

Université de Montréal

**La réponse au Farnésol de *Candida albicans* :
Production de biofilms et Parenté génétique**

par

Jean-François Ross

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Microbiologie et Immunologie

Mars 2010

© Jean-François Ross, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

La réponse au Farnésol de *Candida albicans* :
Production de biofilms et parenté génétique

présenté par :
Jean-François Ross

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre France Daigle, président-rapporteur
Dr Jean Barbeau, directeur de recherche
Dr George Szatmari, membre du jury

RÉSUMÉ

C. albicans est une levure pathogène opportuniste. Elle est un agent causal fréquent des infections muco-cutanées. *C. albicans* peut alterner entre la forme blastospore et mycélium. Cette dernière forme est impliquée dans la formation des biofilms. Le dimorphisme de *C. albicans* est contrôlé en partie par le phénomène de perception du quorum (*quorum sensing*) qui en outre, est associé à la molécule farnésol, produit par cette levure. La présence de cette molécule, inhibe la formation d'hyphe par *C. albicans* et par conséquent limite la formation de biofilms. Certaines souches ne répondent pas au farnésol et nous avons vérifié les hypothèses que : 1) la proportion des Non-Répondeurs (NR) au farnésol est similaire entre les souches de provenance orale et vaginale; 2) la capacité de formation de biofilm varie d'une souche à une autre mais les Non-Répondeurs en produisent en plus grande quantité; 3) la technique RAPD-PCR permettra de regrouper les souches de cette levure suivant leur provenance, leur capacité de formation de biofilm et leur aptitude à répondre au farnésol. La découverte d'une souche vaginale Non-Répondeur nous permet de croire que la proportion de ces souches est similaire entre les deux types de provenance. Les souches caractérisées Non-Répondeurs produisent 30 % plus de biofilm que les Répondeurs en absence de farnésol exogène dans le milieu. En présence de farnésol exogène, les Non-Répondeurs produisent 70 % plus de biomasse que les Répondeurs. De plus, la technique RAPD ne nous a pas permis de classer nos souches d'après les caractéristiques proposées.

En conclusion, les souches orales de *C. albicans* semblent produire en moyenne plus de biomasse que les souches vaginales. Aussi, les NR semblent moins affectés par la présence du farnésol, ce qui pourrait causer la présence de biofilms tenaces. Les amorces utilisées pour la technique RAPD n'ont pas été efficace à la classification des souches dépendamment de leur provenance, de leur capacité à former un biofilm et à répondre au farnésol.

Mots clés : *Candida albicans*, biofilm, perception du quorum (*quorum sensing*), farnésol, Non-Répondeur

ABSTRACT

The opportunistic dimorphic yeast *Candida albicans* is frequently associated with mucosal infections in humans. It can colonize both oral and vaginal mucous membranes. One of its virulence factors is the capacity to form or participate in biofilms formation. Biofilms are a community of bacteria embedded in a matrix of exopolysaccharide and provide protection against environmental stress and antibiotics. The dimorphic characteristic of this yeast is involved in biofilm formation and is controlled in part by the quorum sensing system. Recently, it has been shown that farnesol, a quorum sensing molecule, can control the formation of biofilms through the inhibition formation of hyphae. However, we have shown that some oral and vaginal strains can still form biofilms under the influence of exogenous farnesol and these strains were named Non-Responders (NR). We hypothesized that: 1) The proportion of Non-Responders is similar between oral and vaginal strains; 2) biofilm formation differs between strains but Non-Responders produce more of it; 3) The technique of RAPD-PCR will allow us to group strains according to their origin, biofilm formation and response to farnesol. The discovery of a NR vaginal strain leads us to believe that the proportion of NR is similar between oral and vaginal strains. The NR strains seem to produce 30 % more biofilm than Responders in media without exogenous farnesol. This percentage increased to 70 % when exogenous farnesol was added to the media. The RAPD technique did not allow us to group strains according to their proposed characteristic.

In conclusion, oral strains seem to produce more biofilm than vaginal strains. The NR are less affected by farnesol and may cause persistent biofilm. The primers used for RAPD technique were not effective to discriminate *C. albicans* strains according to origin, capacity to form biofilm and farnesol responding.

Key words: *Candida albicans*, biofilm, *quorum sensing*, farnesol, Non-Responders

TABLE DES MATIERES

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
Remerciements	x
Dédicace	xi
INTRODUCTION	1
1. <i>Candida albicans</i> : de levure commensale à pathogène opportuniste.....	1
1.1. Introduction	1
1.2. Dimorphisme chez <i>Candida albicans</i>	3
1.3. Morphotypes de <i>Candida albicans</i>	6
1.3.1. Blastospores et hyphes	6
1.3.2. Hyphes.....	8
1.3.3. Chlamydo-spores	10
1.3.4. Pseudohyphes	12
1.4. Signalisation de la transition morphologique.....	13
2. Biofilm.....	17
2.1. Introduction	17
2.2. Développement et architecture des biofilms de <i>C. albicans</i>	20
2.3. Expression génique dans la croissance sous forme de biofilm	23

2.4.	Résistance du biofilm	25
2.5.	Biofilm prothétique et stomatite	28
3.	La perception du quorum (quorum sensing) chez <i>C. albicans</i> : une question de communication.	31
3.1.	Introduction	31
3.2.	Communication cellulaire et transition morphologique chez <i>C. albicans</i>	35
3.3.	Farnésol	36
3.3.1.	Formation du farnésol	37
3.3.2.	Action du farnésol	38
3.4.	Autres molécules de la perception du quorum	44
4.	Méthodes d'évaluation de patrons génétique	46
4.1.	Introduction	46
4.2.	RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	47
4.3.	RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	48
4.4.	Analyse des patrons génétique	49
	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	50
1.	Hypothèses	50
2.	Objectifs	51
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	52
	SECTION 1 : SOUCHES ORALES ET VAGINALES, CULTURES ET REPONSE AU FARNESOL	
	52
1.	Isolement et identification des souches de <i>Candida albicans</i>	52

1.1.	Isolement et identification des souches orales de <i>Candida albicans</i> ..	52
1.2.	Isolement et identification des souches vaginales	54
1.3.	Autres souches de <i>Candida albicans</i> utilisées	54
1.4.	Culture des souches de <i>C. albicans</i>	56
1.5.	Congélation des souches de <i>C. albicans</i>	56
2.	PCR (Polymerase chain reaction) d'identification.....	57
2.1.	Extraction d'ADN	57
2.2.	PCR d'identification des <i>Candida albicans</i>	59
3.	Réponse au farnésol.....	61
SECTION 2 : FORMATION DE BIOFILM		62
1.	Biofilms	62
1.1.	Formation de biofilms	62
1.2.	Méthode d'évaluation de la formation de biofilm.....	63
1.2.1.	Évaluation par le Crystal violet	63
1.2.2.	Évaluation par la réduction des sels de tétrazoliums (XTT)	64
1.3.	Statistiques.....	65
SECTION 3 : PATRON D'ANALYSE GENETIQUE PAR LA METHODE RAPD.....		67
1.	RAPD-PCR	67
2.	Électrophorèse sur gel d'agarose.....	68
3.	Analyse des RAPD et dendrogramme.....	69
RÉSULTATS		70
SECTION 1 : CREATION D'UNE CANDIDATHEQUE ET REPONSE AU FARNESOL		70
1.	Candidathèque de souches orales	70

2. Candidathèque de souches vaginales	72
3. Réponse au farnésol.....	72
SECTION 2 : PRODUCTION DE BIOFILM.....	75
1. Comparaison de la formation de biofilm entre Répondeurs et Non-Répondeurs.....	75
2. Comparaison de la formation de biofilm en fonction de l'origine des souches	77
3. Inhibition de la formation de biofilm par le farnésol et effet de cette molécule sur le biofilm des souches Non-Répondeurs.	78
SECTION 3 : ANALYSE DE LA PARENTE GENETIQUE PAR RAPD.....	83
1. Profil génétique obtenu par RAPD.....	83
1.1. Liens observables entre les souches présentes dans un même groupement.....	87
1.2. Liens observables selon la provenance des souches	87
1.3. Liens observables selon la capacité de formation de biofilm.....	88
DISCUSSION.....	89
RÉFÉRENCES	106
ANNEXE I.....	I
ANNEXE II.....	IV
ANNEXE III	VIII
ANNEXE IV.....	IX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Souches utilisées.....	55
Tableau 2. État des patients, des souches échantillonnées de sonicats de prothèses dentaires.....	71
Tableau 3. Pourcentage de colonies chevelues obtenues sur milieu solide TYE en présence de 30 μ M de farnésol des souches Non-Répondeurs.....	74
Tableau 4. Densité optique moyenne (570 nm) obtenue par le test de Crystal violet.	75
Tableau 5. Densité optique moyenne (490 nm) obtenue par le test de réduction des sels de tétrazoliums.....	76
Tableau 6. Densité optique moyenne (570 nm) et pourcentage d'inhibition de la formation de biomasse.....	78
Tableau 7. Densité optique moyenne (490 nm) et pourcentage d'inhibition de l'activité métabolique du biofilm	79
Tableau 8. Densité optique moyenne (570 nm) et pourcentage d'inhibition	80
Tableau 9. Densité optique moyenne (490 nm) et pourcentage d'inhibition de l'activité métabolique	80
Tableau 10. Densité optique (570 nm) des souches orales.....	I
Tableau 11. Densité optique (490 nm) des souches orales.....	II
Tableau 12. Densité optique (570 nm) des souches vaginales	IV
Tableau 13. Densité optique (490 nm) des souches vaginales.....	VI
Tableau 14. Densité optique (490 nm) des souches autres ou de source inconnue..	VIII
Tableau 15. Densité optique (570 nm) des souches autres ou de source inconnue..	VIII

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Photo représentant des blastospores.....	6
Figure 2. Bourgeonnement des blastospores chez <i>C. albicans</i>	7
Figure 3. Photo représentant des hyphes de <i>C. albicans</i>	9
Figure 4. Formation d'un hyphe à partir d'un blastospore.....	9
Figure 5. Photo représentant des chlamydospores	10
Figure 6. Formation d'un chlamydospore	11
Figure 7. Photo représentant des pseudohyphes.....	12
Figure 8. Développement des pseudohyphes	12
Figure 9. Voie de signalisation lors de la transition morphologique.....	15
Figure 10. Photo représentant un biofilm de <i>C. albicans</i>	19
Figure 11. Photo prise par microscopie électronique des étapes de formation du biofilm chez <i>C. albicans</i>	22
Figure 12. Photographie de sujets atteints de stomatites.....	29
Figure 13. Régulation de la perception du quorum chez les bactéries Gram-négatif ..	33
Figure 14. Régulation de la perception du quorum chez les bactéries Gram-positif ..	34
Figure 15. Molécule de farnésol.....	36
Figure 16. Voie du mévalonate	37
Figure 17. Influence du farnésol sur la germination du mutant <i>chk1p</i> et de la souche sauvage CAF2-1	39
Figure 18. Pourcentage de mortalité des cellules de <i>C. albicans</i> en fonction de la concentration de farnésol.....	41

Figure 19. Activation des caspases chez <i>C. albicans</i> en fonction de la concentration de farnésol	42
Figure 20. Influence du farnésol sur la formation de biofilm chez la souche mutante (CHK21) et sauvage (CAF2-1)	43
Figure 21. Comparaison entre l'action du tyrosol et du farnésol sur la formation de biofilm	45
Figure 22. Comparaison de la réponse au farnésol	73
Figure 23. Formation de biomasse entre une souche Non-Répondeur (HM1) (A et B) et Répondeur (18 3715) (C et D).....	81
Figure 24. Patron génétique de souches de <i>C. albicans</i> obtenu avec l'amorce OPA3	84
Figure 25. Dendrogramme obtenu avec 10 amorces différentes sur 53 souches de <i>C. albicans</i>	89
Figure 26. Dendrogramme obtenu avec l'amorce OPA19 sur 53 souches de <i>Candida albicans</i>	IX

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier le Dr Jean Barbeau de m'avoir accepté dans son laboratoire et permis d'accomplir ce projet d'envergure qui m'a permis de repousser mes limites de la connaissance. Merci de m'avoir donné la possibilité d'assister et de présenter des affiches dans des congrès de renommée mondiale. Merci à Jacynthe et Annie, mes deux mentors, qui ont pris soin de toujours m'aider dans les moments plus ardues et merci surtout pour tout le plaisir que nous avons eu ensemble. Merci à Sabrina et Daniel pour avoir agrémente mon séjour au laboratoire. Grâce à vous, il était possible d'oublier les moments difficiles. Merci au Dr Stéphane Roy pour ses conseils sur la technique RAPD. Merci au Dr Cummins et Dre Emami pour les souches de *Candida albicans*. Merci à l'équipe du Dr Roy (Jean-Charles, Éric, Mathieu et Samuel) pour l'agrément apporté durant ce projet. Merci à M. Pierre Rompré pour les analyses statistiques. Merci à mes parents qui m'ont soutenu et encouragé tout le long de cette étape de ma vie. Merci à mon frère, Christian, qui sans lui, j'aurais bien de la difficulté à faire fonctionner un ordinateur. Je remercie tous mes amis qui ont pris part indirectement à cette aventure et qui m'ont appuyé (Miguel, Benoit, Frédéric, Nicolas, Sylvain et Audrey).

À tous ceux qui m'ont épaulé durant ce projet

Introduction

1. *Candida albicans* : de levure commensale à pathogène opportuniste

1.1. Introduction

Candida albicans est une levure diploïde, possédant huit paires de chromosomes, qui appartient à la division des Ascomycètes. On la considère comme un microorganisme commensal, car elle est retrouvée dans la flore normale du tractus gastro-intestinal et de la peau chez environ 70% de la population (124). Elle est présente, en outre, dans le tractus génital chez environ 20% des femmes. Cette levure colonise aussi la cavité buccale chez environ 45% de la population adulte (2).

Chez un hôte susceptible, cette levure opportuniste peut causer plusieurs infections autant superficielles (peau, muqueuses et ongles) que systémiques (sang, coeur) (109). *C. albicans* est responsable d'environ 78% des infections nosocomiales causées par une levure aux États-Unis (102). Plusieurs prédispositions, telles que l'infection au VIH, la prise d'antibiotiques, la chimiothérapie ainsi qu'une transplantation d'appareil médical, tels que des cathéters, des prothèses (valves cardiaque, genou, stimulateur cardiaque) et des implants (prothèse dentaire, lentilles cornéennes) favorisent les candidoses (34) (55). Le nombre d'appareils biomédicaux

transplantés aux États-Unis, par année, est estimé à 45 millions, et environ 60 % des patients développeront une infection reliée à leur transplantation. Environ 20 % de ces infections sont causées par le genre *Candida* (75). Une des raisons invoquées est que ces appareils médicaux favorisent la formation de biofilm, rendant ainsi le traitement laborieux. En effet, les biofilms entraînent une résistance accrue aux antifongiques, ainsi qu'une protection contre les défenses immunitaires (7).

C. albicans est l'agent étiologique principal des vaginites (70%) (27) et le présumé suspect responsable de la stomatite prothétique (10). La stomatite, est une inflammation de la muqueuse palatine présente chez les porteurs de prothèse dentaire (Barbeau, Seguin et al. 2003).

1.2. Dimorphisme chez *Candida albicans*

Un des déterminants majeurs de la virulence, chez cette levure, est sa capacité à pouvoir modifier sa morphologie (151). Cette caractéristique, le dimorphisme, serait une importante caractéristique permettant à *C. albicans* de d'évader les défenses immunitaires de l'hôte et ainsi augmenter sa virulence (64). Chacun des morphotypes de cette levure peut contribuer à la virulence chez l'hôte. Tout d'abord, la forme blastospore permet la dissémination de cette levure dans l'organisme (13). Lorsque ce microorganisme trouve un endroit potentiel à la colonisation, il peut alors changer de morphotype et passer sous forme d'hyphe ou pseudohyphe et ainsi coloniser l'endroit en question. Les hyphes peuvent s'ancrer, pénétrer et envahir les tissus (141). Ce dimorphisme est sous le contrôle de plusieurs paramètres, dont la température, le pH, la taille de la population dans un environnement donné, la source de carbone et d'azote disponible (13, 48). Certaines molécules comme par exemple le N-acetylglucosamine et la proline contribuent aussi au dimorphisme de *C. albicans*, plus précisément à la formation d'hyphes (48).

C. albicans a aussi la capacité d'effectuer une commutation phénotypique (*switch*), qui est en relation étroite avec le phénomène d'accouplement entre deux cellules, le *mating*. Le *mating* se définit comme une reproduction sexuelle, où il y aura échange de matériel génétique

permettant la diversité de l'espèce. Lors de la commutation phénotypique, nous pouvons remarquer la transition réversible entre deux phénotypes différents soit des colonies blanches ou opaques. Ce phénomène ne se remarque pas chez toutes les souches et il a été décrit pour la première fois chez la souche W0-1, une souche homozygote du locus *MTL* (*Mating-type-locus*) (89, 136). Chez cette levure, deux loci sont retrouvés pour permettre cette transition : *MTLa* et *MTLb* (96). Par contre, pour que cette commutation phénotypique se fasse, la souche doit obligatoirement être homozygote pour son locus *MTL*. En contrepartie, une souche hétérozygote pour ce locus peut devenir compétente à la commutation phénotypique. La perte d'un de ces locus *MTL* présent sur le chromosome 5 suivie d'une duplication du locus restant ou bien d'une recombinaison mitotique peuvent permettre à cette souche de devenir compétente au *mating* (150). D'après une étude de Lockart, seulement 3 % des souches seraient homozygote pour ce locus et auraient la possibilité d'effectuer le *mating* (89).

