fux *et al.*, 2003; Dickschat, 2010). Ainsi, le biofilm semble être une vraie structure sociale microbienne, très organisée et structurée (Moons *et al.*, 2009). Cependant, à l'heure actuelle, ce mode de croissance n'est pas entièrement compris.

Les chercheurs se sont toujours demandés pourquoi les microorganismes sont assemblés et vivent dans de telles communautés structurales complexes. Jusqu'à présent les études montrent que les biofilms représentent une stratégie de survie et de prolifération microbienne. Les biofilms sont apparus il y a environ 3.25 milliards d'années et ils ont permis aux microorganismes de survivre dans des environnements hostiles et de coloniser des nouvelles niches (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Ces communautés sont très résistantes aux traitements antimicrobiens et à la défense immunitaire de l'hôte, étant ainsi à la base de nombreuses infections persistantes, très difficiles à éradiquer. Cette résistance accrue est attribuée, entre autres, à la pénétration limitée des agents antimicrobiens dans la matrice exopolymérique, et à la survie d'une petite souspopulation des cellules dormantes, les persisteurs (*persisters*), qui recolonisent par la suite le biofilm (Fux *et al.*, 2003; Lewis, 2007, 2010). Ce mode de croissance assure de meilleures stratégies adaptatives probablement soutenu par un taux de mutations génétiques dramatiquement plus élevé que lorsque les microorganismes sont libres, assurant ainsi une diversité génétique accrue dans les biofilms (Boles *et al.*, 2004). De plus, à la recombinaison génétique entre les génomes se rajoute aussi la recombinaison des organismes dans la communauté. Les biofilms constituent également une stratégie de prolifération, car leurs membres se multiplient plus efficacement comme communauté que individuellement (Caldwell *et al.*, 1997).

Tout résistants qu'ils soient, les biofilms ont des prédateurs naturels : protozoaires, bactériophages et leucocytes polymorphonucléaires. De plus, la compétition interspécies peut se produire aussi dans les biofilms mixtes (Donlan, 2002; Nadell *et al.*, 2009).

1.2.2. Le biofilm de *C. albicans*

C. albicans est l'espèce fongique la plus souvent associée à la formation des biofilms. La levure est capable de développer des biofilms sur presque tous les implants médicaux, des cathéters vasculaires et *pacemakers* aux prothèses dentaires et lentilles de contact (Figure 8) (Douglas, 2003; Kojic & Darouiche, 2004). Les études estiment que plus de 45 millions de dispositifs médicaux sont implantés chaque année aux États-Unis et au moins 50% des toutes les infections hospitalières sont associées à ces implants. Dans 1 à 60% de cas il y a développement d'une infection après l'introduction d'un dispositif médical et les espèces de *Candida* sont responsables d'environ 20% de ces infections (Kojic & Darouiche, 2004). De plus, *C. albicans* peut coloniser aussi différents tissus de l'hôte, comme par exemple l'endothélium des valves cardiaques ou la muqueuse vaginale, conduisant ainsi au développement des endocardites ou des vaginites (Douglas, 2003).

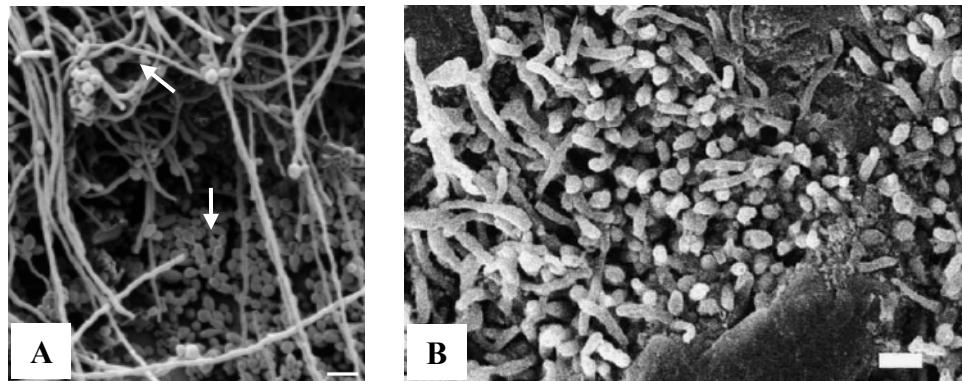


Figure 8 : Biofilms de *C. albicans* – exemples

A – Micrographie électronique d'un biofilm de *C. albicans* formé sur un cathéter en PVC. On remarque l'aspect diphasique du biofilm : une couche basale des blastospores et une couche supérieure formée principalement des formes filamenteuses. Les deux couches sont indiquées par des flèches. Barre d'échelle = 10 μm (Douglas, 2003); **B** – Micrographie électronique d'un biofilm de *C. albicans* formé sur la prothèse dentaire d'un patient atteint d'une stomatite prothétique. Barre d'échelle = 5 μm (Ramage *et al.*, 2004).

Le développement du biofilm de *C. albicans* (durant environ de 24 à 48 heures) suit les étapes classiques illustrées dans la Figure 7, avec une particularité : la présence d'un mélange des formes morphologiques dans les microcolonies. Tout d'abord les blastospores adhèrent à la surface et forment une couche basale. Le contact avec la surface déclenche la morphogenèse (après 3 à 6 heures suivant l'attachement), conduisant ainsi à la formation d'une deuxième couche, constituée principalement des hyphes et des pseudohyphes (Figure 9) (Chandra *et al.*, 2001; Douglas, 2003). Les mécanismes qui conduisent au développement des biofilms de *C. albicans* suite à l'adhésion aux surfaces sont présentement inconnus (Seneviratne *et al.*, 2008a; Ramage *et al.*, 2009; ten Cate *et al.*, 2009).

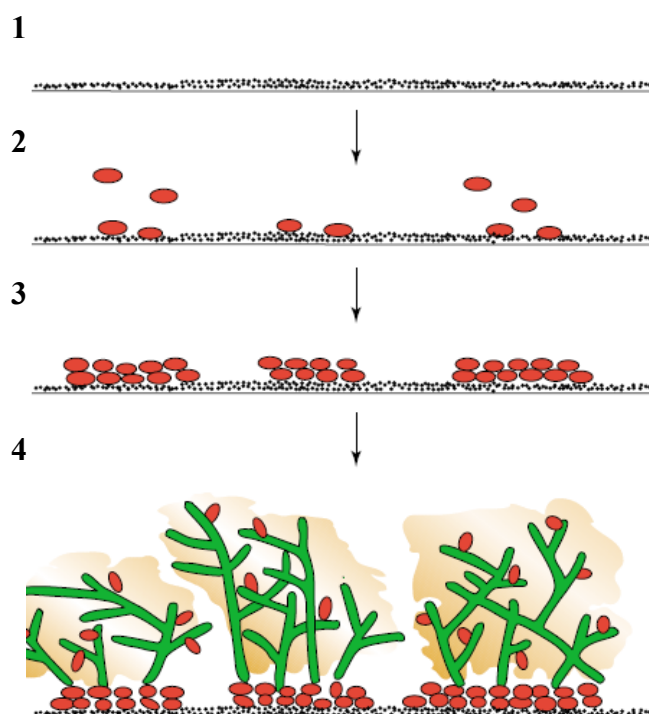


Figure 9 : Les étapes du développement du biofilm de *C. albicans*

1 – Surface d'un cathéter recouverte d'un film formé des protéines de l'hôte (points noirs) ; 2 – Attachement initial des blastospores (rouge) à la surface; 3 – Formation des couches basales des microcolonies; 4 – Développement des microcolonies par l'ajout d'une couche supérieure formée principalement des formes filamenteuses (vert) et par la production d'une matrice extracellulaire (jaune) qui enveloppe les deux couches de la microcolonie (Douglas, 2003).

La structure tridimensionnelle du biofilm de *C. albicans*, notamment la proportion des blastospores et des formes filamenteuses dans les microcolonies, varie en fonction de la composition du milieu, de la souche, de la température et de la nature du substrat (Kumamoto, 2002). Les mutants incapables de croître sous forme de blastospore, ainsi que les mutants incapables de croître sous forme d'hyphe, peuvent former des biofilms. En conséquence, la présence d'une forme morphologique particulière n'est pas strictement nécessaire à la formation des biofilms de *C. albicans* (Baillie & Douglas, 1999). Comme la proportion des formes morphologiques varie en fonction des conditions environnementales, la structure du biofilm est très adaptative (Kumamoto & Vines, 2005a). Cependant, la présence des hyphes est nécessaire pour le développement normal du biofilm de *C. albicans*. Les doubles mutants *efg1/efg1 cph1/cph1* bloqués sous forme de blastospores sont incapables de former un biofilm mais uniquement une monocouche de cellules attachées à la surface (Ramage *et al.*, 2002b).

La quantité de matrice exopolymérique produite est aussi influencée par les conditions de culture. Les biofilms incubés sans agitation ont une matrice peu élaborée, tandis que les biofilms incubés avec agitation produisent des quantités importantes de matrice (Hawser *et al.*, 1998). De plus, les biofilms ne peuvent pas se développer dans des conditions d'anaérobiose (Biswas & Chaffin, 2005). La formation de biofilm est aussi régulée par le *quorum sensing* (plus de détails à la section suivante) (Ramage *et al.*, 2002a). En conclusion, la plasticité de la structure des biofilms de *C. albicans* suggère que ces communautés peuvent varier dans leurs propriétés en fonction de la nature du dispositif médical colonisé ainsi que de sa localisation dans l'hôte (Kumamoto & Vines, 2005a). En ce qui concerne la quantité de biofilm produite, elle est aussi très variable parmi les souches de *C. albicans* (Li *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2008).

Le phénomène de commutation phénotypique est également observé dans les biofilms de *C. albicans*, mais à une fréquence basse de moins de 1%. La commutation dans les biofilms diffère de celle rencontrée dans des conditions de croissance planctonique, et elle affecte de multiples attributs biologiques cellulaires. Elle semble jouer un rôle dans la différenciation du biofilm de *C. albicans* en stimulant la production de blastospores

ayant des caractéristiques particulières en ce qui concerne l'assimilation des hydrates de carbone, l'adhésion, la formation de biofilm, la croissance et la filamentation (Jin *et al.*, 2005).

Le cycle sexuel est aussi impliqué dans la formation du biofilm de *C. albicans*. Les cellules en phase opaques sécrètent des phéromones et ainsi signalent les cellules en phase blanche, majoritaires dans la population, en vue de former un biofilm pour faciliter le processus de mating (Daniels *et al.*, 2006).

Sous forme de biofilm, *C. albicans* est 30 à 2 000 fois plus résistante aux traitements antifongiques que lorsqu'elle croît en culture planctonique, causant ainsi des graves problèmes dans le domaine médical (Hawser & Douglas, 1995; Douglas, 2003). Cette résistance est une caractéristique particulière des cellules du biofilm, puisque les levures provenant des biofilm dispersés gardent des niveaux importants de résistance (Baillie & Douglas, 1998). La résistance des biofilms de *C. albicans* n'est pas due à une pénétration limitée des agents antifongiques dans la matrice, car ces agents y diffusent relativement facilement (Al-Fattani & Douglas, 2004) et les mutants produisant des biofilms défectueux dans la structure, ayant une matrice exopolymérique très mince, montrent aussi une résistance importante aux antifongiques (Ramage *et al.*, 2002b). Dans les premières étapes de développement du biofilm, la résistance est due à l'expression accrue des gènes codant pour des pompes à efflux (Mdr1, Cdr1 et Cdr2) (Mukherjee *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004; Niimi *et al.*, 2010). Cependant, dans les biofilms matures, des mécanismes différents confèrent la résistance : les changements de la composition en ergostérols et en glucans des membranes (Mukherjee *et al.*, 2003; Nailis *et al.*, 2010), ainsi que la présence des persiteurs (LaFleur *et al.*, 2006; Lewis, 2008). De plus, une étude protéomique récente démontre que la formation de biofilm de *C. albicans* est associée aussi à une augmentation des capacités anti-oxydatives de la levure (Seneviratne *et al.*, 2008b).

Pour comprendre au niveau moléculaire le style de vie sous forme de biofilm, des études de profilage génétique à grande échelle (puces à ADN) ont été conduites. Les résultats

montrent que, en comparaison avec la culture planctonique, les cellules des biofilms à l'état préliminaire (6 heures) expriment à des niveaux plus importants les gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, dans l'assimilation des hydrates de carbone, dans le transport intracellulaire et les pompes à efflux (Yeater *et al.*, 2007). Les cellules des biofilms à l'état intermédiaire (12 heures) et mature (24 à 48 heures) surexpriment les gènes impliqués dans le métabolisme et la génération de l'énergie, le transport, la biosynthèse et la modification des protéines et des hydrates de carbone, la localisation subcellulaire, la transcription et l'organisation cellulaire (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004; Yeater *et al.*, 2007; Nett *et al.*, 2009). Ainsi, la morphologie et le phénotype des biofilms de *C. albicans* sont régulés par des gènes appartenant à des fonctions différentes, mais toutefois interconnectés. Des analyses protéomiques ont été aussi réalisées et les résultats montrent un degré élevé de similarité entre les profils protéiques des levures planctoniques et des levures en biofilm. Les différences se situent uniquement au niveau des profils protéiques des antigènes et des protéines de surface (Thomas *et al.*, 2006; Martinez-Gomariz *et al.*, 2009).

En conclusion, la formation de biofilm de *C. albicans* est un processus complexe, quoique pas encore complètement compris (Seneviratne *et al.*, 2008a; Ramage *et al.*, 2009). Il implique la coordination de plusieurs événements moléculaires, en partie contrôlés par le *quorum sensing* (Ramage *et al.*, 2002a). Ce mécanisme de communication intercellulaire est décrit en détail dans la section suivante.

1.3. UN « LANGAGE » CELLULAIRE – LE *QUORUM SENSING*

1.3.1. Généralités

Le *quorum sensing*, défini pour la première fois en 1994 (Fuqua *et al.*, 1994), est un mécanisme de régulation contrôlant l'expression de gènes particuliers au sein d'une population microbienne, en fonction de la densité cellulaire de celle-ci (nombre de cellules par unité de volume). Il repose sur la capacité des microorganismes à communiquer avec leurs congénères en utilisant des signaux moléculaires. Le *quorum sensing* implique la production, la sécrétion et la détection des autoinducteurs (petites molécules signal, semblables aux hormones) dans le milieu. Par la suite, une réponse moléculaire est déclenchée, mais uniquement quand un nombre suffisant de cellules, un quorum, est atteint. En effet, la concentration externe en autoinducteurs augmente proportionnellement avec l'augmentation de la densité cellulaire de la population microbienne, et quand le seuil critique en autoinducteurs est détecté, le groupe répond par une altération de l'expression des gènes (Jayaraman & Wood, 2008; Ng & Bassler, 2009). Les molécules signal sont en général spécifiques aux espèces ou aux souches et il y a un grand degré de diversité structurale parmi les autoinducteurs produits par différents microorganismes (e.g. acyl homosérine lactones, furanosylborate diester, quinolones, diméthoxycinnamate, acide trisporique) (Hogan, 2006; Williams, 2007).

Chez les bactéries, la présence des autoinducteurs est perçue par des récepteurs protéiques intracellulaires. Une fois activés par la fixation des molécules signal, ces récepteurs reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques aux gènes contrôlés par le *quorum sensing*, et activent ou répriment leur expression. En utilisant ce système de signalisation, les cellules synchronisent les comportements particuliers à l'échelle de la population, fonctionnant ainsi comme les organismes pluricellulaires. La majorité des processus contrôlés par le *quorum sensing* ne sont pas productifs s'ils sont entrepris par un microorganisme agissant seul, mais ils deviennent « rentables » lorsqu'ils sont effectués simultanément par un grand nombre des cellules. Par exemple, le *quorum*

sensing contrôle la sécrétion des facteurs de virulence, la formation de biofilm, la conjugaison, la sporulation et la bioluminescence (Jayaraman & Wood, 2008; Atkinson & Williams, 2009). L'incidence très répandue de divers systèmes de *quorum sensing* suggère fortement que la régulation selon la densité cellulaire est importante pour le succès des microorganismes dans plusieurs environnements (Hogan, 2006; Williams, 2007).

L'inhibition du *quorum sensing* représente une alternative attrayante aux antibiotiques traditionnels car cette stratégie n'est pas bactéricide et ainsi l'apparition de la résistance bactérienne pourrait être réduite. En conséquence, le développement des inhibiteurs de *quorum sensing* pourrait être la solution dans la lutte contre les infections chroniques associées aux biofilms ou les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Hentzer & Givskov, 2003; Williams, 2007; Pan & Ren, 2009). De même, les approches qui visent à promouvoir les associations de *quorum sensing* bénéfiques pourront aussi augmenter la production industrielle des produits bactériens (Waters & Bassler, 2005).

Le premier système de *quorum sensing* décrit a été celui de la bactérie marine bioluminescente *Vibrio fischeri* et il est considéré comme le paradigme du *quorum sensing* dans la majorité des bactéries à Gram négatif (Figure 10 A) (Nealson *et al.*, 1970). Dans ce système, les enzymes de type LuxI synthétisent des acyl homosérine lactones comme autoinducteurs. Les protéines de type LuxR se lient à ces molécules signal et contrôlent par la suite la transcription des gènes cibles (comme par exemple l'opéron *luxICDABE* de la luciférase chez *V. fischeri*). Le système de *quorum sensing* LuxI/LuxR a été identifié chez au moins 70 espèces de bactéries à Gram négatif. Une dizaine de molécules d'acyl homosérine lactone ont été aussi isolées, ayant en commun le résidu en anneau hydrophile homosérine lactone et la chaîne hydrophobe acyle avec un nombre des carbones variable (Fuqua *et al.*, 2001; Miller & Bassler, 2001).

Un autre système de *quorum sensing* identifié est celui des bactéries à Gram positif, qui utilise des oligopeptides modifiés comme autoinducteurs (Figure 10 B). Les signaux sont synthétisés sous forme des peptides précurseurs, qui sont ensuite modifiés et

excrétés (Lazazzera & Grossman, 1998). Des senseurs membranaires (histidine kinases) détectent les autoinducteurs, s'autophosphorylent et transmettent par la suite l'information via la phosphorylation d'une protéine régulatrice (système à deux composantes). Cette dernière change sa conformation, lui permettant ainsi de contrôler la transcription des gènes cibles (comme par exemple l'opéron *argBDCA* de *Staphylococcus aureus* impliqué dans la pathogénèse) (Hakenbeck & Stock, 1996).

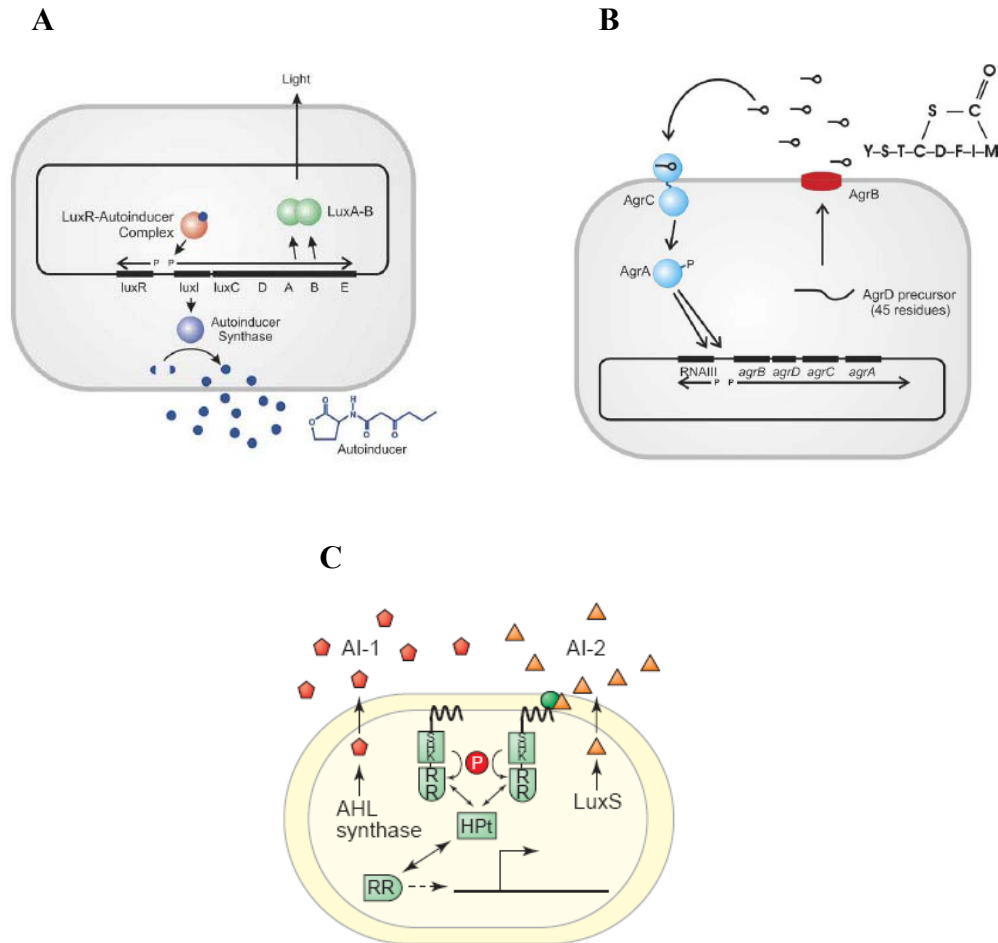


Figure 10 : Différents systèmes de *quorum sensing* rencontrés chez les bactéries

A – Signalisation intercellulaire via des acyl homosérine lactones chez la bactérie marine bioluminescente *Vibrio fischeri* (Gram négatif) (Sprague & Winans, 2006); **B** – Signalisation intercellulaire via des oligopeptides chez la bactérie Gram positif *Staphylococcus aureus* (Sprague & Winans, 2006); **C** – Signalisation intercellulaire via deux autoinducteurs, AI-1 et AI-2, chez la bactérie marine bioluminescente *Vibrio harveyi* (Henke & Bassler, 2004).

Les bactéries qui utilisent les systèmes de *quorum sensing* décrits précédemment, le font principalement pour la communication cellulaire intra-espèce. Cependant, un nouveau système de *quorum sensing* a été identifié, qui est un hybride entre les systèmes classiques des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Figure 10 C). Ce système est utilisé généralement pour la communication inter-espèces (Bassler *et al.*, 1997; Surette *et al.*, 1999; Henke & Bassler, 2004). Il a été identifié pour la première fois chez la bactérie marine bioluminescente *V. harveyi* (Bassler *et al.*, 1993; Bassler *et al.*, 1994), qui produit et détecte deux autoinducteurs distincts : AI-1, une acyl homosérine lactone (Cao & Meighen, 1989) et AI-2, un furanosyl borate diester (Chen *et al.*, 2002). Dans ce cas, le signal est transduit via un système à deux composantes.

La communication via le *quorum sensing* est également utilisée par les bactéries et leurs hôtes eucaryotes avec lesquelles elles sont engagées dans des relations de symbiose ou de pathogénèse (Piper *et al.*, 1993; Joint *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004; Hughes & Sperandio, 2008). De plus, le *quorum sensing* a été aussi rencontré chez les champignons, où il affecte des comportements au niveau de la population, comme la formation de biofilm ou la pathogénèse. Ce mécanisme de régulation semble être prévalent dans divers espèces fongiques, étant le mieux caractérisé chez *C. albicans* (Hogan, 2006; Kruppa, 2009).

1.3.2. Le *quorum sensing* chez *C. albicans*

En 1983, Kevin C. Hazen et Jim E. Cutler furent les premiers à isoler une substance morphogénétique autorégulatrice (MARS, *Morphogenic Autoregulatory Substance*), produite efficacement par *C. albicans* à des hautes densités cellulaires (2×10^8 cellules/mL). MARS réprime la germination, sans inhiber la croissance cellulaire. Pourtant, la structure chimique de cette molécule demeure encore inconnue à l'heure actuelle (Hazen & Cutler, 1979, 1983).

Depuis la découverte de MARS, plusieurs molécules de *quorum sensing* ont été identifiées chez *C. albicans*: le farnésol et l'acide farnésioïque, le tyrosol et l'acide 3(R)-hydroxy-tétradécanoïque.

Le farnésol : la production de farnésol par *C. albicans* fut le premier système de *quorum sensing* découvert chez les eucaryotes (Hornby *et al.*, 2001). Le *E,E*-farnésol inhibe la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe (Hornby *et al.*, 2001; Mosel *et al.*, 2005), ainsi que la formation de biofilm (Ramage *et al.*, 2002a). Comme l'étude de l'effet du farnésol sur différentes souches de *C. albicans* est évaluée dans le cadre de ce projet, la section suivante est entièrement consacrée à la description de cette molécule.

L'acide farnésioïque : en même temps que l'identification de farnésol comme molécule de *quorum sensing*, un autre groupe de chercheurs découvre que la souche ATCC[®] (*American Type Culture Collection*) 10231 de *C. albicans* produit le *E,E*-acide farnésioïque comme molécule responsable de l'inhibition de la croissance filamenteuse dans les cultures denses (Oh *et al.*, 2001). L'acide farnésioïque est un composé très proche du farnésol, mais les études montrent qu'il possède uniquement 3.3% de l'activité de *quorum sensing* du farnésol (Shchepin *et al.*, 2003). En effet, Jacob M. Hornby et Kenneth W. Nickerson ont confirmé par la suite (en 2004) que la souche ATCC[®] 10231 était la seule souche de *C. albicans* connue à ne pas produire de farnésol (Hornby & Nickerson, 2004). Si on compare l'activité de farnésol avec celle de l'acide farnésioïque, le farnésol inhibe la transition morphologique de levure à hyphe à des concentrations plus faibles que l'acide farnésioïque, mais le dernier est moins toxique à des fortes concentrations (Kim *et al.*, 2002).

Le tyrosol : fut identifié comme molécule de *quorum sensing* chez la souche SC5314 de *C. albicans*. Le tyrosol stimule la transition vers la forme hyphe contrairement au farnésol qui l'inhibe. De plus, le tyrosol réduit la phase de latence qui apparaît lorsque les levures sont diluées dans un milieu de culture frais, en prévenant la diminution de l'expression des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, dans la

ségrégation chromosomique et dans la régulation du cycle cellulaire (Chen *et al.*, 2004). Par contre, le tyrosol ne semble pas avoir un rôle dans la détoxification des oxydants du milieu de culture comme dans le cas du farnésol (Westwater *et al.*, 2005). Le tyrosol agit aussi comme molécule de *quorum sensing* pour les biofilms, en stimulant la production des hyphes pendant les premières étapes (1 à 6 heures) du développement du biofilm (Alem *et al.*, 2006). Cependant, la fonction exacte du tyrosol reste encore un mystère. En ce qui concerne la production de tyrosol, elle est au moins 50% plus importante dans le biofilm que dans la culture planctonique (Alem *et al.*, 2006). L'action du farnésol est dominante sur l'action du tyrosol, autant en culture planctonique qu'en biofilm (Alem *et al.*, 2006; Nickerson *et al.*, 2006). Cependant, en biofilm, l'activité du tyrosol excède celle du farnésol après 14 heures d'incubation, mais elle est renversée après 24 heures. D'ailleurs, la production de farnésol semble augmenter significativement pendant les dernières étapes (48 à 72 heures) de la formation de biofilm. Ainsi, le tyrosol favorise la formation des hyphes pendant les phases préliminaires et intermédiaires du développement du biofilm, tandis que le farnésol joue un rôle critique dans les dernières étapes, en stimulant la dispersion des blastospores du biofilm pour permettre la colonisation des nouvelles surfaces (Ramage *et al.*, 2002a; Alem *et al.*, 2006).

Deux autres alcools aromatiques, le phényléthanol et le tryptophol, sont produits par *C. albicans* en plus du tyrosol (Lingappa *et al.*, 1969). Ces deux composés sont des molécules de *quorum sensing* chez *S. cerevisiae* (Chen & Fink, 2006). Récemment, des études montrent que ces deux alcools aromatiques inhibent la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe et le développement du biofilm à des fortes concentrations chez *C. albicans* (Chen & Fink, 2006). Toutefois, leur rôle physiologique demeure inconnu. Les chercheurs pensent que les trois alcools aromatiques ont une origine biosynthétique commune et sont liés par une voie comportant une transamination, suivie par une décarboxylation (Nickerson *et al.*, 2006). De plus, la production de ces trois composés est étroitement contrôlée par l'ammoniaque et la densité cellulaire (Chen & Fink, 2006).

L'acide 3(R)-hydroxy-tétradécanoïque : un métabolite de l'acide linoléique, est une nouvelle molécule de *quorum sensing* identifiée chez *C. albicans*. Elle stimule la germination et la formation de biofilm en modulant l'expression des gènes nécessaires pour le développement des hyphes (Nigam *et al.*, 2010).

En plus des molécules de *quorum sensing* décrites chez *C. albicans*, Margarida Martins et ses collègues ont démontré que les cellules planctoniques et les biofilms de la levure pathogène sécrètent une série d'autres molécules signal (l'alcool isoamylique, le 2-phényléthanol, le 1-dodécanol et le *E*-nérolidol) qui inhibent la transition vers la forme hyphe. La production de ces alcools est dépendante des conditions de culture et de la phase de croissance (Martins *et al.*, 2007). Le 1-dodécanol empêche la formation des hyphes (Hogan *et al.*, 2004) en inhibant la voie de l'AMPc (voir section 1.1.5.) (Davis-Hanna *et al.*, 2008). Une étude récente montre que l'alcool isoamylique inhibe aussi la formation de biofilm de *C. albicans* (Martins *et al.*, 2010).

En conclusion, *C. albicans* possède plusieurs molécules de *quorum sensing*, qui agissent soit en synergie ou en hiérarchie, afin de réguler avec précision la signalisation intercellulaire (Kruppa, 2009).

1.4. LE FARNÉSOL, PLUS QU'UN PARFUM

1.4.1. Généralités

Le farnésol (3,7,11-triméthyl-2,6,10-dodécatrien-1-ol) est un alcool sesquiterpène formé de 3 unités isoprènes (Figure 11). Cette huile volatile incolore a une masse molaire de 222.37 g/mol et un point d'ébullition de 111°C à 0.35 mmHg (Greenwood & Earnshaw, 1997). Le farnésol existe sous forme de 4 isomères, mais seulement l'isomère *E,E* (*trans,trans*) possède des activités biologiques (Shchepin *et al.*, 2003).

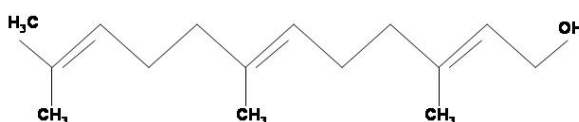


Figure 11 : Molécule de *E,E*-farnésol

Le farnésol est produit par la majorité des cellules comme intermédiaire dans la voie de biosynthèse des stéroïdes. Présent à l'état naturel dans un grand nombre des plantes, il est extrait et utilisé pour ses propriétés odorantes (son nom est originaire de la plante *Acacia farnesiana*, le cassier). Le farnésol fait partie des nombreuses huiles essentielles (e.g. citronnelle, néroli, cyclamen, rose, musc) et est incorporé comme parfum dans les produits cosmétiques, ménagers, et même dans les cigarettes (Lapczynski *et al.*, 2008). Cependant, il est une des 26 substances parfumantes allergènes, dont la présence doit être signalé sur l'étiquette (Schnuch *et al.*, 2007). Ayant des propriétés antimicrobiennes, le farnésol est utilisé notamment dans les déodorants, car il contribue à l'inhibition de la prolifération des bactéries responsables des odeurs corporelles. Les études montrent qu'il affecte la viabilité et la résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* (Brehm-Stecher & Johnson, 2003; Inoue *et al.*, 2004), prévenant aussi

l'accumulation de biofilm de *Streptococcus mutans* (Koo et al., 2003) et *S. aureus* (Unnanuntana et al., 2009), ainsi que la croissance et la formation de biofilm de *Staphylococcus epidermidis* (Gomes et al., 2009). De plus, le farnésol est un pesticide naturel contre les acariens (Guillon, 1998) et une phéromone pour d'autres insectes (Ansebo et al., 2005; Granero et al., 2005).

Chez l'homme, cet isoprénoïde inhibe la prolifération et induit l'apoptose de plusieurs lignées cellulaires néoplasiques de différentes origines : poumon, pancréas, sang, etc. (Adany et al., 1994; Miquel et al., 1996; Rioja et al., 2000; Wiseman et al., 2007; Scheper et al., 2008). Le farnésol semble être ainsi un agent antinéoplasique et il a été rapporté être efficace dans la chimioprévention et dans la chimiothérapie de divers modèles de cancer *in vivo* (Burke et al., 2002; Rao et al., 2002; Mo & Elson, 2004; Chagas et al., 2009). Des études de profilage génétique à grande échelle ont montré récemment que l'induction de la mort cellulaire par le farnésol est couplée avec la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Joo et al., 2007). Le farnésol est impliqué aussi dans l'infertilité chez l'humain, stimulant la perte d'acrosome et l'apoptose des spermatozoïdes (Rennemeier et al., 2009). Chez les mammifères, l'isoprénoïde est présent aussi dans le cerveau, où il inhibe les canaux calciques neuronaux, jouant ainsi un rôle dans la sécrétion des neurotransmetteurs (Roullet et al., 1999). De plus, cet isoprénoïde inhibe la vasoconstriction artérielle en réduisant l'apport de calcium dans les cellules. Cependant, il n'a aucun effet sur la fluidité membranaire ou l'activité des ATPase calciques (Roullet et al., 1996; Roullet et al., 1997).

Chez les mycètes, au moins 47 espèces sécrètent le farnésol, qui est impliqué dans diverses fonctions (Muramatsu et al., 2002). Cet isoprénoïde inhibe la croissance de *S. cerevisiae* (Machida et al., 1999) et induit la production d'espèces réactives oxygénées chez cette levure (Machida et al., 1998). Chez *Neurospora crassa*, il rétablit le rythme circadien de conidiation dans les mutants arythmiques (Granshaw et al., 2003). Le farnésol inhibe la croissance et la formation de biofilm chez d'autres espèces de *Candida* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* et *C. krusei*), en altérant leur activité métabolique (Laffey & Butler, 2005; Jabra-Rizk et al., 2006; Weber et al., 2010). De

plus, l'isoprénoïde inhibe la germination et diminue la résistance aux antifongiques de *C. dubliniensis* (Jabra-Rizk *et al.*, 2006; Henriques *et al.*, 2007) et induit l'arrêt de la croissance cellulaire de *C. parapsilosis* (Rossignol *et al.*, 2007). Le rôle du farnésol chez *C. albicans* est décrit en détail dans la section suivante.

1.4.2. Multiples rôles joués par le farnésol chez *C. albicans*

Comme déjà mentionné dans la section 1.3.2, le farnésol est une molécule de *quorum sensing* chez *C. albicans*, qui inhibe la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphes (Hornby *et al.*, 2001). En conséquence, la levure croît sous forme de blastospore, pouvant ainsi se disperser dans le milieu, en vue de la recherche des nouveaux habitats. Il a été avancé que le farnésol n'influence pas la croissance cellulaire, même à des fortes concentrations (Hornby *et al.*, 2001). Cependant, des études récentes ont montré le contraire, la croissance de la levure étant inhibée en présence de 40 μM farnésol (Uppuluri *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2010). D'ailleurs, cette inhibition est dépendante de la phase de croissance des cellules. Aucune croissance n'a été observée avec 100 μM farnésol. La taille des cellules, ainsi que leur viabilité, ont été aussi diminuées en présence de cet isoprénoïde. L'ajout d'un analogue de diacylglycérol rétablit le taux de croissance normal, impliquant ainsi la voie de signalisation du phosphatidylinositol dans la régulation du retard de croissance (Uppuluri *et al.*, 2007).

Le farnésol inhibe la transition morphologique de levure à hyphes en présence de presque tous les inducteurs environnementaux et chimiques de la filamentation, mais les concentrations de farnésol nécessaires varient en fonction de la composition du milieu (Mosel *et al.*, 2005). Cet isoprénoïde est capable de bloquer uniquement la formation des tubes de germination et non pas l'élongation des tubes de germination déjà existants. Ainsi, il y a une durée limitée de temps (moins de 90 min) pendant laquelle les levures répondent au farnésol. Cela est dû probablement au phénomène d'engagement qui détermine la synchronisation de la population une fois la germination initiée, ainsi que la perte de la totipotence cellulaire. Toutefois, l'engagement n'est pas permanent et les

levures redeviennent totipotentes pendant la phase stationnaire (désengagement), étant ainsi de nouveau sensibles au farnésol (Mitchell & Soll, 1979; Mosel *et al.*, 2005). Par contre, le farnésol n'a aucun effet sur la germination en absence d'oxygène, suggérant ainsi que les levures possèdent probablement un autre système de *quorum sensing* dans ces conditions (Dumitru *et al.*, 2004).

L'ajout de 30 à 300 μM farnésol au temps zéro, avant la formation des hyphes, inhibe aussi le développement de biofilm. Comme observé dans la culture planctonique, le farnésol n'a pas d'effet sur la formation de biofilm une fois la germination initiée (après 1 à 2 heures). Cependant, les biofilms matures (24 heures) redeviennent sensibles au farnésol (Ramage *et al.*, 2002a). Ainsi, le phénomène d'engagement/désengagement est aussi caractéristique des biofilms. En conséquence, la dispersion des blastospores du biofilm mature est stimulée par l'accumulation du farnésol *in situ*, après le désengagement cellulaire (Nickerson *et al.*, 2006).

Le farnésol joue aussi un rôle dans le cycle sexuel de *C. albicans*. En aérobiose, cet isoprénoïde tue les cellules opaques, prévenant ainsi le mating. Pourtant, il ne bloque pas le cycle sexuel en absence d'oxygène. Ainsi, le farnésol semble diriger le mating vers des sites anaérobies, probablement plus propices pour la levure (Dumitru *et al.*, 2007).

Le *quorum sensing* a également un rôle positif chez *C. albicans*, car le farnésol augmente la production des chlamydospores. Le mécanisme par lequel cet isoprénoïde induit le développement des chlamydospores n'est pas encore connu, mais la réponse au stress oxydatif semble être impliquée (Martin *et al.*, 2005). En effet, le farnésol stimule la phosphorylation de la protéine kinase Hog1 (Smith *et al.*, 2004), essentielle dans la réponse aux espèces réactives oxygénées, ainsi que dans la formation des chlamydospores (Alonso-Monge *et al.*, 2003). De plus, les études montrent que cet isoprénoïde, qui est stable à la chaleur, insensible aux enzymes protéolytiques et non affecté par les pH extrêmes, est responsable, au moins en partie, de la protection de la levure contre le stress oxydatif (Westwater *et al.*, 2005).

Une étude récente démontre que le farnésol induit l'apoptose chez les cellules de *C. albicans*, en activant des caspases (Shirtliff *et al.*, 2009). Cependant, l'effet toxique de farnésol est dépendant des conditions environnementales. En effet, la levure est résistante aux fortes concentrations de farnésol si les cellules, en phase stationnaire, sont incubées dans un milieu de culture riche en nutriments. Le farnésol devient nocif pour *C. albicans* si les cellules, en phase exponentielle, sont incubées dans un milieu de culture pauvre en nutriments (Langford *et al.*, 2010).

Le farnésol augmente aussi l'incorporation d'acides aminés chez *C. albicans*, mais seulement à des concentrations inférieures à 10 µg/mL. La magnitude de cette incorporation est dépendante de l'hydrophobicité de la surface cellulaire. Par contre, à des concentrations en farnésol supérieures à 10 µg/mL, l'incorporation des acides aminés retrouve son niveau basal (Braun, 2005). Ainsi, le farnésol semble produire un effet gradient qui influence les activités métaboliques de *C. albicans*. En conséquence, comme le farnésol libre n'est pas normalement détecté dans le plasma humain (Saisho *et al.*, 1997), et comme il prévient la transition morphologique de levure à hyphes et la formation de biofilm, deux processus impliqués dans la virulence de la levure, il pourrait être un nouveau type d'agent antifongique (Braun, 2005). De plus, une étude récente effectuée *in vivo* chez la souris montre que le farnésol prévient l'apparition de la candidose orale (Hisajima *et al.*, 2008). La présence de farnésol exogène induit aussi la réponse de défense des cellules épithéliales humaines contre les infections au *C. albicans* (Decanis *et al.*, 2009).

Cependant, d'autres études *in vivo* ont démontré que le farnésol joue aussi un rôle dans la pathogénèse de *C. albicans*, étant probablement un facteur de virulence. En effet, les mutants défectueux dans la production de cet isoprénoïde sont moins pathogènes que les souches sauvages. De plus, l'ajout de farnésol exogène induit la mortalité chez la souris et, en présence des doses sous létales de *C. albicans*, le taux de mortalité est augmentée (Navarathna *et al.*, 2007a). La pathogénicité de la levure est aussi plus élevée après traitement des cellules par le fluconazole, substance qui augmente jusqu'à 10 fois la production de l'isoprénoïde (Navarathna *et al.*, 2005). Le farnésol augmente la virulence

de *C. albicans* en inhibant la réponse immunitaire de l'hôte, notamment la progression normale de l'expression des cytokines (Navarathna *et al.*, 2007b) et l'activité anti-*Candida* des macrophages (Abe *et al.*, 2009). Ainsi, le potentiel thérapeutique antifongique du farnésol est peu probable et son utilisation devrait se limiter uniquement à des applications topiques (Navarathna *et al.*, 2007a).

Le farnésol est également employé par *C. albicans* pour réduire la compétition avec d'autres microorganismes. Cet isoprénoïde induit l'apoptose chez *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum* et *Penicillium expansum* (Semighini *et al.*, 2006; Semighini *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). La croissance et le développement de *A. nidulans* sont altérés en co-culture avec *C. albicans*, dans une manière dose-dépendante de farnésol (Semighini *et al.*, 2006). L'isoprénoïde induit aussi l'altération du patron de germination de *F. graminearum* et la lyse des spores après une exposition prolongée (Semighini *et al.*, 2008). De plus, il inhibe la conidiation d'*A. niger* (Lorek *et al.*, 2008) ainsi que la croissance et la germination de *Paracoccidioides brasiliensis* (Derengowski *et al.*, 2009). Le dermatophyte *Trichophyton rubrum* n'est pas capable non plus de croître en co-culture avec *C. albicans* ou dans le milieu où la levure avait préalablement poussée (Jillson & Nickerson, 1948). Le farnésol joue aussi un rôle dans les interactions levure-bactéries, vu ses propriétés antibactériennes (voir la section précédente) ou sa capacité de réprimer le signal quinolone, le facteur de virulence pyocyanine ainsi que la motilité chez *Pseudomonas aeruginosa*. À son tour, *P. aeruginosa* affecte la morphologie de *C. albicans*. Cependant, cette interaction inter-espèce varie en fonction des souches (Cugini *et al.*, 2007; McAlester *et al.*, 2008). De plus, *C. albicans* inhibe la croissance de la bactérie pathogène Gram négatif *Acinetobacter baumannii*, mais seulement quand son seuil de *quorum* est atteint, signalé via le farnésol. L'interaction est réciproque, *A. baumannii* étant capable d'inhiber la filamentation et la virulence de la levure (Peleg *et al.*, 2008).

En conclusion, le farnésol est une molécule signal importante chez *C. albicans*, qui régule plusieurs processus cellulaires, ayant tous comme but ultime de favoriser la survie du pathogène dans différentes niches environnementales.

1.4.3. Voie de synthèse, production et inhibiteurs chez *C. albicans*

Chez *C. albicans* le farnésol est produit dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Figure 12) (Hornby *et al.*, 2003), molécule similaire au cholestérol des cellules animales. L'ergostérol participe à la structure membranaire et a ainsi un rôle crucial dans la viabilité des levures (Parks & Casey, 1995).

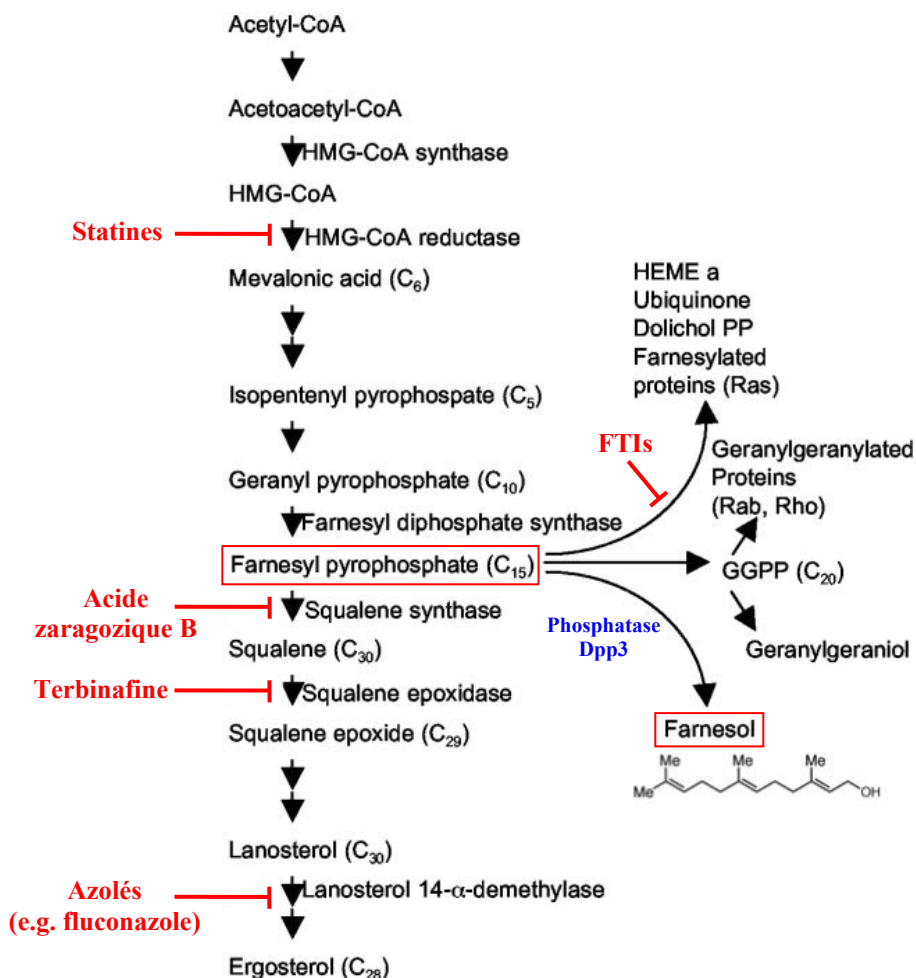


Figure 12 : Voie de biosynthèse du farnésol chez *C. albicans*

Le FPP joue un rôle central dans le métabolisme des lipides chez *C. albicans*, menant à la production de farnésol après déphosphorylation par la phosphatase Dpp3. Les principaux inhibiteurs des enzymes de la voie du mévalonate sont indiqués en rouge. FTIs – inhibiteurs de la FTase. Adapté de : (Nickerson *et al.*, 2006; Shea & Del Poeta, 2006).