Ce phénomène permettrait une meilleure adaptation de *C. albicans* à coloniser certaines niches chez l'hôte, et chacun des types de cellules auraient leurs avantages. Une étude Kvaal démontre que chez la souche WO-1, les cellules blanches sont plus virulente lors d'un modèle d'infection systémique chez la souris, tandis que les cellules opaques sont plus efficaces à coloniser la peau, dans un modèle représentant une infection cutanée (81). Une des raisons invoquées serait que les cellules opaques sont instable à une température de 37 °C (82). La plupart des microorganismes sécrètent des

chimioattractants qui activent le système immunitaire inné, plus particulièrement les lymphocytes polymonucléaires. Une des caractéristiques de la commutation phénotypique est de contrôler cette sécrétion de chimioattractants. Ainsi, les colonies blanches sécrètent une protéine de 1 Kda qui active le système immunitaire (53). Les cellules opaques empêchent la sécrétion de cette protéine, favorisant et facilitant, de ce fait, le *mating* en empêchant l'activation du système immunitaire (53).

1.3. Morphotypes de *Candida albicans*

1.3.1. Blastospores et hyphes

Les blastospores (figure 1) sont des cellules de forme ovoïde ayant une taille d'environ 4 μm , qui se reproduisent par bourgeonnement. Le résultat de cette reproduction est la formation de deux cellules distinctes (figure 2).

Les paramètres qui favorisent la formation de blastospores, sont un pH acide, une basse température, un milieu enrichi en glucose et un inoculum de plus de 10^6 cellules/ml (74).

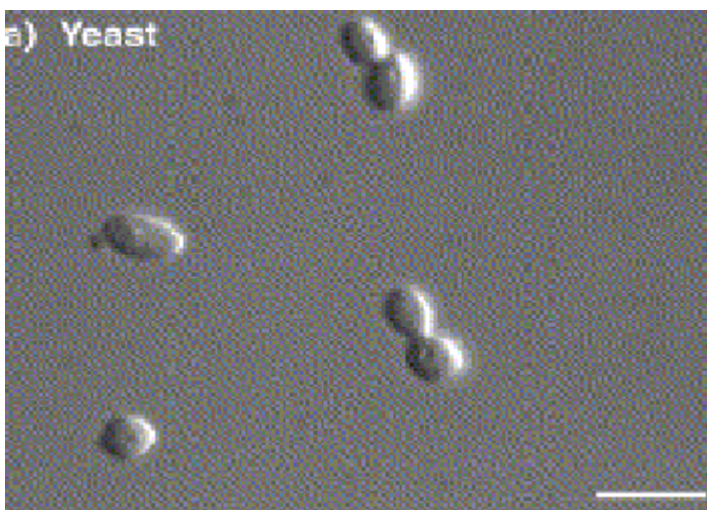


Figure 1. Photo représentant des blastospores
(141)

La paroi des blastospores, chez *C. albicans*, est principalement constituée de carbohydrates. Il y a trois constituants principaux de la paroi cellulaire. Tout d'abord, il y a la présence de polymères de glucose contenant des liens β -1,3 et β -1,6. Ces constituants représentent environ 47 à 60 % de la composition de la paroi cellulaire. En deuxième lieu, la paroi est constituée de polymères de *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) qui contiennent des ponts β -1,4 (chitine) (133). Malgré le fait que la chitine est retrouvée en faible quantité dans la paroi cellulaire (0,6 à 9 %), son rôle est des plus importants, car elle fait partie du septum de constriction entre la cellule mère et la cellule fille (45). De plus, cette chitine et les β -glucans forment un cytosquelette rigide qui fournit de fortes propriétés physique à la cellule (24). Le polymère de mannose est le troisième constituant de base de la paroi cellulaire chez *C. albicans*. Il représente environ 40 % des polysaccharides totaux et est le principal constituant de la matrice de la paroi (131). On retrouve aussi dans cette paroi, des protéines (6 à 25 %) et une faible quantité de lipides (1 à 7 %) (134).

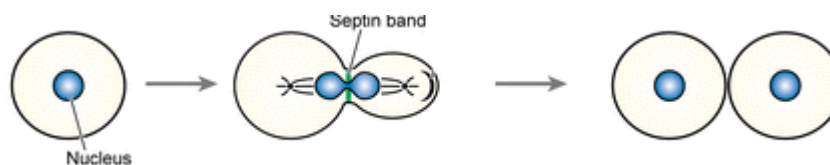


Figure 2. Bourgeonnement des blastospores chez *C. albicans*
où la Septin band sépare les chromosomes entre la cellule mère et fille (148).

1.3.2. Hyphes

Les hyphes (figure 3) sont constitués d'un tube étroit d'environ 2 μm de diamètre, qui est relié à d'autres cellules par un septum. Les hyphes se développent principalement à partir d'un blastospore (figure 4) (13). Ainsi, une membrane, nommé le *spitzenkorper*, se forme au début de la pointe du nouvel hyphe rassemblant ainsi les vésicules sécrétrices nécessaires à la croissance et permet de diriger celle-ci (58). Certains paramètres induisent le changement de la forme blastospore à hyphe. Un pH supérieur à 6,5, une température au-delà de 35 °C, la présence de CO_2 , une carence en carbone ou en azote, l'ajout de N-acetylglucosamine et de proline, la présence de sérum et un inoculum inférieur à 10^6 cellules/ml sont certains paramètres qui favorisent le développement des hyphes (21).

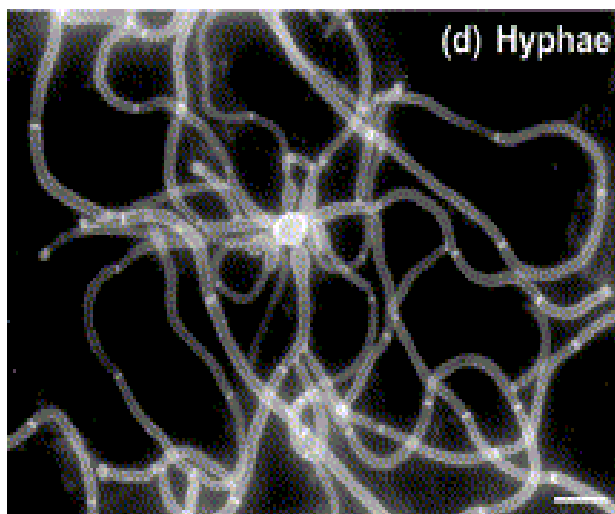


Figure 3. Photo représentant des hyphes de *C. albicans* (141).

La composition de la paroi des hyphes ressemble beaucoup à celle des blastospores. Par contre, les hyphes possèdent environ trois fois moins de chitine qu'eux (143). La paroi de l'hyphe contient aussi une protéine qui lui est propre. Cette protéine, Hwp1 (*hyphal wall protein*), possède des propriétés qui permettent de maintenir les liens non-covalents entre les chaînes de polypeptides (140).

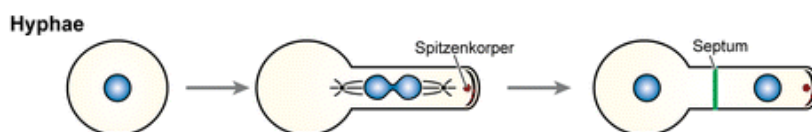


Figure 4. Formation d'un hyphe à partir d'un blastospore où le *spitzenkorper* est une membrane permettant la croissance du tube chez l'hyphe. Le septum permet la différenciation entre la cellule mère et la cellule fille (148).

1.3.3. Chlamydoespores

La démonstration de la présence de chlamydoespores (figure 5) est un bon outil diagnostique pour faire la distinction entre *C. albicans* et les autres espèces de *Candida* (5). Ces cellules sont d'une taille d'environ de 8 à 12 μm de diamètre. La paroi des chlamydoespores est mince et contient une grande concentration en lipides et en carbohydrates (49, 71, 97).

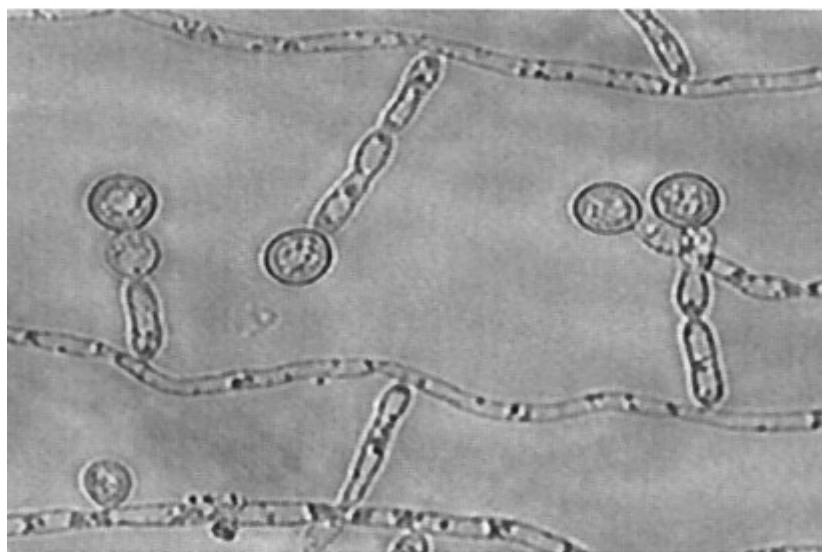


Figure 5. Photo représentant des chlamydoespores
(139)

La chlamydo-spore est ainsi considérée comme une structure de résistance (71). Ce morphotype est rarement observé au site d'infection, et il n'y a aucune évidence que les chlamydo-spores confèrent une viabilité à long terme.

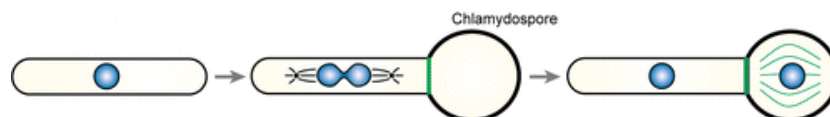


Figure 6. Formation d'un chlamydo-spore
(148)

Les conditions qui favorisent la formation des chlamydo-spores sont l'absence de lumière, une température d'environ 25 °C, des conditions avec faible teneur en oxygène et un milieu pauvre en glucose (71, 91).

1.3.4. Pseudohyphes

Les pseudohyphes (figure 7) possèdent une structure intermédiaire entre les blastospores et les hyphes (13). Les pseudohyphes vont rarement former de vrais hyphes et ceux-ci vont rarement produire des pseudohyphes (149). La grande caractéristique de ce morphotype est la présence de cellules allongées reliées en chaînes, qui sont séparées par des constriction et non par un vrai septum (figure 8) (141).

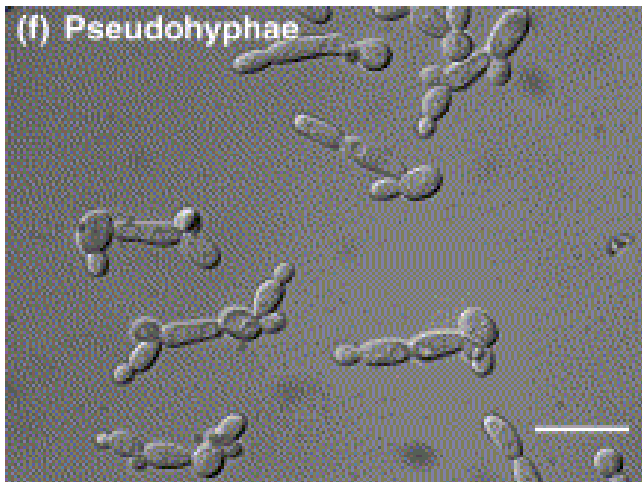


Figure 7. Photo représentant des pseudohyphes
(141)

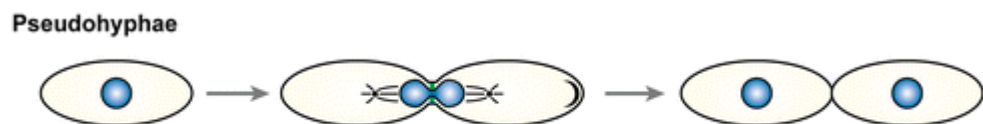


Figure 8. Développement des pseudohyphes
(148)

1.4. Signalisation de la transition morphologique

Le dimorphisme, chez *C. albicans*, est la capacité de pouvoir changer de morphotype (blastospore à hyphe), dépendamment des conditions environnementales. De ces conditions, nous retrouvons la quantité d'oxygène et de dioxyde de carbone, le pH, la température et les composantes des milieux (74). Par exemple, la présence de sérum, de hautes températures, un pH neutre et un milieu de culture pauvre en nutriment favorisent le développement des hyphes (19). L'interaction de *Candida albicans* avec le milieu externe provoque ainsi la régulation ou le silence de plusieurs gènes qui affecteront la morphologie de *Candida albicans*.

Les voies des MAP Kinases et de l'AMPc contrôlent la morphogénèse de *C. albicans* et leurs rôles, lors de la transition morphologique, n'est plus à mettre en doute. Ces voies de signalisations sont régulées dépendamment des conditions environnementales, telles que le pH, une carence en nutriment et le lieu de colonisation (14). Cette transition est régulée par plusieurs facteurs de transcription et une variété de mutations affectant ces voies réduit considérablement le développement des hyphes (8). La délétion combinée de deux facteurs de transcription, Cph1p et Efg1p, bloque la transition de la forme blastospore à hyphe et réduit ainsi la virulence de la souche (88, 128). Le facteur de transcription, Efg1p, est lié au métabolisme de production d'AMPc, tandis que Cph1p est en relation avec les MAP Kinases (39). Un autre facteur de transcription, Flo8p, est essentiel pour le développement des

hyphes et contrôle une sous-classe de gènes régulés par Efg1p (22). On croit que l'interaction de Efg1p avec d'autres régulateurs, tels que Flo8p et Czf1p pourrait expliquer en partie l'importance de Efg1p comme activateur ou répresseur, et de ce fait, affecter la transition morphologique dépendamment des conditions de croissance (16).

Le pH externe a une influence sur une autre voie de signalisation affectant la morphologie. L'activation du facteur de transcription sensible au pH externe, Prr2, permet l'activation du gène *PHR1* et empêche la transcription du gène *PHR2* favorisant ainsi la transition de blastospore à hyphe, lors d'un pH au dessus de 6,5 (20, 37, 48).

Une carence en oxygène ou en nutriment, lors de la croissance de *C. albicans*, affecte aussi ce phénomène. Le facteur de transcription Czf1 surexprimé, stimulerait le développement des hyphes seulement lorsque les levures se retrouvent emprisonnées dans une matrice d'agar ou un milieu faible en glucose. Une étude démontre qu'un mutant *CZFI* homozygote va développer des hyphes sous les conditions idéales à la filamentation et qu'en revanche, ce développement n'est pas observé lorsqu'il se retrouve emprisonné dans l'agar (48) (figure 9).

La découverte de gènes favorisant la production d'hyphes implique la présence de gènes favorisant le morphotype blastospore. Ainsi, le gène de *C. albicans*, *TUPI*, agit négativement et empêche la forme filamenteuse en

favorisant la formation de blastospores (73). Le gène *RBF1* aurait aussi la capacité d'inhiber la formation d'hyphes (18).

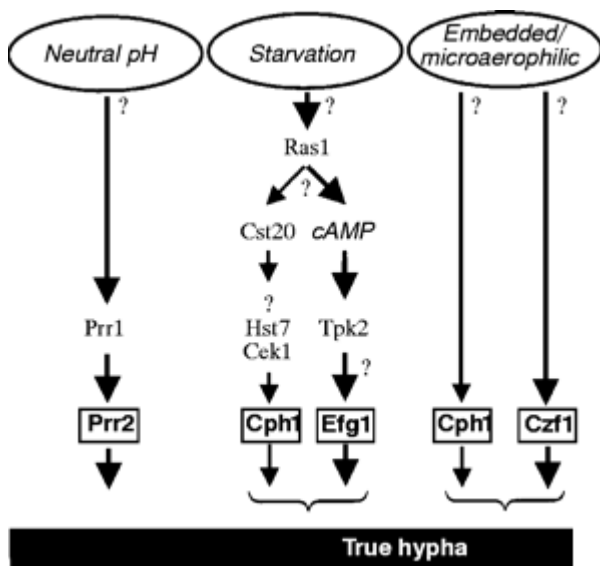


Figure 9. Voie de signalisation lors de la transition morphologique

Certaines conditions environnementales favorisent la transition morphologique vers la forme hyphe. Dépendamment de ces conditions, plusieurs voies activeraient des facteurs de transcription, qui à leurs tours pourraient activer des gènes favorisant le développement d'hyphes (48).

Lors de la commutation phénotypique, plusieurs gènes permettent de contrôler la différenciation des cellules blanches à opaques et vice-versa. Le facteur principal de cette régulation est le gène *WOR1*. En absence de celui-ci, les cellules sont incapables d'adhérer à la forme opaque (152). *Czf1p*, *Efg1* et *Wor2p* ont aussi leurs rôles à jouer dans cette transition. Lorsque *Czf1p* est surexprimé, il augmente la transition des cellules à la forme opaque. Il régule cette transition en inhibant l'expression d'*Efg1*, un facteur de transcription favorisant les cellules blanches. *Wor2p*, quant à lui, permet au maintien de l'état opaque chez les cellules. Une délétion du gène *WOR2* résulte en une perte de la formation de cellules opaques (153).

2. Biofilm

2.1. Introduction

Il y a plusieurs années, la majorité des recherches s'effectuaient principalement avec des suspensions de microorganismes (forme planctonique). Bien qu'il était connu que les bactéries formaient des colonies parfois complexes à l'état naturel, il fallu attendre les années 90 pour voir augmenter en popularité l'étude des microorganismes en biofilms. L'étude des biofilms a révolutionné le monde scientifique, autant pour les chercheurs, que pour les médecins. Ainsi, plusieurs microorganismes vivent en communauté, attachés à des surfaces et expriment certaines fonctions cellulaires bien spécialisées en réponse à cet attachement (33).

Un biofilm (figure 10), se définit, comme une communauté de microorganismes attachés irréversiblement à une surface, à l'intérieur d'une matrice d'exopolysaccharides (79).

C. albicans est la levure le plus fréquemment associée avec la formation de biofilm (41). Une des raisons serait l'implantation quotidienne de biomatériaux et d'implants, qui favorise la colonisation de cette levure sous forme de biofilm (40, 120).

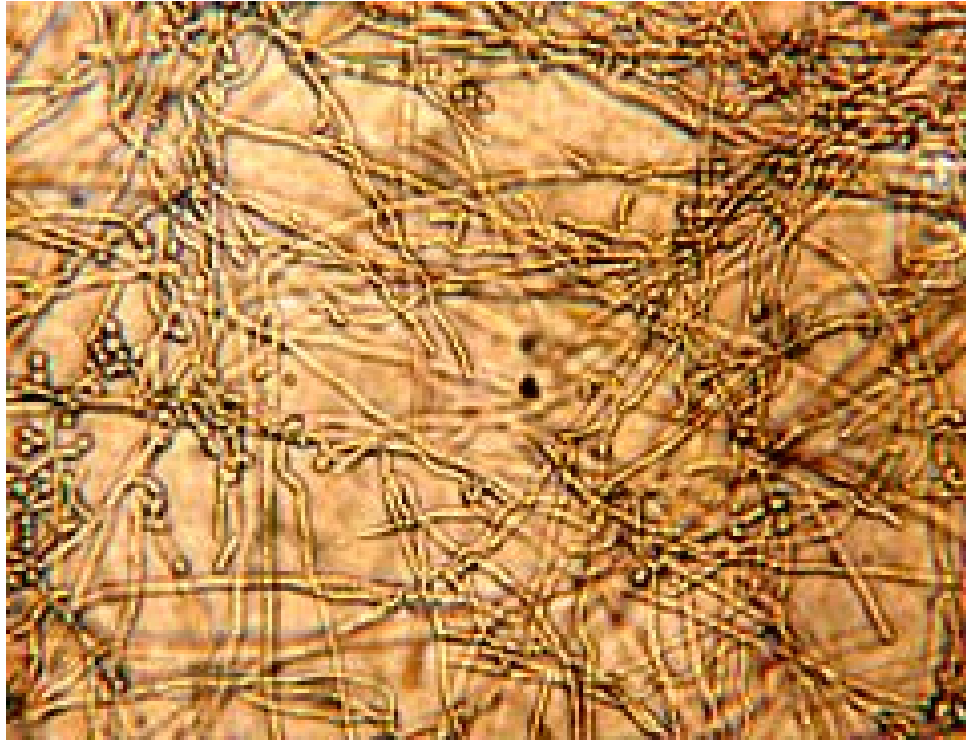


Figure 10. Photo représentant un biofilm de *C. albicans*
(Source : Labo Barbeau)

2.2. Développement et architecture des biofilms de *C. albicans*

Un biofilm de *C. albicans* peut avoir une épaisseur d'environ 25 à 450 μm et se développe sur une période de 24 à 48 heures (56, 120). Le biofilm de *C. albicans* est composé d'un dense réseau de blastospores, d'hyphes et de pseudohyphes (60). Les études antérieures démontrent que la formation du biofilm s'effectue selon différentes étapes (25).

Premièrement, il y a une étape d'adhérence, où les blastospores s'attachent à une surface (103). L'attachement initial est sous le contrôle de plusieurs paramètres, tels que l'hydrophobicité de la surface et les forces électrostatiques (120). Diverses études prouvent que les microorganismes s'attachent plus rapidement à des surfaces hydrophobes, telles que le téflon et les plastiques, qu'hydrophiles (verre, métal) (12).

Les cellules, attachées à la surface, prolifèrent pour former des microcolonies. Les levures de ces microcolonies débuteront la production d'une matrice d'exopolysaccharides (9). Finalement, lorsque la confluence des cellules est atteinte, une transition des blastospores vers les formes filamenteuses (hyphes, pseudohyphes) forme un réseau complexe emprisonné dans la matrice d'exopolysaccharides (80) (figure 11). La formation des hyphes et la sécrétion de la matrice d'exopolysaccharides sont des étapes cruciales au développement du biofilm (15). Une particularité intéressante de la composition du biofilm, observé au microscope à balayage, est la présence de canaux qui permettent l'hydratation du biofilm et l'excrétion des déchets métaboliques (120).

Une étude réalisée par Al-Fattani et Douglas a défini la composition de la matrice d'exopolysaccharides du biofilm de *C. albicans*. Cette matrice contient environ 39,6 % d'hydrates de carbone, dont 32 % de glucose, environ 5 % de protéines, 3,3 % d'hexosamine, 0,5 % de phosphore et 0,1 % d'acide uronique (3).

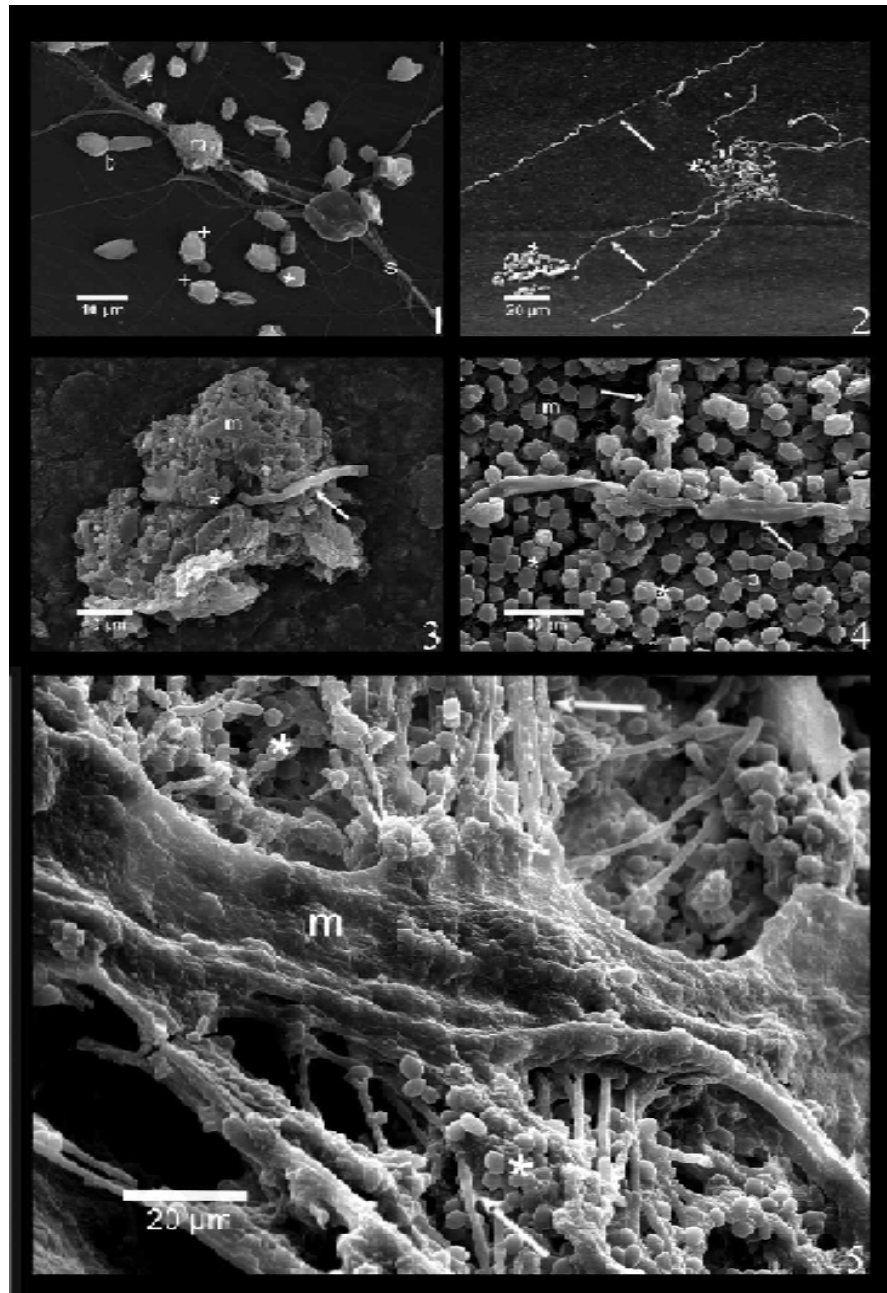


Figure 11. Photo prise par microscopie électronique des étapes de formation du biofilm chez *C. albicans*

Où les cellules s'attachent à une surface (1), suivie d'une différenciation de certains blastospores en hyphes (2), d'une prolifération et d'une sécrétion de matrice d'exopolysaccharides (3-5) (112)

2.3. Expression génique dans la croissance sous forme de biofilm

La structure du biofilm, spécialement la proportion entre les blastospores et les hyphes est fortement influencée par plusieurs paramètres, tels que la température, la composition du milieu et la nature de la surface d'attachement (79). Ces facteurs affectent plusieurs gènes, qui sont ainsi exprimés différemment, lors de la formation du biofilm et lors de la croissance sous forme planctonique. Une analyse par micropuces sur 6354 cadres de lecture chez *C. albicans*, a été effectuée par l'équipe de Nett pour déterminer le profil transcriptionnel de cette levure sur un biofilm de 24 heures.

L'analyse a révélée qu'approximativement 1034 sur 6354 gènes sont exprimés différemment entre la forme biofilm et planctonique. De ces 1034 gènes, environ 523 gènes sont surexprimés et 511 gènes réprimés sous le phénotype du biofilm. Les gènes surexprimés sont impliqués principalement dans la biosynthèse des protéines et acides aminés, le métabolisme et génération de l'énergie, le transport et dans la formation de carbohydrates (104). Le régulateur de la biosynthèse des acides aminés, *Ccn4*, semble nécessaire au développement normal du biofilm chez *C. albicans*. Ce régulateur contrôle la réponse de la carence en acides aminés, favorisant ainsi le développement des hyphes (146) (101). Les gènes surexprimés, sous le phénotype de biofilm, possèdent d'autres activités différentes que celles

de la biosynthèse des acides aminés et des protéines. Subséquemment, plusieurs gènes surexprimés possèdent aussi une activité du métabolisme des lipides, plus précisément dans la synthèse des sphingolipides et des phospholipides mitochondriale. Les gènes ayant une activité de régulateur transcriptionnel et du contrôle de l'organisation cellulaire sont aussi surexprimés, sous la forme de biofilm, chez *C. albicans* (52).

En revanche, les gènes réprimés sont impliqués principalement dans la transcription et le cycle cellulaire (104).

2.4. Résistance du biofilm

Une des propriétés du biofilm, la résistance aux antifongiques rend le traitement des infections à *C. albicans* laborieux. De ce fait, les cellules de *C. albicans*, sous forme de biofilm, sont environ 100 fois plus résistantes au fluconazole et de 20 à 30 fois plus résistantes à l'amphotéricine B comparativement aux cellules planctoniques (25). Les mécanismes de résistance du biofilm aux antifongiques sont peu connus et plusieurs hypothèses ont été suggérées.

Tout d'abord, plusieurs chercheurs croyaient que la matrice d'exopolysaccharides empêchait la diffusion des antifongiques à l'intérieur du biofilm. Par contre, une étude d'Al-Fattani et Douglas prouve que ceux-ci pénètrent à l'intérieur du biofilm, ce qui suggère que la matrice n'est pas le déterminant majeur de cette résistance (4).

Le contenu de la membrane en ergostérol et l'altération de l'expression des gènes permettant la biosynthèse de cette molécule sont d'autres hypothèses pouvant expliquer cette résistance (52, 99). Une étude de Mukherjee démontre que les cellules formant le biofilm mature possèdent un niveau d'ergostérol plus faible comparativement aux cellules planctoniques (99). Une composition faible en ergostérol dans la membrane des cellules pourrait conduire à des changements dans les propriétés de celle-ci, tel que la perméabilité aux antifongiques (80).

La présence de pompes à efflux est déjà impliquée dans la résistance de *C. albicans*. Une étude effectuée par Prasad *et al.* démontre la surexpression des gènes *MDR1*, *CDR1* et *CDR2* chez les cellules de *C. albicans* dans le biofilm (118). Ainsi, un biofilm crée avec un mutant *MDR1* réduit d'environ seize fois la résistance au fluconazole (80). Il en est de même avec les gènes *CDR1* et *CDR2*, où la résistance aux antifongiques est réduite lorsque ces gènes sont mutés (92). Par contre, les pompes efflux auraient un rôle dans la résistance du biofilm seulement au début de son développement (99).

La présence de cellules persistantes (*persisters*), à l'intérieur du biofilm, est une autre hypothèse à considérer. Ces cellules seraient dans un état de dormance, où le métabolisme de la cellule serait considérablement réduit, diminuant de ce fait l'action de ces antifongiques (86). Ces cellules persistantes ne seraient pas des mutants et auraient la capacité de rétablir la

population avec les mêmes caractéristiques que les cellules originales, à la suite du traitement (85). Il a été reporté que la formation de biofilm diminue le niveau d'ergostérol des cellules (99). Ceci expliquerait en partie sa résistance contre l'amphotéricine B, où son mécanisme d'action est de lier l'ergostérol pour former un pore dans la membrane de la cellule. Il serait alors possible que les cellules persistantes aient un niveau d'ergostérol très faible, d'où cette capacité de résistance accrue aux antifongiques (83, 99). Il est aussi intéressant de constater que ces cellules persistantes sont retrouvées seulement dans le biofilm et non lors de la phase exponentielle et stationnaire de croissance, et que l'attachement des cellules à un substrat serait le facteur déterminant de la formation de celles-ci (83).

La diminution de la sensibilité aux antifongiques ne semble pas être l'histoire d'un seul mécanisme de résistance, mais bien d'une synergie entre eux.

2.5. Biofilm prothétique et stomatite

La stomatite se définit comme une inflammation de la muqueuse palatine en contact complètement ou partiellement avec une prothèse recouverte de plaque dentaire (10). L'âge avancé, une diminution du système immunitaire, le port d'une prothèse la nuit et une faible hygiène orale sont des facteurs prédisant à l'apparition d'une stomatite (126). Bien que *C. albicans* représente moins de 1 % de la population microbienne isolée du biofilm prothétique, sa présence est 100 fois plus importante chez les personnes atteintes d'une stomatite (76).

En 1962, Newton a classé les stomatites dépendamment de leur degré d'infections. La stomatite de type I représente l'inflammation localisée et dispersée, le type II se distingue par une inflammation érythémateuse sans hyperplasie tandis que, le type III se différencie du précédent par la présence d'une inflammation érythémateuse accompagnée d'hyperplasie papillaire (figure 12) (105).

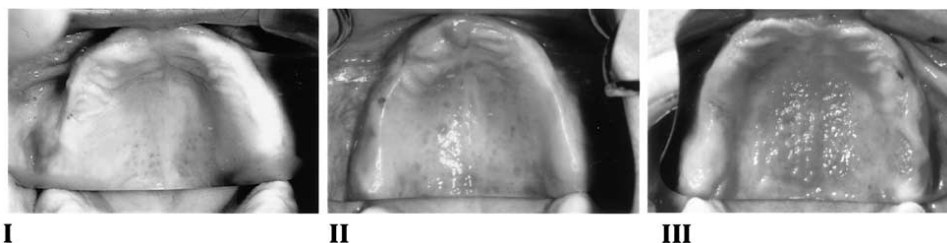


Figure 12. Photographie de sujets atteints de stomatites
I, II et III selon le degré d'inflammation proposé par Newton (10).

La détection des levures présentes dans le biofilm prothétique peut s'effectuer de plusieurs façons. Tout d'abord, la technique de Santarpia *et al.* peut être utilisée pour produire une réplique de la prothèse dentaire (127). Un moule de la prothèse dentaire est refermé à l'aide de cire et un milieu de culture est pipeté sur la prothèse palatine. La réplique gélosée est ensuite transférée dans un pétri stérile et incubé à 37 °C (10).

Une autre technique plus simple permet de récolter les levures présentes sur les prothèses. Le dentier des sujets est échantillonné à l'aide d'un coton-tige stérile. Ce coton-tige est ensuite transféré dans un tampon phosphate et des dilutions sérielles sont effectuées et inoculées sur Sabouraud Dextrose. Une solution de chloramphénicol (50 mg/L) peut être ajoutée au milieu de culture pour prévenir la croissance bactérienne (10).

Il est possible aussi de prendre directement la prothèse dentaire et de la mettre dans un sac contenant du tampon phosphate. Les microorganismes adhérents sont détachés du biofilm microbien à l'aide d'un traitement au bain ultrasonique. La solution est ensuite transférée dans un tube stérile et des dilutions sérielles sont aussi effectuées et inoculées sur agar (29).

3. La perception du quorum (quorum sensing) chez *C. albicans* : une question de communication.

3.1. Introduction

Bien que les microorganismes puissent vivre comme cellules isolées, ils ont la capacité de coordonner leurs comportements grâce à un mécanisme de communication intercellulaire qui leur permet de sentir la densité de leur population : c'est la «perception du quorum» (terme que nous utiliserons dans le présent mémoire) ou *quorum sensing* en anglais (15). La perception du quorum, est donc un système de communication, à l'aide de molécules autoinductrices, et de coordination entre les microorganismes qui affecte leur comportement et leurs interactions dans le milieu (65). Ce mécanisme est donc en étroite relation avec la densité cellulaire dans l'environnement. Les cellules sécrètent des molécules autoinductrices qui diffusent dans le milieu extracellulaire. Lorsqu'une certaine densité cellulaire est atteinte (le seuil critique), ces molécules autoinductrices (les autoinducteurs) se retrouvent en quantité suffisante pour permettre un effet de signalisation sur la cellule. Ces autoinducteurs se nomment ainsi, car elles peuvent provoquer un signal chez les cellules ayant sécrétées ces molécules et les autres présentes dans le milieu. Les cellules impliquées vont théoriquement percevoir le même signal

et accorder leurs actions futures, de la formation de biofilm à la production de divers facteurs de virulence.