Le farnésol est synthétisé suite à la déphosphorylation du FPP par la phosphatase Dpp3 (Navarathna *et al.*, 2007a). Le FPP est impliqué dans la production de nombreuses autres molécules (e.g. géranylgeraniol, dolichol, ubiquinone, hème a) et dans la prénylation protéique, qui joue un rôle important dans le contrôle des divers processus cellulaires (e.g. croissance et différenciation cellulaire, transport membranaire, transduction des signaux) (Perez-Sala, 2007). Le double mutant du gène *DPP3* (homologue de la pyrophosphate phosphatase Dpp1 de *S. cerevisiae* (Carman & Wu, 2007)) produit 6 fois moins de farnésol que la souche sauvage, sans avoir de défauts dans le dimorphisme cellulaire (Navarathna *et al.*, 2007a).

Dans la voie du mévalonate, environ 1.6% de FPP est impliqué dans la production du farnésol et le reste est utilisé pour la synthèse d'ergostérol (Nickerson *et al.*, 2006). La levure produit cet isoprénoïde continuellement durant sa croissance, entre 23 et 43°C, et indépendamment des sources de carbone et d'azote présentes dans le milieu. Par contre, les quantités de farnésol synthétisées sont notamment plus importantes entre 37 et 40°C (Hornby *et al.*, 2001) ou à 37°C en présence de 10% sérum (Weber *et al.*, 2010). La production de farnésol chez *C. albicans* varie aussi en fonction des souches (Weber *et al.*, 2008) et elle est réprimée dans les cellules opaques (Dumitru *et al.*, 2007). Cet isoprénoïde n'est pas produit non plus en anaérobie, car la biosynthèse d'ergostérol est altérée dans ces conditions. En effet, en absence d'oxygène, la levure est insensible aux traitements antifongiques ciblant ce stérol (Dumitru *et al.*, 2004).

En présence d'inhibiteurs de la voie de mévalonate (Figure 12), la production de farnésol chez *C. albicans* est élevée. Par exemple, l'ajout de l'acide zaragozique B (inhibiteur de la squalène synthase) ou des divers azolés (inhibiteurs de la lanostérol 14 α -déméthylase) augmente la production de 8 à 45 fois, probablement à cause de l'accumulation des précurseurs de FPP (Hornby *et al.*, 2003; Hornby & Nickerson, 2004). D'ailleurs, les azolés sont de puissants agents antifongiques (Chen & Sorrell, 2007; Arnold *et al.*, 2010). De plus, un inhibiteur de la FTase, le *FPT inhibitor III*, réprime chez *C. albicans* la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphé induite par le sérum, sans avoir aucun effet sur la croissance des blastospores. Cet

inhibiteur bloque la farnésylation de la protéine Ras1, qui régule la transition morphologique de levure à hyphe, étant ainsi un potentiel agent antifongique (McGeady *et al.*, 2002). La terbinafine, une allylamine qui inhibe la squalène époxydase résultant dans une déficience en ergostérol, est aussi très efficace dans la thérapie antifongique (Gianni, 2010). Les inhibiteurs de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl co-enzyme A (HMG-CoA) réductase (les statines) sont également des potentiels agents antifongiques. Le simvastatine et l'atorvastatine inhibent la croissance de *C. albicans* (Macreadie *et al.*, 2006), tandis que la lovastatine a un effet fongistatique (Gyetvai *et al.*, 2006). Par contre, contrairement aux autres cellules eucaryotes, la lovastatine n'induit pas l'apoptose chez *C. albicans*. De plus, il a récemment été démontré que le simvastatine inhibe aussi la formation de biofilm de *C. albicans in vitro* (Liu *et al.*, 2009).

1.4.4. Récepteur nucléaire

Chez les mammifères, le farnésol active un récepteur nucléaire, le *farnesoid X receptor* (FXR ou RIP14 chez la souris), un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones (Forman *et al.*, 1995; Seol *et al.*, 1995). Cependant, la liaison directe du farnésol sur la protéine FXR n'a pas été encore démontrée. FXR est un homologue du récepteur de l'ecdysone des insectes (EcR) ou du récepteur nucléaire FOR des amphibiens (Forman *et al.*, 1995; Seo *et al.*, 2002). Le rôle principal de FXR est dans le métabolisme des acides biliaires et il est exprimé dans le foie, l'intestin, le rein et le cortex adrénal. FXR forme un hétérodimère avec la protéine RXR et lie ensuite les séquences d'ADN constituées d'une répétition inversée espacée par un nucléotide (Laffitte *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2003; Fiorucci *et al.*, 2010).

Comme l'activité du farnésol est très sensible aux changements structuraux, l'effet direct de cet isoprénoïde sur la fluidité membranaire peut être exclu chez *C. albicans*. Ainsi, l'existence d'un récepteur semblerait être plus probable chez la levure (Nickerson *et al.*, 2006; Langford *et al.*, 2009). Ce récepteur pourrait être soit un analogue fongique du FXR, soit un récepteur différent spécifique du farnésol (Shchepin *et al.*, 2003).

1.4.5. Voies potentielles de signalisation du farnésol chez *C. albicans*

Le mode d'action du farnésol chez *C. albicans* n'est pas complètement compris au niveau moléculaire. Toutefois, jusqu'à présent, plusieurs voies de signalisation ont été décrites (Figure 13) (Kruppa, 2009).

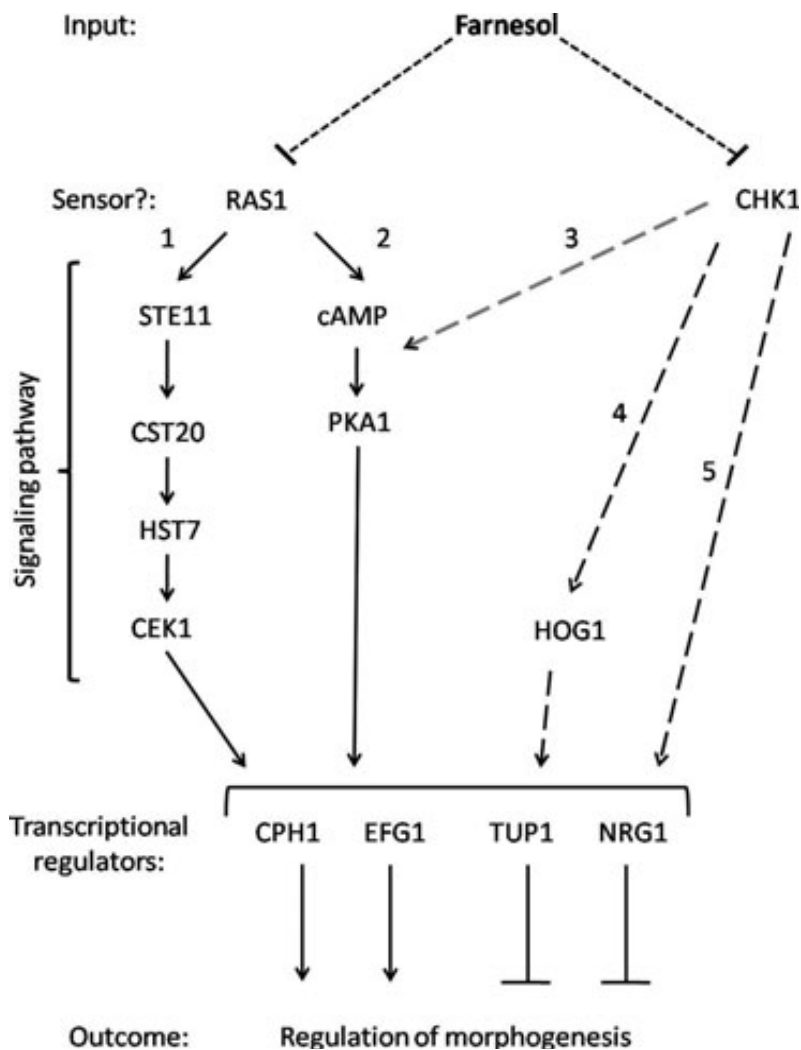


Figure 13 : Voies hypothétiques de signalisation du farnésol chez *C. albicans*

Les lignes pleines indiquent des voies de signalisation connues et les lignes pointillées des voies possibles mais inconnues à l'heure actuelle (Kruppa, 2009).

La voie des MAPKs : en présence de farnésol, l'expression des gènes codant pour la kinase Hst7 et pour le facteur de transcription Cph1 a été altérée, contrairement à l'expression de *CST20* qui est restée inchangée (Sato *et al.*, 2004). De plus, l'expression du gène codant pour la perméase Gap1, qui est régulé par la voie des MAPKs, a été aussi inhibée en présence de cet isoprénoïde. Ainsi, le farnésol semble réguler la germination en inhibant la voie des MAPKs (Figure 13-1) (Sato *et al.*, 2004).

La voie de l'AMPc : plusieurs gènes contrôlés par l'AMPc (*HSP12*, *CTA1*) sont affectés par le farnésol, indiquant ainsi que la transition morphologique de levure à hyphes est inhibée via la cascade de signalisation Ras1-AMPc-Efg1 (Figure 13-2) (Davis-Hanna *et al.*, 2008). De plus, l'ajout de l'AMPc exogène dans un milieu de culture contenant du farnésol rétablit au complet la germination et les mutants du gène *RAS1* qui sont capables de germer en absence des stimuli externes, croissent sous forme de blastospores en présence de farnésol (Davis-Hanna *et al.*, 2008).

Le système à deux composantes : un système à deux composantes pourrait être aussi impliqué dans la réponse au farnésol chez la levure. En effet, des systèmes à deux composantes qui transmettent le signal des molécules de *quorum sensing* ont été déjà décrits chez les bactéries (Haas *et al.*, 2002; Knutsen *et al.*, 2004). Le double mutant du gène *CHK1* (connu aussi sous le nom de *HK1* ou *CaHK1*), qui code pour une histidine kinase d'un système à deux composantes, est réfractaire à l'effet inhibiteur du farnésol sur la filamentation, ainsi que sur la formation de biofilm, même en présence de fortes concentrations d'isoprénoïde (Calera *et al.*, 1998; Kruppa *et al.*, 2004). Comme Chk1 est une protéine membranaire, et comme aucun site potentiel de liaison au farnésol n'a été trouvé dans sa structure, il est probable qu'une autre protéine sentira le signal du farnésol et activera par la suite une voie incluant Chk1 (Figure 13-5) (Kruppa *et al.*, 2004). Chk1 pourrait être aussi un régulateur négatif d'un sentier du développement des hyphes (Figure 13-4) (Nickerson *et al.*, 2006; Davis-Hanna *et al.*, 2008). Chk1 (281.8 kDa), orthologue des senseurs du stress oxydatif Mak2p et Mak3p de *Schizosaccharomyces pombe* (Buck *et al.*, 2001), agit en amont de la protéine kinase Hog1, impliquée dans la réponse aux espèces réactives oxygénées chez *C. albicans*,

modulée par le farnésol (Figure 13-4) (Smith *et al.*, 2004). Les études montrent qu'en présence de plusieurs types de stress, *CHK1* est surexprimée (Li *et al.*, 2004). Les mutants du *CHK1* floculent excessivement en culture liquide mais ils forment des colonies lisses sur milieu solide (Calera & Calderone, 1999). Ces mutants sont avirulents dans un modèle murin de candidose disséminée (Calera *et al.*, 1999), probablement car ils sont plus sensibles aux neutrophiles humains (Torosantucci *et al.*, 2002). Chk1 joue aussi un rôle dans la régulation de la biosynthèse du mannane et du glucane de la paroi cellulaire (Kruppa *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009) et c'est pour cela que les mutants du *CHK1* sont peu capables d'adhérer au tissu œsophagien humain *in vitro* (Li *et al.*, 2002). Une étude récente montre que la délétion du gène *CHK1* entraîne une amélioration de la reconnaissance de la levure pathogène *C. albicans* par les phagocytes du système immunitaire de l'hôte. Ainsi, comme il n'existe pas d'homologues des histidines kinases fongiques chez les mammifères, la protéine Chk1 pourrait être une cible prometteuse pour les nouveaux agents antifongiques (Klippel *et al.*, 2010).

Le répresseur Tup1 : Bessie W. Kebaara et ses collègues ont démontré récemment que le répresseur Tup1 est un composant crucial dans la réponse au farnésol (Kebaara *et al.*, 2008). Tup1 agit en complexe avec les facteurs de transcription Nrg1 et Rfg1 (voir section 1.1.5). Les mutants *tup1/tup1* et *nrg1/nrg1* ne répondent pas au farnésol en culture liquide, tandis que la réponse au farnésol du mutant *rfg1/rfg1* n'est pas affectée. De plus, les mutants *tup1/tup1* et *nrg1/nrg1* produisent 17 à 19 fois plus de farnésol que les souches sauvages (Kebaara *et al.*, 2008). L'expression de *TUP1* est augmentée suite au traitement des cellules par le farnésol et l'expression des gènes régulés par *TUP1* (*HWPI* et *RBT1*) est fortement inhibée suite au même traitement (Cao *et al.*, 2005; Enjalbert & Whiteway, 2005; Kebaara *et al.*, 2008).

L'effet du farnésol sur l'expression globale des gènes a été également examiné dans trois études différentes, mais dans chacune, à des moments distincts: pendant les premières étapes de la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe (Cho *et al.*, 2007), pendant la reprise de la croissance suivant la phase stationnaire (Enjalbert & Whiteway, 2005) et dans le biofilm (Cao *et al.*, 2005). Il n'est pas encore clair quels

gènes sont responsables de l'action du farnésol car les observations de trois études sont différentes, étant donné que le moment d'extraction de l'ARN, ainsi que les conditions de cultures étaient distinctes. Pendant les premières étapes de la transition morphologique de levure à hyphes les gènes impliqués sont ceux engagés dans la biosynthèse des acides aminés, dans le métabolisme central du carbone et du glucose, dans le stress oxydatif et dans l'agglutination. La majorité de ces gènes est régulée principalement par la protéine kinase Gcn4 ou par les complexes Tup1, Nrg1, Mig1 et Ssn6 (Cho *et al.*, 2007). L'étude réalisée pendant la reprise de la croissance, suivant la phase stationnaire, a permis de distinguer les gènes impliqués dans les changements morphologiques induits par le farnésol (e.g. adhésion cellulaire, paroi cellulaire, chromatine, réplication de l'ADN, cycle cellulaire), de ceux exprimés suite à la présence continue de farnésol (e.g. réponse aux agents antifongiques et oxydation des acides gras) (Enjalbert & Whiteway, 2005). Cependant, ces données doivent être analysées avec précaution, car le farnésol ne réprime pas complètement la formation des hyphes dans ces conditions (Nickerson *et al.*, 2006). Quand l'effet du farnésol a été étudié au niveau des biofilms, les gènes impliqués ont été ceux associés à la résistance aux agents antifongiques, à la paroi cellulaire, au transport du fer, au choc thermique et à la formation des hyphes (Cao *et al.*, 2005). De nouveau, ces résultats doivent être regardés avec précaution, car l'étude a analysé un mélange cellulaire, après uniquement 24 heures d'incubation en présence d'une trop forte concentration de farnésol (Nickerson *et al.*, 2006).

En ce qui concerne son rôle dans la protection de la levure contre le stress oxydatif, le farnésol agit via la voie de l'AMPc (Deveau *et al.*, 2010). De plus, le farnésol inhibe la phosphorylation de la kinase Cek1 de la voie des MAPKs (voir section 1.1.5) qui régule l'intégrité de la paroi cellulaire (Roman *et al.*, 2009).

En conclusion, la réponse au farnésol semble être « multifactorielle », c'est-à-dire qu'elle est régulée par des multiples voies de signalisation. Des études additionnelles d'analyse génétique sont nécessaires pour mieux comprendre le mode d'action de farnésol chez *C. albicans* (Kruppa, 2009).

1.4.6. Variations de la réponse au farnésol chez *C. albicans*

Dans la nature, les souches de *C. albicans* ne répondent pas toutes au farnésol en inhibant leur filamentation. En plus des doubles mutants *chk1/chk1*, *tup1/tup1* et *nrg1/nrg1* qui sont réfractaires à l'effet inhibiteur du farnésol en culture liquide (Kruppa *et al.*, 2004; Kebaara *et al.*, 2008), 583 mutants (52.5%) obtenus par mutagenèse chimique ont été décrits comme des répondeurs partiels au farnésol sur milieu solide et 45 mutants (4.1%) comme des non répondeurs au farnésol (Figure 14a) (Jensen *et al.*, 2006). Les répondeurs produisent des colonies lisses en présence de farnésol, tandis que les répondeurs partiels forment des colonies partiellement chevelues et les non répondeurs des colonies hautement chevelues, même en présence de fortes concentrations d'isoprénoïde.

Des non répondeurs au farnésol ont été retrouvés aussi parmi les isolats cliniques de *C. albicans*, dans une étude faite préalablement dans notre laboratoire. Le screening de la réponse au farnésol sur milieu solide (milieux *Trypticase Yeast Extract*, R2A et Lee; pour plus de détails sur les milieux voir la section 3.1.2.), à une température d'incubation de 37°C en présence de 2.5% CO₂, avec ou sans 30 µM farnésol, a permis d'identifier 2 souches non répondeuses au farnésol (2% de toutes les souches) parmi les 106 isolats de différentes sources humaines (Figure 14b) (Desmeules, 2004). Les non répondeurs gardent le phénotype colonial chevelu même en présence de farnésol et ils forment 3 à 4 fois plus de biofilm et semblent produire une quantité plus importante de farnésol que les répondeurs. De plus, l'inhibition de la formation de biofilm par le farnésol est plus importante pour les répondeurs et les non répondeurs (Ross, 2009). Une étude récente effectuée dans notre laboratoire nous a permis de conclure que la prévalence des non répondeurs est sensiblement identique (près de 2%) entre les isolats cliniques de *C. albicans* de provenance orale ou vaginale (Ross, 2009).

En conclusion, les effets nombreux et complexes du farnésol observés chez *C. albicans* suggèrent que des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la multitude des changements que cette molécule induit chez la levure. En particulier, il n'est pas

encore clair comment *C. albicans* balance l'utilisation du farnésol en tant que régulateur de sa propre morphogénèse, de facteur de virulence pendant la pathogénèse et de déclencheur d'apoptose. Aussi, le mystère persiste sur le mécanisme expliquant la tolérance de la levure aux concentrations élevées de farnésol, en évitant sa propre apoptose (Nickerson *et al.*, 2006). Les non répondeurs au farnésol représentent ainsi un outil précieux, qui permettra éventuellement de mieux comprendre la réponse au farnésol chez *C. albicans*.

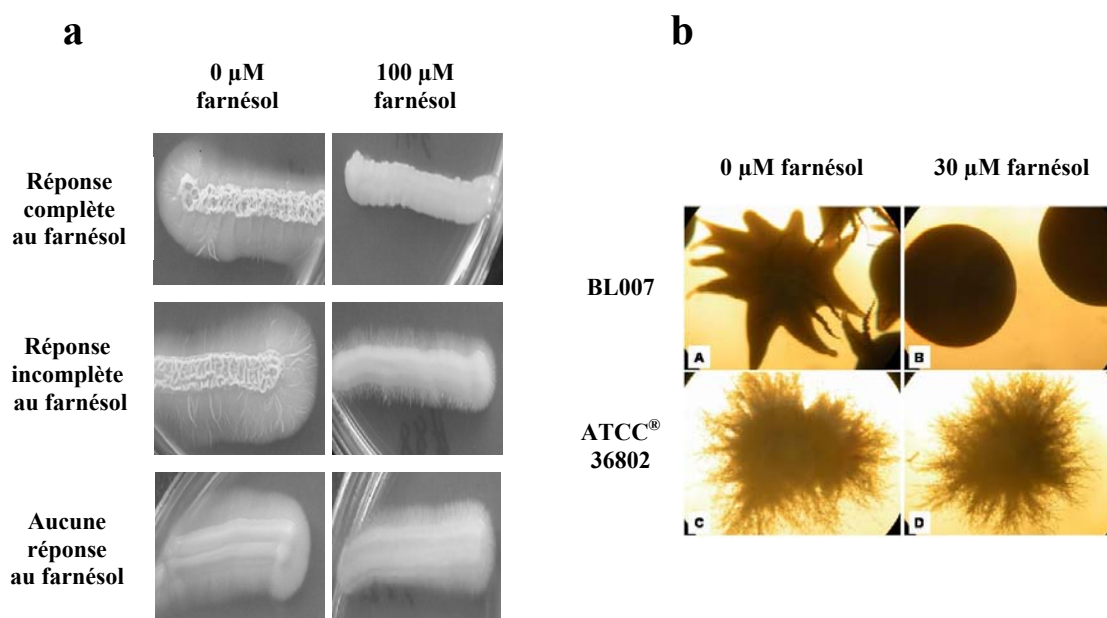


Figure 14 : Variations de la réponse au farnésol en milieu solide chez *C. albicans*

Une réponse complète au farnésol conduit à la formation des colonies lisses en présence de l'isoprénoïde, tandis qu'une réponse incomplète à des colonies légèrement chevelues. Aucune réponse au farnésol n'est remarquée si les colonies produites en présence de l'isoprénoïde restent hautement chevelues. **a** – Différentes réponses au farnésol observées chez des mutants obtenus par mutagenèse chimique, incubés sur des géloses *Yeast Malt* pendant 5 jours à 28°C, avec ou sans 100 µM farnésol (Jensen *et al.*, 2006); **b** – Différentes réponses au farnésol observées chez des isolats humains cliniques, BL007 – répondeur au farnésol, ATCC® 36802 – non répondeur au farnésol; les souches ont été incubées sur géloses R2A pendant 48 heures à 37°C avec 2.5% CO₂, avec ou sans 30 µM farnésol (Desmeules, 2004).

Chapitre 2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Le farnésol, molécule de *quorum sensing* chez le pathogène fongique *C. albicans*, régule une multitude de processus cellulaires impliqués dans la pathogénicité et la survie de la levure chez l'hôte. Son mode d'action n'est pas entièrement compris. Ce projet a pour but de mieux caractériser les isolats cliniques de *C. albicans* qui ne répondent pas au farnésol et ainsi de contribuer à l'avancement des connaissances sur la réponse au farnésol chez cette levure pathogène importante chez l'homme. Ultiment, le mécanisme d'action de l'isoprénoïde sera complètement élucidé, permettant ainsi le développement des nouvelles stratégies antifongiques.

2.1. HYPOTHÈSES

- 2.1.1. Nous avançons l'hypothèse que l'isolat clinique SC5314, la souche de *C. albicans* la mieux caractérisée, est un répondeur au farnésol comme la majorité (98%) des isolats cliniques testés préalablement dans notre laboratoire. En effet, le farnésol inhibe la germination de cette souche en culture liquide dans le milieu *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (Uppuluri *et al.*, 2007), ainsi que sa formation de biofilm dans le milieu RPMI 1640 (Ramage *et al.*, 2002a; Weber *et al.*, 2010).
- 2.1.2. Suite à la revue de la littérature, nous croyons que le profil de germination et la croissance des non répondeurs diffèrent de ceux des répondeurs. Nous posons comme hypothèse que les non répondeurs produisent un plus grand nombre de formes filamenteuses que de blastospores, contrairement aux répondeurs.
- 2.1.3. Le phénotype colonial sur milieu solide et la formation de biofilm des non répondeurs ont été décrits dans des conditions de culture spécifiques. Nous

émettons l'hypothèse que l'absence de réponse au farnésol se manifeste aussi en dehors de ces conditions de culture précises.

2.1.4. Nous posons également l'hypothèse que le farnésol agit via un récepteur nucléaire analogue au récepteur FXR des mammifères et que les non répondeurs présentent des altérations au niveau de ce récepteur.

2.1.5. La différence dans la réponse au farnésol entre les répondeurs et les non répondeurs pourrait s'expliquer aussi par l'existence chez les derniers d'une ou des altérations au niveau des voies de signalisation du farnésol. Ainsi, d'après les résultats de la littérature scientifique, nous pensons qu'il y a des variations entre les répondeurs et les non répondeurs en ce qui concerne la transcription de certains gènes :

- **CHK1** – gène codant pour une histidine kinase d'un système à deux composantes. Le double mutant de ce gène est réfractaire à l'effet inhibiteur du farnésol sur la germination et la formation de biofilm (Kruppa *et al.*, 2004). En conséquence, nous nous attendons à observer une sous-expression de *CHK1* chez les non répondeurs.
- **HST7, CPH1 et GAPI** – gènes de la voie des MAPKs. L'expression de ces gènes est inhibée en présence de farnésol (Sato *et al.*, 2004). Ainsi, nous croyons que leur expression ne sera pas diminuée chez les non répondeurs en présence de l'isoprénoïde, contrairement aux répondeurs.
- **RAM2** – gène codant pour la sous-unité α de la FTase, enzyme qui active par farnésylation la protéine Ras1, le maître régulateur de la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphes. Un inhibiteur de la FTase, le *FPT inhibitor III*, réduit la germination (McGeady *et al.*, 2002) ce qui nous a conduit à émettre l'hypothèse que le farnésol pourrait agir en réprimant cette enzyme. En conséquence, nous suggérons que ce gène sera sous-exprimé chez les non répondeurs.

- ***DPP3*** – gène codant pour la phosphatase Dpp3, impliquée dans la production de farnésol (Uppuluri *et al.*, 2007). Nous pensons que ce gène sera surexprimé chez les non répondeurs, vu que les études précédentes d'HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) ont montré une production plus importante de l'isoprénoïde chez ces souches (Desmeules, 2004).

2.2. OBJECTIFS

- 2.2.1.** Évaluer la réponse au farnésol de la souche SC5314 sur milieu solide, en culture liquide, ainsi qu'en biofilm, et comparer les résultats obtenus avec ceux des répondeurs et des non répondeurs.
- 2.2.2.** Comparer le profil de germination et la croissance en culture liquide des répondeurs et des non répondeurs, en présence ou en absence de farnésol.
- 2.2.3.** Évaluer l'effet des conditions d'incubation (température, concentration de CO₂ et milieu de culture) sur l'expression phénotypique et la croissance sur milieu solide, sur le profil de germination et la croissance en culture liquide, ainsi que sur la formation de biofilms des répondeurs et des non répondeurs, en présence et en absence de farnésol.
- 2.2.4.** Rechercher l'existence d'un récepteur nucléaire du farnésol chez les répondeurs par RT-PCR, en utilisant des amorces dégénérées, établies à partir des séquences du récepteur FXR des mammifères. Vérifier l'existence du même récepteur chez les non répondeurs.
- 2.2.5.** Comparer par RT-PCR semi-quantitative les niveaux d'expression des gènes *CHK1*, *HST7*, *CPHI*, *GAP1*, *RAM2* et *DPP3* entre les répondeurs et les non répondeurs, en présence et en absence de farnésol.

Chapitre 3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES SOUCHES ET FORMATION DE BIOFILM

3.1.1. Souches

Les souches étudiées dans ce projet sont de provenance humaine (Tableau II). SC5314 a été isolée par Margarita Silva-Hutner à partir d'un patient présentant une infection généralisée au *Candida* (Odds et al., 2004). La souche nous a été fournie par Dr Martine Raymond (Université de Montréal, Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montréal, QC). Les deux non répondeurs identifiés précédemment dans notre laboratoire sont : la souche de référence ATCC[®] (*American Type Culture Collection*, ATCC[®], Manassas, VA) 36802 et la souche clinique HM1, isolée dans la clinique dentaire de l'Université Laval à partir d'une stomatite prothétique. Deux répondeurs ont été utilisés dans ce projet : BL007, souche isolée dans la clinique dentaire de l'Université de Montréal à partir d'un patient présentant une candidose orale et LAM1, isolée par Miriam Lacasse d'une candidose systémique (Lacasse *et al.*, 1990). Les deux répondeurs sont étudiés en comparaison avec les non répondeurs et ils ont été choisis car ils présentent une fréquence élevée de phénotype colonial chevelu. Tout au long de ce projet, le terme "répondeur" désigne les souches BL007 et LAM1 et le terme "non répondeurs" les souches ATCC[®] 36802 et HM1.

La vérification de l'identité des souches a été réalisée préalablement dans notre laboratoire par plusieurs approches : culture sélective sur le milieu différentiel CHROMagar (CHROMagar, Paris, France), fermentation et assimilation des sucres avec la galerie API 20C AUX (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) et test de germination en présence de sérum de veau (Quelab, Montréal, QC).

Tableau II : Identification des souches de *C. albicans* utilisées

Souches de <i>C. albicans</i>	Source / Condition	Réponse au farnésol
BL007	Candidose orale	Répondeur
LAM1	Candidose systémique	Répondeur
ATCC® 36802	Inconnue	Non répondeur
HM1	Stomatite prothétique	Non répondeur
SC5314	Infection généralisée à <i>C. albicans</i>	Probablement répondeur d'après la littérature

3.1.2. Produits et milieux de culture

Trois milieux différents ont été utilisés pour la culture liquide des levures :

Yeast Peptone Dextrose (YPD) – 1% extrait de levures (BD, Sparks, MD)

2% dextrose (Difco, Detroit, MN)

2% trypticase peptone (BD, Sparks, MD)

R2A – 0.05% extrait de levures

0.05% peptones de protéolyse (Difco, Detroit, MN)

0.05% acides aminés (Difco, Detroit, MN)

0.05% dextrose

0.05% amidon soluble (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

0.03% pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

0.03% phosphate de potassium dibasique (Fisher, Fair Lawn, NJ)

0.005% sulfate de magnésium (American Chemicals Ltd., Montréal, QC)

RPMI 1640 – sans bicarbonate de sodium et avec rouge de phénol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Annexe I), supplémenté de L-glutamine 200 mM (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) et ajusté à pH 7.0 avec 0.165 M d'acide 3-(N-morpholino)-propane sulfonique (MOPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Pour la croissance des levures sur milieu solide, on a utilisé des géloses (Fisher, Fair Lawn, NJ) Sabouraud Dextrose (SD, BD, Sparks, MD), R2A et RPMI 1640 (ajout de 2% agar (Difco, Detroit, MN) aux ingrédients mentionnés plus haut). Des géloses *Trypticase Yeast Extract* (TYE) ont été aussi employées, constituées de 0.3% extrait de levures, 1.7% trypticase peptone, 0.5% chlorure de sodium (Fisher, Fair Lawn, NJ), 0.25% phosphate de sodium (Fisher, Fair Lawn, NJ), 2% agar et une concentration variable de 0 à 2% de dextrose.

SD et YPD sont des milieux de culture très riches en sucre, utilisés couramment pour la croissance de *C. albicans*. R2A est un milieu pauvre en nutriments, utilisé généralement pour la culture des bactéries aquatiques (Reasoner & Geldreich, 1985). Des études réalisées précédemment dans notre laboratoire ont démontré que ce milieu renforce la formation de biofilm des répondeurs et des non répondeurs. De plus, ce milieu a permis l'identification des non répondeurs parmi les isolats cliniques de *C. albicans* (Desmeules, 2004). En ce qui concerne RPMI 1640, il est un milieu communément utilisé pour la croissance et la caractérisation de la levure, surtout lors de l'évaluation de son profil génétique (Ramage *et al.*, 2002a; Sato *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2005). Cependant, la croissance et la formation de biofilm des répondeurs et des non répondeurs n'ont pas encore été évaluées dans ce milieu de culture. TYE est aussi un milieu très pauvre en nutriments, mais beaucoup plus stable et moins complexe que le R2A.

Le *trans,trans*-farnésol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a été préparé par dilution (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) de la solution commerciale dans le méthanol à 100% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Durant tout le projet, le farnésol a toujours été ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 30 μ M. Des contrôles avec le méthanol seulement

ont été réalisés. Bien que la littérature démontre que le farnésol est stable pendant plusieurs années (Hornby *et al.*, 2001), uniquement les dilutions 10^{-1} de farnésol dans le méthanol ont été conservées à 4°C pendant environ 2 semaines.

3.1.3. Culture de *C. albicans*

Culture pour conservation à long terme : les levures stockées à -80°C dans 15% glycérol (Fisher, Fair Lawn, NJ) sont étalées sur géloses SD. Les géloses sont incubées (incubateur Forma Scientific Inc., Marietta, OH) pendant 48 heures à 37°C, avec 2.5% de CO₂ et en présence d'humidité. Par la suite, les géloses sont conservées à 4°C pendant une à deux semaines.

Pré-culture : avant chaque expérience, les levures prélevées des géloses SD sont pré-cultivées sans agitation pendant la nuit (17 heures) dans le bouillon YPD, à 37°C, avec 2.5% de CO₂ et en présence d'humidité. Toutes les souches de *C. albicans* croissent sous forme de blastospore dans ces conditions. Les cultures sont ensuite centrifugées (International Equipment Company, Needham Heights, MA) à température ambiante, pendant 10 minutes à 5 000 x g et lavées deux fois avec 10 mL d'une solution contenant 0.85% de chlorure de sodium. Les cellules lavées sont suspendues dans la solution saline stérile et la concentration cellulaire est déterminée par décompte à l'hématimètre (Hausser Scientific, Horsham, PA). Ces suspensions sont utilisées pour inoculer les milieux de culture de diverses expérimentations et sont conservées uniquement 12 à 24 heures à 4°C, période durant laquelle le potentiel des unités formatrices de colonies (UFC) reste stable.

Pour toutes les expérimentations décrites ci-après, des témoins négatifs ont été réalisés, en remplaçant l'inoculum avec la solution saline. Trois expériences indépendantes ont été toujours effectuées pour chaque culture, avec trois répliques chaque fois.

3.1.4. Évaluation de la croissance et de l'expression phénotypique sur milieu solide

Les 5 souches de *C. albicans* sont étalées sur des géloses R2A et RPMI 1640 (250 cellules/gélose), en présence ou en absence de 30 μ M farnésol. Les géloses sont incubées pendant 48 heures à :

- Température de la pièce, à l'abri de la lumière, sans humidité
- 37°C, avec humidité (température optimale de croissance de *C. albicans*)
- 37°C avec 2.5% CO₂ et humidité (conditions d'incubation qui ont permis le criblage des non répondeurs et qui sont semblables à l'environnement *in vivo* de *C. albicans*).

Les souches BL007 et ATCC® 36802 ont été aussi étalées sur des géloses TYE avec 0%, 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1% et 2% dextrose (250 cellules/gélose), avec ou sans 30 μ M farnésol. Les géloses ont été incubées pendant 48 heures à 37°C avec 2.5% CO₂, en présence d'humidité.

On relève :

- Le nombre de UFCs/250 cellules inoculées
- Le diamètre moyen des colonies
- Les pourcentages de colonies lisses et de colonies chevelues.

Les colonies sont évaluées à l'œil nu et au microscope inversé (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne). De plus, des montages humides sont réalisés à partir des colonies et visualisés au microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne), pour déterminer la proportion des blastospores et des hyphes dans chaque colonie. Des photos sont prises à l'aide d'une caméra numérique Nikon Coolpix (Nikon Corporation, Tokyo, Japon).

3.1.5. Évaluation du profil de germination en culture liquide

Les cellules des 5 souches étudiées sont inoculées dans des plaques stériles à 24 puits en polystyrène (Corning Inc., Corning, NY) à raison de 10^5 cellules/mL (1 mL de culture/puits), dans les milieux R2A et RPMI 1640, avec ou sans 30 μ M farnésol. Les plaques sont incubées pendant 48 heures à la température ambiante, à l'abri de la lumière, sans agitation, ainsi qu'à 37°C avec ou sans 2.5% CO₂, en atmosphère humide. Au temps zéro ainsi qu'après 4, 8, 12, 18, 24, 32, 40 et 48 heures d'incubation, les cultures sont examinées au microscope inversé et des photos sont prises. Par la suite, les pourcentages des blastospores et des formes filamenteuses sont déterminés par des comptes d'environ 500 cellules.

3.1.6. Évaluation de la croissance en culture liquide

Les cellules des 5 souches de *C. albicans* sont inoculées dans des plaques à 24 puits à raison de 10^5 cellules/mL (1 mL de culture/puits), dans les milieux R2A et RPMI 1640, en présence ou en absence de 30 μ M farnésol. Les plaques sont incubées pendant 48 heures à la température ambiante, à l'abri de la lumière, sans agitation, ainsi qu'à 37°C avec ou sans 2.5% CO₂, en atmosphère humide. Au temps zéro ainsi qu'après 4, 8, 12, 18, 24, 32, 40 et 48 heures d'incubation, les plaques sont agitées pendant 60 secondes et la densité optique (DO) des suspensions de cellules est lue à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaques (AD340, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA).

3.1.7. Évaluation de la formation de biofilm

Formation de biofilm : les biofilms sont formés dans des plaques en polystyrène à 24 et 96 puits (Corning Inc., Corning, NY). Les cellules des 5 souches étudiées sont inoculées dans les plaques à raison de 10^5 cellules/mL (1 mL de culture/puits pour les plaques à 24 puits et 100 μ L de culture/puits pour les plaques à 96 puits), dans les milieux R2A et RPMI 1640, avec ou sans 30 μ M farnésol. Les plaques sont incubées pendant 24 à 48 heures à la température ambiante, à l'abri de la lumière, sans agitation, ainsi qu'à 37°C avec ou sans 2.5% CO₂, en atmosphère humide. Avant de mesurer la biomasse des biofilms formés, la DO des cultures est lue à 620 nm.

Quantification du biofilm par coloration au crystal violet (CV) : le milieu de culture et les cellules non adhérentes sont décantés et les puits sont rincés trois fois sous l'eau courante, puis séchés à l'air. La biomasse des biofilms attachés aux puits des plaques à 24 et 96 puits est évaluée semi-quantitativement par coloration au CV (Li *et al.*, 2003). Les biofilms sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante, en présence de 2 mL (plaque à 24 puits) ou de 200 μ L (plaque à 96 puits) d'une solution de 0.3% de CV (BD, Sparks, MD). Le colorant est décanté et les puits sont ensuite rincés abondamment à l'eau et séchés de nouveau à l'air. Les biofilms colorés sont visualisés au microscope inversé et des photos sont prises. Le colorant est extrait des biofilms en distribuant dans chaque puits 1 mL (plaque à 24 puits) ou 200 μ L (plaque à 96 puits) d'une solution de 10% (v/v) d'acide acétique glacial (Fisher, Fair Lawn, NJ) et de 40% (v/v) de méthanol. La DO du colorant extrait est lue à 570 nm.

Quantification du biofilm par réduction des sels de tétrazolium (XTT) : les biofilms formés dans les plaques à 96 puits sont aussi évalués semi-quantitativement par réduction du XTT en formazan, tel que décrit précédemment dans la littérature (Tellier *et al.*, 1992; Ramage *et al.*, 2001). Une solution de XTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) est préparée à une concentration de 1 mg/mL dans le lactate de Ringer constitué de 0.6% de chlorure de sodium, de 0.04% chlorure de potassium (Biopharm, Montréal, QC), de 0.027% chlorure de calcium hydraté (Fisher, Fair Lawn, NJ) et de 0.52% lactate de

sodium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La solution de XTT est filtrée sur une membrane de 0.22 μm (unités de filtration Corning Inc., Corning, NY) et conservée à la noirceur à -20°C . Une solution de ménadione (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) à 10 mM (1.72 mg/mL) est préparée dans l'acétone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) et utilisée le jour même. Immédiatement avant l'utilisation, la solution de ménadione est ajoutée à la solution de XTT à raison de 1 μL de ménadione dans 2 mL de XTT. Un volume de 100 μL du mélange XTT-ménadione est ajouté à chacun des puits de la plaque à 96 puits, laquelle contient les biofilms fraîchement décantés et lavés, mais non séchés. Les plaques sont incubées pendant 2 heures à 37°C avec 2.5% CO_2 , en atmosphère humide et à la noirceur. Le changement colorimétrique de la réduction de XTT, qui est directement corrélé avec l'activité métabolique des cellules composant le biofilm, est mesuré à 492 nm.

3.2. CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES SOUCHES

3.2.1. Extraction de l'ARN total

Les cellules des 5 souches de *C. albicans* pré-cultivées et lavées comme décrit précédemment, sont inoculées dans des Erlenmeyer (Pyrex, Allemagne) stériles de 1 L contenant 500 mL de milieu de culture, à raison de 10^5 cellules/mL. Le milieu de culture utilisé a été le RPMI 1640, avec ou sans 30 μ M farnésol. Les cultures sont incubées sans agitation pendant 4 heures à 37°C, en présence de 2.5% de CO₂ et en atmosphère humide. Dépendamment de la souche utilisée, 1 à 3 Erlenmeyer contenant 500 mL de culture chacun sont nécessaires pour extraire une quantité suffisante d'ARN. Trois expériences indépendantes sont effectuées pour chaque culture. Des témoins négatifs sont toujours réalisés, en remplaçant l'inoculum avec la solution saline.

Après l'incubation, trois échantillons de 1 mL chacun sont prélevés des cultures. Les cellules de ces échantillons sont fixées par l'addition de 2.5% (v/v) de glutaraldéhyde (Fisher, Fair Lawn, NJ) et comptées à l'hématimètre. Le nombre total des cellules au moment de l'extraction de l'ARN est ainsi déterminé. De plus, les pourcentages des blastospores et des formes filamenteuses sont aussi estimés.

Par la suite, les cultures sont filtrées sur des membranes de 0.22 μ m (Millipore Corporation, Billerica, MA). Les Erlenmeyer sont rincés une fois avec une solution saline contenant 0.85% chlorure de sodium. Les membranes chargées des cellules sont déposées immédiatement sur glace, dans des tubes de 50 ml (Nalge Company, Rochester, NY) stériles et sans traces de ribonucléases (RNases), contenant 10 mL de solution saline chacun. Les tubes sont agités 3 minutes au vortex (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY) à vitesse maximale. Les levures passent ainsi en suspension dans la solution saline. Les membranes déchargées des cellules sont retirées des tubes à l'aide de pinces (Fisher, Fair Lawn, NJ) stériles. Les tubes sont ensuite centrifugés (Sorvall RC-5B, Sorvall Instruments, rotor SS-34) à 4°C pendant 30 minutes à 18 000 x g. Les

surnageants sont enlevés délicatement à l'aide de pipettes stériles de 5 mL (Fisher, Fair Lawn, NJ) et les culots sont transférés, à l'aide des pipettes, dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL (Sarstedt Inc., Newton, NC) stériles et sans traces de RNases.

Par la suite, à moins d'indications contraires, toutes les étapes ont été conduites à 4°C (sur glace), dans des conditions RNase free. Ainsi, toutes les manipulations ont été effectuées avec des gants et l'eau utilisée pour la préparation des réactifs et pendant toutes les étapes d'extraction et d'analyse de l'ARN a été préalablement traitée contre les RNases par le diéthylpyrocarbonate (DEPC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 0.1% (v/v) pendant 12 heures à température ambiante. Le DEPC a été ensuite inactivé par autoclavage. L'eau ainsi traitée a été désignée eau DEPC.

L'extraction de l'ARN total a été effectuée, avec quelques modifications, selon la méthode de Karl W. Henry et ces collaborateurs (Henry *et al.*, 1999) : les culots cellulaires sont centrifugés (Haraeus Biofuge Fresco, Kendro Laboratory Products, Langensfeld, Allemagne) pendant 5 minutes à 16 000 x g et lavés deux fois avec un tampon de pH 5.0, contenant 50 mM d'acétate de sodium (Fisher, Fair Lawn, NJ) et 10 mM d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA; Invitrogen, Carlsbad, CA). Les culots sont resuspendus dans 400 µL de tampon acétate de sodium – EDTA pH 5.0 et sont additionnés de 200 µL de sable d'Ottawa (Fisher, Fair Lawn, NJ), de 20 µL SDS 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA) et de 400 µL de phénol ultra-pure (Invitrogen, Carlsbad, CA; saturé avec le tampon acétate de sodium – EDTA pH 5.0 et préchauffé à 65°C). Les cellules sont lysées par agitation périodique au vortex, durant une incubation de 10 minutes à 65°C (bain thermostat, Fisher, Fair Lawn, NJ). Par la suite, les tubes sont refroidis sur glace pendant 5 minutes et centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 x g. La phase aqueuse supérieure comportant l'ARN est transférée dans un nouveau tube Eppendorf contenant un volume égal d'un mélange (24:1, v/v) de chloroforme (Fisher, Fair Lawn, NJ) et d'alcool isoamylique (Fisher, Fair Lawn, NJ). Les tubes sont agités vigoureusement à la main pendant environ 15 secondes et ensuite incubés 2 à 3 minutes à température de la pièce. Les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 x g. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube Eppendorf et elle est

ensuite précipitée pendant la nuit à -20°C avec 2.5 fois son volume d'éthanol 95% (v/v; Commercial Alcohols Inc., Brampton, ON) et 0.1 fois son volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5.3). Le lendemain, les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes à $12\,000 \times g$ et lavés trois fois avec 1 mL d'éthanol 75% (v/v) chaque fois (centrifugations pendant 7 minutes à $7\,500 \times g$). Le culot d'ARN est séché à température ambiante, sous la hotte (Versalab Inc., St. Hyacinthe, ON) et après suspendu dans 100 μL d'eau DEPC.