De quelle manière les cellules perçoivent-elle le signal véhiculé par ces molécules autoinductrices? Diverses études ont prouvé que les autoinducteurs peuvent diffuser passivement au travers de la membrane, et grâce aux pompes à efflux ou bien par l'entremise de transporteurs spécifiques voyageant de cellules en cellules (68, 114).

Le système de perception du quorum le mieux caractérisé est celui des bactéries Gram-négatif (figure 13). Les molécules qui contrôlent ce système sont les acyle-homosérine lactones (HSL) (95). Plusieurs acyle-homosérine lactones sont produites par la protéine LuxI et sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Lorsque le seuil critique de ces molécules est atteint, les HSL se lient à une autre protéine, LuxR. Ce complexe, HSL-LuxR, activera la transcription de plusieurs gènes, tels que ceux nécessaires à la formation de biofilm, en se liant aux promoteurs de ces gènes (46, 47). Le système LasI/LasR, un homologue du système LuxI/LuxR contrôle aussi la perception du quorum chez les bactéries Gram-négatif, plus particulièrement chez *Pseudomonas aeruginosa*. Le gène *LASI* code pour une enzyme intervenant dans la synthèse du produit 3-oxo-C12. Lorsque la concentration du 3-oxo-C12 atteint un seuil critique, une de ces molécules peut ainsi se lier à deux protéines LasR. Ce complexe va donc agir comme activateur de plusieurs gènes tels que *lasA*, *lasB* et *aprA*.(51, 113). Le gène *lasA* code pour une

protéase, *lasB* pour une élastase et *aprA* pour une phosphatase alcaline (95). Le complexe 3-oxo-C12 et LasR permet l'activation d'un second système de perception du quorum, RhIR (108). RhIR se lie à la molécule autoinductrice produite par RhII. Ce complexe va permettre l'expression de deux gènes, *lasB* et *aprA*, qui sont aussi sous le contrôle du système LasI/LasR. Le complexe RhII/RhIR permet aussi l'activation d'une autre classe de gènes. Ces gènes incluent *rhlA* et *lecA*. Le premier code pour une rhamnosyl transférase et le second, une lectine cytotoxique (17).

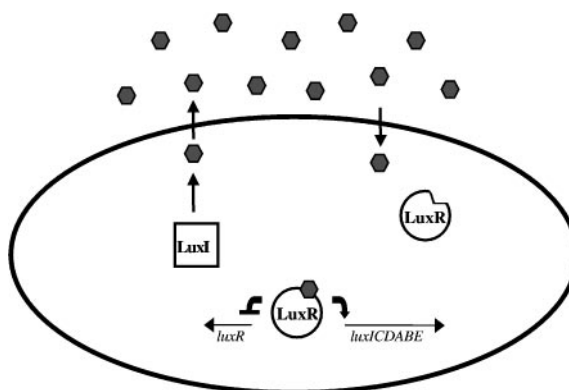


Figure 13. Régulation de la perception du quorum chez les bactéries Gram-négatif

La protéine LuxI est produite et la cellule libère des acyle-homosérine lactone (HSL) dans le milieu extracellulaire. Lorsque que la concentration critique de HSL est atteinte dans le milieu, il se forme un complexe avec une autre protéine LuxR. Ce complexe activera la transcription de plusieurs gènes en se liant au promoteur (95).

La communication intercellulaire chez les bactéries Gram-positif est aussi très bien connue (figure 14). Contrairement aux bactéries Gram-négatif, qui sécrètent les HSL comme molécules autoinductrices, les bactéries Gram-positif sécrètent des oligopeptides. La réponse, à ces peptides, est sous le contrôle d'un système à deux composants qui engendrent une cascade de phosphorylation nécessaire à l'activation de certains gènes (11).

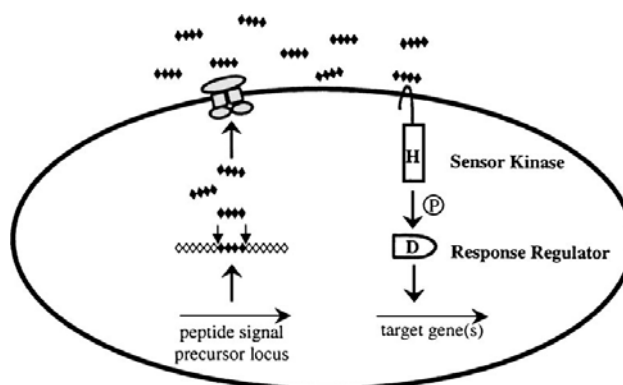


Figure 14. Régulation de la perception du quorum chez les bactéries Gram-positif

La molécule de communication cellulaire, un oligopeptide, est sécrétée dans le milieu extracellulaire. Lorsque la concentration atteint le seuil critique, une protéine senseur déclenche une cascade de phosphorylation qui résultera de l'activation d'une protéine qui formera un complexe avec les promoteurs pour ainsi activer certains gènes (95).

3.2. Communication cellulaire et transition morphologique chez *C. albicans*

En 1979, une étude effectuée par Hazen et Cutler démontrait qu'un composé produit et sécrété *in vitro* par *C. albicans*, le *morphogenic autoregulatory substance* (MARS) permet la répression de la germination sans toutefois inhiber la croissance des blastospores. Ce facteur est produit lorsque la densité cellulaire est élevée (2×10^8 cellules/mL) (62, 63).

Un des facteurs influençant la transition morphologique, chez *C. albicans*, est la taille de l'inoculum. En 2001, les recherches de Hornby démontrent que la production et la diffusion dans le milieu extracellulaire d'une molécule, le farnésol, est sous le contrôle de ce facteur (66). Malgré le fait, que le farnésol inhibe la germination chez *C. albicans*, il est différent du facteur découvert par Hazen par ses propriétés physicochimiques.

3.3. Farnésol

Cette molécule impliquée dans la perception du quorum, le farnésol (3,7,11-Triméthyl-2,6,10-dodécatrien-1 ou $C_{15}H_{26}O$), est un isoprénoïde à 15 carbones qui est produit dans la voie du mévalonate, plus précisément de la biosynthèse de l'ergostérol (130) (67) (figure 15). Cette molécule peut se retrouver sous quatre isomères différents, mais seulement l'isomère *E, E* farnésol possède des propriétés de perception du quorum (66). Le farnésol est une huile produite par plusieurs plantes et il est utilisé dans la conception de parfums (Merck Index, 1996). Tout porte à croire que cette molécule est produite par une grande variété de cellules et possède plusieurs rôles impliqués dans la synthèse des lipides et des protéines, la différenciation des cellules et la virulence (43).

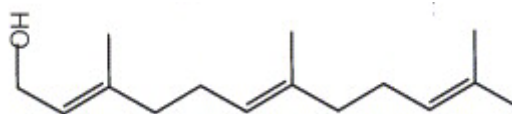


Figure 15. Molécule de farnésol
(132)

3.3.1. Formation du farnésol

La molécule de farnésol est synthétisée dans la voie du mévalonate, plus précisément à partir du farnésyl pyrophosphate, un intermédiaire de cette voie (67) (figure 16). La voie du mévalonate permet la biosynthèse de molécules, telles que les dolichols, les ubiquinones, les groupements prényl et l'ergostérol, essentiel à l'intégrité de la membrane cellulaire.

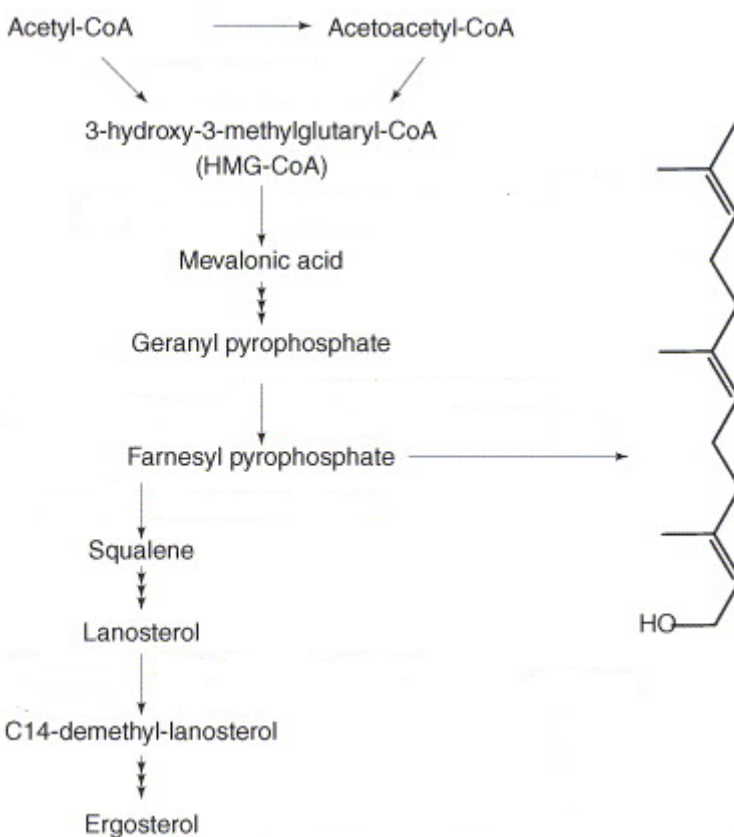


Figure 16. Voie du mévalonate

Voie du mévalonate, où il est possible d'observer que le farnésol est produit à partir du farnésyl pyrophosphate (132).

3.3.2. Action du farnésol

Cette molécule joue un rôle majeur, lors de la transition morphologique, en empêchant la formation d'hyphes. Sur certains milieux solides peu nutritifs, tels que sur *tripticase yeast peptone*, les colonies de *C. albicans* ont tendance à former des colonies chevelues causées par la formation des hyphes. Habituellement, l'ajout de farnésol exogène dans le milieu prévient cette germination, et il est alors possible d'observer, sur agar, des colonies lisses composées de blastospores (Congrès sur les biofilms (ASM Québec 2007) et sur les candidoses (ASM New Jersey 2008)). Le laboratoire de J. Barbeau possède des souches qui ne répondent pas ou très peu à l'ajout de cet isoprénoïde et de ce fait, conservent leur phénotype chevelu. Grâce à cette caractéristique, ces souches auront la capacité de former plus facilement un biofilm. Ces souches ont été nommées Non-Répondeurs au farnésol. Présentement, nous possédons six souches caractérisées Non-répondeur (HM1, ATCC® 10231 chevelue, ATCC® 36802, SP18, Hornby chevelue et 133NR). D'après des études antérieures effectuées au laboratoire, la proportion des Non-Répondeurs serait d'environ 2 %.

Diverses études ont été réalisées pour déterminer l'action du farnésol dans la transduction du signal et le contrôle de certains gènes chez cette levure. Tout d'abord, l'équipe de Kruppa démontre qu'une mutation du gène *Chk1p*, où la protéine produite code pour une histidine kinase d'un système à deux composantes, n'engendre pas l'inhibition de la germination en présence de farnésol chez *Candida albicans* (77) (figure 17). La protéine produite par ce gène posséderait certaines similitudes avec deux protéines, ayant pour fonction d'agir comme senseur du stress oxydatif chez *Schizosaccharomyces pombe*.

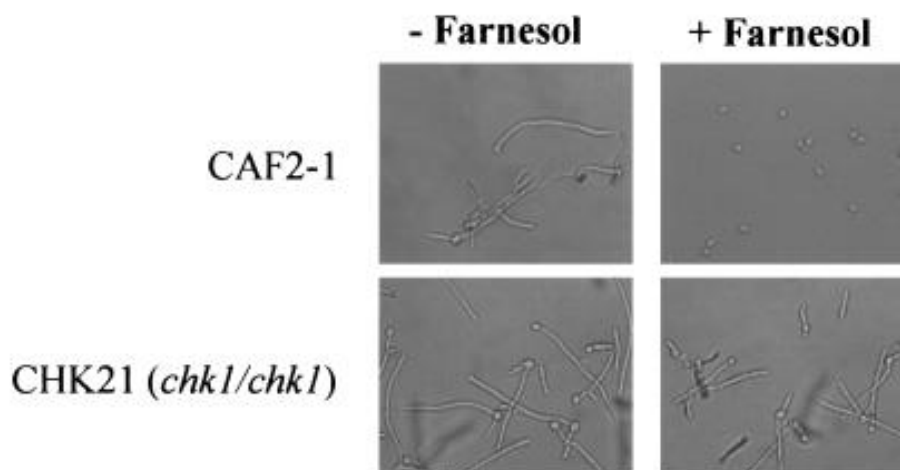


Figure 17. Influence du farnésol sur la germination du mutant *chk1p* et de la souche sauvage CAF2-1

Photomicrographie du mutant CHK21 (*chk1/chk1p*) et de la souche sauvage CAF2-1 en présence ou pas de 250 μ M de farnésol. On peut clairement observer que le mutant n'est pas sensible à cette molécule, d'où le rôle possible de *CHK21* lors de la transition morphologique (77).

Une analyse plus approfondie de l'action du farnésol sur les gènes de *C. albicans* a été réalisée par l'équipe de Cao. Ainsi, une analyse par micropuce d'ARN (*microarray*), sur un biofilm démontre que cette molécule contrôle l'expression de plusieurs gènes. De ceux-ci, ils ont remarqué que cette molécule influence l'expression de certains gènes important lors du développement des hyphes (*tup1* et *crk1cx*), de la résistance aux antifongiques (*fcr1* et *pdr16*) et de l'intégrité de la paroi cellulaire (*cht2* et *cht3*) (104) (23).

En plus d'inhiber la transition morphologique de blastospores à hyphes, cette molécule produite et sécrétée par *C. albicans* possède des propriétés antimicrobiennes. Elle réduit considérablement la croissance de plusieurs microorganismes, tels qu'*Aspergillus nidulans*, *Streptococcus mutans* et *Saccharomyces cerevisiae* (90, 130).

Plusieurs autres fonctions du farnésol chez les cellules eucaryotes ont été élucidées. Ainsi, cette molécule accélère la dégradation de l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA) *in vitro* et *in vivo* (31, 93). La principale fonction de cette enzyme est de convertir le HMG-CoA en mévalonate. La régulation de cette enzyme semble être très importante puisque l'accumulation des produits résultant de cette voie peuvent être très toxiques pour les cellules (94). Une étude de Shirliff démontre que le farnésol, à grande concentration (200 μ M) induit l'apoptose

chez les cellules de *C. albicans*. Ils ont démontré, lors de l'ajout d'une concentration élevée de farnésol (200 μM) sur les cellules, que le gène *MCA1* est surexprimé et de ce fait, permet l'activation des caspases. L'activation de ces caspases est une étape cruciale au phénomène d'apoptose (135) (figure 18-19).

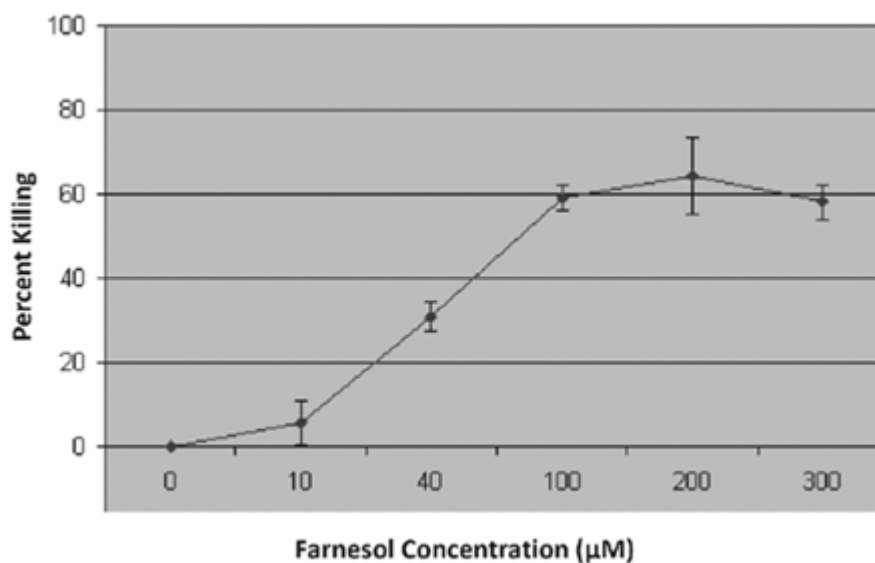


Figure 18. Pourcentage de mortalité des cellules de *C. albicans* en fonction de la concentration de farnésol

Cette figure démontre qu'en présence de 200 μM de farnésol, seulement 40 % des cellules survivent (135).

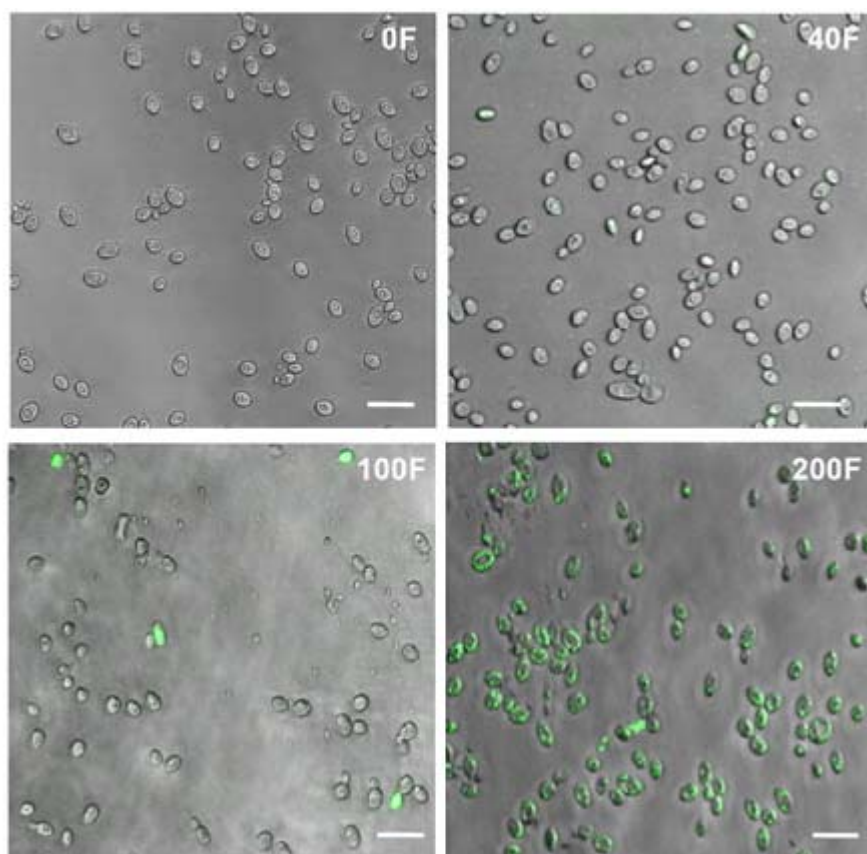


Figure 19. Activation des caspases chez *C. albicans* en fonction de la concentration de farnésol

Image par fluorescence confocale de l'activation des caspases chez les cellules de *C. albicans* en fonction de la concentration (μM) de farnésol ajouté. L'activation des caspases est représentée par la couleur verte. La concentration de farnésol est indiquée dans chaque boîte par le nombre, suivi de la lettre F et la barre du bas représente $20\ \mu\text{m}$ (135).

Une des propriétés du farnésol est d'inhiber la germination chez *C. albicans*. Puisque la formation des hyphes est essentiel lors de la formation de biofilm, l'inhibition de la formation des hyphes devrait en partie diminuer la production du biofilm (15). L'étude de Kruppa démontre ce fait. Ils ont démontré qu'aucune inhibition de la germination n'est observable, lors de l'ajout de farnésol exogène, chez une souche mutante *chk1p*. Ils ont ainsi observé aucune inhibition dans la formation de biofilm, malgré l'ajout de 25 et de 250 μM de farnésol chez ce mutant comparativement à la souche sauvage, où la formation du biofilm est grandement inhibée (77) (figure 20).

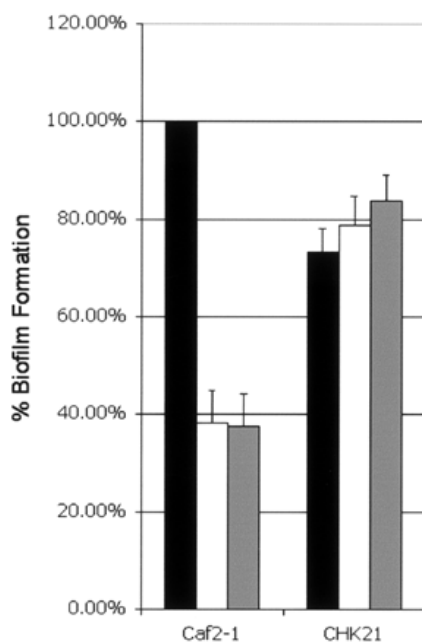


Figure 20. Influence du farnésol sur la formation de biofilm chez la souche mutante (CHK21) et sauvage (CAF2-1)

La formation de biofilm est inhibée chez la souche sauvage par l'ajout de 25 μM (barre blanche) et de 250 μM (barre grise) de farnésol. Chez la souche mutante, aucune inhibition de la formation de biofilm n'est observée. La barre noire représente le contrôle (aucun ajout de farnésol) (77).

3.4. Autres molécules de la perception du quorum

D'autres molécules semblent contrôler la perception du quorum chez *C. albicans*. Le dodecanol semblerait avoir un effet similaire à la molécule de farnésol. Cette petite molécule stimulerait la voie Ras1-cAMP-Efg1 et de ce fait, empêcherait la formation des hyphes (36).

Une étude de Chen démontre, qu'une autre molécule de la perception du quorum, le tyrosol, est sous le contrôle de la densité cellulaire. Ainsi, lorsque l'inoculum de départ est dilué, une longue période de temps s'écoule avant le début de la phase exponentielle. Ce délai est aboli par la production du tyrosol chez cette levure. Cette molécule joue un rôle antagoniste à celui du farnésol en accélérant la formation des tubes de germination (26). Or, aucune inhibition n'est observée sur la formation de biofilm, lors de l'ajout de cette molécule comparativement à l'addition de farnésol (figure 21).

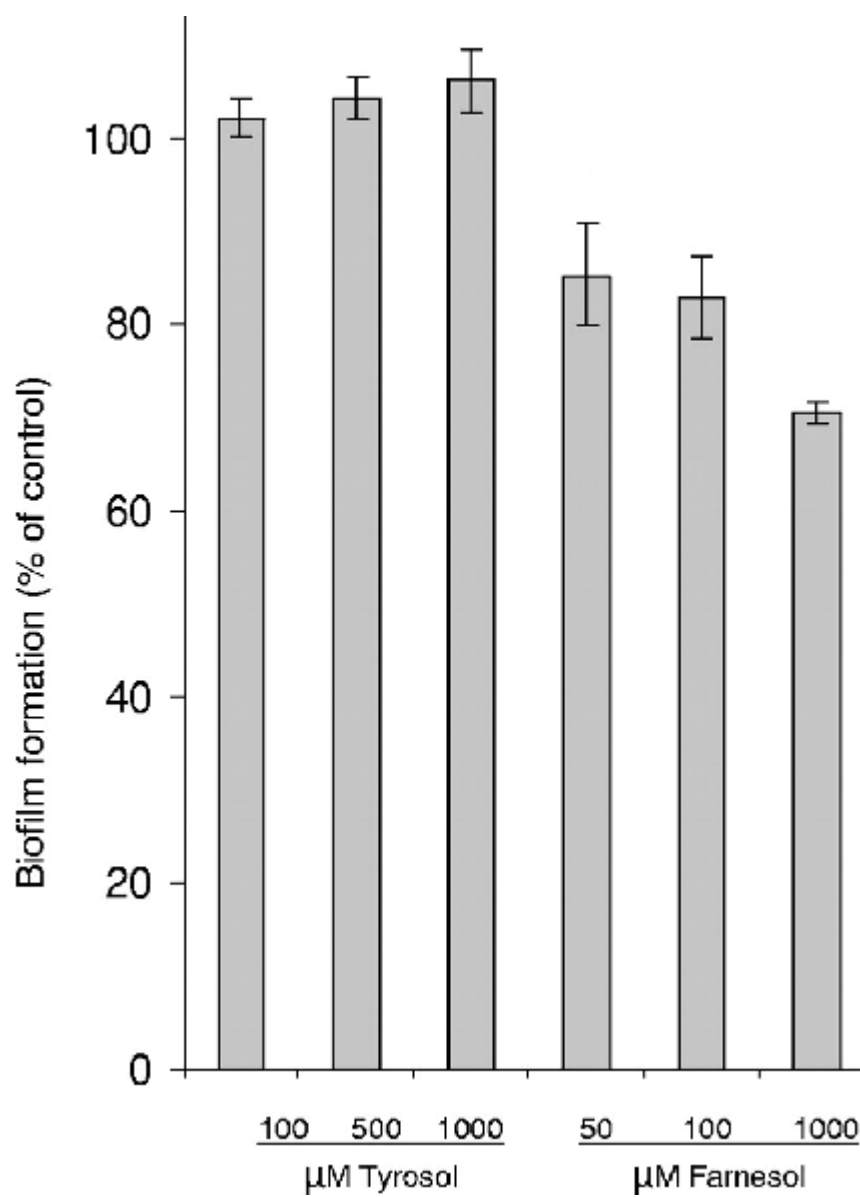


Figure 21. Comparaison entre l'action du tyrosol et du farnésol sur la formation de biofilm

La formation de biofilm chez *C. albicans*, est inhibée par l'ajout de farnésol comparativement à l'ajout de tyrosol, où aucune inhibition est observée (6).

4. Méthodes d'évaluation de patrons génétiques

4.1. Introduction

Avant l'avancement des connaissances en biologie moléculaire, l'identification des souches s'effectuaient principalement d'après leur réactions biochimiques et physiologiques (110). Ces identifications causaient une multitude de complications lors de l'interprétation des résultats. La principale difficulté remarquée est la présence possible de plusieurs variants métaboliques au sein du même isolat, rendant ainsi l'identification très laborieuse (30, 69).

Le développement des techniques de biologie moléculaire permet aujourd'hui, d'effectuer de multiples études sur la génétique entre différentes souches grâce à l'élaboration de plusieurs méthodes d'évaluation de patrons génétiques, comme par exemple le séquençage de gènes. Ainsi, ces méthodes permettent aux chercheurs et cliniciens d'observer rapidement la parenté entre différentes souches et d'identifier les sources d'infections particulières. Par exemple, lors d'une candidose, ces méthodes contribueront plus efficacement et rapidement au diagnostic, qu'un test biochimique (142). Par contre, ces méthodes d'évaluations ne possèdent pas une efficacité

identique et présentent toutes leurs limites. Nous présenterons deux méthodes proposées et efficaces à l'obtention de patrons génétiques.

4.2. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

La première méthode présentée est la technique RFLP. Tout d'abord, l'ADN est extrait, digéré par une ou plusieurs endonucléases et séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose. Le bromure d'éthidium est le colorant de choix pour la visualisation du profil obtenu. La séparation des bandes obtenues dépend de plusieurs paramètres, tels que le pourcentage d'agarose dans le gel, le temps de migration, le voltage et les endonucléases utilisées. La variation obtenue entre les différentes souches est sous l'emprise des différents sites de restrictions. Le grand avantage de cette méthode est dans sa rapidité (138). Par contre, la formation de patrons complexes rend l'interprétation et l'analyse très ardue. Par exemple, un patron RFLP, effectué par Coleman et *al.*, sur des souches de *Candida* spp. avec l'enzyme de restriction *EcoR1*, ne contient qu'un nombre limité de bandes adéquates à l'analyse (30).

4.3. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Jadis, cette méthode était populaire et très utilisée pour l'obtention de patrons génétiques. Le principe est simple. L'utilisation d'amorces aléatoires d'environ dix paires de bases permet d'obtenir des amplicons par PCR; ces amplicons couvrent théoriquement la totalité du génome. Ces amplicons sont ensuite séparés sur un gel d'agarose et visualisés à l'aide du bromure d'éthidium. On remarquera la présence de bandes majeures et mineures. Les bandes majeures sont définies comme étant celles de plus grandes intensités et retrouvées fréquemment, chez un grand nombre de souches d'une même espèce, tandis que les bandes mineures vont principalement permettre de dégager les polymorphismes génétiques. Un des problèmes rencontrés est la reproductibilité de ces profils. Ainsi, le thermocycleur utilisé, la concentration d'ADN, d'amorces et de magnésium affectent la reproductibilité de ces patrons (44). Des changements dans ces paramètres affecteront la présence ou l'absence de bandes mineures. Par contre, cette méthode s'effectue rapidement, est peu coûteuse et facile à effectuer. De plus, aucune information préalable sur le génome n'est requise. La vigilance lors de l'expérimentation permettra d'obtenir des profils discriminatoires entre les souches (107).

4.4. Analyse des patrons génétiques

À la suite de la création de ces profils génétique, divers programmes permettent d'obtenir un arbre phylogénétique ou un dendrogramme pour déterminer le degré de parenté génétique entre les souches. Ces programmes, tels que le DENDRON, calculent le coefficient de similitude entre les différents profils et classent ceux-ci selon leur parenté génétique. Ce programme polyvalent a été conçu principalement pour analyser de complexes patrons multibandes générés par RAPD ou hybridation Southern avec séquences répétitives (138). Le coefficient de similitude (S_{ab}) peut être calculé à l'aide de plusieurs formules différentes telles que le coefficient de Jacard, de Dice et de Jeffrey. Le plus utilisé est le coefficient de Jacard (138). Cette formule prend en considération seulement la position des bandes présentes dans le patron obtenu des différentes souches (138). Le coefficient de Jacard se résume ainsi: $S_{ab} = n_{11} / (n_{01} + n_{10} - n_{11})$, où n_{11} représente le nombre de bandes partagées entre deux souches (par exemple A et B), n_{01} représente le nombre de bandes présentes chez la souche A mais non chez la souche B et n_{10} , le nombre de bandes présentes chez la souche B et absentes chez la souche A. Cette formule peut être utilisée à tous patrons multibandes. De ce fait, une matrice de la distance génétique ($1-S_{ab}$) pourra ainsi être créée et un dendrogramme sera produit (27).

Hypothèses et Objectifs

La perception du quorum contrôle la transition morphologique chez *C. albicans*. Une molécule de la perception du quorum, le farnésol, inhibe la transition morphologique permettant le développement des hyphes et réduit du même coup, la formation de biofilm. Ainsi, la transition morphologique et la perception du quorum sont des facteurs importants dans le développement de biofilms, chez cette levure.

1. Hypothèses

- La capacité de formation du biofilm chez les Répondeurs est diminuée, comparativement aux Non-Répondeurs en présence de farnésol exogène, puisque les Non-Répondeurs possèdent la capacité de conserver leur phénotype chevelue en présence de cet isoprénoïde dans le milieu.
- En absence de farnésol exogène, les souches Non-Répondeurs produiront plus de biofilm que les Répondeurs.
- La technique RAPD-PCR permettra de regrouper les souches de *C. albicans* suivant leur provenance (orale et vaginale), leur capacité de formation de biofilm ou leur aptitude à répondre au farnésol.

2. Objectifs

- Constituer une candidathèque de souches orales et vaginales et les classer quant à la réponse au farnésol et leur capacité de formation de biofilms.
- Vérifier l'influence du farnésol sur la capacité de formation de biofilm.
- Mettre au point la technique RAPD-PCR pour dégager des polymorphismes génétiques capables de différencier nos souches et de les regrouper d'après leurs caractéristiques.

Matériel et Méthodes

Section 1 : Souches orales et vaginales, cultures et réponse au farnésol

1. Isolement et identification des souches de *Candida albicans*

1.1. Isolement et identification des souches orales de *C. albicans*

En plus des 26 souches déjà présente, et utilisées pour ce projet, dans le laboratoire de Dr. J. Barbeau, nous avons procédé à la récolte de 15 souches de *C. albicans* isolées de prothèses dentaires, chez des patients de la clinique de dentisterie de réhabilitation de l'Université de Montréal et l'Hôpital Général de Montréal en collaboration avec Dre E. Emami (D.D.S, M.Sc.). Le protocole suivant a été utilisé.

La prothèse dentaire est rincée à l'eau courante. Par la suite, elle est mise dans un sac ziploc[®] avec 30 mL d'eau saline stérile 0,85 % et le sac est refermé. Un traitement dans un bain ultrasonique (Cole Parmer Instrument Company) de cinq minutes permet le détachement du biofilm microbien attaché à la prothèse dentaire.

Des dilutions sérielles de 10^0 à 10^{-3} sont réalisées et 100 μ L de celles-ci sont ensemencées sur des géloses Sabouraud Dextrose (BD, Sparks, MD) et incubés à 37 °C durant 24 heures, en présence de 2,5 % CO_2 .

À la suite de cette incubation, une empreinte des colonies, à l'aide d'un filtre (Whatman, England), est effectuée sur milieu CHROMagar (CHROMagar, Paris, France). Ce milieu, donne une couleur spécifique aux colonies du genre *Candida*.

Trois autres tests effectués pour confirmer l'identification sont l'assimilation des sucres avec la galerie API 20C AUX (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France) et la germination dans le milieu sérum de veau (Quelab, Montréal, Québec). Un PCR avec une amorce spécifique à ce microorganisme est finalement effectué (voir plus bas).

1.2. Isolement et identification des souches vaginales

Cinquante deux souches d'origine vaginales en provenance de la Barbade ont été utilisées pour notre étude en collaboration avec le Dr. Alvin Cummins (Ph.D. de l'Université West-Indies, Barbados). L'identité de ces souches a été confirmée suivant les tests mentionnés plus haut.

1.3. Autres souches de *Candida albicans* utilisées

Notre laboratoire possédait déjà des souches de *C. albicans* et certaines de celles-ci ont été utilisées pour ce projet. Deux de ces souches proviennent de l'*American Type Culture Collection* (ATCC[®]) (tableau 1). La souche ATCC[®] 10231 semble posséder deux phénotypes différents. Nous les avons nommées (10231 chevelue et lisse) et évaluées différemment. Lors d'un projet parallèle effectué au laboratoire, nous avons acquis la souche ATCC[®] 10231 du laboratoire du chercheur J. M. Hornby et l'avons utilisée au courant de ce projet pour la comparer à la nôtre. Leur souche possède aussi deux phénotypes différents. Nous avons nommé ces souches Hornby chevelue et Hornby lisse.

Tableau 1. Souches utilisées

Souches de Candida albicans	Source
ATCC [®] 10231 lisse	Mycose bronchique
ATCC [®] 36802	Inconnue
LAM1	Candidose systémique
HM1	Inconnue
BL007	Candidose orale
ATCC [®] 10231 chevelue	Mycose bronchique
Hornby chevelue	Mycose bronchique
Hornby lisse	Mycose bronchique

1.4. Culture des souches de *C. albicans*

Les souches sont initialement inoculées sur un milieu Sabouraud Dextrose et incubées durant 24 heures à 37 °C + 2,5 % CO₂. Une colonie, qui s'est développée sur Sabouraud Dextrose, est inoculée dans 5 ml de *Trypticase yeast peptone* (TYP) en présence de 0.5 % glucose et incubées à 37 °C + 2.5 % CO₂ durant 24 heures.