3.2.2. Purification et dosage de l'ARN

Traitement à la Désoxyribonucléase I (DNase I) : les ARNs sont traités à la DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) pour enlever toutes les traces d'ADN. Les tubes contenant les culots d'ARN suspendus dans 100 μL d'eau DEPC sont additionnés de 12 μL du tampon 10x de la DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA), de 1 μL de *Recombinant ribonuclease inhibitor* (RNaseOUT; Invitrogen, Carlsbad, CA) et de 7 μL de DNase I. Les tubes sont incubés pendant 30 minutes à 37°C . La DNase I est ensuite inactivée par l'ajout de 2 μL d'EDTA 0.5 M (pH 8.0), suivi d'une incubation de 10 minutes à 65°C .

Extraction au Trizol : les ARNs traités à la DNase I sont purifiés par une extraction au Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) : les tubes sont additionnés de 1 mL de Trizol, sont bien homogénéisés et ensuite sont incubés pendant 5 minutes à température de la pièce. Un volume de 200 μL de chloroforme est ajouté et les tubes sont bien refermés et agités vigoureusement à la main pendant 15 secondes. Les échantillons sont incubés 2 à 3 minutes à température ambiante et sont centrifugés pendant 15 minutes à $12\,000 \times g$. La phase aqueuse supérieure incolore, qui contient l'ARN, est transférée dans un nouveau tube Eppendorf et elle est précipitée par l'ajout de 500 μL d'isopropanol (Fisher, Fair Lawn, NJ). Les tubes sont bien mélangés et sont incubés pendant 10 minutes à température ambiante, suivi d'une centrifugation de 10 minutes à $12\,000 \times g$. Les surnageants sont enlevés et les culots d'ARN sont lavés 3 fois avec l'éthanol 75%. Les culots sont séchés à température de la pièce et sont suspendus dans

l'eau DEPC. Après leur dosage (voir les détails plus bas), les ARNs sont aliquotés dans des petits volumes et sont conservés à -80°C.

Dosage des ARNs : le dosage des ARNs est effectué en duplicata, par lecture de la DO au spectrophotomètre (Biomate 3, ThermoSpectronic, Rochester, NY) à 260 nm, en utilisant l'équivalence suivante :

$$1 \text{ DO}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g d'ARN/mL}$$

La contamination protéique des échantillons est aussi déterminée en fonction du rapport des DO à 260 et à 280 nm. Le ratio pour un ARN "pur" doit être compris entre 2.0 et 2.2. Pour la lecture de la DO, les ARNs sont dilués dans le tampon Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 5 mM, pH 8.0.

La quantité et la qualité des ARNs extraits sont confirmées par visualisation des ARNs sur gel d'agarose 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) marqué au bromure d'éthidium (BioLabs, Ipswich, MA). Les échantillons sont soumis à une migration par électrophorèse (Thermo EC, Fisher, Fair Lawn, NJ) à 60 V, dans le tampon 40 mM Tris base – 40 mM acide acétique glacial – 0.1 mM EDTA (TAE), à pH final de 8.5. Les gels sont visualisés sous UV (FluorChem 8900, Alpha Innotech, San Leandro, CA). On observe la présence de deux bandes : ARNs ribosomiaux 28S et 18S. L'intégrité des ARNs est garantie par l'absence de traînées, en particulier sous la bande 18S, et par un rapport d'intensité des bandes 28S/18S d'environ 2. En ce qui concerne la quantité d'ARN, on doit observer des bandes de même intensité quand la même quantité d'ARN (calculée d'après le dosage spectrophotométrique) migre sur le gel.

Contrôle de la pureté des ARNs : pour vérifier d'avantage la pureté des ARNs extraits, des PCR sont réalisés, en utilisant directement les ARNs comme matrices. Les réactions de PCR sont conduites comme décrit plus bas, en remplaçant l'ADN par l'ARN. Les amorces utilisées sont celles amplifiant un fragment dans le gène constitutif *EFBI*. Une quantité de 0.2 μg d'ARN est ajoutée dans chaque réaction de PCR de 50

μL. Aucune bande ne doit être visualisée sur les gels d'agarose 1% marqués au bromure d'éthidium si les ARNs ne contiennent pas des traces d'ADN génomique. Par contre, si des bandes sont visualisées, un nouveau traitement à la DNase I des ARNs est effectué. Cependant, si la quantité d'ARN est insuffisante pour réaliser un nouveau traitement à la DNase I, une nouvelle extraction d'ARN est effectuée.

3.2.3. Reverse Transcription (RT)

Des ADNs complémentaires (ADNc) sont générés à partir des ARNs extraits, par des réactions de RT (transcription inverse). À chaque 2 μg d'ARN sont ajoutés 1 μL d'un mélange des 4 nucléotides (Invitrogen, Carlsbad, CA) à 10 mM chaque et 2.5 μL de l'amorce oligo (dT)₁₇ de 500 μg/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA). Le volume est complété à 12 μL par de l'eau DEPC. Les mélanges sont chauffés pendant 5 minutes à 65 °C (thermocycleur ThermoHybaid, Thermo Scientific, Ulm, Allemagne) et ensuite refroidis pendant 2 minutes sur glace. Par la suite, 4 μL de tampon *First-Strand* 5x (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 μL de dithiothréitol 0.1 M (DTT; Invitrogen, Carlsbad, CA) et 1 μL de RNaseOUT sont additionnés aux tubes. Après les avoir mélangés doucement, les tubes sont incubés pendant 2 minutes à 50°C. Un volume de 1 μL de l'enzyme SuperScript™ II RT de 200 unités/μL (Invitrogen, Carlsbad, CA) est ajouté aux mélanges et les tubes sont incubés pendant 50 minutes à 50°C. La réaction est inactivée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes. Les ADNc ainsi formés sont conservés à -20°C, en vue d'utilisation comme matrices pour les réactions de PCR. Un contrôle négatif de la réaction de RT est toujours réalisé en remplaçant l'enzyme par de l'eau DEPC.

3.2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR) semi-quantitative

Les différentes gènes cibles (*CHK1*, *HST7*, *CPHI*, *GAP1*, *RAM2* et *DPP3*) sont amplifiés et quantifiés par PCR semi-quantitative à partir des ADNc. Le gène constitutif

EFBI (gène de ménage codant pour le facteur d'élongation EF-1 β , homologue de *EFBI* de *S. cerevisiae*) (Maneu *et al.*, 1996) est utilisé comme gène contrôle, vu que son niveau d'expression demeure inchangé par le farnésol. En ce qui concerne la recherche du récepteur nucléaire de farnésol, uniquement des réactions de PCR sont réalisées avec des amorces dégénérées.

Amorces : les amorces dégénérées (Tableau III; Invitrogen, Carlsbad, CA) utilisées pour la recherche du récepteur nucléaire de farnésol (CaFXR) ont été construites par alignement des séquences du récepteur nucléaire FXR du poulet, de la souris et de l'homme. L'alignement des séquences, disponibles sur le site Internet de NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a été effectué en utilisant l'outil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de NCBI (voir plus de détails dans l'Annexe II).

Les amorces amplifiant des fragments dans les gènes *EFBI* et *CHK1* ont été synthétisées comme décrit précédemment dans la littérature (Li *et al.*, 2002; Pedreno *et al.*, 2004). Les amorces amplifiant des fragments dans les autres gènes (*HST7*, *CPHI*, *GAP1*, *RAM2* et *DPP3*) ont été construites à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Les séquences des gènes ont été fournies par les sites Internet de NCBI et de *The Candida Genome Database*. Le Tableau III rapporte les séquences des amorces utilisées, ainsi que la taille en paires de bases (pb) des amplicons.

Le gène contrôle *EFBI* contient un intron. Ainsi, la paires des amorces utilisées sert aussi de contrôle de contamination de l'ARN avec de l'ADN génomique. Si l'ARN n'est pas pur, ces amorces amplifieront un fragment de 890 pb (Maneu *et al.*, 1996).

Tableau III : Taille des amplicons et séquences des amorces utilisées dans les réactions de RT-PCR semi-quantitatives

Gène	Séquences des amorces	Taille (pb)
<i>CaFXR</i>	Sens : 5'- TGY GWN ATG GAY ATG TAY ATG - 3' Antisens : 5'- GC RTA YTC YTC YTG NGT CAT - 3'	642
<i>EFB1</i>	Sens : 5'- ATT GAA CGA ATT CTT GGC TGA C - 3' Antisens : 5'- C ATC TTC TTC AAC AGC AGC TTG - 3'	526
<i>CHK1</i>	Sens : 5'- GAG CTA CAA ACT AGA CAG GGG - 3' Antisens : 5'- GTC CGA CCG ATA ATC CAC AAC - 3'	506
<i>HST7</i>	Sens : 5'- TAC GTC CAC TCC AAC ATC CA - 3' Antisens : 5'- GT TCC AAC GGA GAT GAT GCT - 3'	374
<i>CPH1</i>	Sens : 5'- GTG CAA CCT CCA CAC ACA AC - 3' Antisens : 5'- GG CAT TTC TGC TGG GTA AAA - 3'	736
<i>GAP1</i>	Sens : 5'- GCA TGG GCC ATA AGT GCT AT - 3' Antisens : 5'- AT CAC AAG CAC CAC AAA CCA - 3'	272
<i>RAM2</i>	Sens : 5'- TGA ATT GGG CAT TAA GCA AC - 3' Antisens : 5'- TT TTT GCC AAT GTC TCC AAA - 3'	632
<i>DPP3</i>	Sens : 5'- CCA TTT GCT GAA CAT GAA CG - 3' Antisens : 5'- TG GTT GAC AAC GAT CCA AAA - 3'	243

Conditions d'amplification : les réactions de PCR sont conduites dans un volume final de 50 μ L, à l'aide de l'enzyme *Taq* ADN Polymérase (BioLabs, Ipswich, MA). Les mélanges réactionnels sont composés de 2 μ L (environ 0.2 μ g) d'ADNc, de 0.5 μ M de chaque amorce, de 200 μ M de chaque nucléotide, du tampon 1x de l'enzyme (BioLabs, Ipswich, MA) et de 40 unités/mL d'enzyme *Taq*. Le volume est complété à 50 μ L avec de l'eau Nanopure (système de purification d'eau, Thermo Scientific Barnstead, Ulm, Allemagne). Pour uniformité, un mélange commun est préparé (contenant tous les éléments, sauf la matrice d'ADN) et 48 μ L de ce mélange est ajoutée sur glace à chaque ADNc. Pour l'amplification des gènes *EFB1* et *GAP1*, un volume de 2.5 μ L (5%) de diméthylsulfoxyde (DMSO; Invitrogen, Carlsbad, CA) est aussi ajouté au mélange réactionnel, pour éliminer les amplifications non spécifiques. Un contrôle négatif de la

réaction de PCR est toujours réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau Nanopure. Les tubes sont d'abord incubés dans le thermocycleur pendant 8 minutes à 95°C (*Hot Start*), suivi de plusieurs cycles d'amplification composés chacun d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'une étape d'hybridation de 20 secondes à une température d'hybridation (T_m) variable selon le gène amplifié (Tableau IV) et d'une étape d'élongation de 45 secondes à 72°C. L'amplification est finalisée par une étape d'élongation finale de 15 minutes à 72°C. Les produits de PCR sont conservés à -20°C. Plusieurs T_m ont été testées pour chaque paire d'amorces, afin de déterminer la température d'hybridation permettant d'obtenir une amplification optimale. Les T_m sélectionnées sont indiquées dans le Tableau IV. Pour *CaFXR*, plusieurs T_m ont été utilisées.

Tableau IV : Conditions d'amplification des gènes par PCR semi-quantitative

Gène	Concentration de DMSO (%)	Température d'hybridation (°C)	Nombre de cycles
<i>CaFXR</i>	0	50, 55, 60, <i>Touchdown</i> 55-45	30
<i>EFB1</i>	5	62	25
<i>CHK1</i>	0	56	35
<i>HST7</i>	0	56	30
<i>CPH1</i>	0	56	30
<i>GAPI</i>	5	<i>Touchdown</i> 66-58	30
<i>RAM2</i>	0	56	30
<i>DPP3</i>	0	56	25

La technique *Touchdown* implique l'utilisation dans les premiers cycles de PCR d'une T_m qui est plus élevée que la température d'hybridation optimale. La T_m descend de 1°C chaque cycle, jusqu'à ce qu'une température spécifique d'hybridation ou

Touchdown est atteinte. Cette dernière T_m est utilisée pour les cycles restants. La méthode conduit à une diminution des amplifications non spécifiques.

Cinq μL de chaque produit PCR sont soumis à une migration par électrophorèse à 95 V dans le tampon TAE, sur des gels d'agarose 1% marqué au bromure d'éthidium. Les gels sont visualisés sous UV.

Quantification du niveau d'expression des gènes cibles : pour évaluer le niveau d'expression des gènes, des échantillons de 10 μL sont prélevés des réactions de PCR tous les 5 cycles, à partir du 15^{ème} cycle. Ces échantillons sont soumis à une migration sur gel d'agarose 1% et le nombre de cycles nécessaires pour avoir une amplification linéaire pour chaque gène est déterminé (Tableau IV). Le nombre de cycle choisi pour un même gène doit être identique pour toutes les souches. L'intensité des bandes visualisées sur gel est quantifiée en utilisant le logiciel fourni avec le système de documentation des gels FluorChem 8900. Par la suite, pour chaque gène, des réactions de PCR simultanées sont réalisées au nombre de cycle choisi, avec tous les ADNc de toutes les souches. Les produits sont soumis à une migration sur un même gel d'agarose 1%, en parallèle avec le contrôle *EFBI*. Le niveau d'expression de chaque gène est ensuite déterminé et normalisé par rapport au niveau d'expression du gène contrôle.

3.3. ANALYSES STATISTIQUES

Tous les résultats obtenus au cours de ce projet ont été analysés statistiquement à l'aide des logiciels SYSTAT 12 et SPSS 17. Des tests ANOVA, des tests de t de Student, des tests de Kruskal-Wallis, des tests U de Mann-Whitney, des régressions linéaires et des tests D de Durbin-Watson ont été réalisés. Une valeur de $P \leq 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Chapitre 4. RÉSULTATS

4.1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES SOUCHES ET FORMATION DE BIOFILM

4.1.1. Évaluation de la croissance et de l'expression phénotypique sur milieu solide

Lors de la croissance sur milieu solide des répondeurs (BL007 et LAM1), des non répondeurs (ATCC[®] 36802 et HM1), ainsi que de la souche SC5314, trois types de morphologie coloniale ont été observés, indépendamment des conditions de culture (Figure 15) :

- colonies lisses
- colonies chevelues
- colonies poilues

Les colonies lisses sont constituées à 100% de blastospores, tandis que les colonies chevelues d'un mélange de blastospores et de formes filamenteuses. Les colonies poilues ressemblent aux colonies lisses, mais des fines projections poilues irradiant à leur périphérie et envahissent l'agar. Les colonies poilues sont formées majoritairement des blastospores. Cependant, quelques cellules sous forme filamenteuse sont aussi rencontrées (Figure 15).

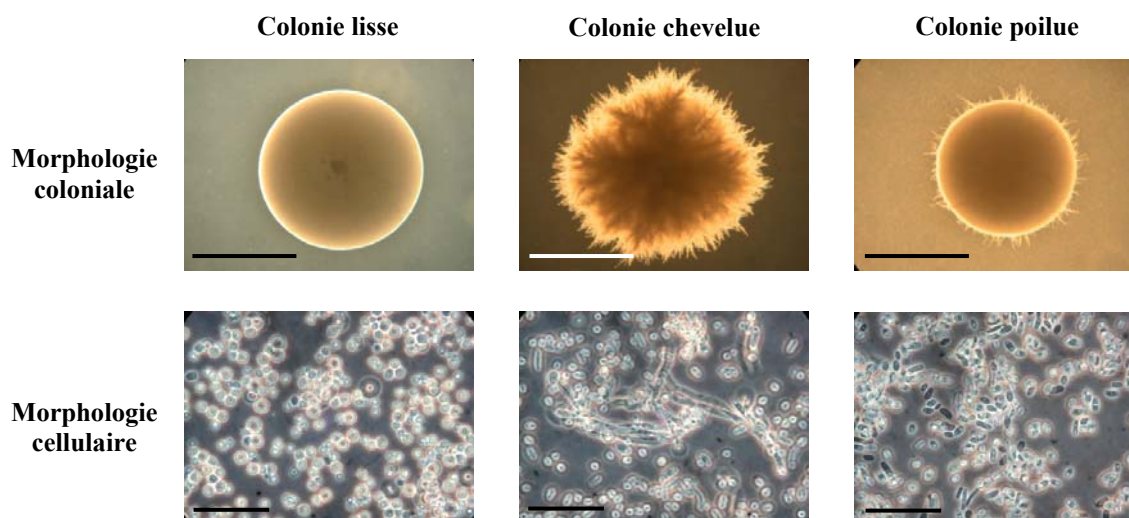


Figure 15 : Types de morphologie coloniale, avec leur morphologie cellulaire correspondante, observés pour toutes les souches de *C. albicans* étudiées

Cinq isolats cliniques de *C. albicans* ont été étudiés : BL007, LAM1, ATCC[®] 36802, HM1 et SC5314. Vue en microscopie inversée pour les colonies (grossissement 40x; barre : 1.25 mm) et en microscopie avec lumière incidente en contrast de phase, pour les cellules (grossissement 100x; barre : 50 μ m).

Effet des conditions d'incubation sur la morphologie coloniale (Tableau V) :

le phénotype colonial est semblable pour les 5 souches étudiées lorsqu'elles sont incubées à température ambiante ou à 37°C avec 2.5% CO₂, sur milieu RPMI 1640 ou R2A. Toutes les souches croissent à 100% sous forme de colonies lisses à température de la pièce et à 100% sous forme de colonies chevelues à 37°C avec 2.5% CO₂ sur les deux milieux de culture testés (sauf LAM1 qui présente seulement 49.6% colonies chevelues sur RPMI 1640 et 84.9% colonies chevelues sur R2A). Par contre, à 37°C en absence de CO₂, on observe des différences entre les souches au niveau de leur phénotype colonial. Les deux non répondeurs et la souche SC5314 croissent à 100% sous forme des colonies chevelues, indifféremment du milieu de culture. Cependant, dans les mêmes conditions de culture, les colonies des deux répondeurs sont 100%

lisses, à l'exception de la souche BL007 qui présente un mélange des colonies poilues (61.0%) et chevelues (39.0%) sur milieu R2A.

Effet du farnésol sur la morphologie coloniale (Tableau V) : étant donné qu'à température ambiante le phénotype colonial est lisse pour toutes les souches étudiées, la réponse au farnésol ne peut pas être départagée dans ces conditions d'incubation. En effet, toutes les souches croissent à 100% sous forme de colonies lisses à cette température, sur milieu RPMI 1640 ou R2A, en présence de 30 μ M farnésol. À 37°C avec 2.5% CO₂, indépendamment du milieu de culture, le farnésol inhibe complètement le phénotype chevelu des répondeurs et n'a aucun effet sur les non répondeurs qui demeurent à 100% chevelus. Par contre, pour la souche SC5314 on observe des résultats différents sur les deux milieux de culture à 37°C avec 2.5% CO₂: sur RPMI 1640 le farnésol n'a aucun effet sur le phénotype chevelu des colonies comme dans le cas des non répondeurs; cependant, sur R2A, l'isoprénoïde inhibe complètement ce phénotype et les colonies poussent à 100% poilues (réponse au farnésol semblable à celle observée dans le cas des répondeurs).

Lorsqu'ils sont incubés à 37°C en absence de CO₂, les non répondeurs se comportent comme en présence de 2.5% CO₂, leur phénotype colonial demeurant à 100% chevelu sur les deux milieux de culture. Les répondeurs forment des colonies lisses à 37°C et ainsi la réponse au farnésol ne peut pas être observée à cette température d'incubation. En présence de 30 μ M farnésol, à 37°C, les répondeurs forment uniquement des colonies lisses (ou poilues pour la souche BL007 sur milieu R2A). La souche SC5314 montre le même phénotype à 37°C sans CO₂ qu'à 37°C avec 2.5 CO₂. Elle croît à 100% sous forme de colonies chevelues sur RPMI 1640 avec 30 μ M farnésol et à 100% sous forme de colonies poilues sur R2A avec farnésol.

La Figure 16 illustre les différents phénotypes coloniaux observés pour les souches de *C. albicans* étudiées (SC5314, BL007 et ATCC[®] 36802), en fonction des conditions d'incubation et des milieux de culture, en présence ou en absence de 30 μ M farnésol.

Tableau V : Phénotype colonial (pourcentage des colonies lisses, poilues et chevelues) de la souche SC5314, des répondeurs (BL007 et LAM1) et des non répondeurs (ATCC[®] 36802 et HM1), en présence et en absence de farnésol, en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation

Souche	Milieu	Conditions d'incubation					
		Température ambiante		37°C		37°C + 2.5% CO ₂	
		0 µM farnésol	30 µM farnésol	0 µM farnésol	30 µM farnésol	0 µM farnésol	30 µM farnésol
SC5314	RPMI	100% lisse	100% lisse	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu
	R2A	100% lisse	100% lisse	100% chevelu	<i>100% poilu</i>	100% chevelu	<i>100% poilu</i>
BL007	RPMI	100% lisse	100% lisse	100% lisse	100% lisse	100% chevelu	100% lisse
	R2A	100% lisse	100% lisse	39.0% chevelu et <i>61.0% poilu</i>	<i>100% poilu</i>	100% chevelu	100% lisse
LAM1	RPMI	100% lisse	100% lisse	100% lisse	100% lisse	49.6% chevelu et 50.4% lisse	100% lisse
	R2A	100% lisse	100% lisse	100% lisse	100% lisse	84.9% chevelu et 15.1% lisse	100% lisse
ATCC [®] 36802	RPMI	100% lisse	100% lisse	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu
	R2A	100% lisse	100% lisse	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu
HM1	RPMI	100% lisse	100% lisse	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu
	R2A	100% lisse	100% lisse	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu	100% chevelu

Note : Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata.

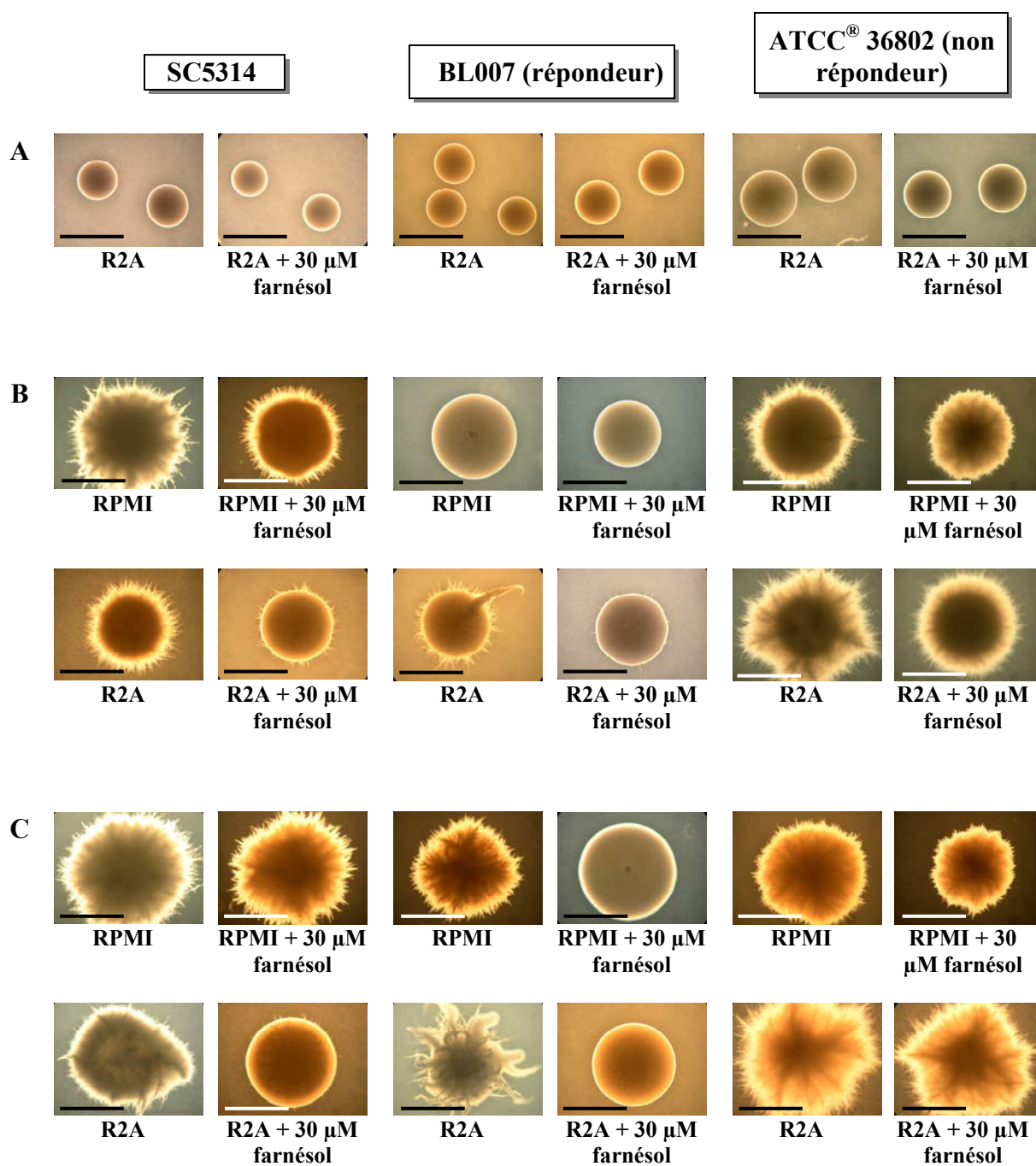


Figure 16: Morphologies coloniales observées pour la souche SC5314, pour les répondeurs (souche BL007) et les non répondeurs (souche ATCC[®] 36802) dans diverses conditions d'incubation, sur les milieux de culture RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 μM farnésol

Vue en microscopie inversée (grossissement 40x; barre : 1 mm); **A** – température ambiante; **B** – 37°C; **C** – 37°C avec 2.5% CO₂.

Effet des conditions d'incubation sur la taille coloniale en milieu solide

(Tableau VI) : Étant donné que les différences observées dans la taille des colonies reflètent le taux de division des cellules, plus une colonie possède un grand diamètre, plus sa croissance est importante, et vice-versa. À température de la pièce, toutes les souches croissent sous forme des colonies d'une taille moyenne de 1 mm sur les deux milieux de culture. Lorsqu'elles sont incubées à 37°C avec ou sans CO₂, leur croissance est de 1.5 à 4.0 fois plus importante ($P \leq 0.05$), indépendamment des souches ou du milieu de culture. Notamment, à 37°C, les colonies des 5 souches ont un diamètre moyen de 2-2.5 mm sur les deux milieux de culture, sauf SC5314 qui montre une taille coloniale 3.5 fois plus importante sur RPMI 1640 et BL007 dont la taille coloniale est 1.5 fois plus importante sur R2A. De plus, seulement pour la souche BL007 on observe une différence statistiquement significative entre la croissance sur les deux milieux de culture à 37°C, les colonies étant 33% ($P \leq 0.05$) plus grandes sur RPMI 1640 que R2A. Lorsque les levures sont incubées à 37°C avec 2.5% CO₂, la taille moyenne des colonies sur les deux milieux est de nouveau de 2-2.5 mm pour toutes les souches, excepté SC5314 dont la croissance est de 4.0 fois plus importante sur RPMI 1640 et HM1 qui croît beaucoup plus sur R2A (diamètre moyen de 3.5 mm) que sur RPMI 1640 (diamètre moyen de 1.5 mm). Ainsi, à 37°C avec 2.5% CO₂ la croissance de la souche SC5314 est 60% ($P \leq 0.05$) plus importante sur RPMI 1640 que sur R2A. En ce qui concerne les non répondeurs, leurs colonies sont plus grandes sur R2A que sur RPMI 1640 (25% plus grandes pour ATCC[®] 36802 et 113% pour HM1, $P \leq 0.05$), contrairement aux répondeurs qui ne présentent aucune différence dans la taille coloniale sur les deux milieux de culture à 37°C avec 2.5% CO₂.

Effet du farnésol sur la taille coloniale en milieu solide (Tableau VI) : le farnésol ne montre aucun effet sur la croissance des 5 souches lorsque celles-ci sont incubées à température ambiante sur les deux milieux de culture, sauf pour SC5314 et LAM1 sur RPMI 1640 où le farnésol induit une diminution de 25% de la taille coloniale. À 37°C le farnésol inhibe de 20% la croissance de HM1 sur RPMI 1640, mais à part cela il n'influence pas la taille moyenne des colonies des non répondeurs à cette température. En ce qui concerne les répondeurs, à 37°C le farnésol affecte uniquement leur croissance

sur le milieu RPMI 1640 en la diminuant de 25%. Cependant, l'isoprénoïde ne montre aucun effet statistiquement significatif sur la croissance de la souche SC5314 à 37°C sur les deux milieux de culture. Lorsque les levures sont incubées à 37°C avec 2.5% CO₂, le farnésol n'a aucune influence sur la taille moyenne des colonies des répondeurs et des non répondeurs, à l'exception d'ATCC[®] 36802 qui a un diamètre colonial de 12.5% moins important en présence de cette molécule sur le milieu RPMI 1640. Par contre l'isoprénoïde agit sur la croissance de la souche SC5314 en l'inhibant de 37.5% sur RPMI 1640 à 37°C avec 2.5% CO₂.

Tableau VI : Taille moyenne des colonies (mm) de la souche SC5314, des répondeurs (BL007 et LAM1) et des non répondeurs (ATCC[®] 36802 et HM1), en présence et en absence de farnésol, en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation

Souche	Milieu	Conditions d'incubation					
		Température ambiante		37°C		37°C + 2.5% CO ₂	
		0 µM farnésol	30 µM farnésol	0 µM farnésol	30 µM farnésol	0 µM farnésol	30 µM farnésol
SC5314	RPMI	1	0.75*	3.5	3	4	2.5*
	R2A	1	1	2.5	2	2.5	2
BL007	RPMI	1	1	2	1.5*	2	2
	R2A	1	1	1.5	1.5	2	2
LAM1	RPMI	1	0.75*	2	1.5*	2	2
	R2A	1	1	2	2	2	2
ATCC [®] 36802	RPMI	1	1	2	2	2	1.75*
	R2A	1	1	2	2	2.5	2.5
HM1	RPMI	1	1	2.5	2*	1.5	1.5
	R2A	1	1	2.5	2.5	3.5	3.5

Note : Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. Les différences statistiquement significatives observées suite à l'ajout du farnésol, sont indiquées par un astérisque : * $P \leq 0.05$.

Effet du dextrose sur la morphologie coloniale (Figure 17) : les non répondeurs ne sont pas des souches constitutivement filamenteuses car ils forment des colonies lisses s'ils sont incubés à température ambiante ou sont étalés sur géloses SD. Comme la différence la plus importante entre les milieux de culture SD, RPMI 1640 et R2A est la concentration en dextrose (SD – 2% dextrose, RPMI 1640 – 0.2% dextrose et R2A – 0.05% dextrose), on pense que la réponse au farnésol et le phénotype colonial des répondeurs et non répondeur varient en fonction de la quantité de sucre disponible dans le milieu. Pour tester cette hypothèse, les souches BL007 (répondeur) et ATCC[®] 36802 (non répondeur) ont été étalées sur des géloses TYE (milieu de culture très pauvre) contenant des concentrations de dextrose allant de 0 à 2%, avec ou sans 30 µM farnésol (Figure 17). Les levures ont été incubées pendant 48 heures à 37°C avec 2.5% CO₂ et en présence d'humidité, conditions qui permettent de visualiser la réponse au farnésol. Pour des concentrations en dextrose de 0.25% ou moins, on observe des morphologies coloniales et des réponses au farnésol habituelles, c'est-à-dire le répondeur forme des colonies chevelues en absence de farnésol et de colonies lisses avec farnésol, tandis que le non répondeur demeure chevelu en présence ou en absence de la molécule de *quorum sensing*. Cependant, si la quantité de sucre dans le milieu de culture solide est de 0.50% dextrose ou plus, l'expression phénotypique et la réponse au farnésol changent. Ainsi, le répondeur croît uniquement sous forme de colonies lisses, en présence ou en absence de farnésol, à des concentrations en dextrose supérieures ou égales à 0.50%. Le même phénotype colonial est observé aussi pour le non répondeur, à des concentrations de 1% ou plus de dextrose. Lorsqu'elle est incubée en présence de 0.50% ou 0.75% dextrose, la souche ATCC[®] 36802 forme comme d'habitude des colonies chevelues mais, si le farnésol est ajouté, la levure croît seulement sous forme des colonies lisses.

Effet du dextrose sur la taille coloniale en milieu solide (Figure 17) : la taille moyenne des colonies augmente proportionnellement avec la concentration de sucre disponible dans le milieu et cela a été observé pour les deux souches de levure testées.

En ce qui concerne le nombre de UFCs/250 cellules inoculées, il demeure semblable pour le répondeur et le non répondeur, indépendamment des conditions de culture.

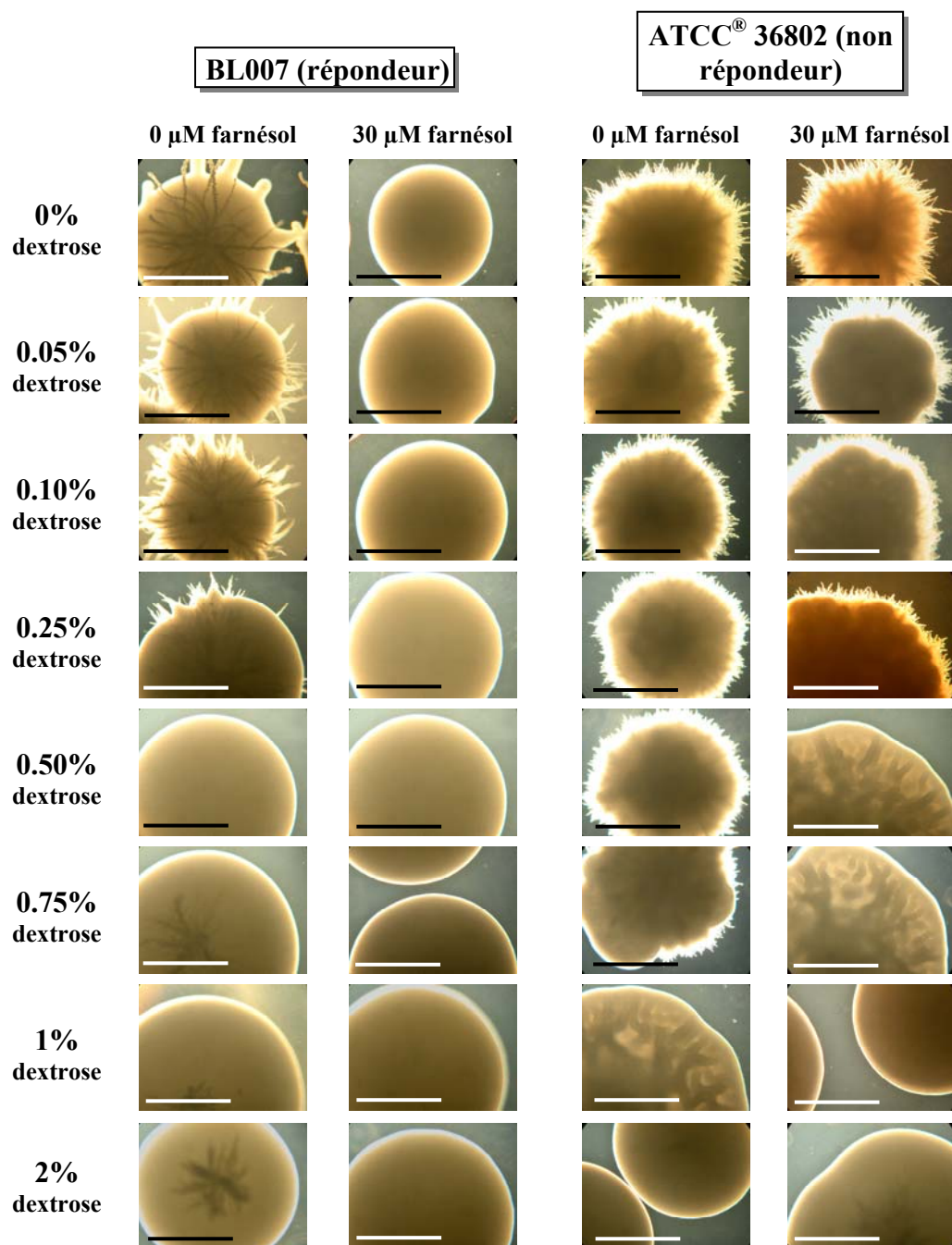


Figure 17: Effet du sucre sur la morphologie coloniale et la réponse au farnésol des répondeurs (souche BL007) et des non répondeurs (souche ATCC[®] 36802)

Vue en microscopie inversée (grossissement 40x; barre : 1.25 mm); les levures ont été incubées pendant 48 heures à 37°C avec 2.5% CO₂ et en présence d'humidité, sur des géloses TYE supplémentées d'une concentration de dextrose variant de 0 à 2%, en présence ou en absence de 30 μ M farnésol.

En conclusion, seulement à 37°C, indépendamment du milieu de culture, on remarque une différence entre les souches au niveau de leur phénotype colonial en absence de farnésol: les répondeurs forment des colonies lisses, tandis que les non répondeurs ainsi que la souche SC5314 produisent des colonies chevelues. L'effet du farnésol sur la morphologie coloniale peut être noté uniquement à 37°C avec 2.5% CO₂, sur les deux milieux de culture : l'isoprénoïde inhibe complètement le phénotype chevelu des répondeurs et n'a aucun effet sur le phénotype des non répondeurs. En ce qui concerne la souche SC5314, elle se comporte comme les répondeurs sur R2A et comme les non répondeurs sur RPMI 1640. La réponse au farnésol est modifiée pour les répondeurs à des concentrations de dextrose de 0.50% ou plus tandis que pour les non répondeurs à des concentrations de dextrose 2 fois plus importantes. Par contre, on n'observe pas de différences importantes entre les tailles moyennes des colonies des répondeurs et des non répondeurs dans toutes les conditions de culture testées.

4.1.2. Évaluation du profil de germination en culture liquide

Effet des conditions d'incubation sur la morphologie cellulaire (Figures 18, 19 et 20) : à température ambiante, indépendamment du milieu de culture, les 5 souches étudiées croissent à 100% sous forme des blastospores (résultats non illustrés).

Les non répondeurs gardent un profil de germination constant de 80 à 100% formes filamenteuses tout au long de la période d'incubation de 48 heures et cela est observé dans toutes les conditions testées.

En ce qui concerne les répondeurs, ils montrent un profil de germination différent en fonction des conditions de culture. Après 4 heures d'incubation à 37°C, les répondeurs produisent approximativement 30 à 90% formes filamenteuses, la germination étant en moyenne 2 fois plus importante dans le milieu R2A que dans le milieu RPMI 1640. De plus, la souche BL007 forme en moyenne 50% plus d'hyphes et de pseudohyphes que la souche LAM1. Suivant les premières 4 heures d'incubation à 37°C, le profil de germination des répondeurs diminue dans le temps jusqu'à 1-5 % formes filamenteuses après 40 à 48 heures d'incubation. À 37°C en présence de 2.5%

CO₂, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les profils de germination des répondeurs dans les deux milieux de culture testés. Après 4 heures d'incubation à 37°C avec 2.5% CO₂, les répondeurs germent à 95-100% et par la suite le pourcentage des formes filamenteuses diminue à 40-50% après 24 à 48 heures d'incubation. La présence de dioxyde de carbone favorise donc la germination des répondeurs à 37°C.

La souche SC5314 montre un profil de germination semblable aux répondeurs lorsqu'elle est incubée à 37°C et un profil semblable aux non répondeurs à 37°C en présence de 2.5% CO₂. Ainsi, après 4 heures d'incubation à 37°C, la souche SC5314 produit 90 à 95% formes filamenteuses dans les deux milieux de culture. Par la suite, sa germination est inhibée graduellement dans le temps jusqu'à 20% de formes filamenteuses dans RPMI 1640 et respectivement 5% dans R2A, après 32 à 48 heures d'incubation. Le milieu RPMI 1640 semble favoriser la filamentation de la souche SC5314 à 37°C. Cette souche produit environ 3 fois plus d'hyphes et de pseudohyphes dans RPMI 1640 que dans R2A durant les 48 heures d'incubation. Par contre, à 37°C en présence de 2.5% CO₂, la souche SC5314 produit 95 à 100% formes filamenteuses dans les deux milieux de culture après 4 heures d'incubation et ce ratio demeure inchangé au cours des 48 heures d'incubation.

Effet du farnésol sur la morphologie cellulaire (Figures 18, 19 et 20) : l'ajout de 30 µM farnésol au début de l'incubation n'a pas d'effet significatif sur le profil de germination des non répondeurs. Dans toutes les conditions testées, on observe seulement une légère inhibition de la filamentation des non répondeurs d'environ 10 à 20% en présence de farnésol. Le milieu RPMI 1640 à 37°C avec 2.5% CO₂ fait exception car l'isoprénoïde ne montre aucun effet sur la germination des non répondeurs dans ces conditions de culture.

Dans le cas des répondeurs, dans toutes les conditions d'incubation expérimentées, l'ajout de 30 µM farnésol inhibe complètement leur filamentation et ce profil de germination demeure constant tout au long de la période d'incubation.

En ce qui concerne la souche SC5314, étant donné qu'elle montre un profil de germination semblable aux répondeurs à 37°C, l'ajout du farnésol inhibe entièrement sa

filamentation dans les deux milieux de culture après 8 heures d'incubation. Cependant, on remarque que l'isoprénoïde nécessite plus de temps (environ 4 heures d'incubation de plus) pour supprimer complètement la germination de la souche SC5314 par rapport aux répondeurs. Quand incubé à 37°C en présence de 2.5% CO₂, le farnésol n'a aucun effet significatif sur la germination de la souche SC5314 dans le milieu RPMI 1640, comme observé aussi dans le cas des non répondeurs. Par contre, dans le milieu R2A, l'ajout de 30 µM farnésol à 37°C avec 2.5% CO₂ inhibe la filamentation de la souche SC5314 à 50% après 4 heures d'incubation. Par la suite, le profil de germination diminue graduellement dans le temps jusqu'à 10% formes filamenteuses après 24 à 48 heures d'incubation.

En conclusion, indépendamment des conditions de culture testées, les non répondeurs gardent un profil de germination constant de 80 à 100% hyphes en absence de farnésol, tandis que les répondeurs germent au cours des 4 premières heures (30 à 100% formes filamenteuses) et ensuite leur développement hyphal diminue graduellement dans le temps jusqu'à 1-5% formes filamenteuses à 37°C, et jusqu'à 40-50% formes filamenteuses à 37°C avec 2.5% CO₂. La souche SC5314 se comporte comme les répondeurs à 37°C et comme les non répondeurs à 37°C en présence de dioxyde de carbone. L'ajout du farnésol inhibe complètement la filamentation des répondeurs mais n'a aucun effet significatif sur le profil de germination des non répondeurs et cela a été observé dans toutes les conditions d'incubation expérimentées. En ce qui concerne la souche SC5314, l'effet du farnésol sur sa germination est semblable aux répondeurs à 37°C dans les deux milieux de culture et à 37°C avec 2.5% CO₂ dans R2A, mais semblable aux non répondeurs dans le milieu RPMI 1640 à 37°C en présence de dioxyde de carbone.