1.5. Congélation des souches de *C. albicans*

Les colonies de *C. albicans* isolées ont été congelées à -80 °C dans un milieu TYP + glycérol 10 % (Fisher, Fair Lawn, NJ).

2. PCR (Polymerase chain reaction) d'identification

2.1. Extraction d'ADN

Les isolats de *C. albicans* sont mis en culture dans 15 mL de TYP + 0,5 % de glucose et incubés à 37 °C + 2,5 % CO₂. Le milieu TYP est composé de 60 % de trypticase peptone (BD, Sparks, MD), 11 % d'extrait de levure (BD, Sparks, MD), 19 % de chlorure de sodium (Fisher, Fair Lawn, NJ) et de 10 % de phosphate de sodium (Fisher, Fair Lawn, NJ). Chacune des suspensions de levures est lavée ensuite trois fois avec une solution saline stérile (0,85 %). Le culot est transféré dans un tube stérile de 1,5 mL (Sarstedt Inc., Newton, NC) et celui-ci est centrifugé durant 1 minute à 16 000 g (Kendro). Par la suite, 200 µL de Tampon A (2 % Triton-X100 (Fisher; Fair Lawn, NJ), 1 % SDS (Sigma; St Louis, MO), 100 mM de chlorure de sodium, 2 mM de Tris pH 8,0 (BioRAD, Hercules, CA) et 1 mM d'EDTA (Sigma; St Louis, MO)) est ajouté au tube. La suspension est ensuite transférée dans un autre tube stérile de 1,5 mL avec 200 µL de solution TE (10 mM de Tris-HCl pH 8,0 et de 1 mM d'EDTA), 0,3 g de sable d'Ottawa (Fisher, Fair Lawn, NJ) et de 400 µL de Phénol-Chloroforme-alcool Isoamyl (PCI) (25 :24 :1) (Invitrogen, Burlington, On). La suspension est ensuite agitée au vortex durant trois minutes, et

centrifugée cinq minutes à 16 000 g. La phase aqueuse est ensuite transférée dans un nouveau tube stérile de 1,5 mL. Par la suite, 200 µL de PCI est ajouté à la phase aqueuse et la suspension est agitée au vortex durant une minute et centrifugée sous les mêmes conditions que précédemment. À la suite de cette centrifugation, 1 mL d'éthanol 100 % (Les alcools de commerce, Brampton, On) est ajouté à la phase aqueuse suivie d'une incubation durant la nuit à -20 °C. Suite à l'incubation, une centrifugation est effectuée durant quinze minutes à 16 000 g. Le culot est ensuite dissout dans 400 µL de TE et 3 µL de RNase A (10 mg/mL) (Sigma, St Louis, MO) est ajouté au tube. Le tube est ensuite incubé à 56 °C durant 15 minutes. Suivant l'incubation, 10 µL d'acétate d'ammonium (4 M) (A&C Ltée, Montréal, Qc) et 1 mL d'éthanol (100 %) sont ajoutés à la suspension et le tout est incubé durant deux heures à -20 °C. La suspension est ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 16 000 g et le culot est resuspendu dans 1 mL d'éthanol (70 %). La suspension est ensuite centrifugée dix minutes à la même vitesse utilisée antérieurement. Le culot est ensuite séché à l'air libre et suspendu dans 25 µL de solution TE.

La pureté de l'ADN est évaluée à l'aide du ratio 260/280 nm au spectrophotomètre (ThermoSpectronic Biomate 3, Madison, WI). Le dosage de l'ADN génomique est déterminé grâce à la règle, où une unité de densité optique à 260 nm équivaut à 50 µg/mL d'ADN. Pour s'assurer que l'ADN n'est pas dégradé, une migration sur gel d'agarose 1 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) contenant du tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) et du bromure d'éthidium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) est effectuée.

2.2. PCR d'identification des *Candida albicans*

L'authenticité des souches de *C. albicans* a été confirmée à l'aide du test PCR. L'amplification des échantillons s'est déroulée dans un volume total de 25 µL. De ce 25 µL, 10 ng d'ADN, 2 U de Taq polymérase (New England Biolabs), le tampon de la Taq (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) (New England Biolabs), 200 µM de dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA) et de 12,5 pmol de chacune des deux amorces (ITS1 et ITS2) (Genosys, Sigma Chemical Aldrich, On) sont ajoutés au tube. Le résultat de l'amplification PCR fournit un amplicon d'une longueur de 273 paires de bases (pb), pour les souches de *C. albicans*. Le gène 5.8S rRNA est ciblé par ces amorces.

L'amplification a été effectuée par Thermocycleur (Electron Corporation, MBS Satellite 0.2G) d'après le programme suivant : une étape de dénaturation à 95 °C durant deux minutes suivie d'une pause à 75 °C pour ajouter la Taq Polymerase. Ceci est suivie de 30 cycles de 95 °C (1 minute), 59 °C (1 minute), 72 °C (1,5 minutes) et d'une étape d'élongation à 72 °C durant quinze minutes.

Une migration sur gel d'agarose 1 %, tel que décrit en section 1.3.1, est réalisée pour observer la présence ou non de l'amplicon à 273 pb.

3. Réponse au farnésol

L'effet du farnésol, sur le phénotype des colonies de *C. albicans*, a été vérifié sur toutes les souches, qui ont été utilisées lors des études de formation de biofilm et d'analyse de parenté génétique par RAPD. Le dépôt de 250 cellules sur un milieu solide TYE + 30 μ M de farnésol (Aldrich Chem. Co, Milwaukee, WI) nous permet d'observer cette réponse. Le (E, E)-farnésol est dilué dans le méthanol (dilution 10^{-3}) et 6,67 μ L/mL est ajouté au milieu solide pour obtenir une concentration finale de 30 μ M. Ces pétris sont ensuite incubés à 37 °C + 2.5 % CO₂ pour une durée de 24 heures.

Section 2 : Formation de biofilm

1. Biofilms

1.1. Formation de biofilms

La formation de biofilm, des différentes souches de *Candida albicans*, est vérifiée dans le milieu R2A. Des études antérieures effectuées au laboratoire ont démontrés que ce milieu est très propice à la formation de biofilm (38). Ce milieu est composé de 0,05 % d'extrait de levure, de protéose peptone (Difco, Detroit, MN), d'acides casamino (Difco, Détroit, MN), de dextrose (Difco, Sparks, MD), d'amidon soluble (Sigma, St. Louis, MO), de sulfate de magnésium (A&C Ltée, Montréal, Qc), de 0,03 % de pyruvate de sodium (Sigma, ST. Louis, MO) et de phosphate de potassium dibasique (Fisher, Fair Lawn, NJ).

Les biofilms sont cultivés dans des plaques stériles à 96 puits (Costar 3599) (Corning Inc., Corning, NY). Des volumes de 100 µL de milieu R2A, avec ou sans farnésol (30 µM), sont alors distribués dans les puits et inoculés avec une suspension de levures pour obtenir une concentration finale de 10^5 cellules/mL. Pour chaque souche, trois puits sont réservés pour l'expérimentation avec farnésol et trois sans farnésol. Il en suit d'une incubation de 24 heures à 37 °C + 2,5 % de

CO₂. De plus, la formation de biofilms de chacune des souches a été réalisée en triplicata sur trois jours différents, donc pour un total de neuf tests.

1.2. Méthode d'évaluation de la formation de biofilm

L'évaluation de la formation de biofilm, de nos souches de *C. albicans*, a été effectuée en deux volets. Tout d'abord, une évaluation au Crystal violet (CV) nous permet de connaître la quantité de biomasse produite par les cellules et le test de réduction des sels de tétrazoliums (XTT), nous fournit un indice de l'activité métabolique à l'intérieur du biofilm.

1.2.1. Évaluation par le Crystal violet

La coloration au CV nous permet de connaître la quantité de biofilm formé. Après une incubation de 24 heures, les puits contenant les biofilms sont rincés à l'eau courante et laissés à sécher. Lorsque les puits sont secs, à la suite du lavage à l'eau courante, le CV (100 %) (Difco, BD, Maryland) est ajouté aux puits pour une période de dix minutes. Le colorant est ensuite décanté, et les puits sont alors rincés à l'eau courante trois fois. La plaque est ensuite séchée à l'air libre et le colorant est extrait grâce à l'ajout de 100 µL/puits de solution décolorante. Cette solution est composée de 40 % de méthanol (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) et de 10 % d'acide acétique

glaciale (Fisher Scientific, Nepean, On). La densité optique de la solution décolorante est ensuite lue à 570 nm au spectrophotomètre à microplaques (Beckman Coulter, VWR).

1.2.2. Évaluation par la réduction des sels de tétrazoliums (XTT)

Cette méthode, décrite dans une étude de Tellier, nous fournis un indice de l'activité métabolique à l'intérieur du biofilm (144). La solution de XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) est préparée à une concentration de 1 mg/mL dans le lactate de Ringer. Le lactate de Ringer est constitué de 0,6 % de chlorure de sodium, 0,04 % de chlorure de potassium (Biopharm, Montréal, Qc), 0,027 % de chlorure de calcium (Fisher, Fair Lawn, NJ) et de 0,52 % de lactate de sodium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cette solution de XTT est conservé au congélateur à -80 °C et à la noirceur.

Une solution de ménadione (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) à une concentration de 1,72 mg/mL (10 mM) est préparée dans l'acétone (FisherScientific, Canada). Cette solution doit être utilisée la journée même de l'expérimentation. Le ménadione joue un rôle de catalyseur et accélère la réaction.

Précédent le test, 1 μ L de la solution de ménadione est ajoutée à 2 mL de solution XTT. Après avoir rincé les puits contenant les biofilms avec du salin stérile, 100 μ L de la solution XTT-ménadione est ajouté à chacun des puits. Les puits et le XTT sont incubés deux heures à 37 °C + 2,5 % CO₂ à la noirceur et suivit d'une lecture à 490 nm au spectrophotomètre à microplaque.

1.3. Statistiques

Tous les résultats statistiques ont été fournis par M. Pierre Rompré grâce au programme Systat. Tout d'abord, un Anova en mesures répétées a été effectué sur les tests de formation de biofilms (Crystal violet ou XTT). Cet Anova possède comme variable intra-sujet, l'ajout ou non de farnésol exogène dans le milieu et inter-sujet, la provenance des souches (orale ou vaginale). Ensuite, un test de t de Student pour échantillons appariés a été exécuté pour chacune des provenances et des tests de formation de biofilm, dépendamment de l'ajout ou non de farnésol. Selon encore l'ajout ou non de farnésol exogène, un Anova à une variable indépendante, suivi de

comparaisons pairées a été réalisé pour évaluer l'effet de la provenance sur la formation de biofilm. En dernier lieu, un test de t de Student pour échantillon indépendants a été accompli sur la réponse au farnésol (Répondeur et Non-Répondeur).

Section 3 : Patron d'analyse génétique par la méthode RAPD

1. RAPD-PCR

Pour l'analyse RAPD, dix amorces contenant 10 paires de bases ont été utilisées (910-25, OPE-3 (Invitrogen, Carlsbad, CA), OPE-19, OPA-04, OPE-12, OPF-12, OPE-20, OPE-3, OPE-18 and OPE-10 (Sigma, St Louis, MO) (119). Ces amorces ont été testées, au préalable, par Pujol et *al.* qui a vérifié l'efficacité et la variabilité de 40 amorces différentes. Les amorces ayant données les meilleurs résultats sont celles décrites plus haut et utilisées pour ce projet. Par contre, les amorces 910-25 et OPE-3 avaient déjà été utilisées au laboratoire (123) et nous les avons réutilisées pour cette étude. L'amplification a été effectuée par Thermocycleur (Electron Corporation, MBS Satellite 0.2G). Chacune des amplifications individuelles ont été effectuées dans un volume total de 25 μ L contenant 1.5 μ L de tampon PCR II (10x) (Invitrogen, Carlsbad; CA), 3 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen, Carlsbad; CA), 1.2 μ M d'amorces, 0.2 μ M de dNTPs (Invitrogen, Carlsbad; CA), 2.5 U de *Taq* polymérase (New England, Biolabs) et 1 μ L de la suspension d'ADN (10 μ g/mL). Le volume final est complété avec de l'eau Nanopure.

L'amplification est effectuée sous diverses conditions spécifiques. Ces conditions avaient déjà été testées au laboratoire lors d'une étude antérieure et démontraient une très bonne efficacité (rapport de stage présenté à la direction du *Network for Oral Research Training and Health* (NORTH), Marie-Claude Riendeau) (123). Premièrement, une étape de dénaturation de l'ADN est réalisée à 95 °C durant six minutes. Cette étape est suivie de 35 cycles d'une minute à 94 °C, 34 °C et 72 °C. Ces 35 cycles sont suivie d'une étape d'élongation à 72 °C durant sept minutes. Chacune des analyses RAPD ont été effectuées en triplicata.

2. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits RAPD amplifiés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % contenant du tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) et du bromure d'éthidium lors d'une migration de 1 heure et 45 minutes à 150 volts. À la suite de cette migration, le résultat est visualisé sous lampe ultraviolet à 300 µM.

3. Analyse des RAPD et dendrogramme

L'évaluation des patrons génétique générés a été réalisé par le programme Dendron (Soll Tech.). À l'aide d'un patron multibande généré par PCR, ce programme calcule le coefficient de similitude entre les différentes souches. La formule de Jacard a été utilisée pour calculer ce coefficient. À la suite de ce calcul, ce programme permet de classer les souches selon le degré génétique dans un dendrogramme.

Résultats

Section 1 : Création d'une candidathèque et réponse au farnésol

1. Candidathèque de souches orales

Comme mentionné précédemment, l'acquisition de souches orales de *C. albicans*, s'est effectuée à l'aide de sonicats de prothèse maxillaire supérieur à l'Hôpital Général de Montréal. Sur un total de 51 sonicats, 24 (47 %) de ceux-ci démontraient la présence de levures du genre *Candida*. Plusieurs espèces ont pu être observées. De ceux-ci, du *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* et *C. albicans* ont été recensés. La présence de *C. albicans* a été observée dans 15 (29 %) (15/51) des échantillons. Environ 10 % des autres souches étaient du *C. tropicalis*, 7 % du *C. krusei* et 1 % du *C. glabrata*. L'état des patients, lors de l'étude, est représenté au tableau 2.

Tableau 2. État des patients, des souches échantillonnées de sonicats de prothèses dentaires

Souche	Statut
OR1	Stomatite type II
OR8	Stomatite type II
OR5	Stomatite type I
OR6	Stomatite type II
OR3	Stomatite type I
OR9	Sain
OR11	Sain
OR18	Stomatite type II
OR21	Stomatite type II
OR24	Sain
OR33	Sain
OR36	Sain
OR40	Sain
OR42	Sain
OR45	Stomatite type II

2. Candidathèque de souches vaginales

La réception de 184 prélèvements de sécrétion vaginales, provenant de la Barbade, devait nous permettre d'obtenir des souches de *C. albicans* de provenance vaginale. Malheureusement, nous ne connaissons pas l'état des patients. Cette levure dimorphique était présente dans 52 de ces prélèvements (28 %). Les autres genres de *Candida* retrouvés dans ces échantillons sont sensiblement identiques à ceux observés dans les sonicats de prothèse. Ainsi, du *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. krusei* ont pu être remarqués sur pétris CHROMagar®.

3. Réponse au farnésol

La réponse au farnésol a été testée sur le milieu solide TYE en présence de 30 μ M de farnésol exogène. Des souches orales isolées, toutes réagissaient à la présence de cet isoprénoïde. Par contre, au laboratoire, nous possédons deux souches orales Non-répondeurs. La souche SP18 et HM1 démontrent cette caractéristique et conservent leur phénotype chevelu sur agar, en présence de farnésol exogène. D'après des études antérieures effectuées au laboratoire, la prévalence des Non-Répondeurs chez les souches de *Candida albicans* se situerait à 2 %.

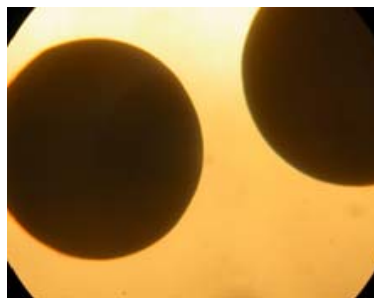
La réponse au farnésol a aussi été vérifiée pour les souches vaginales de *C. albicans*. Des 52 souches isolées, seulement la souche 133NR ne répond pas au farnésol sur milieu solide. Ce résultat concorde avec la prévalence de Non-Répondeur proposé au laboratoire. Comme il est possible de remarquer avec la figure 22, les Non-Répondeurs semblent produire une plus grande quantité d'hyphes même en absence de farnésol.

Figure 22. Comparaison de la réponse au farnésol (30 μ M) sur milieu solide TYP entre Répondeur (BL007) et Non-Répondeur (ATCC $\text{\textcircled{R}}$ 36802) (source labo Barbeau)

Répondeur (Sans Farnésol)



Répondeur (Avec farnésol)



Non-Répondeur (Sans Farnésol)



Non-Répondeur (Avec Farnésol)



Malgré le fait que les souches Non-Répondeurs démontrent principalement un phénotype chevelu sur le milieu TYE en présence de 30 μM de farnésol, certaines colonies de ces mêmes souches répondent à cette molécule et révèlent un phénotype lisse. C'est le cas des souches Non-Répondeur SP18 et 133NR. Chez les souches ATCC® 10231 chevelue, 133NR et SP18 respectivement, 23 %, 18 % et 5 % des colonies démontraient une morphologie lisse, en présence de farnésol. Pour les souches HM1 et ATCC® 36802, aucune colonie lisse n'a pu être détectée (tableau 3).

Tableau 3. Pourcentage de colonies chevelues obtenues sur milieu solide TYE en présence de 30 μM de farnésol des souches Non-Répondeurs

Souche	Pourcentage de colonies chevelues en présence de farnésol
ATCC® 36802	100
HM1	100
SP18	95
133NR	82
ATCC® 10231 chevelue	77

Section 2 : Production de biofilm

1. Comparaison de la formation de biofilm entre Répondeurs et Non-Répondeurs

La formation de biofilm entre Répondeurs et Non-Répondeurs est très différente. En absence de farnésol exogène dans le milieu, les Non-Répondeurs produisent en moyenne 29 % plus de biomasse que les Répondeurs (tableau 4)(Annexe I-III).

L'activité respiratoire mesurée au XTT est aussi distincte entre les deux caractéristiques. On peut remarquer une activité métabolique supérieure de 28 % chez les Non-Répondeurs comparativement aux Répondeurs en absence de farnésol (tableau 5).

Tableau 4. Densité optique moyenne (570 nm) obtenue par le test de Crystal violet représentant la quantité de biomasse formée ($p = 0,26933$ (Répondeurs) et $p = 0,1173$ (Non-Répondeurs)).

Souches	Densité optique (570 nm)	Écart-type	Nombre de souches
Répondeurs	0,7618	0,3503	104
Non-Répondeurs	1,0757	0,3527	6

Tableau 5. Densité optique moyenne (490 nm) obtenue par le test de réduction des sels de tétrazoliums

représentant l'activité métabolique des cellules qui forment le biofilm ($p < 0,05$).

Souches	Densité optique 490 nm)	Écart-type	Nombre de souches
Répondeurs	0,2379	0,1125	104
Non-Répondeurs	0,3148	0,1218	6

2. Comparaison de la formation de biofilm en fonction de l'origine des souches

Un des objectifs de recherche était de vérifier l'influence de la provenance de la souche, sur la formation de biofilm. D'après les résultats obtenus, les souches de provenance orale formeraient en moyenne 34 % plus de biomasse que les souches vaginales en absence de farnésol (tableau 6).

On peut aussi remarquer que les souches de provenance autre produiraient beaucoup plus de biomasse que les souches de provenance orale et vaginale en absence de farnésol. De ce fait, ces souches produiraient environ 29 % plus de biomasse que les souches orales et 53 % de plus que les souches vaginales ($p < 0,05$). Les souches considérées de provenance autre sont : ATCC® 10231, LAM1, ATCC® 36802 et HM1. Les deux premières ont été récoltées respectivement lors d'une mycose bronchique et d'une candidose systémique. Les souches ATCC® 36802 et HM1 ont été caractérisées de provenance autre, car leur source demeure inconnue.

Toujours en absence de farnésol, l'activité métabolique entre les différentes sources, obtenues grâce au test de réduction des sels de tétrazoliums, est sensiblement identique ($p < 0,05$) (tableau 7).

3. Inhibition de la formation de biofilm par le farnésol et effet de cette molécule sur le biofilm des souches Non-Répondeurs.

La molécule de farnésol possède la capacité d'inhiber la germination chez *C. albicans*. La diminution du développement des hyphes, chez cette levure, réduit considérablement la production de biofilm de celle-ci. De ce fait, l'ajout de farnésol exogène dans le milieu de culture au temps zéro inhibe en quasi totalité la formation de biofilm.

L'ajout de farnésol exogène (30 μ M) va réduire drastiquement la formation de biomasse chez le biofilm. Cette molécule permet l'inhibition en moyenne de 70 % de la formation de la biomasse chez les souches orales, 75 % chez les souches vaginales et de 46 % chez les souches provenant d'une source autre, en présence de farnésol exogène ($p < 0,05$) (tableau 6).

Tableau 6. Densité optique moyenne (570 nm) et pourcentage d'inhibition de la formation de biomasse
obtenue par le test de Crystal violet, dépendamment de la provenance

Provenance des souches	Densité optique en absence de farnésol	Densité optique en présence de farnésol	Pourcentage d'inhibition
Orale (50 souches)	0,9014 \pm 0,2872	0,2664 \pm 0,1909	70 %
Vaginale (53 souches)	0,5970 \pm 0,3077	0,1468 \pm 0,1412	75 %
Autre (7 souches)	1,2817 \pm 0,3108	0,6956 \pm 0,4994	46 %

L'activité métabolique chez le biofilm est aussi réduite de 40 % chez les souches orales ($p < 0,05$), de 55 % chez les souches de provenance vaginale ($p < 0,05$) et de 10 % chez les souches de source autre ($p = 0,3990$) (tableau 7).

Tableau 7. Densité optique moyenne (490 nm) et pourcentage d'inhibition de l'activité métabolique du biofilm
obtenue grâce à la réduction des sels de tétrazolium (XTT), dépendamment de la provenance.

Provenance des souches	Absence de farnésol	Présence de farnésol	Pourcentage d'inhibition
Orale (50 souches)	0,2356 ± 0,1408	0,1391 ± 0,0971	40%
Vaginale (53 souches)	0,2498 ± 0,0886	0,1112 ± 0,0681	55%
Autre (7 souches)	0,2446 ± 0,0833	0,2201 ± 0,1343	10%

Les souches caractérisées Non-Répondeurs semblent être peu affectées par l'ajout de farnésol exogène dans le milieu. Ainsi, l'ajout de cette molécule, au temps zéro, inhibe, en moyenne, seulement 20% de la formation de biomasse et l'activité métabolique chez ces souches ne semblent pas du tout affectée. Chez les Répondeurs, au contraire, la formation de biomasse est inhibée d'environ 74 % et l'activité métabolique de 49 % (tableau 8-9 et figure 23).

Tableau 8. Densité optique moyenne (570 nm) et pourcentage d'inhibition
de la formation de biomasse obtenue par le test de Crystal violet

Souches	Absence de farnésol	Présence de farnésol	Pourcentage d'inhibition
Répondeurs (104 souches)	0,7618 ± 0,3503	0,1998 ± 0,1673	74%
Non-Répondeurs (6 souches)	1,0757 ± 0,3527	0,8638 ± 0,4165	20%

Tableau 9. Densité optique moyenne (490 nm) et pourcentage d'inhibition de l'activité
métabolique
obtenue par le test de XTT

Souches	Absence de farnésol	Présence de farnésol	Pourcentage d'inhibition
Répondeurs (104 souches)	0,2379 ± 0,1125	0,1202 ± 0,0778	49%
Non-Répondeurs (6 souches)	0,3310 ± 0,1218	0,3148 ± 0,1024	5%

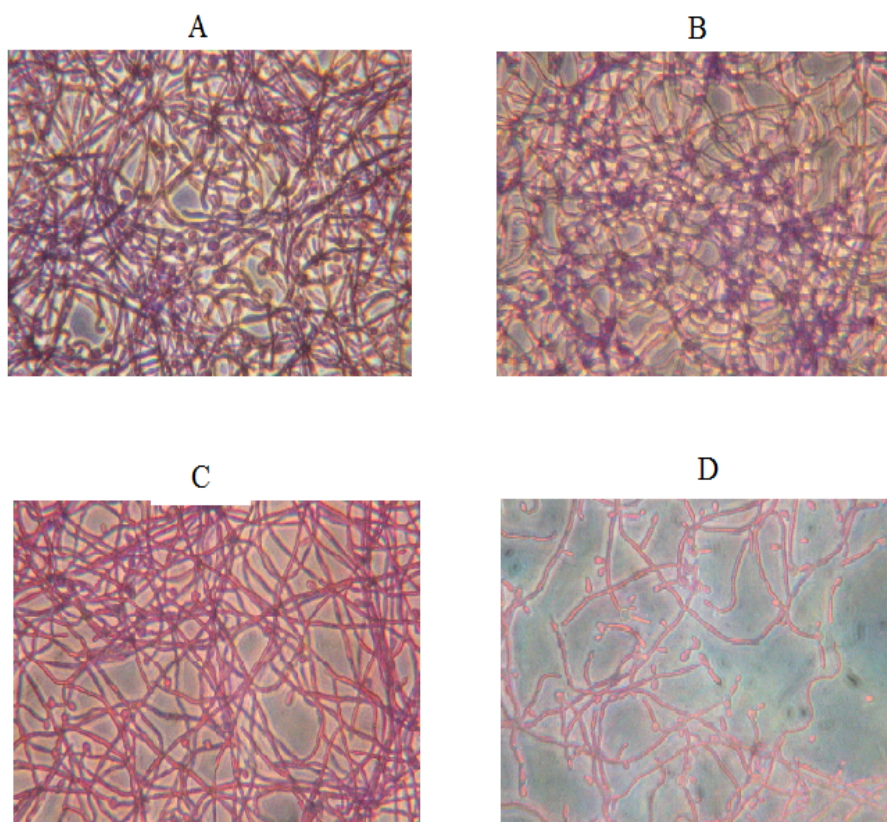


Figure 23. Formation de biomasse entre une souche Non-Répondeur (HM1) (A et B) et Répondeur (18 3715) (C et D)

Chez la souche Non-Répondeur, A représente la quantité de biomasse formée en absence de farnésol et B en présence de 30 μM de cette molécule. Chez la souche Répondeur, C représente la quantité de biomasse formé en absence de cet isoprénoïde et en D, la quantité de biomasse en présence du farnésol.

Plus tôt, nous avons mentionné qu'en absence de farnésol, les Non-Répondeurs produisaient en moyenne 29 % plus de biomasse que les Répondeurs. Lorsqu'on compare la quantité de biomasse formé, en présence de 30 μ M de farnésol, ce pourcentage augmente en flèche et les Non-Répondeurs produisent environ 77 % plus de biomasse que les Répondeurs (tableau 8).

Il en est de même pour l'activité métabolique des cellules formant le biofilm. En absence de cette molécule, le biofilm des Non-Répondeurs possèdent une activité métabolique supérieure d'environ 28%. Lors de la présence de cet isoprénoïde dans le milieu de culture, ce pourcentage grimpe à 61 % (tableau 9).

Section 3 : Analyse de la parenté génétique par RAPD

1. Profil génétique obtenu par RAPD

L'analyse des profils génétique a été effectuée sur 53 souches de *C. albicans*. Pour cette étude, nous avons utilisé 22 souches de source vaginale, 24 orales et 7 d'autre provenance. Au départ, ces souches ont été analysées à l'aide de dix amorces, chacune de dix paires de bases, par la méthode RAPD. Au préalable, huit de ces amorces ont été choisies d'après leur capacité à donner la meilleure variabilité dans le profil génétique (119). Toutes les analyses ont été exécutées en triplicata, et dans tous les cas, la présence des bandes majeures étaient reproductible, et ce pour des profils obtenus de différents extraits d'ADN du même isolat. Par contre les analyses RAPD, ont révélé de légères différences dans la présence des bandes mineures. Chacune des amorces utilisées ont permis de dégager approximativement le même nombre de bandes, dont environ cinq bandes majeures et sept bandes mineures (figure 24).

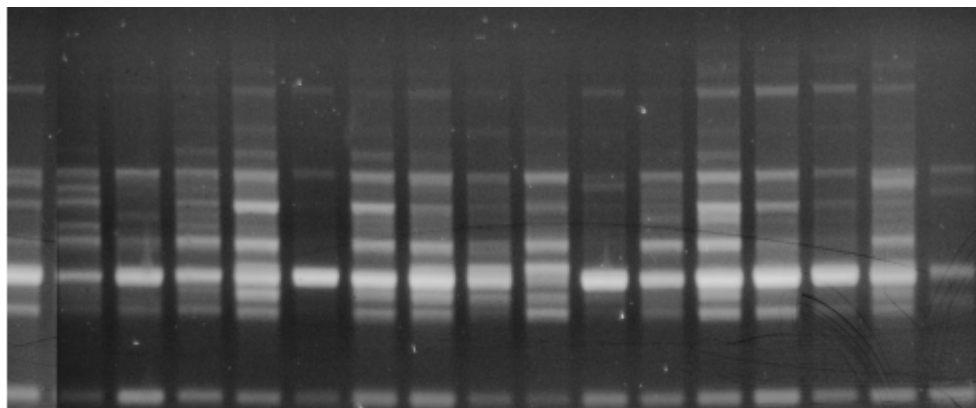


Figure 24. Patron génétique de souches de *C. albicans* obtenu avec l'amorce OPA3

Un dendrogramme représentant le degré de parenté génétique des 53 souches, à l'aide des dix amorces, a été produit grâce au programme DENDRON® (Figure 25). Ce programme a calculé le degré de parenté génétique (S_{AB}), grâce au coefficient de Jaccard qui prend seulement en considération, l'emplacement des bandes. Le S_{AB} moyen obtenu pour les 53 souches est d'environ 0,6. Le S_{AB} représentant le meilleur degré de parenté génétique est de 0,93 (entre la souche E3 et OR36) et le plus faible de 0,47. Ce faible degré de parenté génétique, comparé aux autres souches, nous provient de la souche orale OR3.

L'analyse du dendrogramme nous a permis de rassembler les souches en quatre groupes différents. Dans le groupe I, on remarque la présence d'une souche de provenance orale et une vaginale (83 et OR40). Ces souches ont une parenté génétique faible se situant près de 0,60. En plus d'être de provenance différente, ces souches ne possèdent pas la même capacité de

production de biomasse. La souche OR40 produit environ huit fois plus de biomasse que la souche 83 (Annexe I-IV).

Le groupe II est le groupement comportant le plus de souches. Ainsi, on retrouve la présence de 28 souches, dont douze vaginales, onze orales et cinq de provenance autre. De plus, nous pouvons remarquer la présence de quatre Non-Répondeurs parmi ces souches. Dans ce groupe, le degré de parenté génétique le plus élevé, nous provient des souches orales OR6 et BL007, et se situe à 0,91. Il est en moyenne de 0,67 pour l'ensemble des souches présentent dans ce groupe. La souche vaginale 66 possède une parenté génétique très faible comparativement aux autres retrouvés dans ce groupement (0,60). Dans ce groupement, on peut observer la présence des deux phénotypes différents de la souche 10231. On remarque que ces souches seraient différentes de près de 20 %. Une contamination entre les deux souches pourrait être une bonne hypothèse. Un autre sous-groupement de 5 souches (18, OR9, 7, 3702 et ATCC® 36802) soulève l'intérêt. À l'intérieur de ce sous-groupement, la souche 18 et OR9 possède un degré de parenté génétique élevé (90 %) et cette dernière produit environ dix fois plus de biomasse que la souche de provenance vaginale. De plus, dans ce sous-groupement, nous remarquons la présence d'une souche Non-Répondeur (ATCC® 36802). La capacité de formation de biofilm est très différente entre ces souches. Les souches de provenance vaginale produisent toutes en moyenne dix fois moins de biomasse, à l'intérieur du biofilm,

comparativement à la souche Non-Répondeur et orale (OR9). En somme, les deux souches les plus éloignées génétiquement (18 et ATCC® 36802) possèdent un degré de parenté génétique d'environ 84 %.

Le deuxième groupement en importance est le groupe III. Un total de 22 souches y est retrouvé. De ces souches, dix sont d'origine orale, dix de provenance vaginale et deux d'origine autre. Il est possible d'observer la présence d'un Non-Répondeur (133NR) dans ce groupe. Les souches de provenance orale, E3 et OR36 détiennent le plus haut niveau de degré de parenté génétique (0,93). Le degré de parenté génétique moyen entre les souches de ce groupement est de 0,70. Ces deux souches sont présentes dans un sous-groupement contenant 4 souches orales (E3, OR36, OR18 et BL52). Ces souches produisent pratiquement la même quantité de biomasse, sauf la souche BL52 qui en produit un peu plus. Les deux souches les plus éloignées possèdent un profil génétique différent d'environ 12 % (E3 et BL52). La souche HornbyC et HornbyL sont aussi présentes dans le deuxième groupement et elles ont un degré de parenté génétique de 78 %.

Le dernier groupement, groupe IV, est composé que d'une souche orale (OR3). Cette souche dispose d'une parenté génétique très faible (0,47) comparativement à tous les autres souches utilisées à la conception du dendrogramme.

1.1. Liens observables entre les souches présentes dans un même groupement

Au départ, le dendrogramme devait nous permettre de classer les souches, selon diverses caractéristiques des souches utilisées. Ces caractéristiques sont la provenance des souches, la capacité de formation de biofilm et l'aptitude à répondre au farnésol.

1.2. Liens observables selon la provenance des souches

D'après les résultats obtenus, la provenance ne semble pas être un facteur permettant de regrouper les souches entre-elles. Dans chacun des groupements, à l'exception du quatrième, le nombre de souches orales et vaginales est passablement identique. Par contre, il est possible de remarquer que certaines souches de même provenance possèdent un degré de parenté génétique élevé, par exemple : les souches E3 et OR36 qui possèdent un degré de parenté génétique de 93 %. Mais en générale, les souches de même provenance sont distribuées dans le dendrogramme.

1.3. Liens observables selon la capacité de formation de biofilm

La capacité de formation de biofilm est une autre caractéristique vérifiée pour permettre de regrouper les souches de *C. albicans*. À l'exception de certaines souches, la caractéristique de la formation de biofilm ne semble pas discriminatoire. De ce fait, dans le même groupement, il est possible de remarquer la présence de souche formant beaucoup de biomasse en compagnie de souches en formant peu. Donc, il ne semble pas possible de regrouper les souches d'après leur capacité à former du biofilm, à l'aide des amorces utilisées, lors de cette étude.