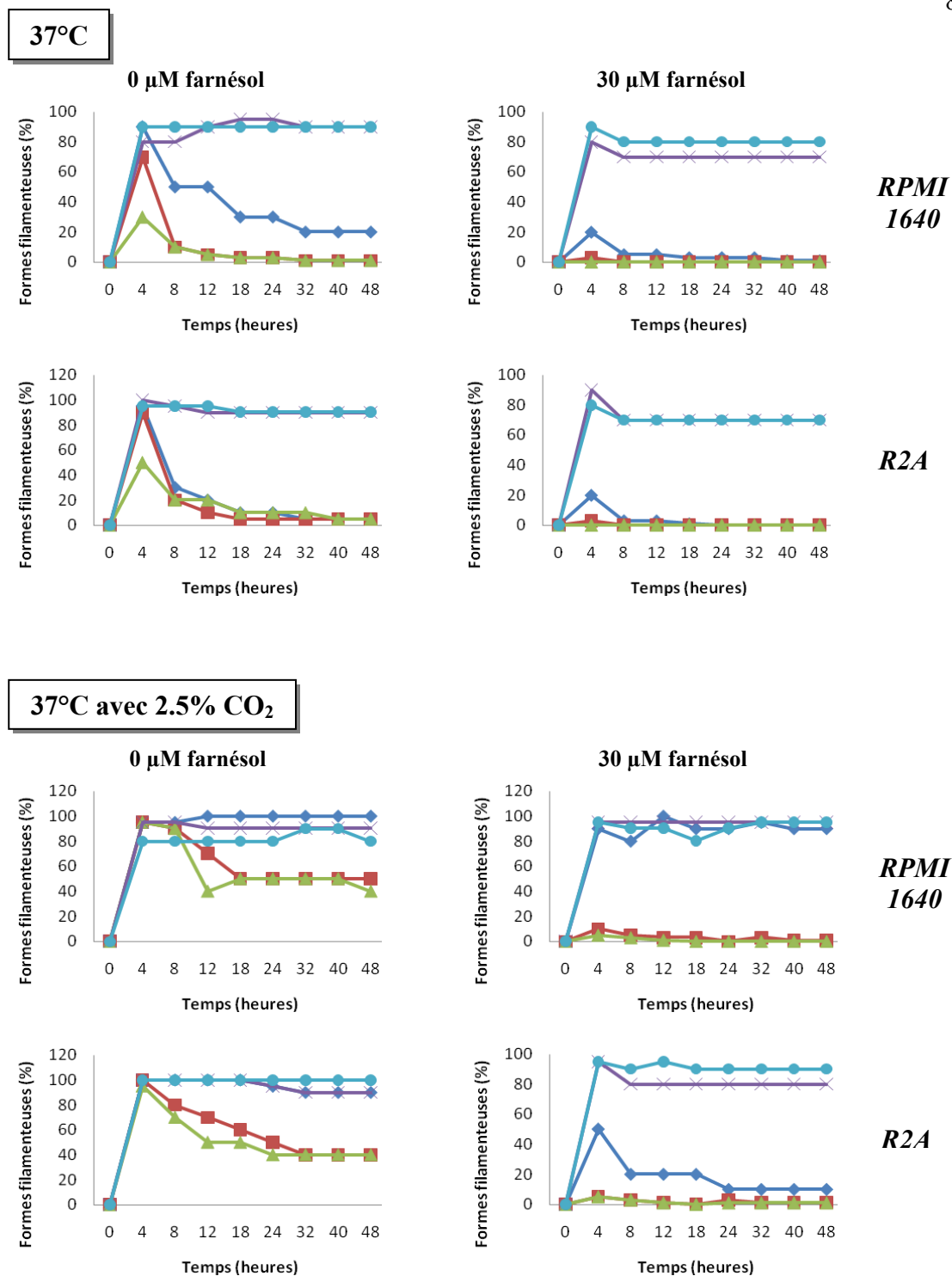


Figure 18 : Profils de germination des 5 souches de *C. albicans* étudiées, en présence et en absence de farnésol, en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation
 Souches – SC5314 (♦), BL007 (■), LAM1 (▲), ATCC[®] 36802 (×) et HM1 (●). Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata.

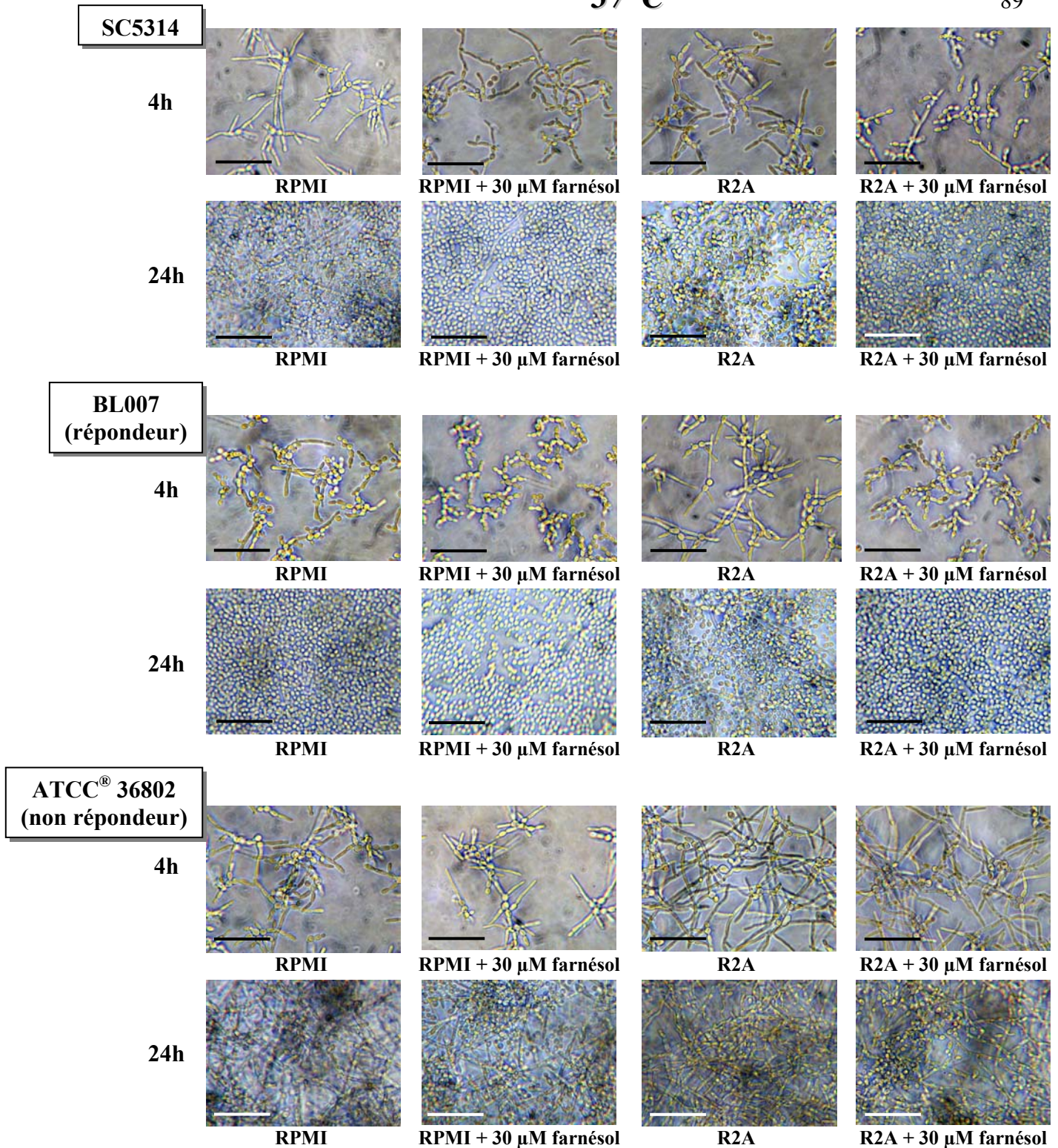


Figure 19 : Morphologies cellulaires observées pour la souche SC5314, pour les répondeurs (souche BL007) et les non répondeurs (souche ATCC® 36802) à 37°C, dans les milieux de culture RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 μM farnésol

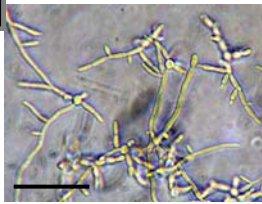
Vue en microscopie droite (grossissement 100x; barre : 50 μm).

37°C avec 2.5% CO₂

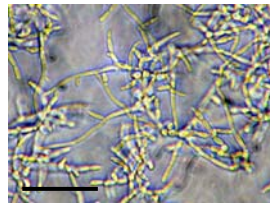
90

SC5314

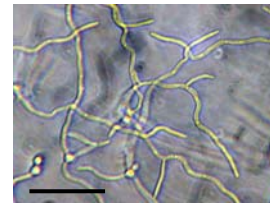
4h



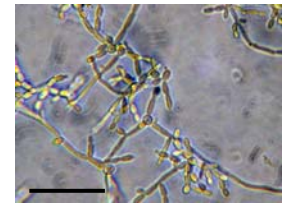
RPMI



RPMI + 30 μM farnésol

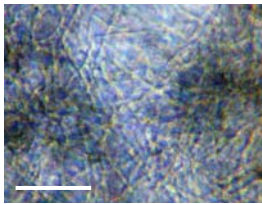


R2A

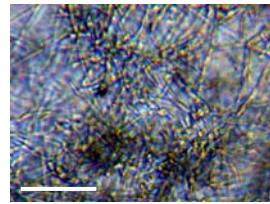


R2A + 30 μM farnésol

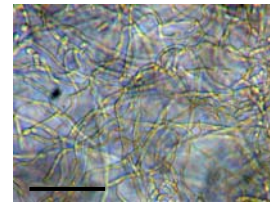
24h



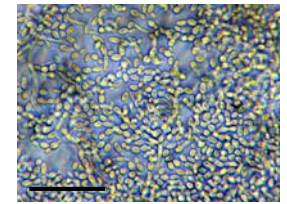
RPMI



RPMI + 30 μM farnésol



R2A



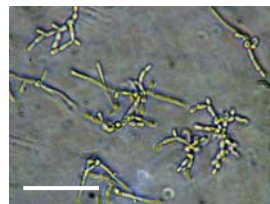
R2A + 30 μM farnésol

**BL007
(répondeur)**

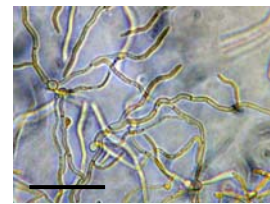
4h



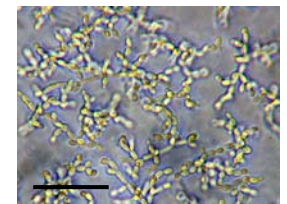
RPMI



RPMI + 30 μM farnésol

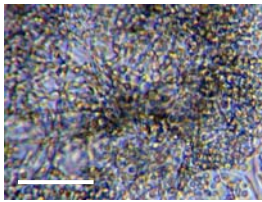


R2A

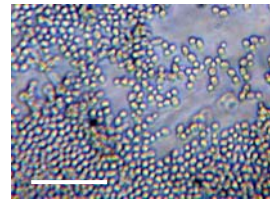


R2A + 30 μM farnésol

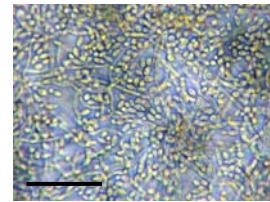
24h



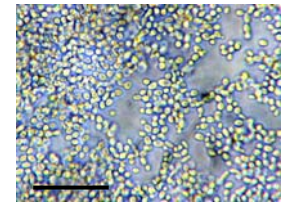
RPMI



RPMI + 30 μM farnésol



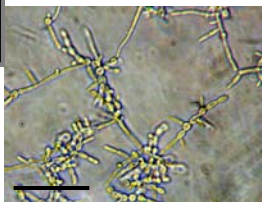
R2A



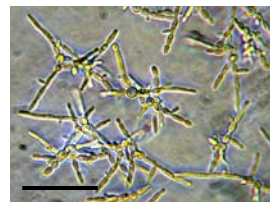
R2A + 30 μM farnésol

**ATCC® 36802
(non répondeur)**

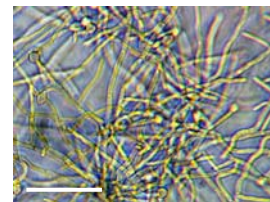
4h



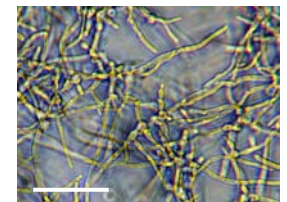
RPMI



RPMI + 30 μM farnésol

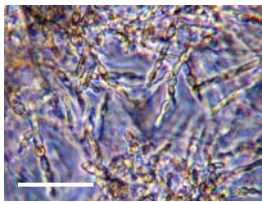


R2A

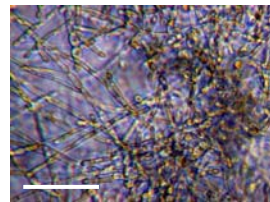


R2A + 30 μM farnésol

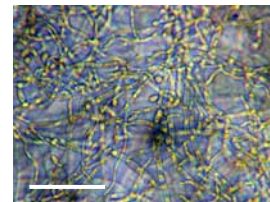
24h



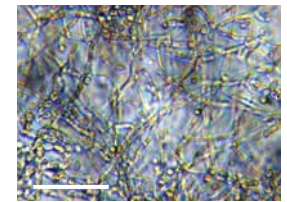
RPMI



RPMI + 30 μM farnésol



R2A



R2A + 30 μM farnésol

Figure 20 : Morphologies cellulaires observées pour la souche SC5314, pour les répondeurs (souche BL007) et les non répondeurs (souche ATCC® 36802) à 37°C avec 2.5% CO₂, dans les milieux RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 μM farnésol
Vue en microscopie droite (grossissement 100x; barre : 50 μm).

4.1.3. Évaluation de la croissance en culture liquide

Effet des conditions d'incubation sur la croissance en culture liquide (Figures 21 et 22) : dans le milieu R2A à 37°C, avec ou sans 2.5% CO₂, les 5 souches de *C. albicans* étudiées montrent un profil de croissance semblable, excepté LAM1 qui croît légèrement moins vite que les autres souches, surtout en présence de dioxyde de carbone. Lorsque les levures sont incubées dans le milieu RPMI 1640 en présence ou en absence de CO₂, les non répondeurs croissent en moyenne 2 fois moins vite que les répondeurs. Cependant, après 18 heures d'incubation à 37°C dans RPMI 1640, le taux de croissance des répondeurs commence à diminuer. Aucun ralentissement de croissance n'a été observé pour les non répondeurs ou les répondeurs à 37°C avec 2.5% CO₂. En ce qui concerne la souche SC5314, sa croissance est environ 2 fois plus rapide que les répondeurs et environ 3 fois plus rapide que les non répondeurs dans le milieu RPMI 1640 à 37°C avec 2.5% CO₂. Son profil de croissance est semblable aux répondeurs dans RPMI 1640 à 37°C, sans montrer par contre de ralentissement de croissance après 18 heures d'incubation. De plus, la souche SC5314 croît approximativement 1.3 fois plus vite que les non répondeurs à 37°C dans RPMI 1640.

La Figure 22 présente la croissance des 5 souches après 24 heures d'incubation. On remarque qu'à 37°C le milieu de culture RPMI 1640 favorise davantage la croissance des levures que le milieu R2A. Notamment, à 37°C, la croissance de la souche BL007 et des non répondeurs est environ 37.1% moins importante ($P \leq 0.05$) dans le milieu R2A que RPMI 1640 et respectivement 61.6% moins importante ($P \leq 0.05$) pour les souches LAM1 et SC5314. Par contre, lorsqu'ils sont incubés à 37°C avec 2.5% CO₂, les non répondeurs croissent plus vite dans le milieu R2A que RPMI 1640 (19.8% plus vite pour ATCC[®] 36802 et 31.3% plus vite pour HM1, $P \leq 0.05$). Contrairement aux non répondeurs, à 37°C en présence de dioxyde de carbone la souche LAM1 montre une croissance 41.3% moins importante ($P \leq 0.05$) dans R2A que RPMI 1640 et la souche SC5314 une croissance 54.7% moins importante ($P \leq 0.05$). Aucune différence significative de croissance dans les deux milieux de culture n'a été observée pour la souche BL007 lorsqu'elle est incubée à 37°C avec 2.5% CO₂.

37°C

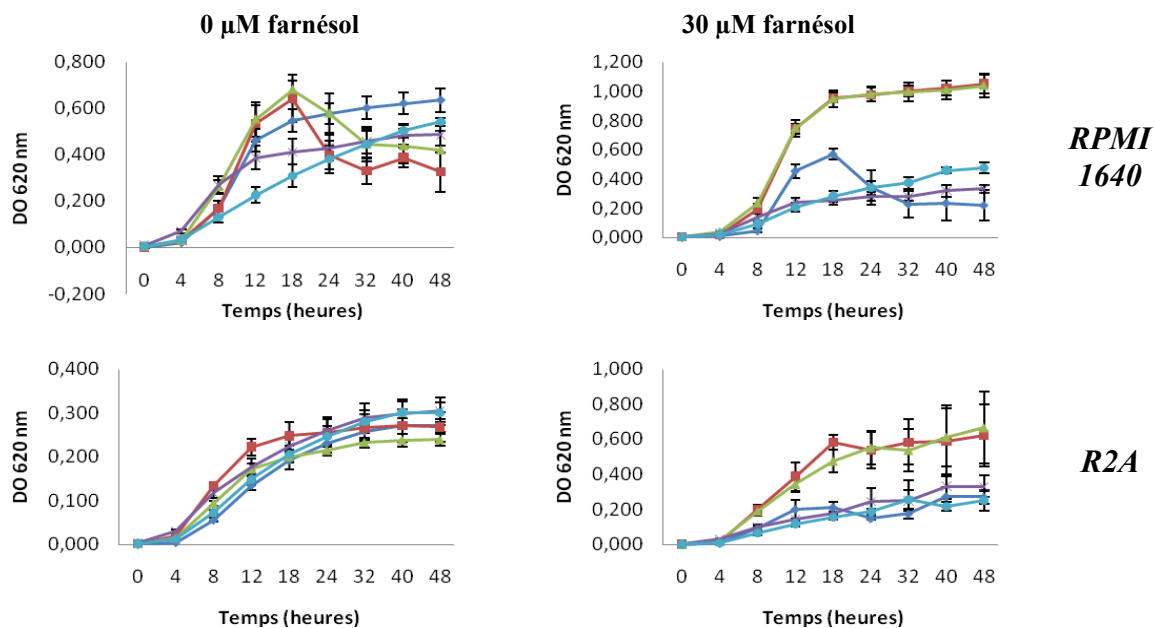
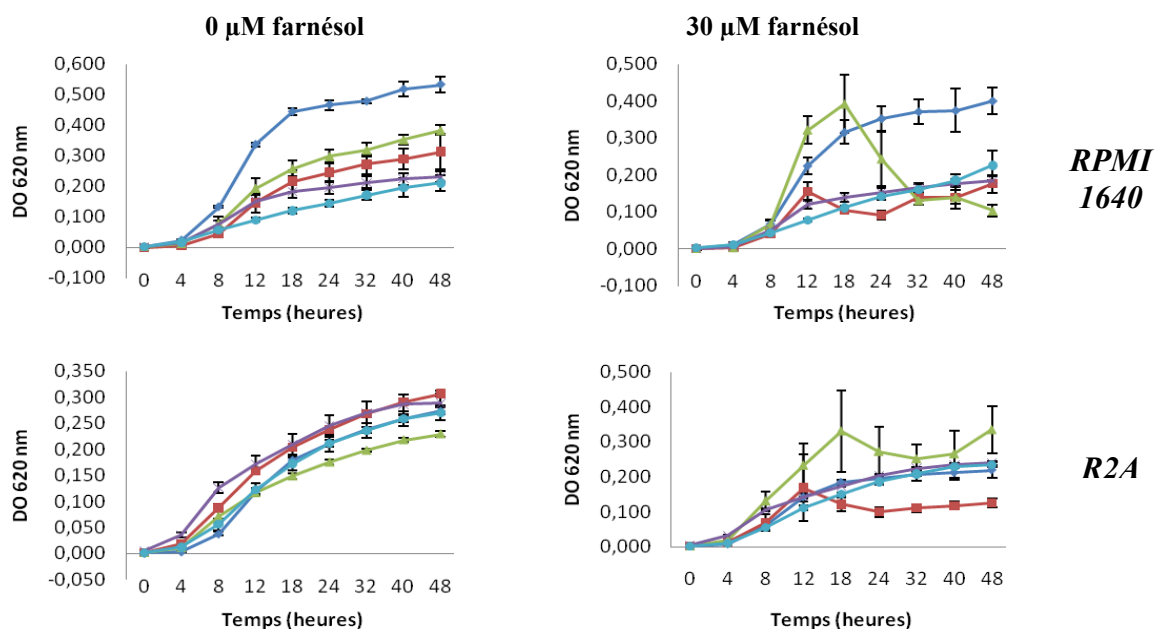
37°C avec 2.5% CO₂

Figure 21 : Courbes de croissance des 5 souches de *C. albicans* étudiées, en présence et en absence de farnésol, en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation
 Souches – SC5314 (◆), BL007 (■), LAM1 (▲), ATCC[®] 36802 (×) et HM1 (●). Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. Les écart-types sont illustrés.

37°C

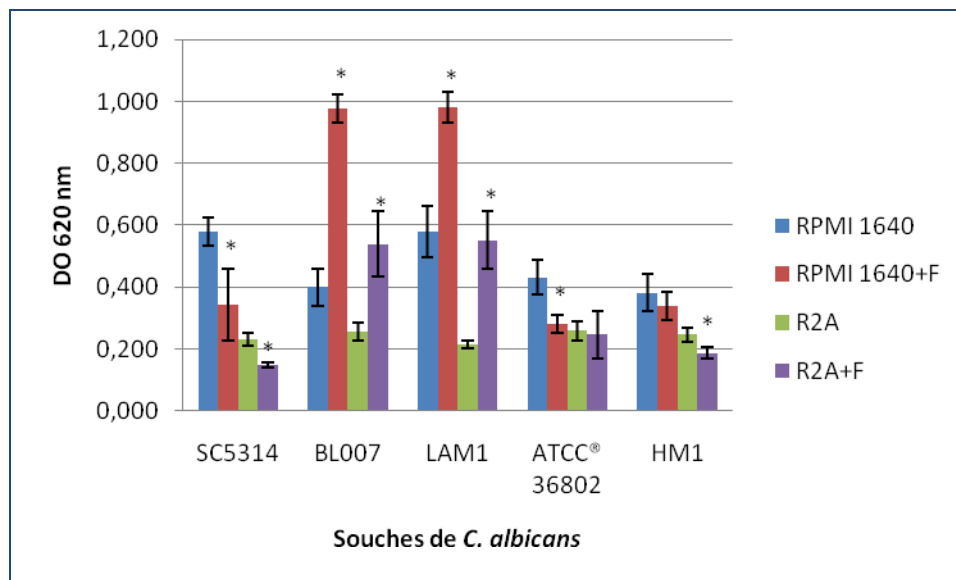
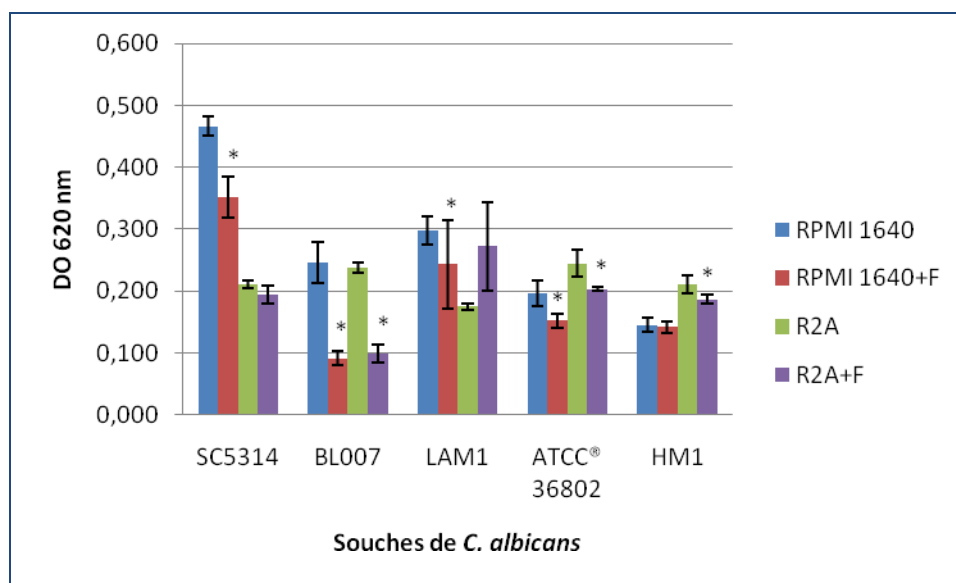
37°C avec 2.5% CO₂

Figure 22 : Croissance des 5 souches de *C. albicans* étudiées, après 24 heures d'incubation à 37°C en présence ou en absence de 2.5% CO₂, dans les milieux RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 µM farnésol (F)

Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. Les écart-types sont illustrés. Les différences statistiquement significatives observées suite à l'ajout du farnésol, sont indiquées par un astérisque : * $P \leq 0.05$.

L'ajout de 2.5% CO₂ ralentit la croissance des 5 souches de *C. albicans* dans le milieu RPMI 1640 (Figure 22). Les répondeurs montrent une diminution de la croissance d'approximativement 43.5% suite à l'ajout du dioxyde de carbone dans RPMI 1640, les non répondeurs une inhibition d'environ 58.2% et la souche SC5314 une diminution de 19.3% ($P \leq 0.05$). Par contre, dans le milieu de culture R2A, on observe une différence significative dans la croissance suivant l'apport de 2.5% CO₂ uniquement pour le répondeur LAM1 (inhibition de croissance de 18.2%, $P \leq 0.05$).

Effet du farnésol sur la croissance en culture liquide (Figures 21 et 22) :

lorsque les levures sont incubées à 37°C en présence de 30 µM farnésol, les répondeurs croissent environ 3 fois plus vite que les non répondeurs et la souche SC5314 dans le milieu RPMI 1640, et approximativement 2 fois plus vite dans R2A (Figure 21). L'ajout de farnésol favorise la croissance des répondeurs à 37°C dans les deux milieux de culture, leur croissance après 24 heures d'incubation étant presque 2 fois plus importante en présence de farnésol qu'en absence de l'isoprénoïde (Figure 22). De plus, le niveau de croissance atteint par les répondeurs à 37°C sur RPMI 1640 avec farnésol représente le niveau le plus élevé de croissance obtenu parmi toutes les conditions d'incubation testées. En ce qui concerne les non répondeurs, l'ajout de 30 µM farnésol à 37°C inhibe leur croissance de 34.9% dans RPMI 1640 pour ATCC[®] 36802 et de 24.3% dans R2A pour HM1. Comme observé pour les non répondeurs, la souche SC5314 montre aussi une diminution de croissance à 37°C en présence de farnésol (40.7% inhibition dans RPMI 1640 et 35.6% inhibition dans R2A).

À 37°C avec 2.5% CO₂, le profil de croissance est semblable pour les répondeurs et les non répondeurs dans le milieu de culture RPMI 1640 avec 30 µM farnésol, leur croissance étant approximativement 2.5 fois plus lente que celle de la souche SC5314 (Figure 21). Par contre, lorsqu'ils sont incubés à 37°C avec 2.5% CO₂ dans R2A en présence de farnésol, les non répondeurs et la souche SC5314 montrent la même courbe de croissance et leur croissance est environ 2 fois plus importante que celle du répondeur BL007 et 1.5 fois moins importante que celle du répondeur LAM1. Pour toutes les souches testées on observe une diminution de la croissance suite à l'ajout du farnésol, après 24 heures d'incubation à 37°C avec 2.5% CO₂, l'inhibition étant plus importante

pour les répondeurs que les non répondeurs (Figure 22). Ainsi, on note une diminution en moyenne de 60.6% de la croissance de BL007 suivant l'apport de l'isoprénoïde dans les deux milieux de culture, autant qu'une inhibition de 18.4% pour LAM1 dans RPMI 1640. La croissance du non répondeur ATCC[®] 36802 est diminuée en moyenne de 19.8% dans les deux milieux de culture suite à l'ajout du farnésol et celle du HM1 de 11.6% dans R2A. De plus, la molécule de *quorum sensing* inhibe aussi de 24.5% la croissance de la souche SC5314 dans RPMI 1640.

À température ambiante, indépendamment du milieu de culture, les 5 souches étudiées montrent un profil de croissance semblable (résultats non illustrés).

En conclusion, uniquement dans le milieu de culture RPMI 1640, indépendamment des conditions d'incubation, on remarque une différence entre les souches au niveau de leur profil de croissance en absence de farnésol: les répondeurs croissent en moyenne 2 fois plus vite que les non répondeurs. La souche SC5314 se comporte comme les répondeurs à 37°C dans RPMI 1640, mais en présence de dioxyde de carbone elle croît 2 fois plus vite que les répondeurs et 3 fois plus vite que les non répondeurs. De plus, l'ajout de 2.5% CO₂ ralentit la croissance des toutes les souches dans le milieu RPMI 1640. En présence de farnésol, la croissance des non répondeurs ainsi que celle de la souche SC5314 sont inhibées en moyenne de 27.3% dans toutes les conditions de culture testées. En ce qui concerne les répondeurs, l'ajout du farnésol stimule leur croissance de 53.4% à 37°C dans les deux milieux de culture et l'inhibe de 39.5% en présence de CO₂.

4.1.4. Évaluation de la formation de biofilm

Effet des conditions d'incubation sur la formation de biofilm (Figures 23 et 24): lorsque les levures sont incubées à température ambiante, aucune souche ne produit de biofilm, indépendamment des conditions de culture (résultats non illustrés).

Le milieu de culture RPMI 1640 ne favorise pas la formation de biofilm du non répondeur HM1 à 37°C en présence ou en absence de dioxyde de carbone. De plus, le répondeur LAM1 produit une faible quantité de biofilm dans RPMI 1640 à 37°C. Par contre, les autres souches de *C. albicans* sont en mesure de former du biofilm dans ce milieu de culture. Notamment, à 37°C, la souche SC5314 produit dans RPMI 1640 la plus grande quantité de biofilm observée parmi toutes les conditions de culture testées, qui est 1.8 fois plus importante que celle de BL007 et 2.5 fois plus importante que celle d'ATCC® 36802 dans les mêmes conditions d'incubation ($P \leq 0.05$). À 37°C avec 2.5% CO₂ dans RPMI 1640, la souche SC5314 forme de nouveau la plus grande quantité de biofilm par rapport aux autres souches dans les mêmes conditions de culture et la souche LAM1 la plus faible. Le répondeur BL007 produit 1.3 fois plus de biofilm ($P \leq 0.05$) que le non répondeur ATCC® 36802 dans RPMI 1640 à 37°C en présence de dioxyde de carbone.

Contrairement au milieu de culture RPMI 1640, toutes les souches testées sont capables de former du biofilm lorsqu'elles sont incubées dans le milieu R2A (Figure 23). Ainsi, à 37°C on observe une production de biofilm semblable pour toutes les levures dans R2A, excepté LAM1 qui forme environ 2.0 fois moins de biofilm ($P \leq 0.05$) que les autres souches. De plus, à 37°C avec 2.5% CO₂ le milieu R2A permet de différencier les répondeurs des non répondeurs, les derniers (ainsi que la souche SC5314) produisant approximativement 1.6 fois plus de biofilm ($P \leq 0.05$) que les répondeurs. En conséquence, le milieu de culture R2A est plus adéquat pour l'étude de la formation de biofilm des souches de *C. albicans* que le milieu RPMI 1640.

Si on compare la production de biofilm entre les deux milieux de culture pour la même souche, on remarque qu'à 37°C les non répondeurs montrent une augmentation de la formation de biofilm dans R2A par rapport au RPMI 1640 (1.5 fois plus de biofilm pour ATCC® 36802 et 10 fois plus pour HM1, $P \leq 0.05$) (Figure 23).

37°C

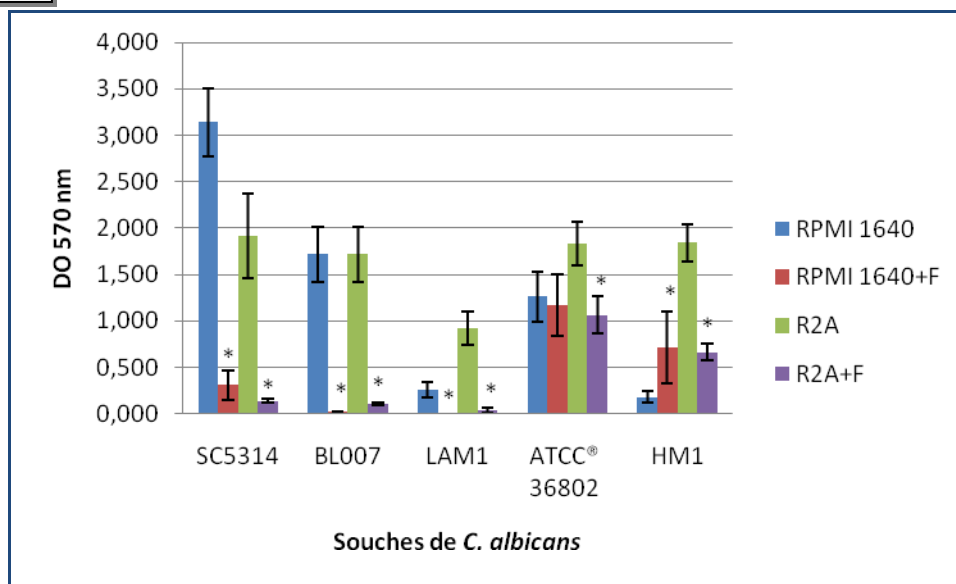
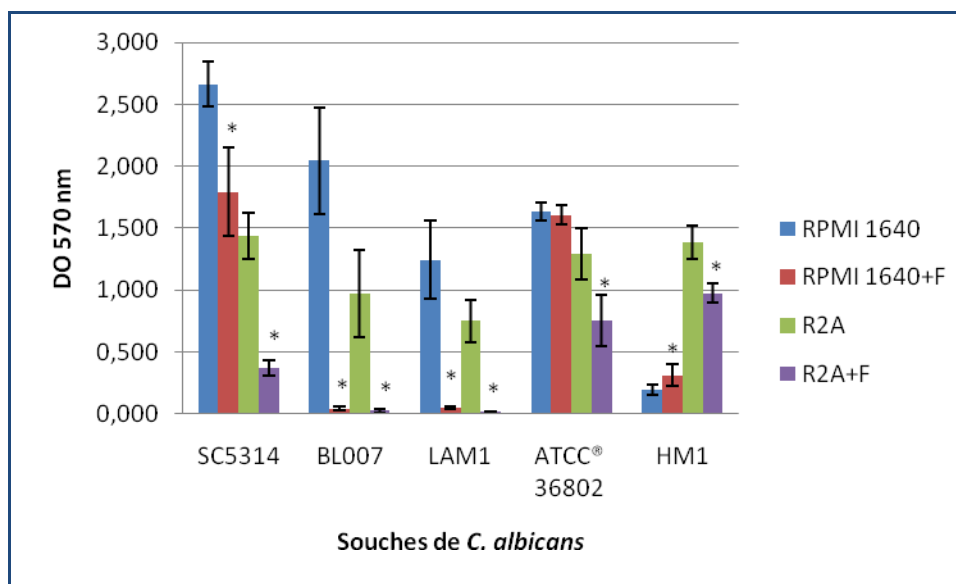
37°C avec 2.5% CO₂

Figure 23 : Formation de biofilm des 5 souches de *C. albicans* étudiées, après 24 heures d'incubation à 37°C en présence ou en absence de 2.5% CO₂, dans les milieux RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 µM farnésol (F)

Les biofilms ont été formés dans des plaques à 24 puits et ont été quantifiés par coloration au CV. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. Les écart-types sont illustrés. Les différences statistiquement significatives observées suite à l'ajout du farnésol, sont indiquées par un astérisque : * $P \leq 0.05$.

Le répondeur LAM1 produit aussi 3.5 fois plus de biofilm ($P \leq 0.05$) dans R2A que RPMI 1640 lorsqu'il est incubé à 37°C (Figure 23). Cependant, aucune différence statistiquement significative dans la biomasse de biofilm produit dans les deux milieux de culture à 37°C n'a été observée pour la souche BL007. Contrairement aux non répondeurs et LAM1, la souche SC5314 forme 38.8 % moins de biofilm ($P \leq 0.05$) dans R2A que RPMI 1640 à 37°C. L'ajout de dioxyde de carbone induit une diminution de la production de biofilm dans R2A par rapport au RPMI 1640, cette inhibition étant presque 2 fois plus importante pour les répondeurs et la souche SC5314 que les non répondeurs. Notamment, les répondeurs et SC5314 forment environ 46.0% moins de biofilm ($P \leq 0.05$) dans R2A que RPMI 1640 lorsqu'ils sont incubés à 37°C avec 2.5% CO₂, tandis que ATCC® 36802 produit 20.9% moins de biofilm et HM1 7.0 fois plus de biofilm dans les mêmes conditions de culture ($P \leq 0.05$).

L'apport de 2.5% CO₂ inhibe la quantité de biofilm produite par les répondeurs et les non répondeurs dans le milieu R2A (inhibition de 43.5% pour BL007, 18.7% pour LAM1 et 27.1% en moyenne pour les non répondeurs, $P \leq 0.05$) (Figure 23). L'ajout de dioxyde de carbone n'a aucun effet significatif sur la biomasse de biofilm produit dans R2A par la souche SC5314. En ce qui concerne le milieu RPMI 1640, on observe une différence dans la formation de biofilm suivant l'apport de 2.5% CO₂ uniquement pour le répondeur LAM1 (4.7 fois augmentation de la production de biofilm, $P \leq 0.05$), le non répondeur ATCC® 36802 (1.3 fois augmentation de la production de biofilm, $P \leq 0.05$) et la souche SC5314 (inhibition de 15.2% de la production de biofilm, $P \leq 0.05$).

La Figure 24 illustre la vue en microscopie inversée des biofilms colorés au CV. La structure des biofilms des toutes les souches étudiées est composée d'un mélange d'hyphes et des blastospores dans le milieu RPMI 1640, tandis que dans R2A les biofilms sont constitués presque exclusivement des formes filamenteuses. L'apport de 2.5% CO₂ favorise la production d'hyphes dans les deux milieux de culture, tous les biofilms étant formés de plus de formes filamenteuses en présence de dioxyde de carbone qu'en son absence. Également, on observe dans toutes les conditions de culture testées, que la composition des biofilms des non répondeurs et de la souche SC5314 est constituée de plus d'hyphes que celle des répondeurs.

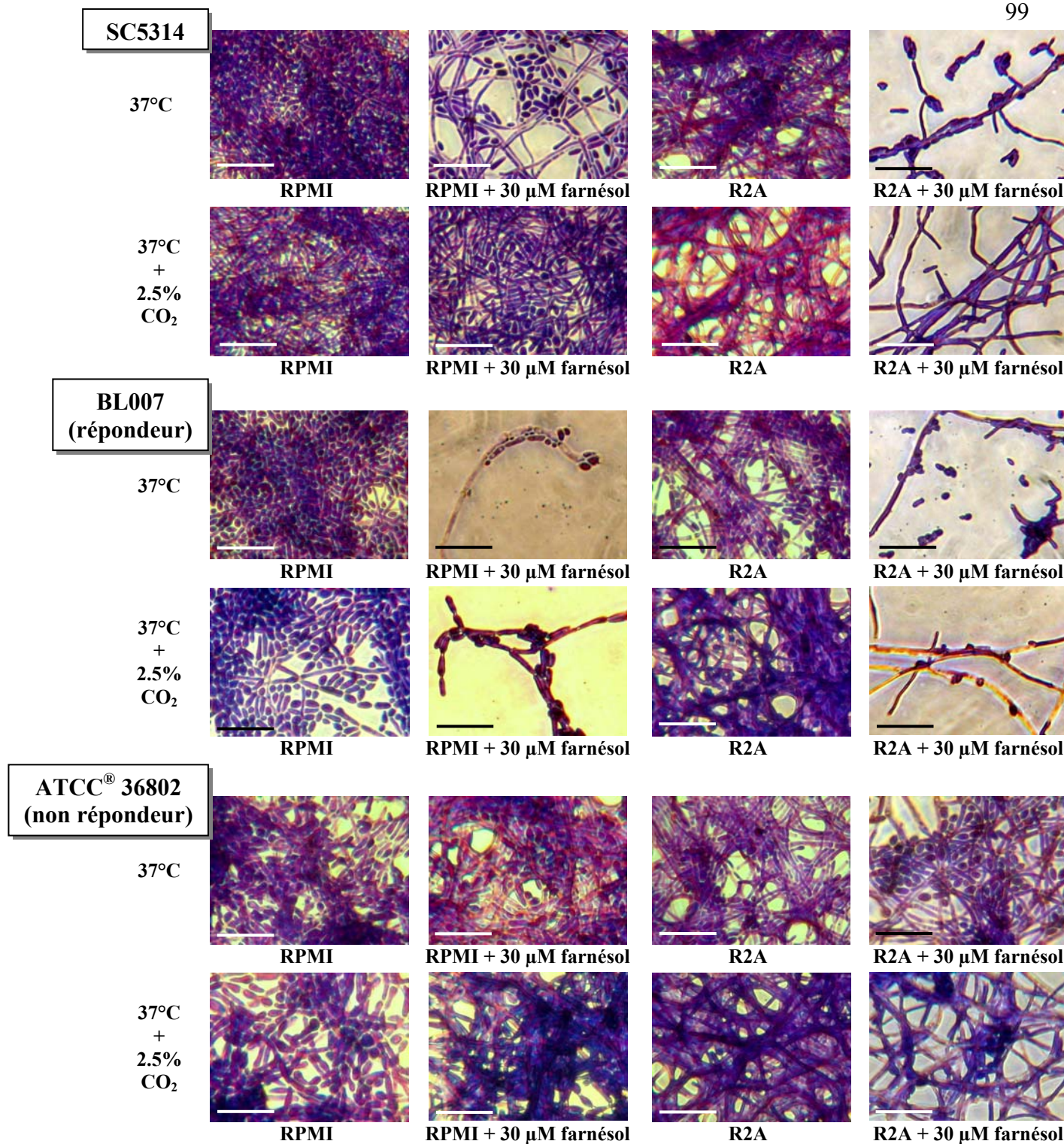


Figure 24 : Biofilms de la souche SC5314, des répondeurs (souche BL007) et des non répondeurs (souche ATCC® 36802) colorés au CV dans des plaques à 24 puits, après 24 heures d'incubation à 37°C en présence ou en absence de 2.5% CO₂, dans les milieux de culture RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 μM farnésol
 Vue en microscopie inversée (grossissement 40x; barre : 50 μm).

Les biofilms ont été aussi quantifiés par coloration au CV après 48 heures d'incubation dans les deux milieux de culture, à 37°C avec ou sans 2.5% CO₂. On remarque le même effet des conditions d'incubation sur la formation des biofilms de 48 heures qu'observé pour les biofilms de 24 heures (résultats non illustrés).

Effet du farnésol sur la formation de biofilm (Figures 23 et 24) : lorsque les levures sont incubées à 37°C en présence de 30 µM farnésol, les non répondeurs forment en moyenne 8.7 fois plus de biofilm ($P \leq 0.05$) que les répondeurs et la souche SC5314, dans les deux milieux de culture testés. On remarque que l'isoprénoïde inhibe presque complètement la formation de biofilm des répondeurs ainsi que celle de la souche SC5314, dans les deux milieux de culture à 37°C (94.5% inhibition en moyenne). Une diminution de la production de biofilm des non répondeurs a été aussi observée à 37°C dans R2A, cette inhibition étant par contre moins importante que celle remarquée pour les répondeurs et la souche SC5314 (52.9% inhibition en moyenne). Dans le milieu RPMI 1640 à 37°C, le farnésol n'a aucun effet significatif sur la formation de biofilm du non répondeur ATCC[®] 36802. Par contre, l'isoprénoïde stimule d'environ 4.0 fois la production de biofilm de HM1 dans RPMI 1640 à 37°C.

À 37°C en présence de 2.5% CO₂, les non répondeurs forment en moyenne 6.3 fois plus de biofilm ($P \leq 0.05$) dans le milieu R2A que les répondeurs et la souche SC5314 (Figure 23). Par contre, lorsqu'ils sont incubés à 37°C avec dioxyde de carbone dans RPMI 1640 en présence de farnésol, le non répondeur ATCC[®] 36802 ainsi que la souche SC5314 produisent en moyenne 12.7 fois plus de biofilm ($P \leq 0.05$) que les répondeurs et la souche HM1. De plus, le farnésol montre le même effet sur la formation de biofilm des répondeurs en présence de dioxyde de carbone qu'en son absence, soit une inhibition presque totale de la production de biofilm sur les deux milieux de culture (97.4% inhibition en moyenne). Les non répondeurs présentent également une diminution de la formation de biofilm dans R2A à 37°C avec 2.5% CO₂, cette inhibition étant de nouveau moins importante que celle observée pour les répondeurs dans les mêmes conditions de culture et aussi moins importante que celle remarquée en absence de dioxyde de carbone (35.7% inhibition en moyenne). L'isoprénoïde ne montre non plus un effet statistiquement significatif sur la production de biofilm d'ATCC[®] 36802

quand incubé dans RPMI 1640 à 37°C avec 2.5% CO₂. Cependant, le farnésol stimule de 1.6 fois la formation de biofilm d'HM1 dans RPMI 1640 à 37°C en présence de dioxyde de carbone, cette augmentation étant par contre moins importante que celle obtenue en absence de CO₂. En ce qui concerne la souche SC5314, l'ajout de 30 µM farnésol à 37°C avec 2.5% CO₂ diminue la formation de biofilm de 32.7% dans RPMI 1640 et de 74.4% dans R2A, ces diminutions étant moins importantes que celles observées en absence de dioxyde de carbone.

De plus, le farnésol produit le même effet sur la formation des biofilms de 48 heures que sur les biofilms de 24 heures, indépendamment des conditions d'incubation (résultats non illustrés).

En conclusion, seulement le milieu de culture R2A favorise la formation de biofilm de toutes les souches étudiées et uniquement à 37°C avec 2.5% CO₂ on observe une différence entre les souches au niveau de leur formation de biofilm en absence de farnésol: les non répondeurs ainsi que la souche SC5314 produisent environ 1.6 fois plus de biofilm que les répondeurs. L'ajout de dioxyde de carbone dans R2A diminue la formation de biofilm des répondeurs et des non répondeurs, mais n'a aucun effet sur la formation de biofilm de SC5314. En présence de farnésol, on remarque une inhibition de la formation de biofilm de toutes les souches dans R2A à 37°C avec ou sans 2.5% CO₂, cette diminution étant 2.2 fois plus importante pour les répondeurs et la souche SC5314 que pour les non répondeurs.

Comparaison des deux méthodes de quantification de biofilm (Figure 25) :

pour mieux quantifier les biofilms formés, en plus de la technique de coloration au CV qui mesure la biomasse des biofilms produits, on a utilisé aussi la méthode de réduction du XTT qui permet d'évaluer l'activité métabolique des cellules composant le biofilm (pour plus de détails voir section 3.1.7). La méthode de quantification des biofilms par réduction du XTT a été standardisée dans la littérature dans des plaques à 96 puits (Tellier *et al.*, 1992; Ramage *et al.*, 2001). Comme les biofilms analysés précédemment (Figures 23 et 24) ont été produits dans des plaques à 24 puits pour être en mesure de comparer la formation des biofilms des souches avec leurs profils de germination et leurs courbes de croissance, des nouveaux biofilms ont dû être produits dans des plaques à 96 puits (Figure 25).

Premièrement, on remarque que la biomasse de biofilms formés dans des plaques à 24 puits (Figure 23) est en moyenne 36.1% plus importante ($P \leq 0.05$) que celle des biofilms produits dans des plaques à 96 puits (Figure 25) et cela a été observé dans toutes les conditions de culture testées, en absence de farnésol (à l'exception de HM1 dans R2A à 37°C et de LAM1 dans R2A à 37°C avec 2.5% CO₂, qui ne montrent aucune différence dans la biomasse des biofilms produits dans les 2 types de plaques). De plus, l'effet du farnésol et des diverses conditions d'incubation sur la biomasse des biofilms est semblable pour les deux types de plaques, tout en sachant que l'inhibition de la formation de biofilm est environ 1.2 fois plus forte dans les plaques à 24 puits que dans les plaques à 96 puits. Par exemple, la biomasse des biofilms des non répondeurs formés dans une plaque à 24 puits est inhibée en moyenne de 35.7% suite à l'ajout du farnésol dans le milieu R2A, à 37°C en présence de dioxyde de carbone. Par contre, l'isoprénoïde ne montre aucun effet sur la biomasse des biofilms des non répondeurs produits dans des plaques à 96 puits, dans les mêmes conditions de culture.

37°C

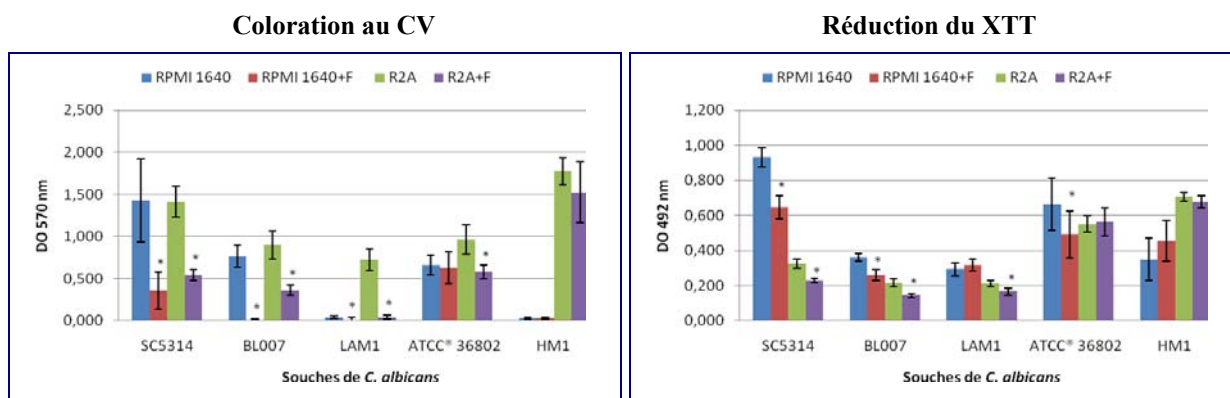
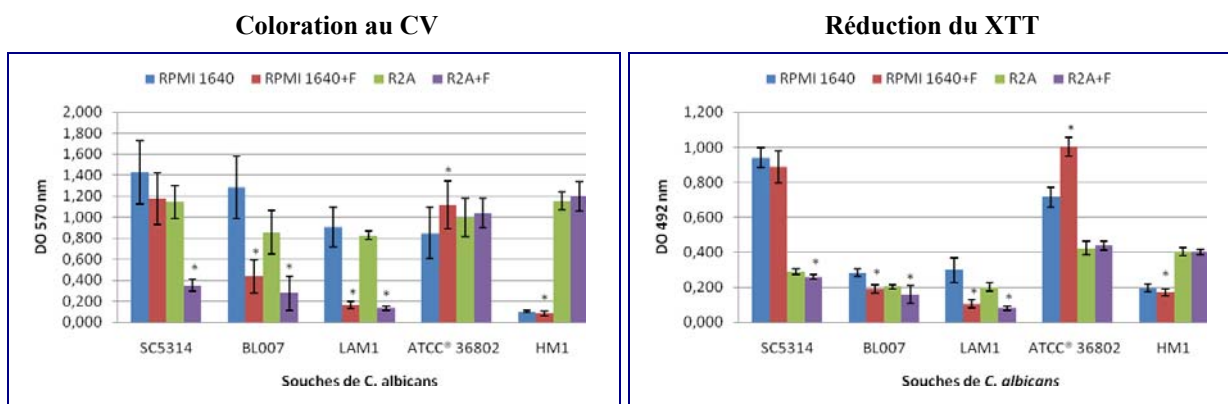
37°C avec 2.5% CO₂

Figure 25: Évaluation de la formation de biofilm des 5 souches de *C. albicans* étudiées, par coloration au CV et réduction du XTT

Les biofilms ont été formés dans des plaques à 96 puits et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence ou en absence de 2.5% CO₂, dans les milieux RPMI 1640 ou R2A, avec ou sans 30 µM farnésol (F). Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. Les écart-types sont illustrés. Les différences statistiquement significatives observées suite à l'ajout du farnésol, sont indiquées par un astérisque : * $P \leq 0.05$.

Deuxièmement, on n'observe pas de corrélation statistiquement significative entre la biomasse des biofilms et leur activité métabolique, indépendamment des conditions de culture, en absence de farnésol (Figure 25). En effet, même si les souches LAM1 et HM1 produisent une très faible quantité de biomasse de biofilm dans RPMI 1640 à 37°C, leur activité métabolique est comparable aux autres souches qui produisent une biomasse de biofilm plus importante dans les mêmes conditions. Par contre, on remarque que les biofilms des non répondeurs présentent une activité métabolique en moyenne 2.2 fois plus importante que celle des répondeurs et de la souche SC5314, lorsqu'ils sont incubés dans le milieu R2A à 37°C en présence ou en absence de CO₂. De plus, dans le milieu RPMI 1640 à 37°C avec ou sans dioxyde de carbone, l'activité métabolique des biofilms des répondeurs et de la souche HM1 est en moyenne 2.3 fois moins importante que celle d'ATCC[®] 36802, ainsi que 3.1 fois moins importante que celle de SC5314. On observe aussi que l'activité métabolique des biofilms de toutes les souches est toujours moins importante dans le milieu R2A que dans RPMI 1640 que ça soit à 37°C en présence ou en absence de 2.5% CO₂ (32.3% moins importante pour les répondeurs, 28.8% moins importante pour la souche ATCC[®] 36802 et 67.1% moins importante pour SC5314, $P \leq 0.05$). Toutefois, le biofilm du non répondeur HM1 fait exception car il montre une activité métabolique en moyenne 51.0% plus importante ($P \leq 0.05$) dans RPMI 1640 que R2A à 37°C avec ou sans CO₂. L'ajout du 2.5% CO₂ inhibe l'activité métabolique de tous les biofilms dans le milieu R2A, cette diminution étant en moyenne 7.9 fois plus importante pour les non répondeurs que les répondeurs et 2.6 fois plus importante pour la souche SC5314 que les répondeurs ($P \leq 0.05$). Dans le milieu RPMI 1640, la présence de dioxyde de carbone a seulement un effet sur l'activité métabolique des biofilms des souches BL007 et HM1, en l'inhibant de 21.3% dans le cas du répondeur BL007 et de 43.5% dans le cas du non répondeur HM1 ($P \leq 0.05$).

Lorsque les levures sont incubées en présence de 30 µM farnésol, l'activité métabolique des biofilms des non répondeurs est en moyenne 2.2 fois plus importante ($P \leq 0.05$) que celle des répondeurs et de la souche SC5314, dans R2A à 37°C avec ou sans 2.5% CO₂ (Figure 25). À 37°C dans le milieu RPMI 1640 en présence de farnésol, les biofilms des non répondeurs montrent de nouveau une activité métabolique 1.7 fois plus importante que celle des répondeurs, mais elle est 1.4 fois moins importante que celle de

la souche SC5314 ($P \leq 0.05$). Par contre, l'ajout de l'isoprénoïde dans le milieu RPMI 1640 à 37°C en présence de dioxyde de carbone conduit à une activité métabolique semblable pour les biofilms des répondeurs et du non répondeur HM1, qui est en moyenne 5.1 fois moins importante ($P \leq 0.05$) que celle observée pour le non répondeur ATCC® 36802 et la souche SC5314.

On observe une corrélation entre l'activité métabolique et la biomasse des biofilms produits dans les deux milieux de culture en présence de farnésol, à 37°C avec 2.5% CO₂ (Figure 25). Par contre, aucune corrélation n'a été notée à 37°C. En conséquence, la biomasse des biofilms des non répondeurs est en moyenne 4.4 fois plus importante ($P \leq 0.05$) que celle des répondeurs et de la souche SC5314 dans le milieu R2A, à 37°C en présence de dioxyde de carbone et de farnésol (la différence dans la biomasse des biofilms est 2 fois plus importante que celle observée au niveau de leur activité métabolique). Lorsque les levures sont incubées dans le milieu RPMI 1640 à 37°C avec 2.5% CO₂ et 30 µM farnésol, la biomasse des biofilms des répondeurs et du non répondeur HM1 est en moyenne 5.0 fois moins importante ($P \leq 0.05$) que celle du non répondeur ATCC® 36802 et de la souche SC5314 (même différence dans la biomasse des biofilms que celle observée au niveau de leur activité métabolique).

En ce qui concerne la réponse au farnésol, l'activité métabolique des biofilms des répondeurs et de la souche SC5314 est inhibée en moyenne de 29.4% suite à l'ajout de l'isoprénoïde dans le milieu R2A, à 37°C avec ou sans 2.5% CO₂ (Figure 25). Cependant, le farnésol ne montre aucun effet sur l'activité métabolique des biofilms des non répondeurs dans les mêmes conditions de culture. L'isoprénoïde diminue aussi d'environ 32.9% l'activité métabolique des biofilms des souches SC5314, BL007 et ATCC® 36802 dans le milieu RPMI 1640 à 37°C, mais il ne présente aucun effet sur l'activité métabolique des biofilms des autres souches dans les mêmes conditions d'incubation. À 37°C en présence de dioxyde de carbone dans le milieu RPMI 1640, l'ajout de farnésol inhibe aussi l'activité métabolique des biofilms des répondeurs ainsi que du non répondeur HM1, la diminution étant approximativement 4.0 fois plus importante dans le cas des répondeurs. Par contre, dans les mêmes conditions de culture, on observe une augmentation de 39.9% de l'activité métabolique du biofilm d'ATCC® 36802 suite à l'ajout du farnésol et aucun effet significatif n'est noté pour la souche

SC5314. De plus, pour toutes les souches et dans toutes les conditions d'incubation testées, on remarque une corrélation entre l'activité métabolique et la biomasse des biofilms au niveau de leur réponse au farnésol, excepté le biofilm du non répondeur ATCC[®] 36802 lorsqu'il est incubé à 37°C dans les deux milieux de culture. Toutefois, dans le cas des biofilms des répondeurs ainsi que de la souche SC5314, on observe toujours une inhibition 2.6 fois plus forte de la biomasse des biofilms que de leur activité métabolique, suivant l'apport de l'isoprénoïde. La réponse au farnésol est par contre identique pour les biofilms des non répondeurs, quand elle est mesurée par coloration au CV ou réduction du XTT.

En conclusion, une corrélation statistiquement significative a été observée entre l'activité métabolique (mesurée par réduction du XTT) et la biomasse des biofilms (mesurée par coloration au CV) seulement en présence de farnésol, indépendamment des conditions de culture. Ainsi, suite à l'ajout du farnésol dans R2A à 37°C avec ou sans 2.5% CO₂, on note une inhibition de l'activité métabolique des biofilms des répondeurs et de la souche SC5314 de 29.4% en moyenne et aucun effet sur l'activité métabolique des biofilms des non répondeurs. Le même effet du farnésol a été remarqué aussi au niveau de la biomasse des biofilms, l'inhibition étant 2.6 fois plus importante dans le cas de la biomasse. En absence de farnésol, on observe que l'activité métabolique mesurée des biofilms des non répondeurs est 2.2 fois plus importante que celle des répondeurs et de la souche SC5314 dans R2A avec ou sans 2.5% CO₂.

4.2. CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES SOUCHES

4.2.1. Recherche du récepteur nucléaire du farnésol

La technique de RT-PCR a été utilisée pour la recherche d'un récepteur nucléaire du farnésol chez le répondeur BL007. Les amorces dégénérées, créées à partir des séquences du récepteur FXR des mammifères, n'ont produit aucun amplicon dans les différentes conditions d'amplification testées (Figure 26 A, B et C). Par contre, le fragment du gène contrôle *EFBI* a été bien amplifié dans les mêmes conditions (Figure 26 D). Une bande de faible intensité d'environ 400 pb a été observée lors de l'amplification de l'ADNc de BL007 à une température d'hybridation de 60°C (Figure 26 A). Cependant, l'intensité de la bande obtenue a été trop faible pour réaliser un séquençage. De plus, cette bande pourrait être simplement un artéfact car une deuxième amplification par PCR de l'amplicon obtenu précédemment ne montre aucune bande sur gel d'agarose (Figure 26 B), même en présence d'une quantité plus importante d'enzyme *Taq* ADN Polymérase (Figure 26 C).

Une recherche a été aussi effectuée dans les génomes de *S. cerevisiae* et de *C. albicans* à l'aide de l'outil BLAST de NCBI, technique permettant d'identifier les régions similaires entre les séquences des nucléotides ou d'acides aminés. Aucune séquence similaire au récepteur du farnésol des mammifères (FXR) ou au récepteur d'ecdysone des insectes (EcR, homologue au FXR) n'a été trouvée dans les deux génomes des levures (résultats non illustrés).

En conclusion, le farnésol ne semble pas agir chez *C. albicans* via un récepteur nucléaire analogue au récepteur FXR des mammifères ou au récepteur EcR des insectes.

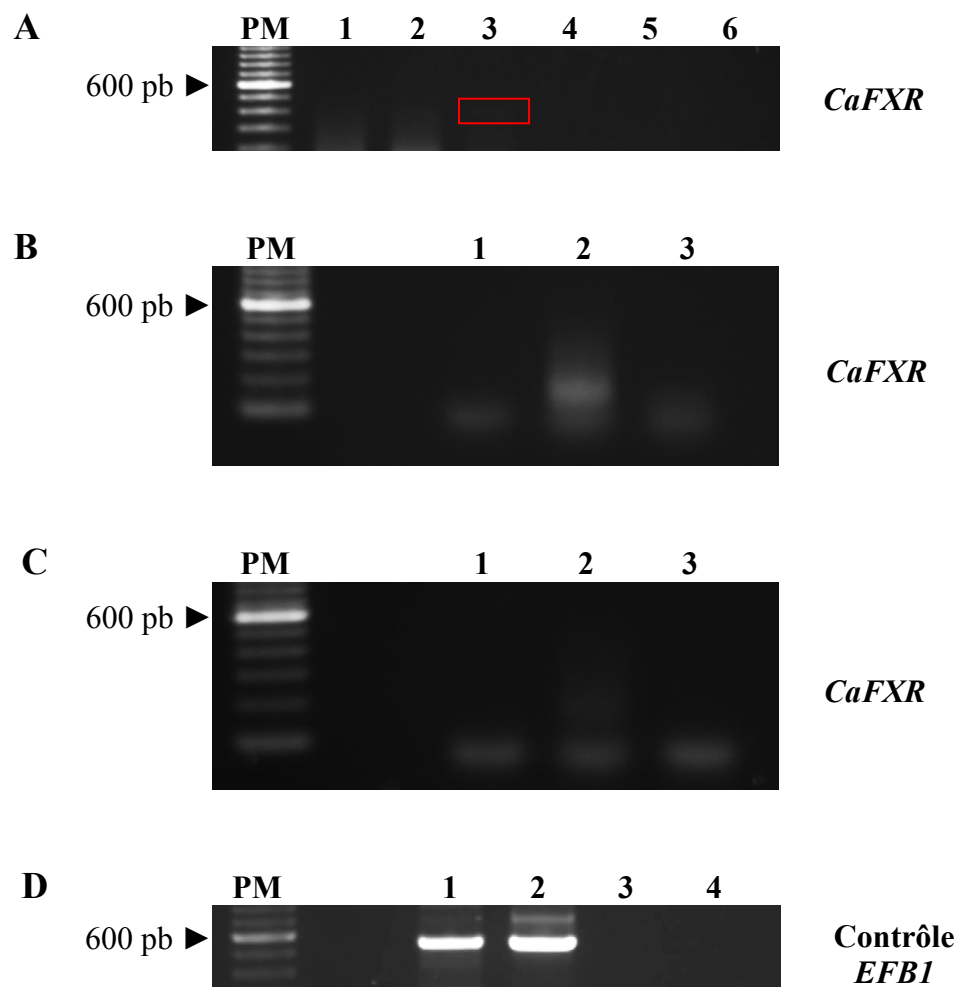


Figure 26: Recherche du récepteur nucléaire du farnésol chez le répondeur BL007 par RT-PCR

Gels d'agarose 1% des produits RT-PCR du gène hypothétique du récepteur du farnésol *CaFXR* (642 pb, A, B et C) et du gène contrôle *EFBI* (526 pb, D), obtenus après différentes conditions d'amplification : **A** – **1**) $T_m = 50^\circ\text{C}$, **2**) $T_m = 55^\circ\text{C}$, **3**) $T_m = 60^\circ\text{C}$ (rectangle rouge – bande de faible intensité d'environ 400 pb), **4**) Contrôle négatif $T_m = 50^\circ\text{C}$, **5**) Contrôle négatif $T_m = 55^\circ\text{C}$, **6**) Contrôle négatif $T_m = 60^\circ\text{C}$; **B** – **1**) PCR $T_m = 60^\circ\text{C}$ sur le produit PCR A3, **2**) Touchdown PCR 55-45°C, **3**) Contrôle négatif Touchdown PCR 55-45°C; **C** – Identique au B avec 60 unités/mL d'enzyme *Taq* ADN Polymérase; **D** – **1**) $T_m = 50^\circ\text{C}$, **2**) $T_m = 60^\circ\text{C}$, **3**) Contrôle négatif $T_m = 50^\circ\text{C}$, **4**) Contrôle négatif $T_m = 60^\circ\text{C}$. **PM** = Marqueur de poids moléculaire de 100 pb.

4.2.2. Évaluation du niveau d'expression des gènes *CHK1*, *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *RAM2* et *DPP3*

Quantification du niveau d'expression des gènes *CHK1*, *RAM2* et *DPP3*

(Figures 27, 28 et 29): l'évaluation semi-quantitative du niveau d'expression du gène *CHK1* par RT-PCR, gène codant pour une histidine kinase d'un système à deux composants impliqué potentiellement dans la voie de signalisation du farnésol, ne montre aucune différence statistiquement significative parmi les deux répondeurs, ainsi que parmi les deux non répondeurs (Figure 27). De plus, aucune différence n'a été observée entre les répondeurs et les non répondeurs au niveau de l'expression de ce gène, excepté pour le répondeur LAM1 qui montre une expression du *CHK1* 1.9 fois plus importante que le non répondeur HM1 ($P \leq 0.05$). En ce qui concerne la souche SC5314, on remarque que le niveau d'expression du gène *CHK1* est en moyenne 2.1 fois moins important que celui des répondeurs BL007 et LAM1 ainsi que du non répondeur ATCC[®] 36802 ($P \leq 0.05$). Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été notée entre la souche SC5314 et le non répondeur HM1 au niveau de l'expression du *CHK1*. Ainsi, la différence entre les répondeurs et les non répondeurs ne semble pas se retrouver au niveau de l'expression de l'histidine kinase Chk1.

Quand le niveau d'expression du gène *RAM2* a été quantifié chez les 5 souches étudiées, on remarque qu'il est exprimé au même niveau dans les répondeurs et les non répondeurs (Figure 28). Ce gène code pour la sous-unité α de la FTase, enzyme qui active par farnésylation la protéine Ras1, le maître régulateur la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe. Par contre, la souche SC5314 montre une expression du *RAM2* 2.2 fois moins importante que le répondeur BL007, ainsi que 1.7 fois moins importante en moyenne que le répondeur LAM1 et les non répondeurs ATCC[®] 36802 et HM1 ($P \leq 0.05$). En conclusion, le niveau d'expression de l'enzyme FTase ne semble pas expliquer non plus la différence dans la réponse au farnésol observée entre les répondeurs et les non répondeurs.

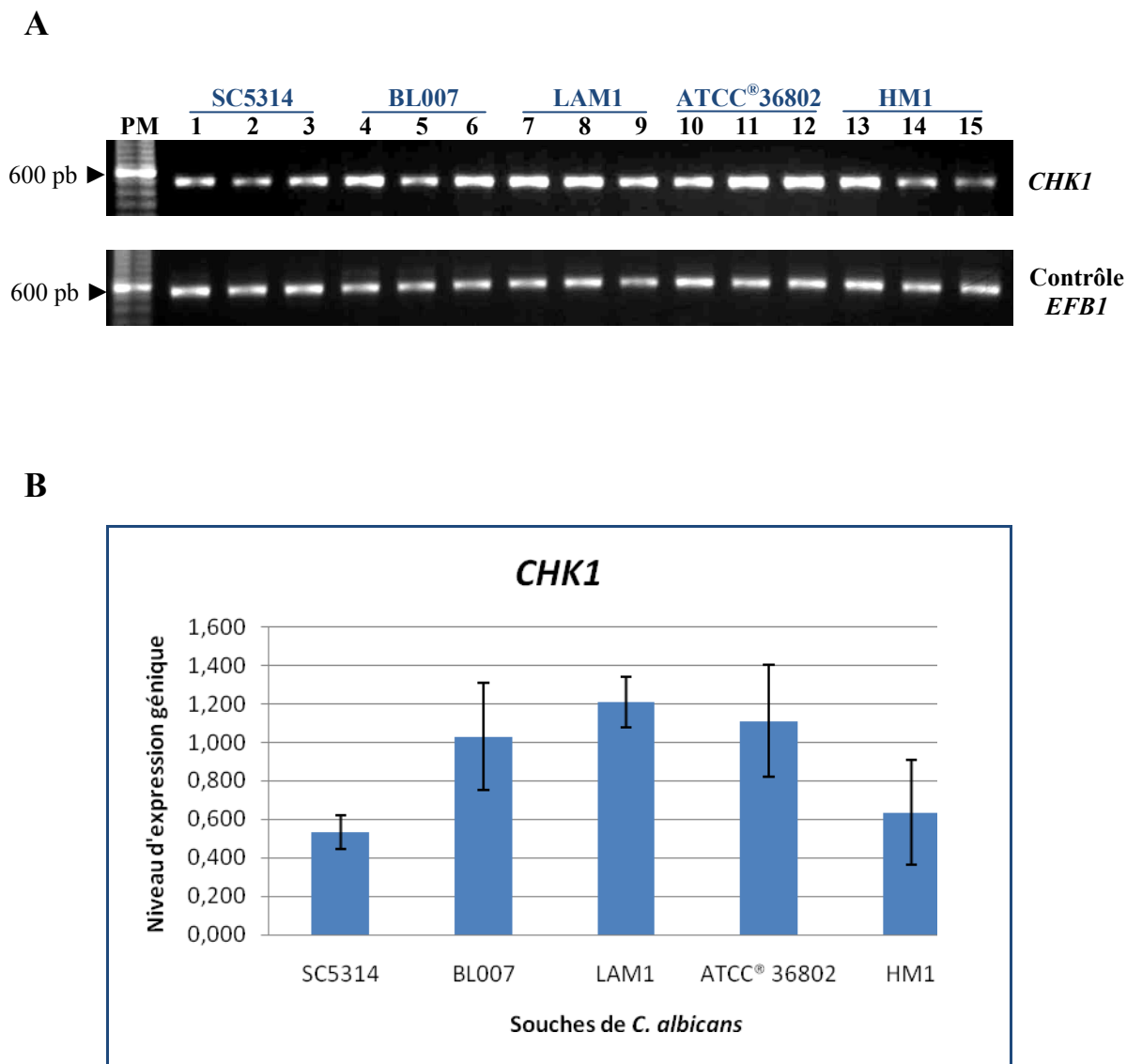


Figure 27: Quantification du niveau d'expression du gène *CHK1* chez les 5 souches de *C. albicans* étudiées

A – Gels d'agarose 1% des produits RT-PCR semi-quantitative du gène *CHK1* (506 pb) et du gène contrôle *EFB1* (526 pb) (3 expériences indépendantes). Les ARNs ont été extraits après 4 heures d'incubation dans RPMI 1640, à 37°C avec 2.5% CO₂, en absence de farnésol. **PM** = Marqueur de poids moléculaire de 100 pb; **B** – Niveau d'expression du gène *CHK1*, normalisé par rapport au gène contrôle. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes. Les écart-types sont illustrés.

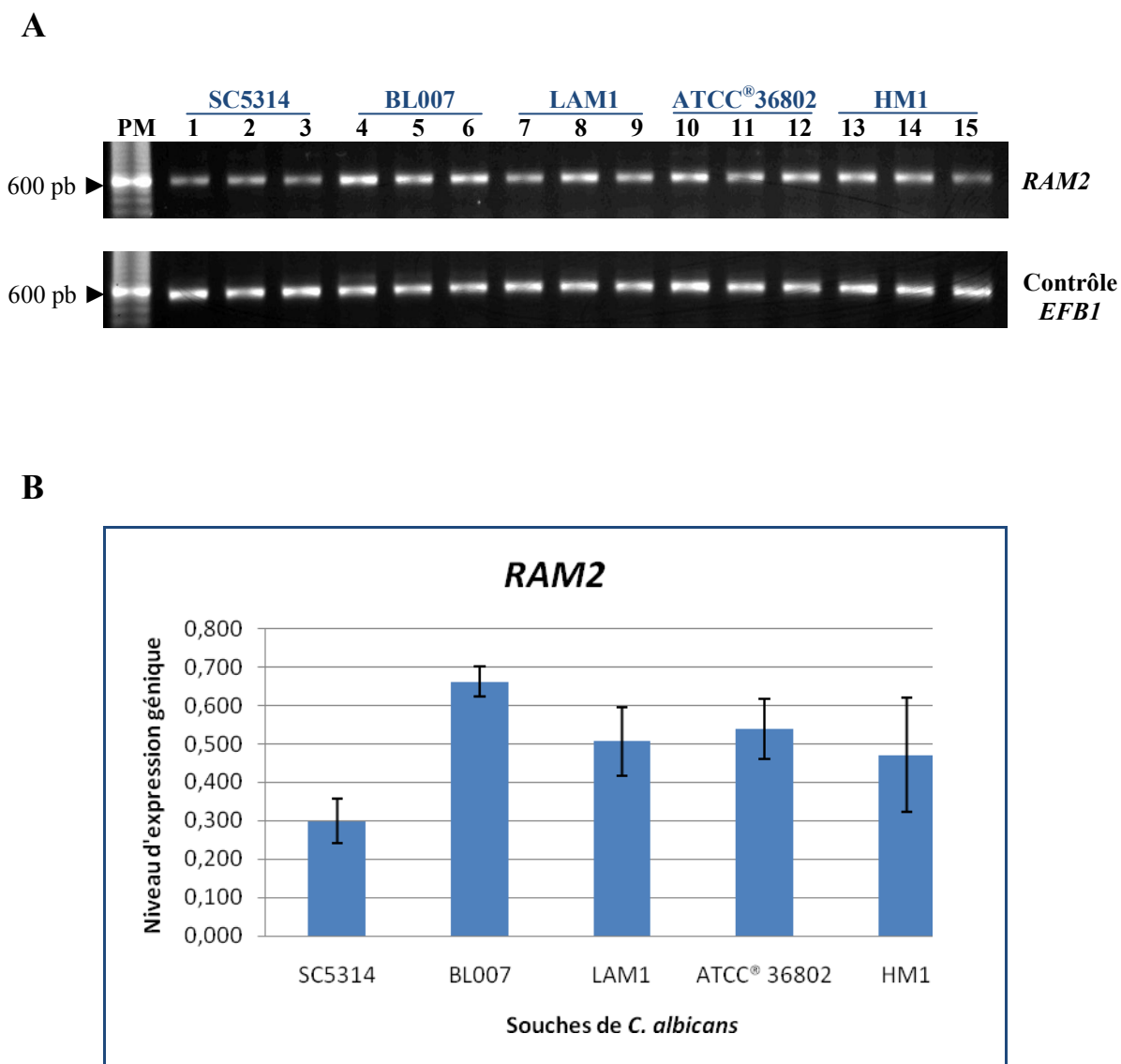


Figure 28: Quantification du niveau d'expression du gène *RAM2* chez les 5 souches de *C. albicans* étudiées

A – Gels d'agarose 1% des produits RT-PCR semi-quantitative du gène *RAM2* (632 pb) et du gène contrôle *EFB1* (526 pb) (3 expériences indépendantes). Les ARNs ont été extraits après 4 heures d'incubation dans RPMI 1640, à 37°C avec 2.5% CO₂, en absence de farnésol. **PM** = Marqueur de poids moléculaire de 100 pb; **B** – Niveau d'expression du gène *RAM2*, normalisé par rapport au gène contrôle. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes. Les écart-types sont illustrés.

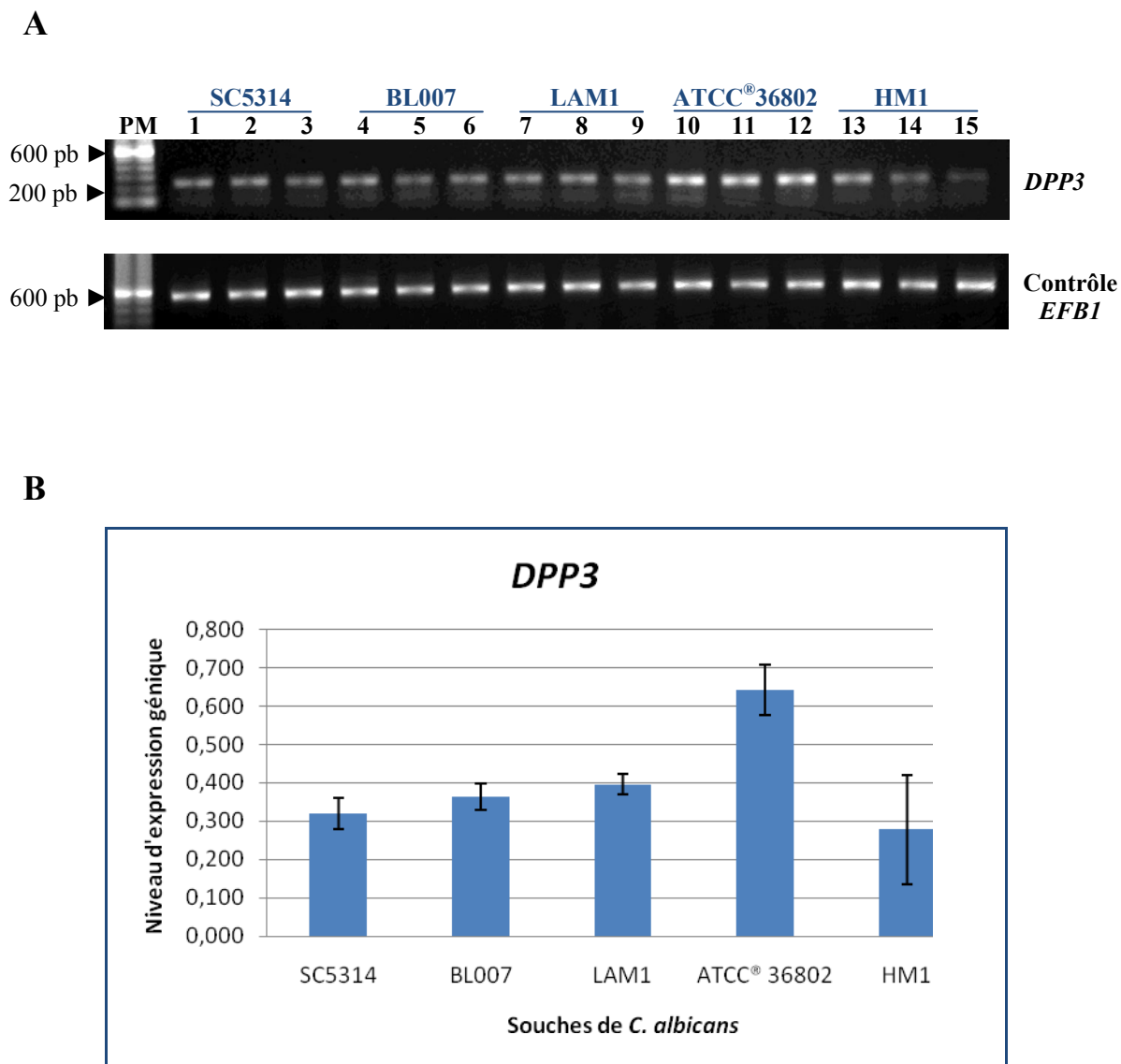


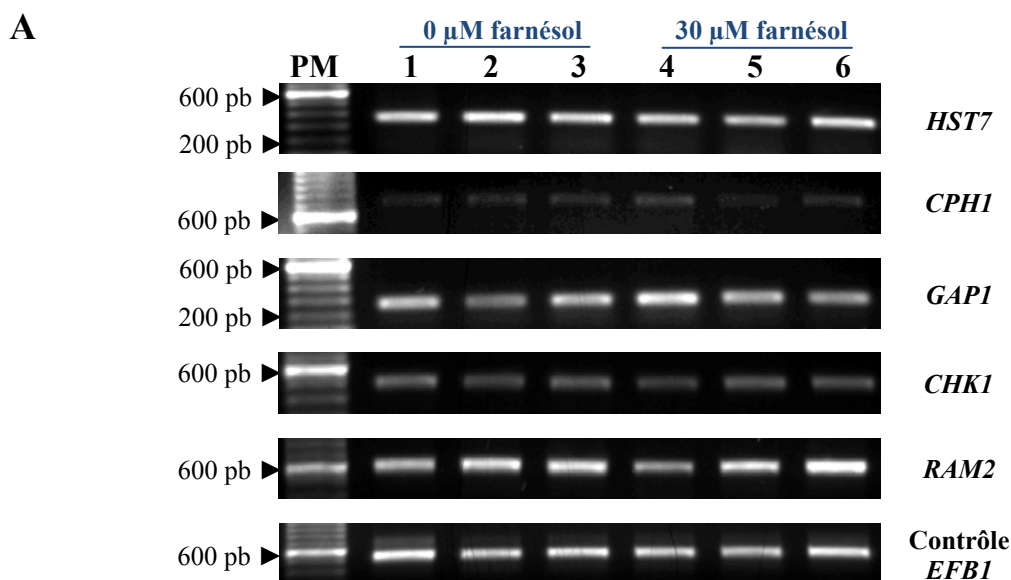
Figure 29: Quantification du niveau d'expression du gène *DPP3* chez les 5 souches de *C. albicans* étudiées

A – Gels d'agarose 1% des produits RT-PCR semi-quantitative du gène *DPP3* (243 pb) et du gène contrôle *EFBI* (526 pb) (3 expériences indépendantes). Les ARNs ont été extraits après 4 heures d'incubation dans RPMI 1640, à 37°C avec 2.5% CO₂, en absence de farnésol. **PM** = Marqueur de poids moléculaire de 100 pb; **B** – Niveau d'expression du gène *DPP3*, normalisé par rapport au gène contrôle. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes. Les écart-types sont illustrés.

En ce qui concerne la quantification du niveau d'expression du gène *DPP3*, impliqué dans la production de farnésol, on observe qu'il est surexprimé chez le non répondeur ATCC[®] 36802 (Figure 29). Son niveau d'expression est 1.7 fois plus important en moyenne chez ATCC[®] 36802 que chez les répondeurs BL007 et LAM1, ainsi que 2.1 fois plus important en moyenne que chez le non répondeur HM1 et la souche SC5314 ($P \leq 0.05$). Aucune autre différence n'a pas été remarquée parmi les levures étudiées au niveau de l'expression du gène *DPP3*. Ainsi, la différence entre les répondeurs et les non répondeurs ne s'explique pas par un déficit dans la production de farnésol. De plus, la synthèse de la molécule de *quorum sensing* varie parmi les deux non répondeurs.

Effet du farnésol sur le niveau d'expression des gènes *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *CHK1* et *RAM2* (Figures 30 et 31): le farnésol semble réguler la germination en inhibant la voie des MAPKs. Cependant, l'ajout de 30 μ M farnésol dans le milieu de culture RPMI 1640 à 37°C avec 2.5% CO₂ ne montre aucun effet statistiquement significatif sur le niveau d'expression des gènes de la voie des MAPKs (*HST7*, *CPH1* et *GAP1*), autant pour le répondeur BL007 (Figure 30) que pour le non répondeur ATCC[®] 36802 (Figure 31). De plus, l'isoprénoïde ne présente aucun effet non plus sur le niveau d'expression de l'histidine kinase Chk1 ou de l'enzyme FTase chez les souches BL007 et ATCC[®] 36802, deux protéines potentiellement impliquées dans la voie de signalisation du farnésol.

En conclusion, aucune différence significative n'a pas été notée entre les répondeurs et les non répondeurs au niveau de l'expression des gènes *CHK1* et *RAM2*. Cependant, la souche SC5314 montre une sous-expression significative de ces gènes. En ce qui concerne le gène *DPP3*, impliqué dans la production de farnésol, il est surexprimé significativement chez le non répondeur ATCC[®] 36802. L'ajout de 30 μ M farnésol n'a aucun effet sur le niveau d'expression des gènes *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *CHK1* et *RAM2*, ainsi pour les répondeurs que pour les non répondeurs.



B

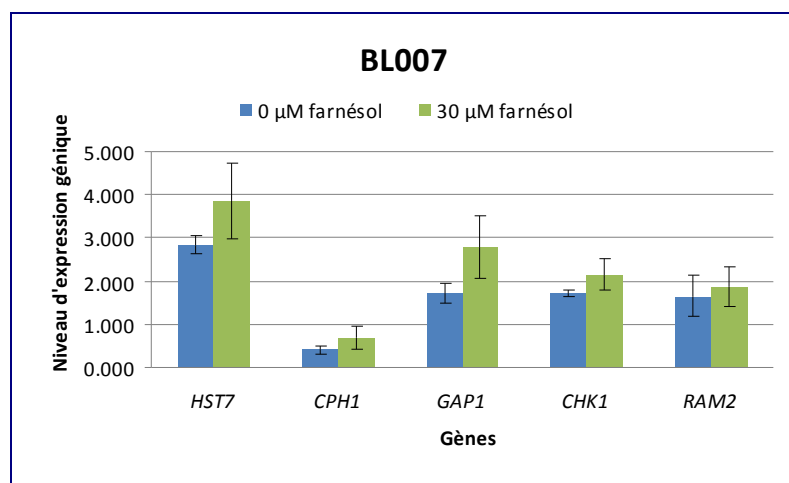


Figure 30: Influence du farnésol sur le niveau d'expression des gènes *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *CHK1* et *RAM2* chez le répondeur BL007

A – Gels d'agarose 1% des produits RT-PCR semi-quantitative des gènes *HST7* (374 pb), *CPH1* (736 pb), *GAP1* (272 pb), *CHK1* (506 pb), *RAM2* (632 pb) et du gène contrôle *EFB1* (526 pb) chez la souche BL007 (3 expériences indépendantes). Les ARNs ont été extraits après 4 heures d'incubation dans RPMI 1640, à 37°C avec 2.5% CO₂, en présence ou en absence de 30 μM farnésol. **PM** = Marqueur de poids moléculaire de 100 pb; **B** – Niveaux d'expression des 5 gènes étudiées, normalisés par rapport au gène contrôle. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes. Les écart-types sont illustrés.

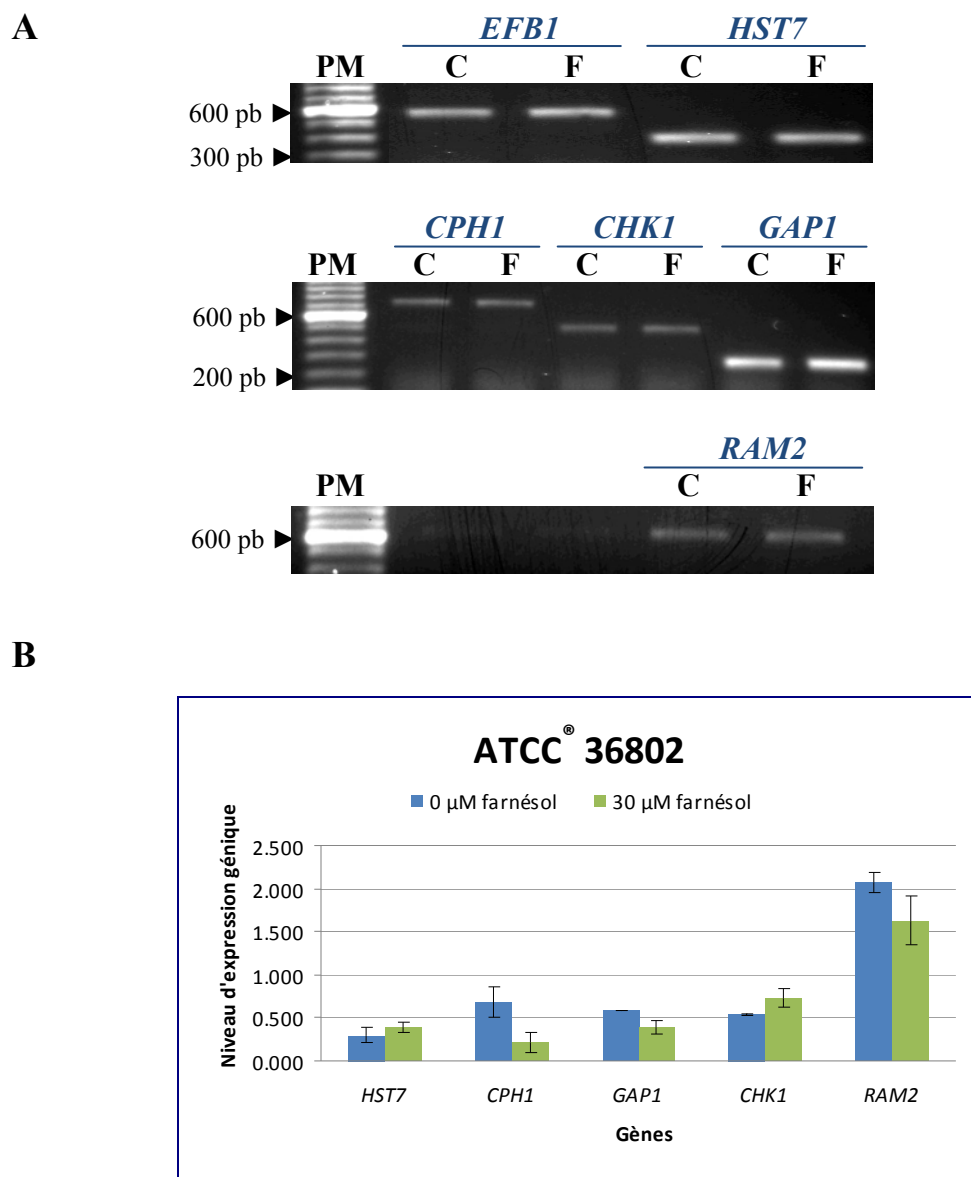


Figure 31: Influence du farnésol sur le niveau d'expression des gènes *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *CHK1* et *RAM2* chez le non répondeur ATCC® 36802

A – Gels d'agarose 1% des produits RT-PCR semi-quantitative des gènes *HST7* (374 pb), *CPH1* (736 pb), *GAP1* (272 pb), *CHK1* (506 pb), *RAM2* (632 pb) et du gène contrôle *EFB1* (526 pb) chez la souche ATCC® 36802. Les ARNs ont été extraits après 4 heures d'incubation dans RPMI 1640, à 37°C avec 2.5% CO₂, en présence (F) ou en absence (C) de 30 μM farnésol. **PM** = Marqueur de poids moléculaire de 100 pb; **B** – Niveaux d'expression des 5 gènes étudiés, normalisés par rapport au gène contrôle. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes. Les écart-types sont illustrés.

Une partie des résultats décrits dans ce mémoire a été présentée dans plusieurs conférences internationales (voir détails des affiches présentées dans les **Annexes III, IV et V**).

Un article-note a été aussi rédigé dans le cadre de ce projet de maîtrise, en vue de publication dans la revue *Canadian Journal of Microbiology* (voir texte intégral de l'article dans l'**Annexe VI**).

Chapitre 5. DISCUSSION

C. albicans, le pathogène fongique le plus commun chez l'humain, est responsable d'une grande variété d'infections, des plus superficielles, tel que les candidoses orales ou mucocutanées, jusqu'au plus profondes, comme les candidoses systémiques qui sont souvent mortelles (Segal, 2005). Plusieurs formes de candidose résultent de l'attachement de la levure opportuniste aux tissus de l'hôte ou à des implants artificiels, conduisant à la formation des biofilms (Ramage *et al.*, 2009). Ce mode de croissance sessile confère aux cellules une résistance accrue aux thérapies antifongiques et au système immunitaire de l'hôte, entraînant en conséquence une augmentation considérable de l'incidence des candidémies (Perlroth *et al.*, 2007).

Le farnésol, molécule de *quorum sensing* chez *C. albicans*, régule une multitude de processus cellulaires impliqués dans la pathogénicité et la survie de la levure chez l'hôte. Par contre, son mode d'action n'est pas entièrement élucidé (Kruppa, 2009). Une étude réalisée préalablement dans notre laboratoire a permis d'identifier 2 souches de *C. albicans* non répondeurs au farnésol (Desmeules, 2004). Le présent projet de recherche avait pour but de caractériser les isolats cliniques de *C. albicans* non répondeurs au farnésol en vue de mieux comprendre le mécanisme d'action de cet isoprénoïde.

5.1. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES SOUCHES ET FORMATION DE BIOFILM

L'étude réalisée précédemment dans notre laboratoire décrit le phénotype colonial sur milieu solide et la formation de biofilm des non répondeurs dans des conditions de culture spécifiques : milieu de culture R2A, 37°C, 2.5% CO₂ (Desmeules, 2004). Pour débiter ce projet de recherche, nous avons tout d'abord regardé si l'absence de la réponse au farnésol se manifeste aussi en dehors de ces conditions de culture précises. Nous avons évalué l'effet du farnésol au niveau de la morphologie coloniale, ainsi que de la germination, de la croissance et de la formation de biofilm.

Lorsque les levures ont été incubées à température ambiante, toutes les souches croissent sous forme des colonies lisses, elles forment uniquement des blastospores et possèdent un profil de croissance semblable. De plus, aucune production de biofilm n'a été notée à cette température d'incubation. Ainsi, on ne peut pas différencier les répondeurs des non répondeurs à la température de la pièce. Les résultats obtenus sont en concordance avec les données de la littérature, une température d'incubation supérieure à 35°C étant nécessaire pour la germination (Odds, 1988; Biswas *et al.*, 2007).

5.1.1. Évaluation de la morphologie coloniale et du profil de germination

Indépendamment des conditions de culture testées, nous avons observé que les non répondeurs gardent toujours un profil de germination constant de 80 à 100% hyphes en absence de farnésol, tandis que les répondeurs germent au cours des 4 premières heures et par la suite leur développement hyphal diminue graduellement dans le temps jusqu'à 1-5% formes filamenteuses à 37°C, et jusqu'à 40-50% formes filamenteuses à 37°C avec 2.5% CO₂. Pour les non répondeurs aucun ralentissement de la transition morphologique n'a été remarqué. Les mêmes résultats ont été obtenus aussi au niveau de la morphologie coloniale. Notamment, après 48 heures d'incubation, les souches qui

possèdent un profil de germination formé presque exclusivement de blastospores forment des colonies lisses, tandis que les levures qui montrent un profil de germination constitué des formes filamenteuses croissent sous forme des colonies chevelues. En effet, la concentration extracellulaire en farnésol augmente proportionnellement avec l'augmentation de la densité cellulaire. Lorsqu'un seuil critique de farnésol est détecté (après environ 4 heures d'incubation), les levures déclenchent une voie de signalisation qui inhibe la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe (Hornby *et al.*, 2001). Cependant, cette voie de signalisation semble déficiente chez les non répondeurs.

Effet du dioxyde de carbone sur la morphologie coloniale et le profil de germination : les répondeurs forment des colonies lisses en absence de dioxyde de carbone, tandis qu'en présence de 2.5% CO₂ ils produisent des colonies chevelues. Par contre, les non répondeurs forment des colonies chevelues avec et sans CO₂. De plus, la présence de dioxyde de carbone favorise aussi la germination en culture liquide. Les études précédentes ont montré en effet qu'un ratio CO₂ : O₂ supérieur à 2 : 1 est nécessaire pour le développement des hyphes chez *C. albicans* (Odds, 1988; Biswas *et al.*, 2007). La littérature rapporte qu'aucune germination n'est observée lorsque le dioxyde de carbone est ajouté à la température ambiante (Mock *et al.*, 1990). Pour réaliser son action, le dioxyde de carbone doit être présent tout au long de la période de germination car son rôle ne se limite pas uniquement au déclenchement de la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe (Mock *et al.*, 1990).

La formation des colonies chevelues par les non répondeurs à 37°C, même en absence de CO₂, pourrait être expliqué par l'existence chez ces souches d'une ou des altérations au niveau des voies de signalisation associées au dioxyde de carbone. En présence des niveaux élevés de CO₂ la voie de l'AMPC est activée par stimulation de l'adénylate cyclase Cdc35, qui induit la transition morphologique de levure à hyphe (Klengel *et al.*, 2005; Bahn & Muhlschlegel, 2006). Chez les non répondeurs, la voie de l'AMPC pourrait être par exemple surexprimée et ainsi la germination serait induite même en absence du dioxyde de carbone. D'après ces résultats, on pourrait penser aussi que les non répondeurs sont des souches constitutivement filamenteuses. Cette

hypothèse peut être par contre rejetée car les non répondeurs sont capables de produire des blastospores et des colonies lisses lorsqu'ils sont incubés à température de la pièce, ainsi que dans les milieux de pré-culture YPD et SD.

Effet du dextrose sur la morphologie coloniale et le profil de germination :

nous avons démontré que la réponse au farnésol est modifiée pour les répondeurs à des concentrations de dextrose de 0.50% ou plus, tandis que pour les non répondeurs cette modification s'observe à des concentrations de 1% ou plus. L'ajout du sucre conduit à la formation des colonies lisses et ainsi la réponse au farnésol ne peut plus être évaluée. La concentration de glucose dans le milieu de culture est un paramètre important pour la germination. Mykola M. Maidan et ses collègues ont montré qu'en présence de 2% dextrose *C. albicans* produit des colonies lisses, tandis qu'à 0.1% dextrose les colonies sont chevelues (Maidan *et al.*, 2005). De fortes concentrations de dextrose inhibent le récepteur Gpr1 couplé à la protéine G, qui à son tour réprime l'adénylate cyclase Cdc35 et la voie de l'AMPc, réprimant la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe (Maidan *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2007). En conséquence, les non répondeurs pourraient surexprimer des récepteurs de la voie de l'AMPc car une concentration en dextrose 2 fois plus importante est nécessaire pour inhiber leur germination, comparativement aux répondeurs. De plus, cette hypothèse est en accord avec l'effet du dioxyde de carbone sur la morphologie coloniale et le profil de germination des non répondeurs.

Effet du milieu de culture sur la morphologie coloniale et le profil de germination : les répondeurs forment plus de colonies chevelues dans le milieu R2A que dans RPMI 1640 (39.0% plus des colonies chevelues pour BL007 et 71.2% plus pour LAM1). Le répondeur BL007 germe aussi environ 28.6% plus dans le milieu R2A que RPMI 1640 à 37°C, tandis que LAM1 germe 66.7% plus. Le milieu de culture R2A est un milieu pauvre en nutriments, utilisé généralement pour la culture des bactéries retrouvées en milieu aquatique (Reasoner & Geldreich, 1985). Il contient seulement 0.05% dextrose. En ce qui concerne RPMI 1640, c'est un milieu de culture défini, communément utilisé pour la croissance et la caractérisation de la levure (Ramage *et al.*,

2002a; Sato *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2005). Il contient 0.2% dextrose. Ainsi, la faible concentration en sucre du milieu R2A peut expliquer nos résultats. De plus, il a été démontré qu'une carence en nutriments induit la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe en stimulant la protéine Ras1, le maître régulateur de la transition morphologique (Calderone *et al.*, 2000; Biswas *et al.*, 2007), ce qui pourrait expliquer aussi nos résultats, étant donné que R2A est un milieu pauvre en nutriments.

Effet du farnésol sur la morphologie coloniale et le profil de germination :

sur milieu solide on peut observer l'action du farnésol seulement à 37°C avec 2.5% CO₂. car toutes les souches forment des colonies chevelues dans ces conditions. Dans les deux milieux de culture testés, R2A et RPMI 1640, l'isoprénoïde inhibe complètement le phénotype chevelu des répondeurs et n'a aucun effet sur le phénotype des non répondeurs. De plus, l'ajout du farnésol exogène au temps zéro inhibe complètement la filamentation des répondeurs mais n'a aucun effet sur la germination des non répondeurs, dans toutes les conditions d'incubation expérimentées. L'absence de réponse au farnésol chez les non répondeurs pourrait être expliqué par plusieurs hypothèses : l'absence d'un récepteur du farnésol, une déficience au niveau de la voie de signalisation de l'isoprénoïde ou tout simplement la présence des mutations dans la voie de signalisation de la transition morphologique, qui domine la réponse au farnésol (Jensen *et al.*, 2006). Il se pourrait aussi que les non répondeurs présentent un déficit dans la voie de synthèse du farnésol ou que l'isoprénoïde produit par ces souches soit rapidement dégradé ou utilisé dans une autre voie de signalisation (Jensen *et al.*, 2006).

5.1.2. Évaluation de la formation de biofilm

Effet du milieu de culture sur la formation de biofilm: toutes les souches étudiées sont en mesure de former des biofilms mais seulement dans le milieu de culture R2A. Les souches LAM1 et HM1 produisent de faibles quantités de biofilm dans RPMI 1640. De plus, tous les biofilms sont composés presque exclusivement de formes filamenteuses dans le milieu R2A, tandis que dans RPMI 1640 ils sont constitués d'un

mélange d'hyphes et des blastospores. Cela peut être expliqué par la faible teneur en nutriments du milieu R2A qui provoque la germination chez *C. albicans*, étape cruciale dans la formation de biofilm (Biswas *et al.*, 2007; ten Cate *et al.*, 2009). Ainsi, le milieu de culture R2A est le milieu de culture de choix pour l'étude de la formation de biofilm des souches de *C. albicans*.

Tel qu'observé précédemment dans notre laboratoire (Desmeules, 2004; Ross, 2009), le présent projet de recherche confirme que les non répondeurs forment environ 1.6 fois plus de biofilm que les répondeurs. Cependant, ce résultat a été noté seulement dans R2A à 37°C avec 2.5% CO₂. En absence de dioxyde de carbone, on ne remarque pas de différence significative entre la formation de biofilm des répondeurs et de non répondeurs, à l'exception de la souche LAM1 qui produit 2 fois moins de biofilm que les autres levures. La présence des hyphes est nécessaire pour le développement de biofilm (Ramage *et al.*, 2002b; Stoodley *et al.*, 2002; Douglas, 2003) et une germination importante semble augmenter la formation de biofilm (Swindell *et al.*, 2009). En effet, LAM1 présente une capacité de germination moins importante que le répondeur BL007 : elle forme 100% colonies lisses sur R2A à 37°C, tandis que BL007 produit 39% colonies chevelues dans les mêmes conditions d'incubation.

Le fait que les non répondeurs forment plus de biofilm que les répondeurs dans R2A à 37°C avec 2.5% CO₂ pourrait être expliqué par la germination plus importante de ces souches. Notamment, nous avons remarqué que la composition des biofilms des non répondeurs est constituée de plus d'hyphes que celle des répondeurs dans toutes les conditions de culture testées. Par contre, même si les répondeurs forment presque uniquement des blastospores après 24 heures d'incubation à 37°C, ils sont quand même en mesure de produire des quantités significatives de biofilm, confirmant ainsi que la présence d'une forme morphologique particulière (blastospore ou hyphe) n'est pas strictement nécessaire à la formation des biofilms de *C. albicans* (Baillie & Douglas, 1999).

Effet du dioxyde de carbone sur la formation de biofilm: l'ajout de dioxyde de carbone permet de différencier les répondeurs des non répondeurs au niveau de leur formation de biofilm. Cette condition de culture est plus adéquate pour la comparaison

de la production des biofilms entre les levures étudiées, car toutes les souches croissent sous forme de colonies chevelues lorsqu'elles sont incubées à 37°C avec 2.5% CO₂. En présence du dioxyde de carbone tous les biofilms sont constitués de plus de formes filamenteuses qu'en son absence, étant donné que le CO₂ stimule la transition morphologie de la forme levure à la forme hyphe (Bahn & Muhlschlegel, 2006). De plus, on note que dans le milieu R2A l'apport de dioxyde de carbone diminue la formation de biofilm des répondeurs et des non répondeurs (inhibition de 43.5% pour le répondeur BL007, 18.7% pour le répondeur LAM1 et 27.1% pour les non répondeurs). Une diminution de la formation de biofilm de *C. albicans* d'environ 25% a été aussi décrite récemment par C. Stichernoth et J. F. Ernst suivant l'ajout de 6% CO₂ à 37°C (Stichernoth & Ernst, 2009). En conséquence, la formation de biofilm est sensible au niveau de dioxyde de carbone environnemental. Par contre, le mécanisme par lequel le CO₂ influence la production de biofilm chez *C. albicans* n'a pas été encore compris à l'heure actuelle (Stichernoth & Ernst, 2009).

Effet du farnésol sur la formation de biofilm: l'action du farnésol sur la production de biofilm peut être observée uniquement dans le milieu de culture R2A où toutes les souches sont capables de former des biofilms. En présence de farnésol, on remarque une inhibition de la production de biofilm des levures à 37°C avec ou sans CO₂, cette diminution étant 2.2 fois plus importante pour les répondeurs que pour les non répondeurs. Une corrélation statistiquement significative a été observée entre l'activité métabolique et la biomasse des biofilms en présence de farnésol. Ainsi, suite à l'ajout du farnésol dans R2A à 37°C avec ou sans CO₂, on note une inhibition de l'activité métabolique des biofilms des répondeurs de 29.4% en moyenne et aucun effet sur l'activité métabolique des biofilms des non répondeurs.

Une des fonctions du farnésol chez *C. albicans* est d'inhiber le développement des hyphes, une étape essentielle à la formation du biofilm (Blankenship & Mitchell, 2006; Nickerson *et al.*, 2006). Nos résultats démontrent bien ce phénomène, tel que décrit aussi précédemment dans notre laboratoire (Ross, 2009). Chez les non répondeurs il y a bien une action du farnésol mais à un faible niveau, résultant probablement du fait que ces souches forment plus d'hyphes et plus de biofilm. Une autre hypothèse pourrait

être aussi que les non répondeurs présentent un retard dans la réponse au farnésol, qui pourra être par exemple rétabli en augmentant la concentration de farnésol exogène.

Comparaison des deux méthodes de quantification de biofilm: la quantité de biofilm produite a été évaluée par deux techniques différentes : coloration au CV et réduction du XTT. La technique de coloration au CV mesure la quantité de biomasse à l'intérieur du biofilm. L'utilisation du CV a été décrite pour la première fois par Gordon D. Christensen (Christensen *et al.*, 1985). Ce colorant lie les molécules extracellulaires chargées négativement, tel que les molécules de la surface cellulaire ou les polysaccharides de la matrice exopolymérique des biofilms (Li *et al.*, 2003). Cette technique, simple et peu coûteuse, est utilisée couramment pour la quantification des biofilms des divers microorganismes. Cependant, une de ses faiblesses est qu'il nous est impossible d'évaluer la viabilité des cellules à l'intérieur du biofilm. En effet, ce colorant teint la paroi des cellules en ne discriminant pas les cellules vivantes des cellules mortes (Peeters *et al.*, 2008). La deuxième technique utilisée mesure l'activité métabolique des cellules composant le biofilm par réduction du XTT (Tellier *et al.*, 1992; Ramage *et al.*, 2001). Par contre cette méthode présente aussi des limitations : il n'y a pas forcément une relation linéaire entre le nombre des cellules et le changement colorimétrique, différentes souches possèdent des capacités métaboliques différentes ce qui rend la comparaison inter-souche plus difficile, le formazan pourrait rester emprisonné dans les cellules chez certaines souches et échapper ainsi à la quantification (Kuhn *et al.*, 2003).

La comparaison des deux méthodes de quantification des biofilms ne montre aucune corrélation statistiquement significative entre l'activité métabolique et la biomasse des biofilms en absence de farnésol, contrairement aux données obtenues avec farnésol et ce que cite la littérature (Li *et al.*, 2003). Le manque de corrélation entre les deux méthodes de quantification des biofilms pourrait être expliqué par la saturation de la courbe de détection de la réduction du XTT à une concentration cellulaire de 10^5 cellules/mL (Kuhn *et al.*, 2003; Honraet *et al.*, 2005). La limite inférieure de détection de cette méthode n'est pas très basse (10^5 cellules/mL), ce qui laisse des lacunes concernant l'effet du farnésol en deçà de cette limite. Une autre raison pourrait être

l'épaisseur différente de la couche basale des biofilms, étant donnée que cette couche est responsable de la presque totalité de réduction du XTT (Kuhn *et al.*, 2002). De plus, sous forme de biofilm les souches peuvent démontrer un métabolisme différent, résultant en une diminution de la respiration cellulaire. Une autre explication pourrait être aussi la quantité de la matrice exopolymérique, vu qu'elle est colorée par le CV, mais elle n'est pas mesurée par la réduction du XTT (Kuhn *et al.*, 2002). Pour mieux quantifier les biofilms de *C. albicans* on pourra envisager d'autres méthodes plus précises : mesure du poids sec des biofilms ou des tests fluorogéniques (SYTO[®] 9, diacétate de fluorésceine ou résazurin) (Kuhn *et al.*, 2002; Honraet *et al.*, 2005; Peeters *et al.*, 2008).

5.1.3. Évaluation de la croissance

Dans le milieu de culture RPMI 1640 uniquement on remarque une différence entre les souches au niveau de leur croissance, en absence de farnésol: les répondeurs croissent en moyenne 2 fois plus vite que les non répondeurs. La faible prolifération des non répondeurs pourrait s'expliquer par le fait que ces souches utilisent plus d'énergie à germer qu'à se multiplier. De plus, nous avons aussi observé que le milieu défini RPMI 1640 est généralement plus propice à la croissance des levures que le milieu R2A, qui est pauvre en nutriments. L'ajout de 2.5% CO₂ ralentit la croissance de toutes les souches dans le milieu RPMI 1640, ce qui pourrait aussi être conséquent au fait que les levures semblent dépenser plus d'énergie pour la germination que la prolifération. En effet, le dioxyde de carbone, ainsi que la carence en nutriments du milieu de culture R2A, sont connus pour stimuler la filamentation.

Tel que décrit précédemment dans la littérature (Uppuluri *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2010), nous avons démontré que le farnésol inhibe la croissance de toutes les souches étudiées, la diminution observée étant 1.5 fois plus importante pour les répondeurs que pour les non répondeurs. Des études récentes ont montré que la croissance de la levure semble être inhibée en présence de 40 µM farnésol via la voie de signalisation du phosphatidylinositol (Uppuluri *et al.*, 2007). Nous avons aussi observé que la taille des

cellules est diminuée en présence de cet isoprénoïde (résultats non illustrés), confirmant ainsi les résultats obtenus par Priya Uppuluri et ses collègues (Uppuluri *et al.*, 2007). Cependant, le ralentissement de la croissance planctonique en présence de farnésol n'explique pas entièrement l'inhibition de la formation de biofilm. En effet, la diminution remarquée dans la formation de biofilm en présence de l'isoprénoïde est beaucoup plus importante que celle notée au niveau de la croissance. Les répondeurs BL007 et LAM1 font quand même exception à ces résultats lorsqu'ils sont incubés à 37°C en présence de farnésol, leur croissance étant augmentée de 53.4% dans ces conditions. Par contre, leur formation de biofilm est complètement inhibée dans les mêmes conditions de culture.

La croissance des levures en culture liquide a été quantifiée par mesure de la densité optique à 620 nm. Cette technique peu coûteuse présente certaines limitations : l'absorbance des diverses formes morphologiques de *C. albicans* n'est pas tout à fait semblable, les formes filamenteuses forment des agrégats cellulaires et rendent ainsi la solution de lecture non homogène, les cellules s'attachent à la surface en polystyrène et forment des biofilms dans le puits de mesure. D'autres alternatives pour la quantification de la croissance pourront être le décompte cellulaire et la mesure du poids sec des cellules (Alem *et al.*, 2006; Uppuluri *et al.*, 2007).

5.1.4. Évaluation de la réponse au farnésol de la souche SC5314

L'isolat clinique SC5314, la souche de *C. albicans* la mieux caractérisée dans la littérature, présente un profil de germination semblable aux répondeurs lorsqu'elle est incubée à 37°C. Par contre, dans les mêmes conditions de culture, cette souche forme uniquement des colonies chevelues, suggérant ainsi que probablement une concentration en dextrose plus importante que 0.2% serait nécessaire pour que la souche SC5314 développe des colonies lisses sur milieu solide. De plus, en présence de 2.5% CO₂, SC5314 garde un profil de germination constant de 80 à 100% hyphes, comme dans le cas des non répondeurs. En conséquence, chez cette souche, la stimulation par le

dioxyde de carbone de la transition morphologique de blastospore à hyphe semble dominer sur l'effet anti-germination de la molécule de *quorum sensing* farnésol.

L'ajout du 30 μ M farnésol exogène occasionne une diminution importante de la formation de biofilm de la souche SC5314, comme dans le cas des répondeurs. En présence de l'isoprénoïde la germination est aussi complètement inhibée à 37°C dans les deux milieux de culture, ainsi que dans R2A à 37°C avec 2.5% CO₂. En conséquence, nos résultats confirment les données obtenues dans la littérature au niveau de la réponse au farnésol de la souche SC5314 (Ramage *et al.*, 2002a; Uppuluri *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2010). Cependant, dans le milieu RPMI 1640 en présence de dioxyde de carbone, le farnésol n'a aucun effet sur la filamentation de cette souche. Sur milieu solide on a observé le même résultat : l'isoprénoïde inhibe le phénotype chevelu sur milieu R2A mais n'a aucun effet sur RPMI 1640. De plus, nous avons remarqué que le milieu RPMI 1640 favorise la germination de la souche SC5314, ainsi que sa formation de biofilm. En conclusion, chez la souche SC5314 le milieu de culture RPMI 1640 semble stimuler la transition morphologique de levure à hyphe via un mécanisme de signalisation qui domine la réponse au farnésol.

5.1.5. Conclusion sur la caractérisation phénotypique des souches et la formation de biofilm

Notre étude a permis de vérifier nos hypothèses. Dans un premier temps, nous avons pu démontrer que l'absence de la réponse au farnésol se manifeste aussi en dehors des conditions de culture précise décrites auparavant dans notre laboratoire. Cependant, le milieu R2A demeure le milieu de culture de choix pour l'évaluation de la réponse au farnésol sur la formation des biofilms. De plus, l'ajout de 2.5% CO₂ est nécessaire pour l'étude de la réponse au farnésol sur milieu solide. Nous avons pu confirmer que les non répondeurs forment plus de biofilm que les répondeurs et que le farnésol inhibe davantage la formation de biofilm des répondeurs que des non répondeurs.

Nos résultats nous ont permis également de conclure que le profil de germination et la croissance des non répondeurs diffèrent de ceux des répondeurs. Notamment, les non répondeurs produisent un plus grand nombre des formes filamenteuses que les répondeurs, aussi bien en présence qu'en absence de farnésol. De plus, nous avons démontré que les répondeurs croissent plus vite que les non répondeurs et que le farnésol inhibe plus la croissance des répondeurs que des non répondeurs.

Cette étude est la première à montrer qu'on peut distinguer les répondeurs des non répondeurs en absence de farnésol, sur milieu solide à 37°C. Ce nouveau résultat nous conduit à penser que le farnésol pourrait dominer le processus de germination chez *C. albicans* ou vice-versa, qu'une hyper-filamentation pourrait conduire à un manque de réponse au farnésol. Cette hypothèse est en concordance avec la réponse au farnésol observée au niveau de la souche SC5314. En effet, nous avons pu démontrer que la souche SC5314 se comporte comme un répondeur. Cependant, certains facteurs environnementaux peuvent stimuler chez cette souche la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe via une voie de signalisation qui semble dominer la réponse au farnésol. La caractérisation au niveau génétique des répondeurs et non répondeurs est ainsi nécessaire pour mieux comprendre ces observations.

Précédemment, nous avons mentionné que la formation de biofilm est associée au prolongement de l'infection et d'une mauvaise réhabilitation (Tumbarello *et al.*, 2007; Hasan *et al.*, 2009). Puisque les non répondeurs forment plus de biofilm que les répondeurs, il serait intéressant d'évaluer, dans un modèle murin, la capacité de virulence des ces isolats cliniques. Les résultats pourraient prouver que la germination et la formation de biofilm sont en étroite relation avec la virulence.

Plusieurs molécules de *quorum sensing* ont été décrites récemment chez *C. albicans* qui agissent en synergie ou en hiérarchie afin de réguler la transition morphologique de levure à hyphe (Kruppa, 2009). Il serait ainsi très pertinent d'évaluer également la réponse des répondeurs et des non répondeurs aux autres molécules de *quorum sensing* afin de mieux comprendre la différence dans la réponse au farnésol chez ces souches.

5.2. CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES SOUCHES

5.2.1. Recherche du récepteur nucléaire du farnésol

Nous avons avancé l'hypothèse que le farnésol agit via un récepteur nucléaire analogue au récepteur FXR des mammifères et que les non répondeurs présentent possiblement des altérations au niveau de ce récepteur. La recherche de l'existence de ce récepteur chez le répondeur BL007 par RT-PCR nous a conduit uniquement à des résultats négatifs. De plus, une recherche génomique dans les génomes de *S. cerevisiae* et *C. albicans* n'a pas identifiée une séquence similaire au récepteur FXR ou au récepteur d'ecdysone, homologue au FXR. En conséquence, si le farnésol agit via un récepteur nucléaire, il est très probable qu'il soit d'un type non décrit précédemment. R. Shchepin et son équipe sont arrivés à la même conclusion après avoir analysé la structure et l'activité des 40 analogues naturels et synthétiques de cet isoprénoïde (Shchepin *et al.*, 2003). Pour mieux étudier l'existence ainsi que la localisation du récepteur hypothétique de farnésol, un outil pertinent sera l'utilisation des analogues de farnésol fluorescents, décrits précédemment dans la littérature (Shchepin *et al.*, 2005). Une interaction directe du farnésol avec la membrane cellulaire ne peut pas être non plus exclue, étant donné que l'isoprénoïde a la capacité de s'intégrer naturellement dans la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique, d'en augmenter sa fluidité et de favoriser la redistribution des protéines membranaires (Rowat & Davis, 2004; Rowat *et al.*, 2005).

5.2.2. Évaluation du niveau d'expression des gènes *CHK1*, *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *RAM2* et *DPP3*

Nous avons aussi suggéré que la différence dans la réponse au farnésol entre les répondeurs et les non répondeurs pourrait s'expliquer par l'existence chez les derniers des altérations au niveau d'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation

du farnésol. Tout d'abord, ce projet nous a permis de mettre au point une méthode optimale d'extraction d'ARN total des levures, ainsi qu'une technique de purification de cet ARN. Par la suite, nous avons développé une méthode d'évaluation de l'expression des gènes *CHK1*, *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *RAM2* et *DPP3* par RT-PCR semi-quantitative.

Expression du gène *CHK1*: les études précédentes ont démontré que le double mutant du gène *CHK1*, qui code pour une histidine kinase d'un système à deux composantes, est réfractaire à l'effet inhibiteur du farnésol sur la germination, ainsi que sur la formation de biofilm (Kruppa *et al.*, 2004). Par contre, le farnésol montre une diminution de la production du biofilm du mutant d'une seule copie du gène *CHK1* (Kruppa *et al.*, 2004). Étant donné que le farnésol inhibe la formation de biofilm des non répondeurs, cela nous a conduits à émettre l'hypothèse que ces souches sont inactivées partiellement dans une seule copie du gène *CHK1* et ainsi présentent une sous-expression de ce gène. Cependant, l'évaluation semi-quantitative du niveau d'expression du gène *CHK1* n'a montré aucune différence statistiquement significative entre les répondeurs et les non répondeurs. Le non répondeur HM1 seulement présente une sous-expression significative de ce gène par rapport au répondeur LAM1 ($P \leq 0.05$), ce qui nous amène à croire que les profils génétiques des deux non répondeurs sont probablement distincts. Ainsi, le manque de réponse au farnésol de ces isolats cliniques pourrait être expliqué par des altérations différentes de la voie de signalisation du farnésol pour chacune des souche.

Le gène *CHK1* est par contre sous-exprimé chez la souche SC5314. En effet, le farnésol ne montre aucun effet sur la germination de cette souche dans le milieu de culture RPMI 1640 à 37°C avec 2.5% CO₂ mais il inhibe cependant sa formation de biofilm. Ainsi, nos résultats confirment l'hypothèse qu'une des voies de signalisation du farnésol chez *C. albicans* est probablement via un système à deux composantes médié par l'histidine kinase Chk1 (Kruppa *et al.*, 2004; Kruppa, 2009).

Expression du gène *RAM2*: le gène *RAM2* code pour la sous-unité α de la FTase, enzyme qui active la protéine Ras1 par farnésylation. Un inhibiteur de la FTase, le *FPT inhibitor III*, réprime la transition de la forme levure à la forme hyphe (McGeady

et al., 2002) ce qui nous a conduit à émettre l'hypothèse que le farnésol agit en inhibant cette enzyme. Cependant, le gène *RAM2* est exprimé au même niveau chez les répondeurs et les non répondeurs. Ainsi, la différence dans la réponse au farnésol observée dans nos isolats cliniques ne semble pas se situer au niveau de l'expression de l'enzyme FTase. En effet, une étude réalisée précédemment dans notre laboratoire montre également qu'il n'y a aucune différence marquante au niveau des profils de farnésylation des répondeurs et des non répondeurs (Desmeules, 2004). Un des mécanismes d'action du farnésol proposé dans la littérature est qu'il inhibe la transition morphologique de levure à hyphe en réprimant la cascade de signalisation Ras1-AMPC-Efg1 (Davis-Hanna *et al.*, 2008). Étant donné que le farnésol est en mesure de réprimer la germination d'un mutant hyper-filamenteux qui possède un dominant actif du gène *RASI*, l'isoprénoïde ne semble pas agir seulement par inhibition de l'activation de la protéine Ras1, mais plutôt en régulant des processus en amont, tel que les modifications post-traductionnelles de la Ras1 (Piispanen *et al.*, 2008).

Nous avons par contre observé que le gène *RAM2* est sous-exprimé significativement chez la souche SC5314. Comme cette souche garde un profil de germination constitué d'hyphes même en présence de farnésol dans RPMI 1640 avec dioxyde de carbone, nos résultats soutiennent l'hypothèse qu'un des mécanismes d'action du farnésol est probablement l'inhibition de la FTase.

Expression du gène *DPP3*: la production de farnésol par les levures peut être évaluée en quantifiant le niveau d'expression du gène *DPP3*. Ce gène code pour la phosphatase Dpp3, enzyme responsable d'environ 90% de la synthèse de farnésol (Navarathna *et al.*, 2007a). Nous avons remarqué que le gène *DPP3* est surexprimé significativement chez le non répondeur ATCC[®] 36802 par rapport aux autres souches ($P \leq 0.05$). En effet, une étude d'évaluation de la synthèse de farnésol par HPLC, réalisée précédemment dans notre laboratoire, a montré une production de cet isoprénoïde 10 fois plus importante chez les non répondeurs que chez les répondeurs (Desmeules, 2004). Ainsi, nous avons démontré qu'il y a une corrélation entre le niveau d'expression du gène *DPP3* et la mesure de la production de farnésol par HPLC chez le non répondeur ATCC[®] 36802, mais pas chez le non répondeur HM1. De plus, aucune

corrélation n'a été observée dans la littérature entre la surproduction de farnésol par les mutants *tup1/tup1* et *nrg1/nrg1* et leur niveau d'expression du gène *DPP3* (Kebaara et al., 2008). En conclusion, les non répondeurs ne présentent pas un déficit dans la synthèse de farnésol. Par contre, leur profil génétique semble être distinct. La juxtaposition du manque de réponse au farnésol avec la surproduction de l'isoprénoïde chez les non répondeurs suggère l'existence d'une boucle de rétroaction positive. En effet, Bessie W. Kebaara et son équipe ont démontré également que les mutants *tup1/tup1* et *nrg1/nrg1*, réfractaires à l'effet anti-germination du farnésol, produisent 17 à 19 fois plus de farnésol que les souches sauvages (Kebaara et al., 2008). De nouvelles méthodes plus précises pourront être envisagées pour la mesure de la production de farnésol chez les levures, tel que l'électrophorèse capillaire de zone avec détection fluorimétrique ou la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (Gregus et al., 2010; Kubsova et al., 2010).

Effet du farnésol sur le niveau d'expression des gènes *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *CHK1* et *RAM2* : Tatsuki Sato et ses collègues ont démontré que plusieurs gènes de la voie des MAPKs, régulée par la protéine Ras1, sont réprimés par le farnésol : le gène codant pour l'histidine kinase Hst7, pour le facteur de transcription Cph1 et pour la perméase Gap1 (Sato et al., 2004). Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'expression de ces gènes ne sera pas diminuée chez les non répondeurs en présence de farnésol, contrairement aux répondeurs. L'évaluation semi-quantitative du niveau d'expression de gènes *HST7*, *CPH1* et *GAP1* par RT-PCR, après ajout du farnésol, nous a permis de confirmer notre hypothèse, étant donné que l'isoprénoïde ne montre aucun effet sur l'expression de ces gènes chez le non répondeur ATCC® 36802. Par contre, le farnésol n'a aucun effet non plus sur le niveau d'expression de gènes *HST7*, *CPH1* et *GAP1* chez le répondeur BL007. La différence entre nos résultats et ceux obtenus par Tatsuki Sato (Sato et al., 2004) pourrait être expliquée par une dissemblance significative entre les deux systèmes expérimentaux. Amber Davis-Hanna est arrivée aussi à la même conclusion lorsqu'elle n'a observé aucun effet du farnésol sur le niveau d'expression du gène *HST7* chez *C. albicans* (Davis-Hanna et al., 2008). En effet, Tatsuki Sato et son équipe n'ont pas remarqué d'inhibition des gènes spécifiques du développement des

hyphes (*ALSI*, *HYR1* et *HWP1*) en présence de farnésol, tel qu'il a été déjà démontré à plusieurs reprises dans la littérature (Ramage *et al.*, 2002a; Enjalbert & Whiteway, 2005; Davis-Hanna *et al.*, 2008).

L'ajout du farnésol ne présente aucun effet non plus sur le niveau d'expression des gènes *CHK1* et *RAM2* chez les répondeurs et les non répondeurs, confirmant ainsi nos résultats précédents sur l'expression de ces gènes. Pour mieux comprendre l'effet du farnésol, il sera intéressant d'évaluer aussi le niveau d'expression des gènes *HST7*, *CPH1*, *GAP1*, *CHK1* et *RAM2* chez la souche SC5314.

5.2.3. Conclusion sur la caractérisation génétique des souches

Le présent projet de recherche est la première étude qui a comparé les répondeurs et les non répondeurs au niveau de leur expression génique. Nous avons ainsi démontré que si le farnésol agit via un récepteur nucléaire, il sera d'un type non décrit précédemment. Aucune différence n'a été observée entre les répondeurs et les non répondeurs au niveau de l'expression des gènes *CHK1* et *RAM2*, ainsi qu'au niveau de l'expression des gènes de la voie des MAPKs après ajout du farnésol. Par contre, la phosphatase Dpp3 qui est impliquée dans la production de farnésol est surexprimée significativement chez le non répondeur ATCC[®] 36802. De plus, l'histidine kinase Chk1 est sous-exprimée significativement chez le non répondeur HM1 par rapport au répondeur LAM1. En conséquence, ces résultats nous amènent à conclure que les deux isolats cliniques non répondeurs au farnésol présentent des profils génétiques distincts. En effet, le génome de *C. albicans* est très dynamique et il a été démontré dans la littérature qu'il n'y a pas deux souches de laboratoire qui possèdent un caryotype identique, même si elles dérivent de la même souche parentale (Rustchenko, 2007; Kabir & Hussain, 2009).

Pour mieux comprendre la différence dans la réponse au farnésol des répondeurs et des non répondeurs, il serait très pertinent d'évaluer le niveau d'expression des gènes impliqués dans les autres voies hypothétiques de signalisation du farnésol, tel que les

gènes de la voie de l'AMPc (*HSP12* et *CTAI*) ou le répresseur Tup1 (Davis-Hanna *et al.*, 2008; Kebaara *et al.*, 2008). De plus, on pourrait utiliser comme méthode de quantification du niveau d'expression des gènes la RT-PCR en temps réel, qui nous apportera plus de précision que la RT-PCR semi-quantitative (Fricke *et al.*, 2010; Hay & Jones, 2010; Nailis *et al.*, 2010). Une autre possibilité d'évaluation des profils génétiques des répondeurs et des non répondeurs serait de les comparer par profilage génétique à grande échelle, ce qui nous permettrait d'avoir une compréhension plus approfondie des nos isolats cliniques.

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous avons quantifié l'expression des différents gènes dans le milieu de culture RPMI 1640, après 4 heures d'incubation à 37°C avec 2.5% CO₂. Étant donné que toutes les souches étudiées sont capables de produire un biofilm seulement dans le milieu de culture R2A et qu'à 37°C en absence de dioxyde de carbone on observe une différence dans la germination des répondeurs et des non répondeurs, il serait très intéressant d'évaluer aussi l'expression génique de nos souches dans ces conditions d'incubation. De plus, comme le farnésol ne bloque pas l'élongation des tubes de germination déjà existants et qu'il y a une durée limitée de temps (moins de 90 min) pendant laquelle les levures répondent au farnésol (Mosel *et al.*, 2005), on pourrait envisager de varier le moment d'extraction d'ARN pour obtenir une meilleure compréhension sur le mode d'action du farnésol.

Nous avons également démontré que les non répondeurs ne présentent pas un déficit dans la synthèse de farnésol. De plus, ces souches semblent produire une quantité plus importante de farnésol que les répondeurs. Ainsi, l'isoprénoïde produit par ces souches est possiblement dégradé rapidement ou utilisé dans une autre voie de signalisation. Comme plusieurs molécules de *quorum sensing* ont été décrites récemment chez *C. albicans* (Kruppa, 2009), il serait très pertinent d'évaluer la production de ces molécules chez les répondeurs et les non répondeurs. Les résultats pourraient nous apporter des connaissances utiles dans la compréhension de la régulation de la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe chez cette levure pathogène.

5.3. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans le cadre de ce projet de maîtrise contribuent à l'avancement des connaissances sur le pathogène fongique *C. albicans* et sur le mode d'action de sa molécule de *quorum sensing* farnésol. Nous avons démontré que la voie de signalisation du farnésol et la régulation du dimorphisme de la levure sont intimement liées. Cela nous conduit à conclure que l'appellation des souches comme « répondeurs » et « non répondeurs » au farnésol n'est pas tout à fait adéquate. Notamment, ces isolats cliniques pourront présenter des différences au niveau des voies de signalisation contrôlant la transition morphologique de la forme levure à la forme hyphe, qui pourraient entraîner en effet une réponse réfractaire au farnésol. Les non répondeurs au farnésol sont ainsi un outil précieux pour mieux connaître et comprendre le mécanisme d'action de cet isoprénoïde. Grâce à ces propriétés anti-germination, la molécule de farnésol pourrait, dans l'avenir, devenir un agent thérapeutique promoteur et permettra ainsi de réduire l'incidence des candidémies.

SOURCES DOCUMENTAIRES

- Abe S, Tsunashima R, Iijima R, Yamada T, Maruyama N, Hisajima T, Abe Y, Oshima H & Yamazaki M. (2009). Suppression of anti-*Candida* activity of macrophages by a quorum-sensing molecule, farnesol, through induction of oxidative stress. *Microbiology and immunology* **53**, 323-330.
- Adany I, Yazlovitskaya EM, Haug JS, Voziyan PA & Melnykovych G. (1994). Differences in sensitivity to farnesol toxicity between neoplastically- and non-neoplastically-derived cells in culture. *Cancer letters* **79**, 175-179.
- Ainsworth GC. (1986). *History of medical and veterinary mycology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Al-Fattani MA & Douglas LJ. (2004). Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3291-3297.
- Alem MA, Oteef MD, Flowers TH & Douglas LJ. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic cell* **5**, 1770-1779.
- Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Roman E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C & Pla J. (2003). The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **2**, 351-361.
- Andaluz E, Ciudad T, Gomez-Raja J, Calderone R & Larriba G. (2006). Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hypha-specific genes. *Molecular microbiology* **59**, 1452-1472.
- Andres DA, Goldstein JL, Ho YK & Brown MS. (1993). Mutational analysis of alpha-subunit of protein farnesyltransferase. Evidence for a catalytic role. *The Journal of biological chemistry* **268**, 1383-1390.
- Ansebo L, Ignell R, Lofqvist J & Hansson BS. (2005). Responses to sex pheromone and plant odours by olfactory receptor neurons housed in sensilla auricillica of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of insect physiology* **51**, 1066-1074.
- Arnold TM, Dotson E, Sarosi GA & Hage CA. (2010). Traditional and emerging antifungal therapies. *Proceedings of the American Thoracic Society* **7**, 222-228.
- Atkinson S & Williams P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **6**, 959-978.
- Bachewich C, Thomas DY & Whiteway M. (2003). Depletion of a polo-like kinase in *Candida albicans* activates cyclase-dependent hyphal-like growth. *Molecular biology of the cell* **14**, 2163-2180.
- Bahn YS & Muhlschlegel FA. (2006). CO₂ sensing in fungi and beyond. *Current opinion in microbiology* **9**, 572-578.
- Bai C, Ramanan N, Wang YM & Wang Y. (2002). Spindle assembly checkpoint component CaMad2p is indispensable for *Candida albicans* survival and virulence in mice. *Molecular microbiology* **45**, 31-44.
- Baillie GS & Douglas LJ. (1998). Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1900-1905.

- Baillie GS & Douglas LJ. (1999). Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of medical microbiology* **48**, 671-679.
- Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, Rompre P & Deslauriers N. (2003). Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **95**, 51-59.
- Bassler BL, Greenberg EP & Stevens AM. (1997). Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology* **179**, 4043-4045.
- Bassler BL, Wright M, Showalter RE & Silverman MR. (1993). Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular microbiology* **9**, 773-786.
- Bassler BL, Wright M & Silverman MR. (1994). Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular microbiology* **13**, 273-286.
- Bendel CM, Hess DJ, Garni RM, Henry-Stanley M & Wells CL. (2003). Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice. *Critical care medicine* **31**, 501-507.
- Berkhout CM. (1923). De schimmelgeslachten *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* en *Torula*. Utrecht University, Utrecht.
- Berman J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology* **9**, 595-601.
- Berman J & Sudbery PE. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature reviews* **3**, 918-930.
- Biswas S, Roy M & Datta A. (2003). N-acetylglucosamine-inducible *CaGAP1* encodes a general amino acid permease which co-ordinates external nitrogen source response and morphogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **149**, 2597-2608.
- Biswas S, Van Dijck P & Datta A. (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 348-376.
- Biswas SK & Chaffin WL. (2005). Anaerobic growth of *Candida albicans* does not support biofilm formation under similar conditions used for aerobic biofilm. *Current microbiology* **51**, 100-104.
- Blankenship JR & Mitchell AP. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current opinion in microbiology* **9**, 588-594.
- Bockmuhl DP, Krishnamurthy S, Gerads M, Sonneborn A & Ernst JF. (2001). Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **42**, 1243-1257.
- Boles BR, Thoendel M & Singh PK. (2004). Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 16630-16635.
- Braun BR, Head WS, Wang MX & Johnson AD. (2000). Identification and characterization of *TUPI*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**, 31-44.

- Braun BR & Johnson AD. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science (New York, NY)* **277**, 105-109.
- Braun BR & Johnson AD. (2000). *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**, 57-67.
- Braun PC. (2005). The effect of farnesol on amino acid incorporation by a wild-type and cell-wall variant strain of *Candida albicans*. *Canadian journal of microbiology* **51**, 715-718.
- Brehm-Stecher BF & Johnson EA. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3357-3360.
- Brown AJP. (2002). Morphogenetic signaling pathways in *Candida albicans*. In *Candida and candidiasis*, ed. Calderone RA, pp. 95-106. ASM Press, Washington, D.C.
- Buck V, Quinn J, Soto Pino T, Martin H, Saldanha J, Makino K, Morgan BA & Millar JB. (2001). Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular biology of the cell* **12**, 407-419.
- Burke YD, Ayoubi AS, Werner SR, McFarland BC, Heilman DK, Ruggeri BA & Crowell PL. (2002). Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. *Anticancer research* **22**, 3127-3134.
- Calcagno AM, Bignell E, Rogers TR, Jones MD, Muhlschlegel FA & Haynes K. (2005). *Candida glabrata* Ste11 is involved in adaptation to hypertonic stress, maintenance of wild-type levels of filamentation and plays a role in virulence. *Med Mycol* **43**, 355-364.
- Calderone R, Suzuki S, Cannon R, Cho T, Boyd D, Calera J, Chibana H, Herman D, Holmes A, Jeng HW, Kaminishi H, Matsumoto T, Mikami T, O'Sullivan JM, Sudoh M, Suzuki M, Nakashima Y, Tanaka T, Tompkins GR & Watanabe T. (2000). *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. *Med Mycol* **38 Suppl 1**, 125-137.
- Calderone RA. (2002). Introduction and historical perspectives. In *Candida and candidiasis*, ed. Calderone RA, pp. 3-13. ASM Press, Washington, D.C.
- Calderone RA & Fonzi WA. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* **9**, 327-335.
- Caldwell DE, Atuku E, Wilkie DC, Wivcharuk KP, Karthikeyan S, Korber DR, Schmid DF & Wolfaardt GM. (1997). Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. *Advances in dental research* **11**, 4-13.
- Calera JA & Calderone R. (1999). Flocculation of hyphae is associated with a deletion in the putative *CaHK1* two-component histidine kinase gene from *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **145 (Pt 6)**, 1431-1442.
- Calera JA, Choi GH & Calderone RA. (1998). Identification of a putative histidine kinase two-component phosphorelay gene (*CaHK1*) in *Candida albicans*. *Yeast (Chichester, England)* **14**, 665-674.
- Calera JA, Zhao XJ, De Bernardis F, Sheridan M & Calderone R. (1999). Avirulence of *Candida albicans* *CaHK1* mutants in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis. *Infection and immunity* **67**, 4280-4284.

- Cao JG & Meighen EA. (1989). Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *The Journal of biological chemistry* **264**, 21670-21676.
- Cao YY, Cao YB, Xu Z, Ying K, Li Y, Xie Y, Zhu ZY, Chen WS & Jiang YY. (2005). cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 584-589.
- Carman GM & Wu WI. (2007). Lipid phosphate phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology* **434**, 305-315.
- Cassola A, Parrot M, Silberstein S, Magee BB, Passeron S, Giasson L & Cantore ML. (2004). *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryotic cell* **3**, 190-199.
- Chabasse D, Bouchara JP, de Gentile L & Chenebault JM. (1988). [*Candida albicans* chlamydozoospores observed in vivo in a patient with AIDS]. *Annales de biologie clinique* **46**, 817-818.
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D & Martinez JP. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 130-180.
- Chagas CE, Vieira A, Ong TP & Moreno FS. (2009). Farnesol inhibits cell proliferation and induces apoptosis after partial hepatectomy in rats. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* **24**, 377-382.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T & Ghannoum MA. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology* **183**, 5385-5394.
- Chen H & Fink GR. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & development* **20**, 1150-1161.
- Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J & Fink GR. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5048-5052.
- Chen SC & Sorrell TC. (2007). Antifungal agents. *The Medical journal of Australia* **187**, 404-409.
- Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczer I, Bassler BL & Hughson FM. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* **415**, 545-549.
- Cho T, Aoyama T, Toyoda M, Nakayama H, Chibana H & Kaminishi H. (2007). Transcriptional Changes in *Candida albicans* Genes by Both Farnesol and High Cell Density at an Early Stage of Morphogenesis in N-acetyl-D-glucosamine Medium. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **48**, 159-167.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM & Beachey EH. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology* **22**, 996-1006.
- Clark KL, Feldmann PJ, Dignard D, Larocque R, Brown AJ, Lee MG, Thomas DY & Whiteway M. (1995). Constitutive activation of the *Saccharomyces cerevisiae* mating response pathway by a MAP kinase kinase from *Candida albicans*. *Mol Gen Genet* **249**, 609-621.

- Cole GT, Seshan KR, Phaneuf M & Lynn KT. (1991). Chlamydospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice. *Canadian journal of microbiology* **37**, 637-646.
- Costanzo MC, Arnaud MB, Skrzypek MS, Binkley G, Lane C, Miyasato SR & Sherlock G. (2006). The *Candida* Genome Database: facilitating research on *Candida albicans* molecular biology. *FEMS yeast research* **6**, 671-684.
- Costerton JW, Geesey GG & Cheng KJ. (1978). How bacteria stick. *Scientific American* **238**, 86-95.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR & Lappin-Scott HM. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, NY)* **284**, 1318-1322.
- Crampin H, Finley K, Gerami-Nejad M, Court H, Gale C, Berman J & Sudbery P. (2005). *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkorper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. *Journal of cell science* **118**, 2935-2947.
- Csank C, Schroppel K, Leberer E, Harcus D, Mohamed O, Meloche S, Thomas DY & Whiteway M. (1998). Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infection and immunity* **66**, 2713-2721.
- Cugini C, Calfee MW, Farrow JM, 3rd, Morales DK, Pesci EC & Hogan DA. (2007). Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **65**, 896-906.
- Daniels KJ, Srikantha T, Lockhart SR, Pujol C & Soll DR. (2006). Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*. *The EMBO journal* **25**, 2240-2252.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW & Greenberg EP. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (New York, NY)* **280**, 295-298.
- Davis-Hanna A, Piispanen AE, Stateva LI & Hogan DA. (2008). Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Molecular microbiology* **67**, 47-62.
- Decanis N, Savignac K & Rouabhia M. (2009). Farnesol promotes epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptor 2 expression, interleukin-6 and human beta-defensin 2 production. *Cytokine* **45**, 132-140.
- Derengowski LS, De-Souza-Silva C, Braz SV, Mello-De-Sousa TM, Bao SN, Kyaw CM & Silva-Pereira I. (2009). Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* **8**, 13.
- Desmeules S. (2004). Mémoire de maîtrise: Étude entre le senseur de quorum farnesol et la formation de biofilms par la levure opportuniste *Candida albicans*. In *Faculté de Médecine, Département de Microbiologie et Immunologie*, pp. 153. Université de Montréal, Montréal.
- Deveau A, Piispanen AE, Jackson AA & Hogan DA. (2010). Farnesol induces hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans* yeast by inhibiting the Ras-cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryotic cell* **9**, 569-577.

- Dickschat JS. (2010). Quorum sensing and bacterial biofilms. *Natural product reports* **27**, 343-369.
- Doedt T, Krishnamurthy S, Bockmuhl DP, Tebarth B, Stempel C, Russell CL, Brown AJ & Ernst JF. (2004). APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **15**, 3167-3180.
- Donaton MC, Holsbeeks I, Lagatie O, Van Zeebroeck G, Crauwels M, Winderickx J & Thevelein JM. (2003). The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* **50**, 911-929.
- Donlan RM. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* **8**, 881-890.
- Donlan RM & Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* **15**, 167-193.
- Douglas LJ. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology* **11**, 30-36.
- Dumitru R, Hornby JM & Nickerson KW. (2004). Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2350-2354.
- Dumitru R, Navarathna DH, Semighini CP, Elowsky CG, Dumitru RV, Dignard D, Whiteway M, Atkin AL & Nickerson KW. (2007). In vivo and in vitro anaerobic mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **6**, 465-472.
- Enjalbert B & Whiteway M. (2005). Release from quorum-sensing molecules triggers hyphal formation during *Candida albicans* resumption of growth. *Eukaryotic cell* **4**, 1203-1210.
- Fang HM & Wang Y. (2006). RA domain-mediated interaction of Cdc35 with Ras1 is essential for increasing cellular cAMP level for *Candida albicans* hyphal development. *Molecular microbiology* **61**, 484-496.
- Feng Q, Summers E, Guo B & Fink G. (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **181**, 6339-6346.
- Filoche S, Wong L & Sissons CH. (2010). Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *Journal of dental research* **89**, 8-18.
- Fiorucci S, Mencarelli A, Distrutti E, Palladino G & Cipriani S. (2010). Targetting farnesoid-X-receptor: from medicinal chemistry to disease treatment. *Current medicinal chemistry* **17**, 139-159.
- Fonzi WA & Irwin MY. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**, 717-728.
- Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM & Weinberger C. (1995). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **81**, 687-693.
- Frame GW, Strauss WG & Maibach HI. (1972). Carbon dioxide emission of the human arm and hand. *The Journal of investigative dermatology* **59**, 155-159.
- Francis GA, Fayard E, Picard F & Auwerx J. (2003). Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annual review of physiology* **65**, 261-311.

- Fricke S, Fricke C, Schimmelpfennig C, Oelkrug C, Schonfelder U, Blatz R, Zilch C, Faber S, Hilger N, Ruhnke M & Rodloff AC. (2010). A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species. *Journal of applied microbiology* **109**, 1150-1158.
- Fuqua C, Parsek MR & Greenberg EP. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**, 439-468.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* **176**, 269-275.
- Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L & Costerton JW. (2003). Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert review of anti-infective therapy* **1**, 667-683.
- Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM & d'Enfert C. (2004). *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic cell* **3**, 536-545.
- Gianni C. (2010). Update on antifungal therapy with Terbinafine. *G Ital Dermatol Venereol* **145**, 415-423.
- Giusani AD, Vences M & Kumamoto CA. (2002). Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czflp-dependent relief of Efg1p-mediated repression. *Genetics* **160**, 1749-1753.
- Gomes FI, Teixeira P, Azeredo J & Oliveira R. (2009). Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Current microbiology* **59**, 118-122.
- Gow NAR. (2002). Cell biology and cell cycle of *Candida*. In *Candida and candidiasis*, ed. Calderone RA, pp. 145-158. ASM Press, Washington, D.C.
- Granero AM, Sanz JM, Gonzalez FJ, Vidal JL, Dornhaus A, Ghani J, Serrano AR & Chittka L. (2005). Chemical compounds of the foraging recruitment pheromone in bumblebees. *Die Naturwissenschaften* **92**, 371-374.
- Granshaw T, Tsukamoto M & Brody S. (2003). Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: farnesol or geraniol allow expression of rhythmicity in the otherwise arrhythmic strains frq10, wc-1, and wc-2. *Journal of biological rhythms* **18**, 287-296.
- Greenwood NN & Earnshaw A. (1997). *Chemistry of the elements*. 2nd ed. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Gregus P, Vlckova H, Buchta V, Kestranek J, Krivcikova L & Novakova L. (2010). Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **53**, 674-681.
- Guillon M. (1998). Insecticidal/acaricidal composition based on anionic surfactant(s), and semiochemical(s), and method for combatting arthropods using this composition. European Patent EP0629345.
- Gyetzvai A, Emri T, Takacs K, Dergez T, Fekete A, Pesti M, Pocsi I & Lenkey B. (2006). Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *FEMS yeast research* **6**, 1140-1148.
- Haas W, Shepard BD & Gilmore MS. (2002). Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* **415**, 84-87.
- Hakenbeck R & Stock JB. (1996). Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods in enzymology* **273**, 281-300.

- Hall-Stoodley L, Costerton JW & Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**, 95-108.
- Hall RA, Cottier F & Muhlschlegel FA. (2009). Molecular networks in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Advances in applied microbiology* **67**, 191-212.
- Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N & Fries BC. (2009). Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **11**, 753-761.
- Hawser SP, Baillie GS & Douglas LJ. (1998). Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *Journal of medical microbiology* **47**, 253-256.
- Hawser SP & Douglas LJ. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2128-2131.
- Hay RJ & Jones RM. (2010). New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clinics in dermatology* **28**, 190-196.
- Hazen KC & Cutler JE. (1979). Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infection and immunity* **24**, 661-666.
- Hazen KC & Cutler JE. (1983). Isolation and purification of morphogenic autoregulatory substance produced by *Candida albicans*. *Journal of biochemistry* **94**, 777-783.
- Hellstein J, Vawter-Hugart H, Fotos P, Schmid J & Soll DR. (1993). Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. *Journal of clinical microbiology* **31**, 3190-3199.
- Henke JM & Bassler BL. (2004). Bacterial social engagements. *Trends in cell biology* **14**, 648-656.
- Henriques M, Martins M, Azeredo J & Oliveira R. (2007). Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* morphogenesis. *Letters in applied microbiology* **44**, 199-205.
- Henry KW, Cruz MC, Katiyar SK & Edlind TD. (1999). Antagonism of azole activity against *Candida albicans* following induction of multidrug resistance genes by selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1968-1974.
- Hentzer M & Givskov M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1300-1307.
- Hisajima T, Maruyama N, Tanabe Y, Ishibashi H, Yamada T, Makimura K, Nishiyama Y, Funakoshi K, Oshima H & Abe S. (2008). Protective effects of farnesol against oral candidiasis in mice. *Microbiology and immunology* **52**, 327-333.
- Hogan DA. (2006). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic cell* **5**, 613-619.
- Hogan DA & Sundstrom P. (2009). The Ras/cAMP/PKA signaling pathway and virulence in *Candida albicans*. *Future microbiology* **4**, 1263-1270.
- Hogan DA, Vik A & Kolter R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular microbiology* **54**, 1212-1223.

- Honraet K, Goetghebeur E & Nelis HJ. (2005). Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *Journal of microbiological methods* **63**, 287-295.
- Hornby JM, Dumitru R & Nickerson KW. (2004). High phosphate (up to 600 mM) induces pseudohyphal development in five wild type *Candida albicans*. *Journal of microbiological methods* **56**, 119-124.
- Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, Dussault P & Nickerson KW. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology* **67**, 2982-2992.
- Hornby JM, Kebaara BW & Nickerson KW. (2003). Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2366-2369.
- Hornby JM & Nickerson KW. (2004). Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2305-2307.
- Huang G, Yi S, Sahni N, Daniels KJ, Srikantha T & Soll DR. (2010). N-acetylglucosamine induces white to opaque switching, a mating prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS pathogens* **6**, e1000806.
- Huang H, H Marcus D & Whiteway M. (2008). Transcript profiling of a MAP kinase pathway in *C. albicans*. *Microbiological research* **163**, 380-393.
- Hughes DT & Sperandio V. (2008). Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* **6**, 111-120.
- Hull CM, Raisner RM & Johnson AD. (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science (New York, NY)* **289**, 307-310.
- Inoue Y, Shiraishi A, Hada T, Hirose K, Hamashima H & Shimada J. (2004). The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS microbiology letters* **237**, 325-331.
- Ishii N, Yamamoto M, Yoshihara F, Arisawa M & Aoki Y. (1997). Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **143 (Pt 2)**, 429-435.
- Jabra-Rizk MA, Shirtliff M, James C & Meiller T. (2006). Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS yeast research* **6**, 1063-1073.
- Jansons VK & Nickerson WJ. (1970). Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydospore of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **104**, 910-921.
- Jayaraman A & Wood TK. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual review of biomedical engineering* **10**, 145-167.
- Jensen EC, Hornby JM, Pagliaccetti NE, Wolter CM, Nickerson KW & Atkin AL. (2006). Farnesol restores wild-type colony morphology to 96% of *Candida albicans* colony morphology variants recovered following treatment with mutagens. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* **49**, 346-353.
- Jillson OF & Nickerson WJ. (1948). Mutual antagonism between pathogenic fungi. Inhibition of dimorphism in *Candida albicans*. *Mycologia* **40**, 369-385.

- Jin Y, Samaranayake YH, Yip HK & Samaranayake LP. (2005). Characterization of switch phenotypes in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* **160**, 191-200.
- Johnson NW & Bain CA. (2000). Tobacco and oral disease. EU-working group on tobacco and oral health. *British dental journal* **189**, 200-206.
- Joint I, Tait K, Callow ME, Callow JA, Milton D, Williams P & Camara M. (2002). Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science (New York, NY)* **298**, 1207.
- Jones S, White G & Hunter PR. (1994). Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections. *Journal of clinical microbiology* **32**, 2869-2870.
- Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW & Scherer S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7329-7334.
- Joo JH, Liao G, Collins JB, Grissom SF & Jetten AM. (2007). Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer research* **67**, 7929-7936.
- Kabir MA & Hussain MA. (2009). Human fungal pathogen *Candida albicans* in the postgenomic era: an overview. *Expert review of anti-infective therapy* **7**, 121-134.
- Kadosh D & Johnson AD. (2005). Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Molecular biology of the cell* **16**, 2903-2912.
- Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M & Kozik A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta biochimica Polonica* **56**, 211-224.
- Kebara BW, Langford ML, Navarathna DH, Dumitru R, Nickerson KW & Atkin AL. (2008). *Candida albicans* Tup1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *Eukaryotic cell* **7**, 980-987.
- Kim S, Kim E, Shin DS, Kang H & Oh KB. (2002). Evaluation of morphogenic regulatory activity of farnesoic acid and its derivatives against *Candida albicans* dimorphism. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **12**, 895-898.
- Klengel T, Liang WJ, Chaloupka J, Ruoff C, Schroppel K, Naglik JR, Eckert SE, Mogensen EG, Haynes K, Tuite MF, Levin LR, Buck J & Muhlschlegel FA. (2005). Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol* **15**, 2021-2026.
- Klippel N, Cui S, Groebe L & Bilitewski U. (2010). Deletion of *Candida albicans* Histidine Kinase *CHK1* Improves Recognition by Phagocytes through an Increased Exposure of Cell Wall {beta}-1,3-Glucans. *Microbiology (Reading, England)*.
- Knoke M & Bernhardt H. (2006). The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses* **49**, 283-287.
- Knutsen E, Ween O & Havarstein LS. (2004). Two separate quorum-sensing systems upregulate transcription of the same ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* **186**, 3078-3085.

- Kohler JR & Fink GR. (1996). *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13223-13228.
- Kojic EM & Darouiche RO. (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clinical microbiology reviews* **17**, 255-267.
- Kolotila MP & Diamond RD. (1990). Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. *Infection and immunity* **58**, 1174-1179.
- Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Vacca-Smith AM & Bowen WH. (2003). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **52**, 782-789.
- Kruppa M. (2009). Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* **52**, 1-10.
- Kruppa M, Goins T, Cutler JE, Lowman D, Williams D, Chauhan N, Menon V, Singh P, Li D & Calderone R. (2003). The role of the *Candida albicans* histidine kinase [*CHK1*] gene in the regulation of cell wall mannan and glucan biosynthesis. *FEMS yeast research* **3**, 289-299.
- Kruppa M, Krom BP, Chauhan N, Bambah AV, Cihlar RL & Calderone RA. (2004). The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **3**, 1062-1065.
- Kubesova A, Horka M, Ruzicka F, Slais K & Glatz Z. (2010). Separation of attogram terpenes by the capillary zone electrophoresis with fluorometric detection. *Journal of chromatography* **1217**, 7288-7292.
- Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK & Ghannoum MA. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of clinical microbiology* **41**, 506-508.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK & Ghannoum MA. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and immunity* **70**, 878-888.
- Kumamoto CA. (2002). *Candida* biofilms. *Current opinion in microbiology* **5**, 608-611.
- Kumamoto CA & Vines MD. (2005a). Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol* **59**, 113-133.
- Kumamoto CA & Vines MD. (2005b). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular microbiology* **7**, 1546-1554.
- Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, McCoy J & Soll DR. (1999). Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infection and immunity* **67**, 6652-6662.
- Lacasse M, Fortier C, Trudel L, Collet AJ & Deslauriers N. (1990). Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. *J Oral Pathol Med* **19**, 136-141.
- Laffey SF & Butler G. (2005). Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology (Reading, England)* **151**, 1073-1081.

- Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD & Edwards PA. (2000). Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *The Journal of biological chemistry* **275**, 10638-10647.
- LaFleur MD, Kumamoto CA & Lewis K. (2006). *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3839-3846.
- Lane S, Birse C, Zhou S, Matson R & Liu H. (2001). DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry* **276**, 48988-48996.
- Langford ML, Atkin AL & Nickerson KW. (2009). Cellular interactions of farnesol, a quorum-sensing molecule produced by *Candida albicans*. *Future microbiology* **4**, 1353-1362.
- Langford ML, Hasim S, Nickerson KW & Atkin AL. (2010). Activity and toxicity of farnesol towards *Candida albicans* are dependent on growth conditions. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 940-942.
- Lapczynski A, Bhatia SP, Letizia CS & Api AM. (2008). Fragrance material review on farnesol. *Food Chem Toxicol* **46 Suppl 11**, S149-156.
- Lazazzera BA & Grossman AD. (1998). The ins and outs of peptide signaling. *Trends in microbiology* **6**, 288-294.
- Leberer E, H Marcus D, Broadbent ID, Clark KL, Dignard D, Ziegelbauer K, Schmidt A, Gow NA, Brown AJ & Thomas DY. (1996). Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13217-13222.
- Leberer E, H Marcus D, Dignard D, Johnson L, Ushinsky S, Thomas DY & Schroppel K. (2001). Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular microbiology* **42**, 673-687.
- Leberer E, Ziegelbauer K, Schmidt A, H Marcus D, Dignard D, Ash J, Johnson L & Thomas DY. (1997). Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCl4p. *Curr Biol* **7**, 539-546.
- Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M & Heitman J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-785.
- Lewis K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* **5**, 48-56.
- Lewis K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current topics in microbiology and immunology* **322**, 107-131.
- Lewis K. (2010). Persister cells. *Annu Rev Microbiol* **64**, 357-372.
- Li D, Bernhardt J & Calderone R. (2002). Temporal expression of the *Candida albicans* genes *CHK1* and *CSSK1*, adherence, and morphogenesis in a model of reconstituted human esophageal epithelial candidiasis. *Infection and immunity* **70**, 1558-1565.
- Li D, Gurkovska V, Sheridan M, Calderone R & Chauhan N. (2004). Studies on the regulation of the two-component histidine kinase gene *CHK1* in *Candida albicans* using the heterologous *lacZ* reporter gene. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 3305-3313.

- Li D, Williams D, Lowman D, Monteiro MA, Tan X, Kruppa M, Fonzi W, Roman E, Pla J & Calderone R. (2009). The *Candida albicans* histidine kinase Chk1p: signaling and cell wall mannan. *Fungal Genet Biol* **46**, 731-741.
- Li X, Yan Z & Xu J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **149**, 353-362.
- Lingappa BT, Prasad M, Lingappa Y, Hunt DF & Biemann K. (1969). Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science (New York, NY)* **163**, 192-194.
- Liu G, Vellucci VF, Kyc S & Hostetter MK. (2009). Simvastatin inhibits *Candida albicans* biofilm in vitro. *Pediatric research* **66**, 600-604.
- Liu H, Kohler J & Fink GR. (1994). Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science (New York, NY)* **266**, 1723-1726.
- Liu P, Luo L, Guo J, Liu H, Wang B, Deng B, Long CA & Cheng Y. (2010). Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillium expansum*. *Mycologia* **102**, 311-318.
- Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A & Fink GR. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.
- Lockhart SR, Daniels KJ, Zhao R, Wessels D & Soll DR. (2003). Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **2**, 49-61.
- Lockhart SR, Pujol C, Daniels KJ, Miller MG, Johnson AD, Pfaller MA & Soll DR. (2002). In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **162**, 737-745.
- Lohse MB & Johnson AD. (2009). White-opaque switching in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology* **12**, 650-654.
- Lorek J, Poggeler S, Weide MR, Breves R & Bockmuhl DP. (2008). Influence of farnesol on the morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Journal of basic microbiology* **48**, 99-103.
- Machida K, Tanaka T, Fujita K & Taniguchi M. (1998). Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* **180**, 4460-4465.
- Machida K, Tanaka T, Yano Y, Otani S & Taniguchi M. (1999). Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism. *Microbiology (Reading, England)* **145 (Pt 2)**, 293-299.
- Macreadie IG, Johnson G, Schlosser T & Macreadie PI. (2006). Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. *FEMS microbiology letters* **262**, 9-13.
- Magee BB & Magee PT. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science (New York, NY)* **289**, 310-313.
- Maidan MM, De Rop L, Serneels J, Exler S, Rupp S, Tournu H, Thevelein JM & Van Dijck P. (2005). The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **16**, 1971-1986.
- Maneu V, Cervera AM, Martinez JP & Gozalbo D. (1996). Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene (*EFB1*) coding for the elongation factor EF-1 beta. *FEMS microbiology letters* **145**, 157-162.

- Martin SW, Douglas LM & Konopka JB. (2005). Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydozoospores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryotic cell* **4**, 1191-1202.
- Martinez-Gomariz M, Perumal P, Mekala S, Nombela C, Chaffin WL & Gil C. (2009). Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *Proteomics* **9**, 2230-2252.
- Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA & Oliveira R. (2007). Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryotic cell* **6**, 2429-2436.
- Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA & Oliveira R. (2010). *Candida* species extracellular alcohols: production and effect in sessile cells. *Journal of basic microbiology*.
- Mateus C, Crow SA, Jr. & Ahearn DG. (2004). Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3358-3366.
- Mazur P, Register E, Bonfiglio CA, Yuan X, Kurtz MB, Williamson JM & Kelly R. (1999). Purification of geranylgeranyltransferase I from *Candida albicans* and cloning of the *CaRAM2* and *CaCDC43* genes encoding its subunits. *Microbiology (Reading, England)* **145 (Pt 5)**, 1123-1135.
- McAlester G, O'Gara F & Morrissey JP. (2008). Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology* **57**, 563-569.
- McGeady P, Logan DA & Wansley DL. (2002). A protein-farnesyl transferase inhibitor interferes with the serum-induced conversion of *Candida albicans* from a cellular yeast form to a filamentous form. *FEMS microbiology letters* **213**, 41-44.
- Merson-Davies LA & Odds FC. (1989). A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*. *Journal of general microbiology* **135**, 3143-3152.
- Miller MB & Bassler BL. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, 165-199.
- Miller MG & Johnson AD. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**, 293-302.
- Miquel K, Pradines A & Favre G. (1996). Farnesol and geranylgeraniol induce actin cytoskeleton disorganization and apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **225**, 869-876.
- Mitchell LH & Soll DR. (1979). Commitment to germ tube or bud formation during release from stationary phase in *Candida albicans*. *Experimental cell research* **120**, 167-179.
- Mo H & Elson CE. (2004). Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* **229**, 567-585.
- Mock RC, Pollack JH & Hashimoto T. (1990). Carbon dioxide induces endotrophic germ tube formation in *Candida albicans*. *Canadian journal of microbiology* **36**, 249-253.
- Moons P, Michiels CW & Aertsen A. (2009). Bacterial interactions in biofilms. *Critical reviews in microbiology* **35**, 157-168.

- Mosel DD, Dumitru R, Hornby JM, Atkin AL & Nickerson KW. (2005). Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Applied and environmental microbiology* **71**, 4938-4940.
- Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM & Ghannoum MA. (2003). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and immunity* **71**, 4333-4340.
- Muramatsu M, Obata S & Shimizu S. (2002). Microorganisms for production of geranylgeraniol and analogous compounds. European Patent EP1219714.
- Nadell CD, Xavier JB & Foster KR. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS microbiology reviews* **33**, 206-224.
- Nailis H, Vandenbosch D, Deforce D, Nelis HJ & Coenye T. (2010). Transcriptional response to fluconazole and amphotericin B in *Candida albicans* biofilms. *Research in microbiology* **161**, 284-292.
- Navarathna DH, Hornby JM, Hoerrmann N, Parkhurst AM, Duhamel GE & Nickerson KW. (2005). Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **56**, 1156-1159.
- Navarathna DH, Hornby JM, Krishnan N, Parkhurst A, Duhamel GE & Nickerson KW. (2007a). Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a *DPP3* knockout mutant of *Candida albicans*. *Infection and immunity* **75**, 1609-1618.
- Navarathna DH, Nickerson KW, Duhamel GE, Jerrels TR & Petro TM. (2007b). Exogenous farnesol interferes with the normal progression of cytokine expression during candidiasis in a mouse model. *Infection and immunity* **75**, 4006-4011.
- Nealson KH, Platt T & Hastings JW. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of bacteriology* **104**, 313-322.
- Nett JE, Lepak AJ, Marchillo K & Andes DR. (2009). Time course global gene expression analysis of an *in vivo* *Candida* biofilm. *The Journal of infectious diseases* **200**, 307-313.
- Ng WL & Bassler BL. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**, 197-222.
- Nickerson KW, Atkin AL & Hornby JM. (2006). Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Applied and environmental microbiology* **72**, 3805-3813.
- Nicolella C, van Loosdrecht MC & Heijnen JJ. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of biotechnology* **80**, 1-33.
- Nigam S, Ciccoli R, Ivanov I, Sczepanski M & Deva R. (2010). On mechanism of quorum sensing in *Candida albicans* by 3(R)-hydroxy-tetradecaenoic acid. *Current microbiology* **62**, 55-63.
- Niimi M, Firth NA & Cannon RD. (2010). Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University* **98**, 15-25.
- Noble SM & Johnson AD. (2007). Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen. *Annu Rev Genet* **41**, 193-211.
- Odds FC. (1988). *Candida and candidosis*. Baillière Tindall, London.

- Odds FC, Brown AJ & Gow NA. (2004). *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome biology* **5**, 230.
- Odds FC, Van Nuffel L & Gow NA. (2000). Survival in experimental *Candida albicans* infections depends on inoculum growth conditions as well as animal host. *Microbiology (Reading, England)* **146 (Pt 8)**, 1881-1889.
- Oh KB, Miyazawa H, Naito T & Matsuoka H. (2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4664-4668.
- Pan J & Ren D. (2009). Quorum sensing inhibitors: a patent overview. *Expert opinion on therapeutic patents* **19**, 1581-1601.
- Parks LW & Casey WM. (1995). Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol* **49**, 95-116.
- Pedreno Y, Maicas S, Arguelles JC, Sentandreu R & Valentin E. (2004). The *ATCI* gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry* **279**, 40852-40860.
- Peeters E, Nelis HJ & Coenye T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of microbiological methods* **72**, 157-165.
- Peleg AY, Tampakakis E, Fuchs BB, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr. & Mylonakis E. (2008). Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14585-14590.
- Perez-Sala D. (2007). Protein isoprenylation in biology and disease: general overview and perspectives from studies with genetically engineered animals. *Front Biosci* **12**, 4456-4472.
- Perlroth J, Choi B & Spellberg B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* **45**, 321-346.
- Phillips AJ, Crowe JD & Ramsdale M. (2006). Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 726-731.
- Piispanen AE, Davis-Hanna A & Hogan DA. (2008). Modulation of the Ras1-Adenylyl Cyclase-Protein Kinase A pathway in *Candida albicans* by farnesol and dodecanol. *9th Candida and Candidiasis ASM Conference* **B188**, 100.
- Piper KR, Beck von Bodman S & Farrand SK. (1993). Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**, 448-450.
- Radford DR, Challacombe SJ & Walter JD. (1994). A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. *Journal of medical microbiology* **40**, 416-423.
- Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C & Lopez-Ribot J. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Critical reviews in microbiology* **35**, 340-355.
- Ramage G, Saville SP, Wickes BL & Lopez-Ribot JL. (2002a). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and environmental microbiology* **68**, 5459-5463.

- Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL & Redding SW. (2004). Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **98**, 53-59.
- Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL & Lopez-Ribot JL. (2001). Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 2475-2479.
- Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL & Wickes BL. (2002b). The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS microbiology letters* **214**, 95-100.
- Rao CV, Newmark HL & Reddy BS. (2002). Chemopreventive effect of farnesol and lanosterol on colon carcinogenesis. *Cancer detection and prevention* **26**, 419-425.
- Reasoner DJ & Geldreich EE. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology* **49**, 1-7.
- Reess M. (1877). Über den Soorpilz. *Physikalisch-Medicinische Societät zu Erlangen* **9**, 190-193.
- Regezi JA, Sciubba JJ & Pogrel MA. (2000). *Atlas of oral and maxillofacial pathology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Reiss Y, Brown MS & Goldstein JL. (1992). Divalent cation and prenyl pyrophosphate specificities of the protein farnesyltransferase from rat brain, a zinc metalloenzyme. *The Journal of biological chemistry* **267**, 6403-6408.
- Rennemeier C, Frambach T, Hennicke F, Dietl J & Staib P. (2009). Microbial quorum-sensing molecules induce acrosome loss and cell death in human spermatozoa. *Infection and immunity* **77**, 4990-4997.
- Richards JJ & Melander C. (2009). Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem* **10**, 2287-2294.
- Rioja A, Pizzey AR, Marson CM & Thomas NS. (2000). Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. *FEBS letters* **467**, 291-295.
- Robin CP. (1853). *Histoire naturelle des végétaux. Parasites qui croissent sur l'homme et sur les animaux vivants*. Ballière, Paris.
- Rocha CR, Schroppel K, Harcus D, Marcil A, Dignard D, Taylor BN, Thomas DY, Whiteway M & Leberer E. (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **12**, 3631-3643.
- Roman E, Alonso-Monge R, Gong Q, Li D, Calderone R & Pla J. (2009). The Cek1 MAPK is a short-lived protein regulated by quorum sensing in the fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS yeast research* **9**, 942-955.
- Roman E, Arana DM, Nombela C, Alonso-Monge R & Pla J. (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends in microbiology* **15**, 181-190.
- Ross JF. (2009). Mémoire de maîtrise: La réponse au farnésol de *Candida albicans*: production de biofilms et parenté génétique. In *Faculté de Médecine, Département de Microbiologie et Immunologie*, pp. 114. Université de Montréal, Montréal.

- Rossignol T, Logue ME, Reynolds K, Grenon M, Lowndes NF & Butler G. (2007). Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 2304-2312.
- Roulet JB, Le Quan Sang KH, Luft U, Watanabe M, Otsuka K, McCarron DA & Devynck MA. (1997). Inhibition of Ca²⁺ uptake into A7r5 vascular smooth muscle cells by farnesol: lack of effect on membrane fluidity and Ca²⁺-ATPase activities. *Journal of hypertension* **15**, 1723-1728.
- Roulet JB, Spaetgens RL, Burlingame T, Feng ZP & Zamponi GW. (1999). Modulation of neuronal voltage-gated calcium channels by farnesol. *The Journal of biological chemistry* **274**, 25439-25446.
- Roulet JB, Xue H, Chapman J, McDougal P, Roulet CM & McCarron DA. (1996). Farnesyl analogues inhibit vasoconstriction in animal and human arteries. *The Journal of clinical investigation* **97**, 2384-2390.
- Rowat AC & Davis JH. (2004). Farnesol-DMPC phase behaviour: a (2)H-NMR study. *Biochimica et biophysica acta* **1661**, 178-187.
- Rowat AC, Keller D & Ipsen JH. (2005). Effects of farnesol on the physical properties of DMPC membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1713**, 29-39.
- Ruhnke M & Maschmeyer G. (2002). Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer -- review of the literature. *European journal of medical research* **7**, 227-235.
- Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F & Hicks JB. (1990). Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **172**, 1276-1283.
- Rustchenko E. (2007). Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS yeast research* **7**, 2-11.
- Sabie FT & Gadd GM. (1992). Effect of nucleosides and nucleotides and the relationship between cellular adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP) and germ tube formation in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **119**, 147-156.
- Saisho Y, Morimoto A & Umeda T. (1997). Determination of farnesyl pyrophosphate in dog and human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical biochemistry* **252**, 89-95.
- Samson J. (1990). [Oral candidiasis: epidemiology, diagnosis and treatment]. *Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie = Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia / SSO* **100**, 548-559.
- Sato T, Watanabe T, Mikami T & Matsumoto T. (2004). Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biological & pharmaceutical bulletin* **27**, 751-752.
- Sauer K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome biology* **4**, 219.
- Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C & Lopez-Ribot JL. (2003). Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryotic cell* **2**, 1053-1060.
- Scheper MA, Shirtliff ME, Meiller TF, Peters BM & Jabra-Rizk MA. (2008). Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers apoptosis in human oral squamous carcinoma cells. *Neoplasia (New York, NY)* **10**, 954-963.

- Schnuch A, Uter W, Geier J, Lessmann H & Frosch PJ. (2007). Sensitization to 26 fragrances to be labelled according to current European regulation. Results of the IVDK and review of the literature. *Contact dermatitis* **57**, 1-10.
- Segal E. (2005). *Candida*, still number one--what do we know and where are we going from there? *Mycoses* **48 Suppl 1**, 3-11.
- Semighini CP, Hornby JM, Dumitru R, Nickerson KW & Harris SD. (2006). Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Molecular microbiology* **59**, 753-764.
- Semighini CP, Murray N & Harris SD. (2008). Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS microbiology letters* **279**, 259-264.
- Seneviratne CJ, Jin L & Samaranayake LP. (2008a). Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral diseases* **14**, 582-590.
- Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, Abiko Y & Samaranayake LP. (2008b). *Candida albicans* biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities. *Proteomics* **8**, 2936-2947.
- Seo YW, Sanyal S, Kim HJ, Won DH, An JY, Amano T, Zavacki AM, Kwon HB, Shi YB, Kim WS, Kang H, Moore DD & Choi HS. (2002). FOR, a novel orphan nuclear receptor related to farnesoid X receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**, 17836-17844.
- Seol W, Choi HS & Moore DD. (1995). Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **9**, 72-85.
- Sharkey LL, McNemar MD, Saporito-Irwin SM, Sypherd PS & Fonzi WA. (1999). *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *Journal of bacteriology* **181**, 5273-5279.
- Shchepin R, Dumitru R, Nickerson KW, Lund M & Dussault PH. (2005). Biologically active fluorescent farnesol analogs. *Chemistry & biology* **12**, 639-641.
- Shchepin R, Hornby JM, Burger E, Niessen T, Dussault P & Nickerson KW. (2003). Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chemistry & biology* **10**, 743-750.
- Shea JM & Del Poeta M. (2006). Lipid signaling in pathogenic fungi. *Current opinion in microbiology* **9**, 352-358.
- Shepherd MG. (1990). Biology of *Candida* species. In *Oral candidosis*, ed. Samaranayake LP & MacFarlane TW, pp. 10-20. Wright, London.
- Shirtliff ME, Krom BP, Meijering RA, Peters BM, Zhu J, Scheper MA, Harris ML & Jabra-Rizk MA. (2009). Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2392-2401.
- Slutsky B, Buffo J & Soll DR. (1985). High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science (New York, NY)* **230**, 666-669.
- Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M & Soll DR. (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **169**, 189-197.

- Smith DA, Nicholls S, Morgan BA, Brown AJ & Quinn J. (2004). A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Molecular biology of the cell* **15**, 4179-4190.
- Soll DR. (1992). High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clinical microbiology reviews* **5**, 183-203.
- Soll DR. (2002). Phenotypic switching. In *Candida and candidiasis*, ed. Calderone RA, pp. 123-142. ASM Press, Washington, D.C.
- Soll DR. (2009). Why does *Candida albicans* switch? *FEMS yeast research* **9**, 973-989.
- Soll DR, Anderson J & Bergen M. (1991). The developmental biology of the white-opaque transition in *Candida albicans*. In *The molecular biology of Candida albicans*, ed. Prasad R, pp. 20-45. Springer-Verlag, Berlin.
- Soll DR, Langtimm CJ, McDowell J, Hicks J & Galask R. (1987). High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *Journal of clinical microbiology* **25**, 1611-1622.
- Soll DR, Lockhart SR & Zhao R. (2003). Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **2**, 390-397.
- Soll DR & Pujol C. (2003). *Candida albicans* clades. *FEMS immunology and medical microbiology* **39**, 1-7.
- Song JL & White TC. (2003). *RAM2*: an essential gene in the prenylation pathway of *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **149**, 249-259.
- Sonneborn A, Bockmuhl DP & Ernst JF. (1999a). Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infection and immunity* **67**, 5514-5517.
- Sonneborn A, Tebarth B & Ernst JF. (1999b). Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infection and immunity* **67**, 4655-4660.
- Sprague GF, Jr. & Winans SC. (2006). Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes & development* **20**, 1045-1049.
- Staib P & Morschhauser J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*--an enigmatic developmental programme. *Mycoses* **50**, 1-12.
- Stichternoth C & Ernst JF. (2009). Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida albicans*. *Applied and environmental microbiology* **75**, 3663-3672.
- Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE & Ernst JF. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *The EMBO journal* **16**, 1982-1991.
- Stoodley P, Debeer D & Lewandowski Z. (1994). Liquid Flow in Biofilm Systems. *Applied and environmental microbiology* **60**, 2711-2716.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG & Costerton JW. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187-209.
- Su Z, Osborne MJ, Xu P, Xu X, Li Y & Ni F. (2005). A bivalent dissectional analysis of the high-affinity interactions between Cdc42 and the Cdc42/Rac interactive binding domains of signaling kinases in *Candida albicans*. *Biochemistry* **44**, 16461-16474.

- Sudbery P, Gow N & Berman J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* **12**, 317-324.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE & Coleman DC. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology (Reading, England)* **141** (Pt 7), 1507-1521.
- Surette MG, Miller MB & Bassler BL. (1999). Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1639-1644.
- Swindell K, Lattif AA, Chandra J, Mukherjee PK & Ghannoum MA. (2009). Parenteral lipid emulsion induces germination of *Candida albicans* and increases biofilm formation on medical catheter surfaces. *The Journal of infectious diseases* **200**, 473-480.
- Taylor JW. (1995). Making the Deuteromycota redundant: a practical intergration of mitosporic fungi. *Canadian journal of botany* **73**, s754-s759.
- Tellier R, Krajden M, Grigoriew GA & Campbell I. (1992). Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1619-1625.
- ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W & de Groot PW. (2009). Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida biofilm* formation. *Journal of dental research* **88**, 105-115.
- Thomas DP, Bachmann SP & Lopez-Ribot JL. (2006). Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. *Proteomics* **6**, 5795-5804.
- Torosantucci A, Chiani P, De Bernardis F, Cassone A, Calera JA & Calderone R. (2002). Deletion of the two-component histidine kinase gene (*CHK1*) of *Candida albicans* contributes to enhanced growth inhibition and killing by human neutrophils in vitro. *Infection and immunity* **70**, 985-987.
- Tsuboi R, Ogawa H, Bramono K, Richardson MD, Shankland GS, Crozier WJ, Sei Y, Ninomiya J, Nakabayashi A, Takaiuchi I & et al. (1994). Pathogenesis of superficial mycoses. *J Med Vet Mycol* **32 Suppl 1**, 91-104.
- Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, de Gaetano Donati K, La Sorda M, Spanu T, Fadda G, Cauda R & Sanguinetti M. (2007). Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *Journal of clinical microbiology* **45**, 1843-1850.
- Unnanuntana A, Bonsignore L, Shirliff ME & Greenfield EM. (2009). The effects of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilms and osteoblasts. An *in vitro* study. *The Journal of bone and joint surgery* **91**, 2683-2692.
- Uppuluri P, Mekala S & Chaffin WL. (2007). Farnesol-mediated inhibition of *Candida albicans* yeast growth and rescue by a diacylglycerol analogue. *Yeast (Chichester, England)* **24**, 681-693.
- van het Hoog M, Rast TJ, Martchenko M, Grindle S, Dignard D, Hogues H, Cuomo C, Berriman M, Scherer S, Magee BB, Whiteway M, Chibana H, Nantel A & Magee PT. (2007). Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome biology* **8**, R52.
- Vargas K, Srikantha R, Holke A, Sifri T, Morris R & Joly S. (2004). *Candida albicans* switch phenotypes display differential levels of fitness. *Med Sci Monit* **10**, BR198-206.

- Waters CM & Bassler BL. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental biology* **21**, 319-346.
- Weber K, Schulz B & Ruhnke M. (2010). The quorum-sensing molecule E,E-farnesol-its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. *Yeast (Chichester, England)*.
- Weber K, Sohr R, Schulz B, Fleischhacker M & Ruhnke M. (2008). Secretion of E,E-farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Westwater C, Balish E & Schofield DA. (2005). *Candida albicans*-conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryotic cell* **4**, 1654-1661.
- Whiteway M & Bachewich C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annual Review of Microbiology* **61**, 529-553.
- Williams P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology (Reading, England)* **153**, 3923-3938.
- Williams SC, Patterson EK, Carty NL, Griswold JA, Hamood AN & Rumbaugh KP. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer enters and functions in mammalian cells. *Journal of bacteriology* **186**, 2281-2287.
- Wiseman DA, Werner SR & Crowell PL. (2007). Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **320**, 1163-1170.
- Yeater KM, Chandra J, Cheng G, Mukherjee PK, Zhao X, Rodriguez-Zas SL, Kwast KE, Ghannoum MA & Hoyer LL. (2007). Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology (Reading, England)* **153**, 2373-2385.
- Zopf W. (1890). *Die Pilze*. Verlag von E. Trewendt, Breslau.
- Zordan RE, Galgoczy DJ & Johnson AD. (2006). Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 12807-12812.
- Zordan RE, Miller MG, Galgoczy DJ, Tuch BB & Johnson AD. (2007). Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS biology* **5**, e256.

ANNEXE I

Composition du milieu de culture RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), sans bicarbonate de sodium et avec rouge de phénol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) :

Composantes	g/L
Nitrate de Calcium * 4 H ₂ O	0.1
Sulphate de Magnésium (anhydre)	0.04884
Chlorate de Potassium	0.4
Chlorate de Sodium	6.0
Phosphate Dibasique de Sodium (anhydre)	0.8
Acide Succinique * 4 H ₂ O * 2 Na	0.1
Acide Succinique (sans acide)	0.075
L-Arginine	0.2
L-Asparagine (anhydre)	0.05
L-Acide Aspartique	0.02
L-Cystéine * 2 HCl	0.0652
L-Acide Glutamique	0.02
Glycine	0.01
L-Histidine	0.015
Trans-4-Hydroxy-L-Proline	0.02
L-Isoléucine	0.05
L-Léucine	0.05
L-Lysine * HCl	0.04
L-Méthionine	0.015
L-Phénylalanine	0.015
L-Proline	0.02
L-Sérine	0.03
L-Thréonine	0.02
L-Tryptophane	0.005
L-Tyrosine	0.02
L-Valine	0.02
D-Biotine	0.0002
Bitartrate de Choline	0.00544
Acide Folique	0.001
myo-Inositol	0.035
Niacinamide	0.001
p-Acide Aminobenzoïque	0.001
D-Acide Pantothénique (hémicalcium)	0.00025
Pyridoxine * HCl	0.001
Riboflavine	0.0002
Thiamine * HCl	0.001
Vitamine B-12	0.000005
D-Glucose	2.0
Glutathione (réduite)	0.001
Rouge de Phénol * Na	0.00318

ANNEXE II

Alignement des séquences du récepteur FXR du poulet, de l'homme et de la souris :

Alignment Workspace of alignment FXR.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet) Page
 9 septembre, 2003 11:48

MGSXMN-----LIXHSHLXT---XDGFSXXEX--LFGXLTXXAGPLGONLDVEPYSOYNNVPPFOV
 10 20 30 40 50 60 70
 Chicken FXR p: MGSXMN-----LIGHPQLAT---ADGFLSABGPHLFGILSEPMSSPV-QEADVSPYTOYNSVPPFOV 58
 Human FXR rec: MGSXMN-----LIEHSHLPT---TDFSPFSEN--LFGVLTEQVAGPLGONLEVEPEYSQYNSVQFPQV 57
 Mouse recepto: MVMQFOGLENPFIQISLHSHRLSGFVDPDGMSVKP---AKGMLTEHAAGPLGONLDLESYSPYNNVPPFOV 67
 L₅ +

QPQISSSSYYSNLGFYPOQPEEWYSPGIYELRRMPAETLYQGETEVAEMPVTKKPRMG-ASAGRIKGDDEL
 80 90 100 110 120 130 140
 Chicken FXR p: QPQISSPPYYSNLGFYPPQHEEWYSPGMYELRRI PSETFFTREREIMDIPAAKKPRLG-HSTGRMKGEEL 127
 Human FXR rec: QPQISSSSYYSNLGFYPOQPEEWYSPGIYELRRMPAETLYQGETEVAEMPVTKKPRMG-ASAGRIKGDDEL 126
 Mouse recepto: QPQISSSSYYSNLGFYPOQPEDWYSPGIYELRRMPAETLYQGETEVAEMPVTKKPRMAAASAGRIKGDDEL 137

CVVOGDRASGYHYNALTCCEGCKGFFRRSITKNAVYKCKNGGNCVMDMYMRRKQCECRLRCKCKEMGMLAEC
 150 160 170 180 190 200 210
 Chicken FXR p: CVVOGDKASGYHYNALTCCEGCKGFFRRSITKNAVYKCKNGGNCVMDMYMRRKQCECRLRCKCKEMGMLAEC 197
 Human FXR rec: CVVOGDRASGYHYNALTCCEGCKGFFRRSITKNAVYKCKNGGNCVMDMYMRRKQCECRLRCKCKEMGMLAEC 196
 Mouse recepto: CVVOGDRASGYHYNALTCCEGCKGFFRRSITKNAVYKCKNGGNCVMDMYMRRKQCECRLRCKCKEMGMLAEC 207

FXR-F

LLTEIQCKSKRLRKNVKQHADQTVNED-SEGRDLRQVTSITTKXCREKTELTPDQQTLLDYIMDSYNKQRM
 220 230 240 250 260 270 280
 Chicken FXR p: LLTEIQCKSKRLRKNVKQLPDQTVNED-NEGHDMKQVTSITTKMYREKVEFTPEQQNLLDYIMDSYSKQOI 266
 Human FXR rec: LLTEIQCKSKRLRKNVKQHADQTVNED-SEGRDLRQVTSITTKSCREKTELTPDQQTLLHFDIMDSYNKQRM 265
 Mouse recepto: LLTEIQCKSKRLRKNVKQHADQTVNEDSEGRDLRQVTSITTKFCREKTELTPDQQTLLDYIMDSYNKQRM 277

PQEITNKILKEEFSAEENFLILTEMATSHVQVLVEFTKKLPGFQITLDHEDQIALLKGSAAVEAMFLRSAEI
 290 300 310 320 330 340 350
 Chicken FXR p: PQEVSKLLHEEFSABGNFLILTEMATSHVQVLVEFTKKLPGFQITLDHEDQIALLKGSAAVEAMFLRSAEI 336
 Human FXR rec: PQEITNKILKEEFSAEENFLILTEMATSHVQVLVEFTKKLPGFQITLDHEDQIALLKGSAAVEAMFLRSAEI 335
 Mouse recepto: PQEITNKILKEEFSAEENFLILTEMATSHVQVLVEFTKKLPGFQITLDHEDQIALLKGSAAVEAMFLRSAEI 347

FNKKLPXGHXDLLEERIRNSGISDEYITPMFSPYKSIGELKMTQEEYALLTAIVILSPDRQYIKDREAVE
 360 370 380 390 400 410 420
 Chicken FXR p: FSRKLPIGHIVLLEERIRNSGISDEYITPMFSPYKSIGELKMTQEEYALLTAIVILSPDRQYIKDRESVE 406
 Human FXR rec: FNKKLPXGHXDLLEERIRNSGISDEYITPMFSPYKSIGELKMTQEEYALLTAIVILSPDRQYIKDREAVE 405
 Mouse recepto: FNKKLPAGHADLLEERIRKSGISDEYITPMFSPYKSVGELKMTQEEYALLTAIVILSPDRQYIKDREAVE 417

FXR-R

KLOEPLLDVLOKLCXHPENPQHFACLLGRITELRTFNHHAEMLSWRVNDHKFTPLLCEIWDVQ
 430 440 450 460 470 480
 Chicken FXR p: RLQEPFLDILQKFKLHHPDNPQHFACLLGRITELRTFNHHAEMLSWRVNDHKFTPLLCEIWDVQ 473
 Human FXR rec: KLOEPLLDVLOKLCXHPENPQHFACLLGRITELRTFNHHAEMLSWRVNDHKFTPLLCEIWDVQ 472
 Mouse recepto: KLOEPLLDVLOKLCXHPENPQHFACLLGRITELRTFNHHAEMLSWRVNDHKFTPLLCEIWDVQ 484

ANNEXE IV

Affiche présentée dans le cadre du 75^e Congrès de l'Association Francophone pour le Savoir (7-11 Mai 2007, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada):

La RÉPONSE au FARNÉSOL – MOLÉCULE de "QUORUM SENSING" – chez *Candida albicans*

Cristina Irimescu*, Stéphane Roy, Jacynthe Séguin, Sophie Desmeules, Jean Barbeau

Département de Stomatologie, Faculté de Médecine Dentaire



Université de Montréal

*Personne à contacter
Téléphone: (514) 343 2374
Télécopieur: (514) 343 2333
cristina.irimescu@umontreal.ca

RÉSUMÉ

Candida albicans, la levure opportuniste la plus commune, peut subir des transitions morphologiques entre la forme blastospore et la forme hypha, jouant un rôle dans sa pathogénicité. Le farnésol, un lipide endogène produit par *C. albicans*, est une molécule de "quorum sensing" qui inhibe cette transition morphologique. Son mécanisme d'action demeure encore peu connu. Nous avons identifié 19s souches cliniques qui répondent faiblement au farnésol. On pense que la différence de la réponse au farnésol entre les répondeurs (type sauvage) et les faibles répondeurs pourrait être expliquée par des variations au niveau transcriptionnel de certains gènes (*CHIK1*, *OPH1*, *IST2*, *GAP1*) et le gène de la famille *Y* (*YJL007*). Pour tester notre hypothèse l'ARN a été extrait des répondeurs et des faibles répondeurs après 4 heures d'incubation en présence ou en absence de 30 µM de farnésol. Le niveau transcriptionnel des gènes ciblés a été déterminé par RT-PCR semi-quantitatif. Des analyses comparatives de microarrays ont été aussi réalisées entre deux répondeurs. Le niveau transcriptionnel des gènes sélectionnés ne varie pas significativement suite les répondeurs et les faibles répondeurs mais des études additionnelles sont présentement conduites pour compléter ce résultat. L'analyse des microarrays a révélé des gènes surreprésentés et réprimés impliqués dans une variété de fonctions mais la grande majorité demeure inconnus ou non caractérisés.

* Les résultats récents ne démontrent aucune variation au niveau transcriptionnel des gènes sélectionnés suite au traitement par le farnésol, mais une répression significative du gène *CHIK1* a été observée chez les faibles répondeurs.

INTRODUCTION

- *C. albicans* est une levure dimorphique pathogène opportuniste.
- *C. albicans* est capable de former des biofilms, augmentant ainsi sa pathogénicité.
- Le farnésol est une molécule de "quorum sensing" chez *C. albicans*.
- Le farnésol prévient le développement du mycélium (1) et inhibe la formation de biofilms (2).
- Le mécanisme de signalisation du farnésol chez *C. albicans* est inconnu.
- Des mutants déficients pour le gène d'inhibiteur kinase Chik1 de système à deux composants sont résistants à la répression de la filamentation et de la formation de biofilms induite par le farnésol (3).
- Le farnésol réprime les gènes *OPH1*, *IST2* and *GAP1*, composants essentiels dans la voie des MAP-kinases qui régule la morphogénèse (4).
- Ras1 régule la voie de signalisation des MAP-kinases et aussi celle de l'AMP cyclique (5), contrôlant ainsi la transition morphologique de *C. albicans*.
- Ras1 est fonctionnellement inégalement après farnésolisation par la famille *Y* transcrits.
- 30% des isolats cliniques ont été identifiés comme des "faibles répondeurs" quant à la transition morphologique induite par le farnésol.
- On s'est interrogé pourquoi il y a des différences entre les répondeurs et les faibles répondeurs au niveau de l'expression des gènes *CHIK1*, *OPH1*, *IST2*, *GAP1* et du gène de la famille *Y* transcrits sous contrôle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches de *C. albicans* répondeurs (isolat clinique BL007, référence ATCC® 10231), faibles répondeurs (référence ATCC® 30022).

Préparation des cellules : pré-culture de 18 heures dans le bouillon YPD, lavage soigné.

Conditions d'incubation : 37°C, 2-5% CO₂, humidité, sans agitation.

Estimation de la croissance planctonique et de la formation de biofilms : plaques à 24 puits, 10⁶ cellules/ml, milieux de culture RPMI-1640 avec ou sans 30 µM farnésol, estimation de la croissance par mesure de la DO_{600nm}, quantification de la biomasse du biofilm par coloration au crystal violet.

Extraction de FARN : incubation pendant 4 heures dans le milieu RPMI-1640 avec ou sans 30 µM farnésol (10⁶ cellules/ml), technique du solide d'Oliva - phénol charni.

RT-PCR semi-quantitatif : des analyses spécifiques ont été conduites à l'aide du logiciel Primer3 pour amplifier des fragments dans chaque gène, *ACT1* - contrôle interne.

Analyses des microarrays : le marquage de FADN, hybridation et l'acquisition des données ont été réalisés chez RT-PCR. Les données ont été converties numériquement en analyses, les gènes ont été identifiés grâce The Clustal-Genome Database.

REFERENCES

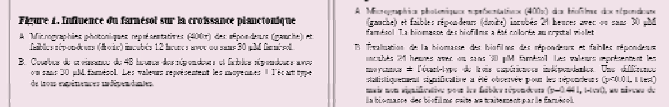
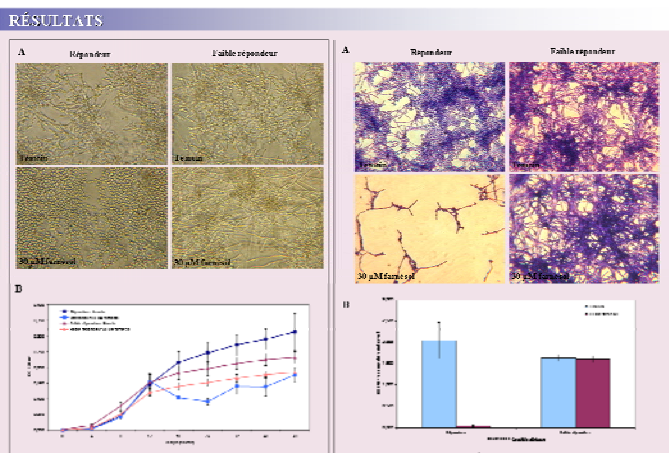
1. Jorgensen JM, Archer G, Lee AD, Tarr PI, Abble D, Stenseth R, Dierckx H & Holmberg K (2003) *Antifungal Activity* 31: 200-209.
2. Zhang G, Goulet G, P. Wain, D.L & Lopez-Ribot JL (2002) *Appl Environ Microbiol* 68: 5657-5663.
3. Roy S, Kim B.T., Chaudhri N., Bhatnagar, V., Chik, R.L. & Gaitanaris R.A. (2005) *Molecular Cell* 2: 100-107.
4. Sun T, Watanabe T, Mikami T & Mizukawa T. (2003) *Biol Pharm* 18: 731-732.
5. Lohmeijer H, Garcia D, Ingaret D, Johnson L, Ullrich S, Thomas D et al. *Microbiol Cell* 4: 473-481.
6. Barbeau J, & Irimescu C (2006) *Antifungal Cell* 4: 220-229.

REMERCIEMENTS

Je remercie notamment M. Jean Barbeau pour son aide avec l'analyse bioinformatique et Anzela G. Méthé, Thérèse Kelly et Tania Chouh pour leur aide technique.

CONCLUSIONS

1. Le farnésol prévient le développement du mycélium des répondeurs mais il n'a aucun effet sur l'inhibition de la germination des faibles répondeurs. Les souches de *C. albicans* faibles répondeurs croissent moins vite que les répondeurs. Le farnésol ralentit la croissance des répondeurs (environ 50% d'inhibition) et des faibles répondeurs (environ 20% d'inhibition).
2. Le farnésol inhibe à 95% la formation des biofilms des répondeurs mais il n'a aucun effet sur les biofilms des faibles répondeurs. Le ralentissement de la croissance planctonique en présence de farnésol n'explique pas entièrement l'inhibition de la formation des biofilms des répondeurs.
3. Les résultats préliminaires ne montrent aucun effet significatif du farnésol sur l'expression des gènes sélectionnés autant pour les répondeurs que pour les faibles répondeurs. *CHIK1* est réprimé chez les faibles répondeurs ce qui confirme la participation de la famille du système à deux composants dans le quorum sensing médié par le farnésol (3). *IST2* et *FTa* semblent aussi être réprimés chez les faibles répondeurs.
4. Les résultats préliminaires de l'analyse des microarrays confirment l'induction du *YJL007* par le farnésol (6). *BLT1* a été trouvé réprimé par le farnésol comme rapporté précédemment (6). Cependant, *PCL2* est vu comme réprimé contrairement aux résultats publiés (6).
5. Le farnésol régule le quorum sensing par une voie complexe qui implique directement ou indirectement la protéine Chik1 du système à deux composants. Le développement des inhibiteurs du système à deux composants pourrait être une nouvelle stratégie dans le traitement des candidoses.



Microarray: Sélection des gènes des répondeurs montrant une différence d'expression suite au traitement par le farnésol

Souches	Fonction, processus biologique (gène)	Niveau d'expression
BL007 et ATCC® 10231	Aryl-alcool déhydrogénase, réponse aux drogues (<i>YJL007</i>)	1.77 ± 0.51
	Cytochrome P450 hépatocytaires, cycle cellulaire (<i>YJL007</i>)	0.51 ± 0.09
	Inconnue, méiose (<i>YJL007</i>)	0.47 ± 0.09
BL007	Protéines de choc thermique, repliement des protéines (<i>YJL007</i>)	2.24 ± 0.06, 1.83 ± 0.21
	Protéine putative à cluster de zinc, transcription (<i>YJL007</i>)	1.91 ± 0.76
	Fonctions métaboliques (<i>YJL007</i> , <i>YJL007</i>)	0.36 ± 0.03, 0.43 ± 0.07
	Alpha-1,3-mannoglycosyltransférase, processus de la paroi cellulaire (<i>YJL007</i>)	0.90 ± 0.067
	Troisième de la paroi cellulaire ressemblant à l'AMP, pathogénicité (<i>YJL007</i>)	0.96 ± 0.178
ATCC® 10231	Fermentation putative des sucres amorphes, transport des sucres amorphes (<i>YJL007</i>)	0.39 ± 0.042
	Réductase putative du ribonucleodiphosphate, réplication de l'ADN (<i>YJL007</i>)	0.12 ± 0.022

*Des valeurs > 1.05 ou < 0.75 signifient que les gènes ont été respectivement surreprésentés ou réprimés dans les cellules traitées avec du farnésol versus les cellules des mêmes souches. Les valeurs représentent les moyennes ± l'écart-type de deux expériences indépendantes.

ANNEXE V

Affiche présentée dans le cadre de la 9^{ème} Conférence Internationale sur *Candida* et Candidoses organisée par *The American Society for Microbiology* (24-28 Mars 2008, New Jersey, États-Unis) :

INVESTIGATIONS ON FARNESOL LOW-RESPONSIVENESS IN *Candida albicans* :

INFLUENCE OF CO₂, TEMPERATURE AND EXPRESSION OF SELECTED GENES

Corresponding author
Phone (514) 343-2366
Fax (514) 343-2233
jean.barbeau@umontreal.ca

Cristina Irimes, Jacynthe Séguin, Stéphanie Roy, Jean Barbeau*

Département de Stomatologie, Faculté de Médecine Dentaire

*Corresponding author
Phone (514) 343-2366
Fax (514) 343-2233
jean.barbeau@umontreal.ca

ABSTRACT: A switchable feature of *Candida albicans* is its ability to switch between the yeast form and the filamentous form. This morphological transition is regulated by many environmental and chemical signals including temperature, carbon dioxide and oxygen tension. These conditions are transduced into a change in morphology via a network of signal transduction pathways. Ras1 is an important regulator of transition and is functional only after being preactivated by farnesyltransferase (FT). Farnesol, a quorum sensing molecule, has been shown to also be a regulator of morphogenesis by inhibiting filamentation. Farnesol is produced in the steroid pathway after dephosphorylation of farnesyl pyrophosphate by Dpp3 phosphatase. Currently little is known about farnesol's mechanism of action. A two-component signal transduction pathway may be involved, because mutants lacking the histidine kinase gene *CHK1* were shown to be refractory to farnesol inhibition. Our previous work identified two clinical isolates that were unable to respond to farnesol in cell and colony morphology assays. **Objective:** Our goal is to better understand *C. albicans* response to farnesol inhibition in natural isolates and *Yeast* mutants. **Methods:** We analyzed the influence of temperature (room temperature and 37°C) and CO₂ level (0% and 2.5%) on the transition of room temperature and 37°C grown cells to filamentous forms. We also tested the colony morphology of *Yeast* mutants lacking the histidine kinase gene *CHK1* and the phosphatase gene *DPP3* in the presence of farnesol. **Results:** At room temperature all strains had smooth colonies and 100% blastospores in liquid culture. At 37°C, NR displayed a hairy colony phenotype while R showed a smooth phenotype. With 2.5% CO₂ all strains had hairy colonies. In liquid culture at 37°C with or without CO₂, R germinated extensively over the first 4 hours and afterwards hyphal development was inhibited. On the other hand, NR retained a constant 80-100% filamentous forms over the 48 hours. When exogenous farnesol was added, only R showed an inhibition of filamentation and of the hairy colony phenotype. Compared with the expression level of *fts*, one of the two NRs has a 3.8-fold decrease in the expression of *CHK1* while the other refractory to farnesol NR has a 1.6-fold increase in *DPP3*. No important differences between R and NR were seen in the level of *fts*. **Conclusions:** Our results suggest that the two NR display different molecular profiles. Furthermore, NR's hyperfilamentous phenotype could be a cause or a consequence of their refractory response to farnesol.

INTRODUCTION

> *C. albicans* undergoes a morphological transition between the yeast form (blastospore) and the filamentous forms (pseudohyphae and hyphae).

> The morphological transition is regulated by many factors such as temperature, CO₂ level and oxygen tension.

> Farnesol is a quorum sensing molecule that prevents the yeast-to-filamentous transition.

> The mechanism by which farnesol is sensed by *C. albicans* is currently unknown.

> Farnesol is produced after dephosphorylation of farnesyl pyrophosphate by Dpp3 phosphatase.

> Mutants defective in the two-component signal transduction histidine kinase *CHK1* are resistant to farnesol suppression of filamentation.

> GTPase Ras1 regulates the morphological conversion, but has to be farnesylated by farnesyltransferase to be functional.

> We identified 2 clinical isolates (Non Responders) that did not respond to farnesol-induced morphological transition.

> The farnesol response of these two isolates is different from that of the wild type and we determined their expression profiles of *DPP3*, *CHK1* and farnesyltransferase.

METHODS

***C. albicans* strains:** Responders (BL007 – and oxidants, LAM1 – blood systemic candidosis), Non Responders (ATCC® 9880 – serotype B, IHM1 – denture stomatitis).

Cell preparation: overnight pre-culture in YPD medium, sterile wash.

Inoculation conditions: Room temperature, 37°C, 37°C + 2.5% CO₂, humidity, no agitation.

Colony morphology evaluation: 250 cells/plate, RPMI 1640 medium with or without 30 µM farnesol, 48 h incubation.

Estimation of filamentous forms: 24 well plates, 10⁷ cells/ml, RPMI 1640 medium with or without 30 µM farnesol, 48 h incubation, light microscopy counts every 4 h.

RNA extraction: 4 h incubation in RPMI 1640 medium at 10⁷ cells/ml, Ottawa and-lyt phenol RNA extraction, DNase I treatment.

Semi-quantitative Reverse Transcription – PCR: specific primers designed to amplify a fragment region in each gene, number of cycles for a linear amplification determined, *EFB1* – internal control.

REFERENCES

1. Hoots TM, Jones E.C., Lee A.D., Diaz J.J., Janda R., Stummgen R., Daniels P. & Nisbetson K.W. (2001) *Appl Environ Microbiol* 67: 2982-2985.

2. Barbeau J, Irimes C, Séguin J, Roy S, Veilleux N, Veilleux A, Drouin G.E. & Nisbetson K.W. (2007) *Appl Environ Microbiol* 73: 1893-1898.

3. O'Rourke M, Jones E.C., Stummgen R., Nisbetson K.W. (2003) *Appl Environ Microbiol* 69: 3366-3369.

4. Leberer E, Heres D, Diepold D, Johnson L, Ulanovsky S, Thomas D.Y.R. & Schoppa K. (2001) *Mol Microbiol* 42: 67-68.

CONCLUSIONS

1. Culture morphology evaluation: at room temperature all strains displayed smooth colonies and at 37°C with 2.5% CO₂ they all had hairy colonies. Only at 37°C in absence of CO₂ there was a difference between Responders and Non Responders: Responders had smooth colonies while Non Responders displayed hairy ones. When 30 µM farnesol was added, only Responders showed an inhibition of the hairy colony phenotype.

2. Estimation of filamentous forms in liquid culture: at room temperatures all strains grew as blastospores. In all incubation conditions (i.e. farnesol, 37°C, CO₂) Non Responders retained a constant 80-100% filamentous forms. On the other hand, Responders germinated extensively over the first 4 h (70-90% filamentous forms) and afterwards hyphal development was inhibited to 0% at 37°C, and to 50% at 37°C with CO₂. In presence of exogenous farnesol, Responders showed a complete inhibition of filamentation. Data of liquid culture support results obtained in solid media.

3. *CHK1* and *DPP3* expression profiles: Responders and Non Responders displayed different expression profiles. In Responders and Non Responders, *fts* expression was expressed at same levels as in Responders and was even upregulated in Non Responders. ATCC® 9880 (76.4% increase of expression in comparison with Responders BL007). Only Non Responders IHM1 showed a defect in farnesyl transferase because *DPP3* was expressed at same levels as in Responders and was even upregulated in Non Responders. ATCC® 9880 (76.4% increase of expression in comparison with Responders BL007). Only Non Responders IHM1 showed a defect in *CHK1* expression level (38.4% decrease compared with BL007 in both). Farnesyl transferase was expressed equally in Responders and Non Responders.

4. Results show that the two natural farnesol Non Responders display different molecular profiles. These strains are not permanently filamentous. The difference seen between Responders and Non Responders at 37°C suggests that farnesol may override the filamentation process or the yeast, that a hyperfilamentous phenotype confer to a refractory response to farnesol. Present data bring new insight into the complex pathway that regulates the morphological transition in *C. albicans*.

INFLUENCE OF TEMPERATURE AND CO₂ LEVEL ON COLONY MORPHOLOGY AND GERMINATION

Percentage of filamentous forms at 37°C

Percentage of filamentous forms at 37°C + 2.5% CO₂

GENE EXPRESSION PROFILES

Gene transcript quantity was measured by semi-quantitative RT-PCR after 48 h incubation in absence of farnesol, at 37°C with 2.5% CO₂. RT-PCR values are presented as a ratio of the specified gene's signal in the selected time amplification cycle divided by the *EFB1* signal (internal control). Data represent mean values ± SD of three independent experiments. Statistically significant differences (Student's *t* test) are indicated as follows: (*) *P* < 0.05, (**) *P* < 0.01.

ANNEXE VI

Article-note écrit en vue de publication dans la revue *Canadian Journal of Microbiology*:


Human clinical isolates of *Candida albicans* reveal 2% of natural farnesol non-responders

Cristina Irimes, Jacynthe Séguin, Jean-François Ross, and Jean Barbeau

Cristina Irimes. Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Montreal, P.O. Box 6128, Centre-ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada (e-mail: [REDACTED]).

Jacynthe Séguin. Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Montreal, P.O. Box 6128, Centre-ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada (e-mail: [REDACTED]).

Jean-François Ross. Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Montreal, P.O. Box 6128, Centre-ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada (e-mail: [REDACTED]).

Corresponding author: Jean Barbeau. Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Montreal, P.O. Box 6128, Centre-ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada (telephone: (514) 343-2366, fax: (514) 343-2233, e-mail: ).

Candida albicans, the most common human fungal pathogen, can adapt to different environmental conditions, thus causing a wide variety of opportunistic infections (Segal 2005). Being able to form biofilms on different substrates, *C. albicans* represents a problem for medical treatment due to the resistance of biofilm cells to antifungal therapy (Douglas 2003). An important feature of *C. albicans* is its ability to grow as yeast (blastospores), pseudohyphae or hyphae. In response to different environmental signals such as temperature, pH and CO₂ (Mock et al. 1990; Odds 1988), the dimorphic pathogen can undergo a morphological transition between the yeast form and the hyphal and pseudohyphal forms. The morphological transition is associated with virulence (Bendel et al. 2003) and biofilm development (Baillie and Douglas 1999). Quorum sensing is another signal that regulates the morphological transition. Farnesol, a 15-carbon isoprenoid naturally produced in the ergosterol biosynthetic pathway, was identified by Hornby et al. (2001) as an extracellular quorum sensing molecule in *C. albicans*. Farnesol was found to prevent the yeast-to-mycelium conversion *in vitro*, without affecting cell growth (Hornby et al. 2001) and to inhibit biofilm formation (Ramage et al. 2002). Furthermore, recent *in vivo* studies suggest that farnesol may represent a virulence factor in *C. albicans* (Navarathna et al. 2007). The mechanisms by which farnesol mediates its effects are not yet characterized.

Since the morphological transition appears critical for *C. albicans* pathogenicity, it is important to understand its regulation by farnesol. Jensen et al. (2006) found different farnesol responses on solid cultures, in a collection of *C. albicans* mutants produced *in vitro*. Accordingly, to obtain a broader perspective on farnesol-mediated quorum sensing, we investigated the farnesol response in a collection of human clinical isolates.

A total of 100 *C. albicans* strains were isolated from 6 different human body sources, from either healthy subjects or patients with denture stomatitis or candidosis (Table 1). Six *C. albicans* ATCC[®] reference strains (ATCC[®], Manassas, VA) were also included in the study. All strains were identified based on the serum germ tube test, the growth on CHROMagar[®] (CHROMagar, Paris, France) selective medium and the fermentation and assimilation profiles on API 20 C AUX[®] (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Isolates were maintained on Sabouraud Dextrose (SD) agar (BD, Sparks, MD) stored at 4°C. Cells were pre-cultured overnight in yeast peptone dextrose broth (YPD: 1% yeast extract, 2% dextrose, 2% trypticase peptone) (BD, Sparks, MD), in a humid atmosphere at 37°C, in presence of 2.5% CO₂, without agitation. All *C. albicans* strains grew in the budding-yeast phase under these conditions. Cells were then washed twice in 0.85% NaCl and counted with a hemacytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA). All isolates were plated at 250 cells/plate and grown 48 h at 37°C in a humid 2.5% CO₂ atmosphere on different solid media (2% agar): SD, trypticase yeast extract (TYE: 0.3% yeast extract, 1.7% trypticase peptone, 0.5% NaCl, 0.25% Na₂HPO₄), R2A (low nutriment media used to culture waterborne bacteria (Reasoner and Geldreich 1985)) (Difco, Detroit, MN) and Lee's medium (Lee et al. 1975). The strains expressed spontaneous hairy colony phenotypes, ranging from 0 to 100% of the colonies, easily visible on TYE and R2A (Figure 1). Lower hairy colony phenotype levels were observed on Lee's medium and none on SD. Isolates from candidosis condition expressed a higher median proportion of spontaneous hairy colony phenotype (97.2%) than healthy (0.30%) and denture stomatitis (0.45%) categories. Different conditions of incubation were also tested (Table 2) and showed that all strains produced hairy colonies

when incubated at 37°C in a humid atmosphere, in presence of 2.5% CO₂. In absence of CO₂, only the 2 farnesol non-responders expressed a hairy colony phenotype.

To evaluate the strains' response to farnesol, pre-cultured cells were grown 48 h at 37°C with 2.5% CO₂ on TYE agar plates (250 cells/plate) containing 0, 3, 30, 60, 90, 120 and 300 µM *trans,trans*-farnesol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Farnesol concentrations higher than 90 µM inhibited completely the growth of all strains (data not shown). Smooth colony phenotype was expressed in 104 of *C. albicans* isolates, in presence of 30 µM farnesol. These strains were classified as "farnesol responders" (Table 1). Two strains, ATCC[®]36802 (serotype B) and HM1 isolated from a denture stomatitis swab (dental clinic of Laval University), expressed a 100% hairy colony phenotype even when 60 µM farnesol was added to the agar plates. These strains were classified as "farnesol non-responders" (Table 1). Farnesol responders regained and farnesol non-responders retained the hairy colony phenotype, when were replica plated by filter paper imprints, from solid TYE with 30 µM farnesol onto TYE without farnesol. Farnesol non-responders were not permanently filamentous: we obtained blastospores in YPD broth used for pre-culture, smooth colonies on all solid media when incubated at room temperature (Table 2) and on SD agar even at 37°C with CO₂ (Figure 1).

We conducted more extensive studies on the farnesol response with the 2 farnesol non-responders and 2 farnesol responders that show a high frequency of hairy colony phenotype expression: BL007 isolated from an oral candidosis swab (dental clinic of University of Montréal) and LAM1 from a blood systemic candidosis (Lacasse et al. 1990). Three different aspects of farnesol response were studied: phenotype expression of colonies on solid culture, cell germination and morphological transition in liquid culture and biofilm formation. All cultures were performed in triplicate in three

independent experiments. Three different culture media were tested: TYE, R2A and RPMI 1640 (supplemented with L-glutamine and buffered to pH 7.0 with morpholinepropanesulfonic acid (MOPS)) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Farnesol concentration added was set to 30 μ M and incubation conditions 37°C, humid atmosphere, 2.5% CO₂, no agitation. Cells were pre-cultured overnight in YPD broth and washed with 0.85% NaCl before each study.

Solid culture: To evaluate the colony phenotype expression, cells were grown 48 h at 250 cells/plate. The same response to farnesol as described previously with TYE agar was seen with the 2 other media: numbers of colony-forming units and levels of phenotype expression were similar (Figure 2 A).

Liquid culture: To evaluate the effect of farnesol on germination, cells were grown for 48 h at 10⁵ cells/mL. The percentages of yeast cells, pseudohyphae and hyphae were determined every 4 h by light microscopy (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), based on counts of 500 cells. After 4 h incubation, farnesol responders contained more than 90% hyphae and pseudohyphae in the absence of farnesol and less than 10% in the presence of farnesol. For farnesol non-responders, more than 90% hyphae and pseudohyphae were seen both in presence and absence of farnesol. The yeast/hyphae ratio remained unchanged for all *C. albicans* strains, up to 48 h incubation and in all culture media tested (Figure 2 B). The farnesol non-responder strain HM1 grew very slowly in RPMI 1640.

Biofilm formation: To evaluate the influence of farnesol on biofilm formation, 100 μ L of 10⁵ cells/mL pre-cultured cell suspensions were inoculated into individual wells of polystyrene 96-well microtiter plates (Corning Inc., Corning, NY). Farnesol was added at time zero and biofilms were allowed to develop for 24 h. A farnesol free control was

used and wells with media and no cells were included as blank wells. Following incubation, the medium was aspirated and wells were washed three times with sterile water to eliminate non adherent cells. Biofilm biomass was assessed semi-quantitatively by crystal violet (CV) staining (Li et al. 2003) as such: biofilms were air-dried, 200 μ L of 0.3% CV dye solution (BD, Sparks, MD) was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. After rinsing under running water, the dye was extracted using a 10% acetic acid – 40% methanol solution (200 μ L/well) and the absorbance of extracted dye was read at 570 nm using a microtiter plate reader (AD340, Beckman Coulter Inc., Fullerton, Canada). Biofilm metabolic activity was evaluated by 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) reduction assay as previously described (Ramage et al. 2001; Tellier et al. 1992). Briefly, 100 μ L of XTT-menadione solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were added to each well of wet pre-washed biofilm. After 2 h of incubation in the dark at 37°C and 2.5% CO₂, the reduction of XTT was measured at 492 nm. Statistical analyses were performed using SYSTAT 11 and SPSS 15. ANOVA tests were used to evaluate data. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

In TYE broth, none of the strains was able to form significant quantities of biofilms (data not shown). In RPMI 1640, a medium generally used to evaluate *C. albicans* biofilms (Cao et al. 2005; Ramage et al. 2002), all strains produced important quantities of biofilms except for HM1 (due to very poor growth as mentioned previously) (Table 3). R2A was the only medium tested where all strains formed important quantities of biofilms. Farnesol non-responders showed a biofilm metabolic activity two-fold higher than farnesol responders in this medium ($P < 0.01$, Table 3). Regarding the biofilm architecture, in RPMI 1640 the biofilms were composed of intertwining hyphae and

blastospores whereas in R2A they contained almost exclusively mycelial structures (Figure 2 C). The number of yeast cells seen in biofilms was always higher with farnesol responders than farnesol non-responders. In presence of farnesol, both CV staining and XTT reduction assays showed important inhibition of biofilm formation for farnesol responders, with greater decrease in biomass than metabolic activity (Table 3). Similar results were obtained with both culture media. For farnesol non-responders, no inhibition of biofilm formation was seen in presence of farnesol, in all media and with both evaluation methods used. Reference strain ATCC[®]36802, in RPMI 1640, showed a 35% increase ($P < 0.05$) in biofilm formation in presence of farnesol (Table 3). The data on biofilm formation support the observed effects of farnesol on germination and colony morphology (Figure 2). Because the farnesol non-responder strain HM1 wasn't able to form an important quantity of biofilm in RPMI 1640 and since the results obtained with the other strains were similar in RPMI 1640 and R2A, we considered R2A the most appropriate medium to study the biofilms of our *C. albicans* clinical isolates.

Li et al. (2003) described a significant correlation between the CV staining method and the XTT reduction assay when quantifying *C. albicans* biofilms from various natural sources. Contrary to Li et al., we obtained no significant correlation between the two evaluation methods of biofilm formation, except for LAM1 in RPMI 1640 medium ($R^2 = 0.699$, $P < 0.05$, Table 3). According to Kuhn et al. (2002) this result could be explained by the presence/absence of the blastospore layer, differences in metabolic rates among cell types and the amount of extracellular matrix. While XTT estimates the metabolic activity of cells, CV can stain both active and inactive cells and the matrices in mature biofilms.

We studied three different aspects of farnesol response (colony morphology, cell germination and biofilm formation) in 106 *C. albicans* isolates from human clinical sources and found that 2% of strains do not respond to farnesol. In presence of farnesol, the farnesol non-responders expressed no change in the hairy colony phenotype, showed no inhibition of yeast-to-mycelium conversion and of biofilm formation, although they formed smooth colonies at room temperature and on SD agar. These results suggest that different signals/molecules may be involved in the regulation of germination and that some "natural" strains of *C. albicans* show altered response to the quorum sensing molecule farnesol.

Unresponsiveness to farnesol may be associated to higher virulence or better ability to colonize tissues. Farnesol non-responders could have functional alterations in a critical farnesol receptor or a signal transduction pathway mediated by farnesol. For instance, they could present variations in the expression of *CHK1* since mutants lacking both copies of this gene were shown to be refractory to farnesol inhibition of germination and biofilm formation (Kruppa et al. 2004). Farnesol non-responders could also have a defect in farnesol production and thus show variation in the expression of *DPP3* (Navarathna et al. 2007). Since farnesol non-responders were the only isolates to express a hairy colony phenotype when incubated at 37°C without CO₂, they may have mutations in the pathway activated by these environmental conditions.

Farnesol non-responders represent a valuable tool in the quest to understand the complex signaling pathway orchestrated by farnesol. Further characterization of these isolates at molecular level is currently being pursued in our laboratory. Quorum sensing inhibitors in bacteria have been shown to be a successful approach against biofilm formation (Hentzer and Givskov 2003). Thus, the development of new antifungal strategies based

on quorum sensing phenomenon is an attractive concept but has to take into account the fact that 2% of clinical isolates may be farnesol non-responders and that farnesol acts also as a virulence factor (Navarathna et al. 2007).

Acknowledgements

Many thanks to Mr. Pierre Rompré for help with data statistic analysis, to Dr. Noëlla Deslauriers (Laval University) and Dr. Benoit Lalonde (University of Montreal) for clinical strains and samples, and all volunteers for their contributions to the collection of samples.

References

- Baillie, G.S., and Douglas, L.J. 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol*, **48**: 671-679.
- Bendel, C.M., Hess, D.J., Garni, R.M., Henry-Stanley, M., and Wells, C.L. 2003. Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice. *Crit Care Med*, **31**: 501-507.
- Cao, Y.Y., Cao, Y.B., Xu, Z., Ying, K., Li, Y., Xie, Y., Zhu, Z.Y., Chen, W.S., and Jiang, Y.Y. 2005. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**: 584-589.
- Douglas, L.J. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, **11**: 30-36.
- Hentzer, M., and Givskov, M. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*, **112**: 1300-1307.

- Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisee, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., and Nickerson, K.W. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 2982-2992.
- Jensen, E.C., Hornby, J.M., Pagliaccetti, N.E., Wolter, C.M., Nickerson, K.W., and Atkin, A.L. 2006. Farnesol restores wild-type colony morphology to 96% of *Candida albicans* colony morphology variants recovered following treatment with mutagens. *Genome*, **49**: 346-353.
- Kruppa, M., Krom, B.P., Chauhan, N., Bambach, A.V., Cihlar, R.L., and Calderone, R.A. 2004. The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, **3**: 1062-1065.
- Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., and Ghannoum, M.A. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*, **70**: 878-888.
- Lacasse, M., Fortier, C., Trudel, L., Collet, A.J., and Deslauriers, N. 1990. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. *J Oral Pathol Med*, **19**: 136-141.
- Lee, K.L., Buckley, H.R., and Campbell, C.C. 1975. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, **13**: 148-153.
- Li, X., Yan, Z., and Xu, J. 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, **149**: 353-362.
- Mock, R.C., Pollack, J.H., and Hashimoto, T. 1990. Carbon dioxide induces endotrophic germ tube formation in *Candida albicans*. *Can J Microbiol*, **36**: 249-253.

- Navarathna, D.H., Hornby, J.M., Krishnan, N., Parkhurst, A., Duhamel, G.E., and Nickerson, K.W. 2007. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun*, **75**: 1609-1618.
- Odds, F.C. 1988. *Candida* and candidosis. Baillière Tindall, London, United Kingdom.
- Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B.L., and Lopez-Ribot, J.L. 2001. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**: 2475-2479.
- Ramage, G., Saville, S.P., Wickes, B.L., and Lopez-Ribot, J.L. 2002. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*, **68**: 5459-5463.
- Reasoner, D.J., and Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol*, **49**: 1-7.
- Segal, E. 2005. *Candida*, still number one--what do we know and where are we going from there? *Mycoses*, **48**: 3-11.
- Tellier, R., Krajden, M., Grigoriew, G.A., and Campbell, I. 1992. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother*, **36**: 1619-1625.

Table 1. Response to farnesol of *C. albicans* isolates from human clinical sources evaluated on solid culture.

Source	Healthy subjects	Denture stomatitis	Candidosis	Total number of isolates	Farnesol responders	Farnesol non-responders
Denture	16	30	-	46	45	1
Dental plaque	6	-	-	6	6	0
Oral swabs	9	16	16	41	41	0
Saliva	4	-	-	4	4	0
Blood	-	-	2	2	2	0
Vagina	-	-	1	1	1	0
ATCC [®] strains	N/A	N/A	N/A	6	5	1
Total	35	46	19	106	104	2

Note: All isolates were pre-cultured overnight in YPD, washed with saline 0.85% and then grown for 48 h on TYE agar (250 cells/plate) with or without 30 μ M farnesol, at 37°C and 2.5% CO₂. Isolates that showed a hairy colony phenotype in absence of farnesol but a smooth colony phenotype in presence of exogenous farnesol were labelled "responders", contrary to "farnesol non-responders" that showed no change in the hairy colony phenotype expression with or without farnesol (Figure 2A).

Table 2. Colony morphology of *C. albicans* isolates obtained under different conditions of incubation in absence of exogenous farnesol.

Conditions of incubation	Colony morphology	
	Farnesol responders	Farnesol non-responders
Room temperature (20-28°C)	Smooth	Smooth
37°C	Smooth	Hairy
37°C + 2.5 % CO ₂	Hairy	Hairy

Note: All strains were pre-cultured overnight in YPD broth, washed with saline 0.85% and then grown for 48 h on TYE agar (250 cells/plate), in a humid atmosphere.

Table 3. Biofilm formation of farnesol responders (BL007, LAM1) and farnesol non-responders (ATCC[®] 36802, HM1) in presence or absence of farnesol.

Strains	Culture media	Crystal violet (OD _{570 nm})			XTT(OD _{492 nm})		
		Control	30 μ M farnesol	Farnesol inhibition (%)	Control	30 μ M farnesol	Farnesol inhibition (%)
BL007	RPMI	1.286 \pm 0.295	0.440 \pm 0.161 ^{**}	65.8	0.284 \pm 0.019	0.192 \pm 0.023 ^{**}	32.4
	R2A	0.858 \pm 0.211	0.278 \pm 0.160 ^{**}	67.6	0.204 \pm 0.011	0.158 \pm 0.051 [*]	22.5
LAM1	RPMI	0.905 \pm 0.188	0.164 \pm 0.032 ^{**}	81.9	0.297 \pm 0.071	0.103 \pm 0.022 ^{**}	65.3
	R2A	0.826 \pm 0.041	0.135 \pm 0.019 ^{**}	83.7	0.203 \pm 0.025	0.082 \pm 0.011 ^{**}	59.6
36802	RPMI	0.849 \pm 0.243	1.121 \pm 0.226 [*]	0	0.715 \pm 0.057	1.000 \pm 0.054 ^{**}	0
	R2A	0.998 \pm 0.181	1.039 \pm 0.137	0	0.422 \pm 0.039	0.439 \pm 0.026	0
HM1	RPMI	0.101 \pm 0.013	0.082 \pm 0.022 [*]	18.8	0.197 \pm 0.023	0.172 \pm 0.021 [*]	12.7
	R2A	1.157 \pm 0.085	1.198 \pm 0.143	0	0.405 \pm 0.022	0.403 \pm 0.015	0.49

Note: Biofilms were grown 24 h with or without 30 μ M farnesol, at 37°C and 2.5% CO₂. Biofilm formation was quantified by staining the biomass with crystal violet dye and by XTT metabolic assay. Negative values are considered as zero. Data are shown as mean values \pm SD of triplicate samples from three independent experiments ($n = 9$). Statistically significant differences (Student's t test, comparison with control) are indicated as follows: ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$.

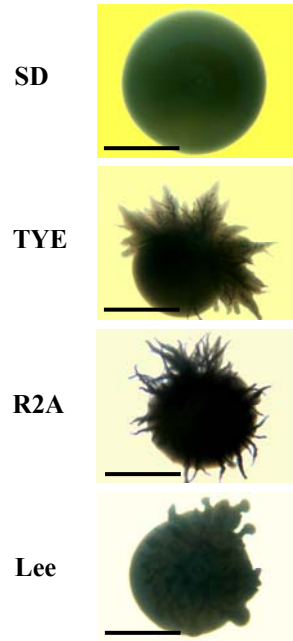


Figure 1. Representative examples of different hairy phenotype expression in a human clinical isolate (BL007, farnesol responder). Cells were pre-cultured overnight in YPD broth, washed with saline 0.85% and then grown for 48 h on various solid media, at 37°C, 2.5% CO₂, in a humid atmosphere (250 cells/plate). Scale bars: 1.25 mm.

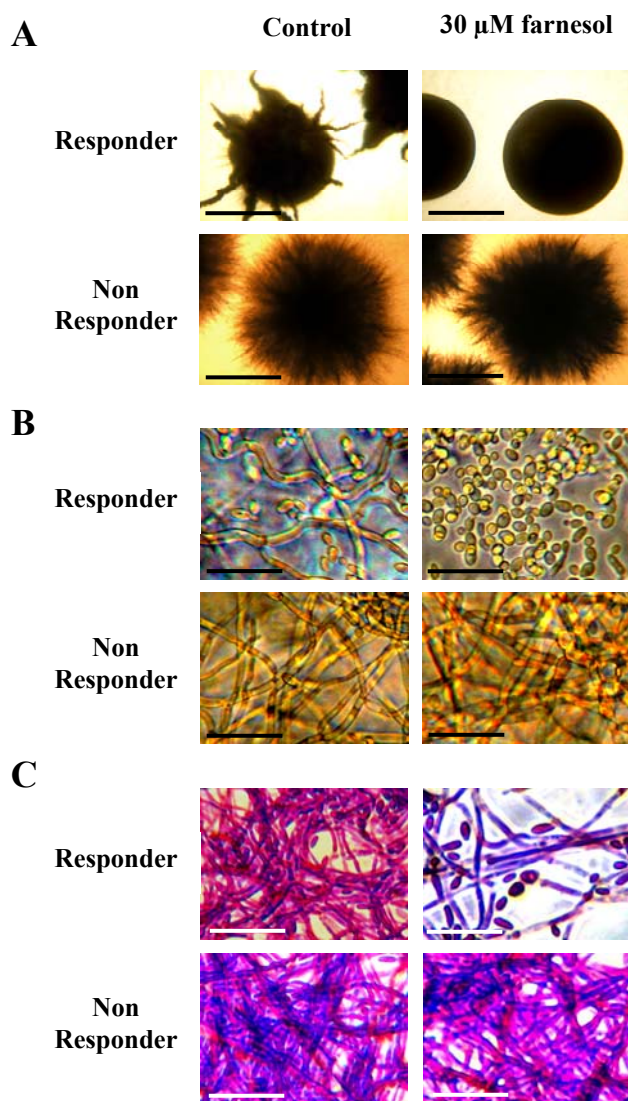


Figure 2. Representative illustrations of 3 different farnesol response studies conducted in R2A media with or without 30 μ M farnesol. Farnesol responder: BL007, farnesol non-responder: ATCC[®] 36802. (A) Colony morphology of 24 h solid cultures, 250 cells/plate. (B) Cell morphology of 24 h liquid cultures. (C) Biofilm aspect of 24 h biofilms stained with crystal violet dye. All cultures were incubated at 37°C, 2.5% CO₂, in humidity, without agitation. The scale bars in the photomicrographs correspond to 1.25 mm for A and 50 μ m for B and C.