1.4. Liens observables selon l'aptitude à répondre au farnésol

Les Non-Répondeurs réagissent très peu à la présence de farnésol exogène dans le milieu. Il est intéressant de vérifier, si cette caractéristique permet de regrouper les souches Non-Répondeurs et Répondeurs entre-elles. Malgré le fait, que trois Non-Répondeurs sont retrouvés dans le groupe II, ils possèdent entre eux, un degré de parenté génétique faible (environ 0,60) et il en est de même avec celui retrouvé dans le groupe III. Donc, les amorces utilisées ne nous permettent pas de dégager les possibles différences génétiques retrouvées entre Répondeurs et Non-Répondeurs.

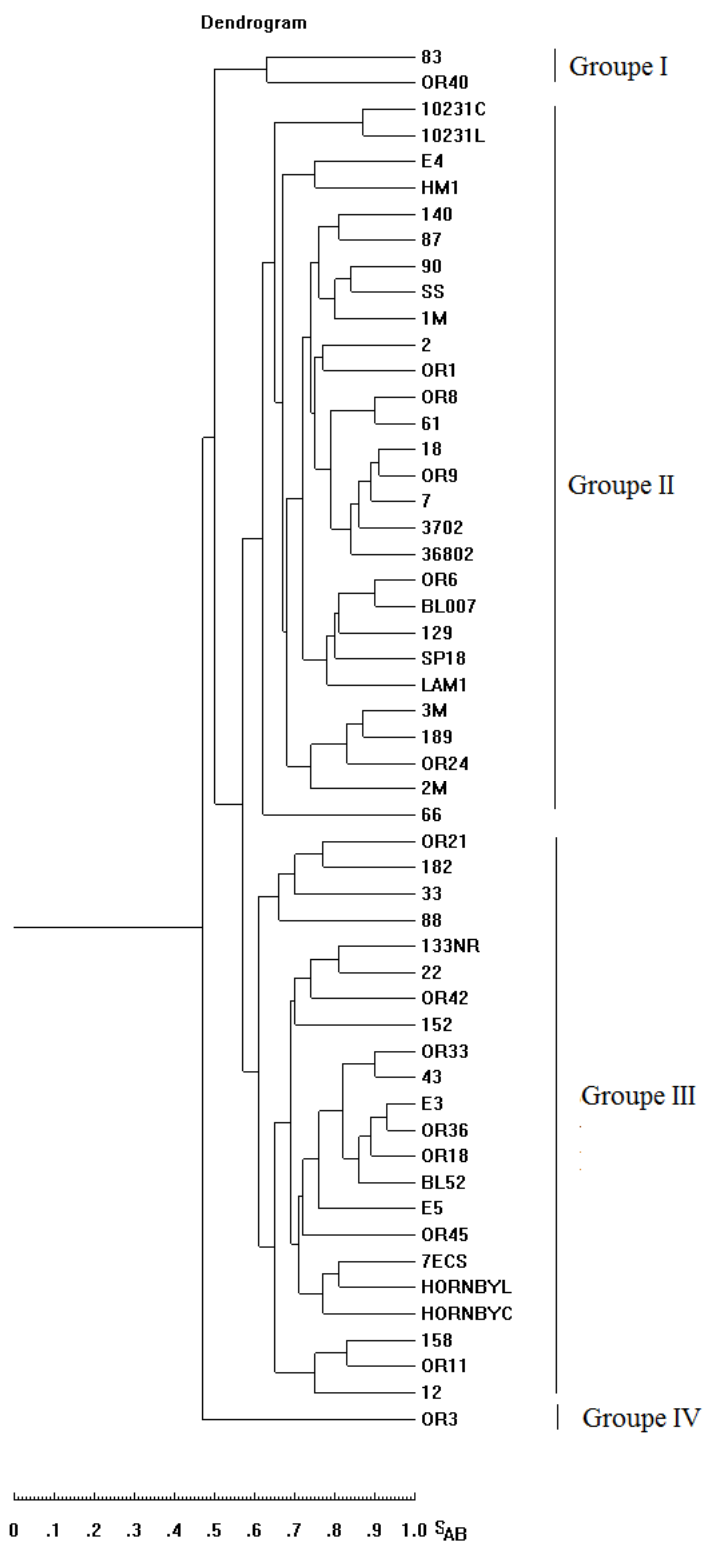


Figure 25. Dendrogramme obtenu avec 10 amorces différentes sur 53 souches de *C. albicans*

Discussion

Dans la plupart des environnements, une cellule planctonique est plus vulnérable aux changements environnementaux. C'est pourquoi, elle adopte un mode de croissance sessile. Ce mode de croissance hautement organisé, le biofilm, permet aux microorganismes de s'attacher à une surface et d'exhiber une multitude de nouvelles caractéristiques qui diffèrent de celles retrouvées chez la cellule planctonique (33). Parmi ces caractéristiques, il est possible de remarquer une résistance accrue aux antibiotiques et au système immunitaire.

La levure, *Candida albicans*, ne fait pas exception à la règle. Cette levure est fréquemment retrouvée dans la flore buccale et vaginale des sujets sains. Elle est aussi responsable de 70 % des infections vaginales et la présumée suspecte de la stomatite prothétique (27). Plusieurs formes de candidoses sont directement reliées à la production de biofilm. Les infections acquises, lors d'implantations d'appareils médicaux, sont couramment associées aux biofilms formés par cette levure (34).

Pour débiter ce projet de recherche, il était capital de créer une banque de souches de *C. albicans*. Lors de cette étude, les buts principaux de la collecte de souches sont de pouvoir permettre l'évaluation de la capacité de formation de biofilm entre ces souches, de comparer cette capacité selon leur

provenance et d'augmenter nos probabilités d'identifier et de caractériser d'autres Non-Répondeurs (70, 84, 125, 129). Ces souches Non-Répondeurs possèdent la capacité de répondre très faiblement au farnésol, comparativement aux Répondeurs et le principal effet de cette molécule de la perception du quorum est l'inhibition de la germination chez ces souches. Chez les Non-Répondeurs, il est possible d'observer que la formation d'hyphes est très peu inhibée et ceci pourrait favoriser la formation de biofilm. La caractérisation de nouveaux Non-Répondeurs est donc importante considérant la rareté de ce phénomène. De plus, ces souches pourraient permettre, dans le futur, de mieux comprendre l'action du farnésol sur la transition morphologique.

De tous les sonicats de prothèses maxillaires obtenus, 47 % démontraient la présence de levures, et 27 % de l'espèce *C. albicans*. Ce résultat est plus faible que celui présenté dans l'étude de Daniluk (35). Cette étude suggère qu'environ 67 % de la population portant une prothèse dentaire sont colonisés par cette levure dans leur cavité buccale. Une autre étude, traitant également de sujets portant la prothèse, définit cette prévalence et la situe près de 61 % (57). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, pour participer à cette étude, les patients présents devaient être conscients de l'importance d'entretenir leur prothèse dentaire. Il est donc parfaitement possible que les sujets aient pris la peine de brosser leur prothèse ou bien d'utiliser un rince-bouche avant leur rendez-vous. Ceci aurait pour effet de réduire considérablement la

quantité de levures présentent dans le sonicat. L'étape de sonication peut aussi être en jeu. Cette étape sert principalement à délier les agrégats de cellules attachés à la surface de la prothèse dentaire. Il se pourrait que cette étape réduise la viabilité des cellules. En revanche, une étude de Tunney, démontre que la sonication n'a aucun effet sur la viabilité (147). Il est aussi probable que l'efficacité de cette étape cruciale n'était pas maximale, et du même coup, ne délierait pas totalement les agrégats de cellules présents sur la prothèse, ce qui réduirait grandement nos chances d'obtenir de nouvelles souches de ce microorganisme. Il faut aussi prendre en considération le temps de transport entre l'Université de Montréal et l'Hôpital Général de Montréal. En conséquence, une perte de la viabilité des cellules n'est pas à écarter.

Pour accroître notre candidathèque, nous avons aussi fait la réception de souches vaginales provenant de la Barbade. Des 184 prélèvements obtenus, un total de 28 % des échantillons contenaient cette levure. Dans la littérature, le pourcentage est estimé entre 20 % (124) et 35 % (98). La présence d'un biais social peut être la cause de cette différence de la prévalence entre les deux études. Plusieurs prédispositions peuvent permettre la colonisation de cette levure dans cette cavité. Tout d'abord, la grossesse, la fréquence des activités sexuelles et la prise d'antibiotiques sont des facteurs favorisant cette colonisation (98, 137).

Au préalable, chacune des souches de *C. albicans* obtenues ont été testées sur un milieu TYE contenant 30 μ M de farnésol exogène pour déterminer leur capacité à répondre à cette molécule. Toutes les souches orales ont démontré une aptitude à réagir à la présence de cet isoprénoïde, tandis qu'une seule souche vaginale a été déclarée Non-Répondeur. La prévalence des Non-Répondeurs chez les souches vaginales a donc été estimée à 2 %. Antérieurement, au laboratoire, plusieurs autres souches orales ont été testées et la prévalence des Non-Répondeurs avait été évaluée à 2 %. Ainsi, la proportion de Non-Répondeurs, chez les souches orales et vaginales, s'avère sensiblement identique. Il semble donc possible de retrouver ce phénomène à différents endroits de colonisation.

Nous avons voulu vérifier la capacité de production de biofilm, en présence et absence de farnésol de chacune des souches (annexe I-III). Nous avons utilisé le milieu R2A pour la production de biofilm. Ce milieu faible en nutriment avait été mis au point pour mettre en évidence les bactéries auxotrophes de l'eau qui survivent en présence de faibles concentrations en nutriments (122). Les milieux pauvres en nutriments provoquent la germination chez *C. albicans*, étape cruciale de la formation de biofilm (110). Dans la littérature, il est décrit que cette levure lie grandement et spécifiquement les acides aminés non polaires aliphatiques et chargés positivement (61). Le milieu R2A ne contient qu'une très faible quantité d'acides aminés, principalement obtenu par l'hydrolyse de la caséine. Cette composante pourrait jouer un rôle dans l'attachement de *C. albicans* au polystyrène. Donc, il serait possible que le milieu R2A puisse induire la germination, due à sa faible teneur en nutriments, et à l'induction de l'expression, chez les cellules, de certains facteurs ou adhésines permettant l'attachement de celles-ci au polystyrène. Ces deux caractéristiques du R2A favoriseraient le développement du biofilm, ce qui en fait un milieu de choix pour cette étude.

Nous voulons démontrer que les différentes souches de *C. albicans* ne possèdent pas toutes la même capacité à développer un biofilm. Une telle étude prend tout son sens d'un point de vue clinique, en comparant l'habilité d'isolats cliniques à former un biofilm et la virulence. Une étude démontre que la formation de biofilm est associée au prolongement de l'infection et d'une mauvaise réhabilitation (59). Ainsi, les souches ayant la capacité de former plus de biofilm pourraient être plus virulentes.

Une comparaison de la capacité de formation de biofilm a été effectuée entre les souches orales et vaginales. Tout d'abord, pour évaluer la quantité de biomasse à l'intérieur du biofilm, nous avons utilisé la technique de coloration au CV. Ce colorant a été décrit pour la première fois par Christensen (28). Le CV lie les molécules chargées négativement, de la paroi cellulaire et des polysaccharides, à l'intérieur de la matrice d'exopolysaccharides (87). Il est très utilisé, pour la quantification des biofilms, car il est peu coûteux et simple (115). Par contre, 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 mortes (117).

Ainsi, en absence de farnésol exogène, les souches orales produisent 34 % plus de biomasse que les souches vaginales. Une des hypothèses serait que la cavité buccale est plus sujette à des mouvements mécaniques et un

nettoyage fréquent des dents ou de la prothèse dentaire. Ainsi, les souches de *C. albicans* colonisant la cavité buccale auraient pu développer une aptitude plus grande pour éviter son élimination, en formant un biofilm plus imposant. De plus, la présence d'acides aminés demeurant sur les parois de la bouche et entre les dents pourrait provoquer la formation de biofilm. Comme mentionné plus tôt, les milieux contenant certaines acides aminés permettraient l'adhérence des microorganismes (61). Les nutriments transitant dans la cavité buccale pourraient en contenir, ce qui favoriserait l'adhérence de cette levure. Les acides aminés présents dans le milieu R2A pourrait jouer un rôle dans cette adhérence. Cette adhérence pourrait contribuer grandement à la formation de biofilm, puisque l'étape d'attachement à une surface est primordial lors de sa formation (111).

La variabilité de pH entre les différents milieux peut aussi être une hypothèse intéressante. De ce fait, le pH du milieu R2A utilisé est évalué à 7,1 et il diffère de celui de la cavité vaginale et orale. Un pH différent pourrait empêcher du même coup, une formation maximale de biomasse chez les différentes souches. Le pH moyen de la cavité orale se situerait à 6,8 et celui de la cavité vaginale à environ 4,5 (1) (145). Donc, un pH neutre pourrait réduire la capacité de formation de biofilm des souches vaginales, qui habituellement, développent un biofilm à un pH plus acide. Par contre, une étude de Giaouris démontre que le pH n'a pas d'influence sur la formation de biofilm. En effet, ils ont testé différent pH, de 4,5 à 7,4, chez

une souche de *Salmonella enterica*, et dans tous les cas, le pH ne semblait pas être un facteur déterminant dans la formation de biofilm (54).

Une autre technique pour évaluer le biofilm est la réduction des sels de tétrazolium (XTT). Cette réduction est proportionnelle au nombre de cellule métaboliquement active (115). Ce test est surtout utilisé pour la quantification des biofilms et la viabilité des cellules sous croissance planctonique (50, 116). Notre évaluation de l'activité métabolique, à l'intérieur du biofilm, démontre qu'elle est sensiblement identique entre les deux provenances, avec une légère différence de 10 %. Une étude de Li propose qu'il existe une corrélation entre l'activité métabolique du biofilm et la quantité de matrice extracellulaire produite (87). Nos résultats ne concordent pas avec cette affirmation. Nos résultats démontrent que les souches orales produisent plus de biomasse, mais possèdent une activité métabolique moindre que celle de provenance vaginale. Kuhn propose que certaines souches, sous la forme de biofilm, puissent avoir un métabolisme altéré, résultant en une diminution de la respiration cellulaire. De plus, il suggère que les souches formant un important biofilm puissent réduire leur métabolisme, ce qui résulterait en une baisse de la réponse au XTT (78). Il peut donc être probable que, sous forme de biofilm, les souches orales possèdent une respiration cellulaire plus faible que celles de provenance vaginales, ce qui pourrait expliquer ce résultat légèrement différent.

Simultanément, la capacité de formation de biofilm, en présence de 30 μ M de farnésol exogène, a aussi été vérifiée. On observe des baisses drastiques d'en moyenne 70 - 75 % de la formation de biomasse, et 40 - 55 % de l'activité métabolique chez les souches d'origine orales et vaginales. Une des fonctions du farnésol chez cette levure est d'inhiber le développement des hyphes, une autre étape essentielle à la formation du biofilm (15, 106). Donc, en conséquence, le farnésol provoque une diminution de la production de biofilm (121) et nos résultats démontrent bien ce phénomène. En revanche, chez les Non-Répondeurs, cette molécule a pour effet de réduire seulement 20 % de la formation de biomasse et l'effet ressenti sur l'activité métabolique est minime. Ce résultat nous indique qu'il y a bien une action du farnésol, chez les cellules Non-Répondeurs, mais à un très faible niveau.

La caractéristique spéciale des Non-Répondeurs est encore plus évidente lorsqu'on compare la capacité de formation de biofilm de ces souches comparativement à celle des Répondeurs. En effet, en absence de farnésol, les Non-Répondeurs produisent près de 30 % plus de biomasse que les Répondeurs. En présence de cet isoprénoïde, on remarque une augmentation d'environ 70 % de la formation de biomasse et de 61 % de l'activité métabolique.

Quelle sont les raisons expliquant que les Non-Répondeurs produisent plus de biofilm que les Répondeurs, en présence et en absence de farnésol exogène? Tout d'abord, il se pourrait que les Non-Répondeurs puissent avoir un déficit dans la voie de synthèse du farnésol. Il est aussi possible que le farnésol, produit par ces cellules, soit rapidement dégradé ou tout simplement utilisé dans une autre voie de signalisation (72). D'autres probabilités sont l'absence d'un récepteur du farnésol, d'une déficience au courant de la voie de signalisation de la réponse à cet isoprénoïde ou tout simplement la présence de mutations dans la voie de signalisation de la transition morphologique (72). Ces mutations pourraient causer un déficit de la réponse au farnésol, et du fait même empêcher l'inhibition de la germination et provoquer la formation de biofilm. Ces souches pourraient aussi avoir un gène *CHK1* déficient (77). Ce gène induit la formation d'une histidine kinase à deux composantes, ayant pour fonction la transduction de signal lors de la voie de signalisation. L'étude de Kruppa démontre que les souches de *C. albicans* possèdent une déficience dans la réponse au farnésol lorsque le gène *CHK1* est muté et non fonctionnel (77). Donc, chez les Non-Répondeurs, il se pourrait que ce gène soit muté, ce qui expliquerait la faible action du farnésol sur ces souches.

Précédemment, nous avons mentionné que la formation de biofilm est associée au prolongement de l'infection et d'une mauvaise réhabilitation (59). 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 Non-Répondeurs comparativement aux Répondeurs. Les résultats pourraient prouver que la germination et la formation de biofilm sont en étroite relation avec la virulence, puisque les Non-Répondeurs ont tendance à former plus facilement les hyphes.

Un des objectifs de ce projet de maîtrise est de vérifier la parenté génétique entre les différentes souches de *C. albicans*, en fonction de leur provenance, leur capacité de formation de biofilm et leur aptitude à répondre au farnésol. Ainsi, la technique RAPD et l'utilisation de plusieurs amorces différentes, utilisées antérieurement dans une étude de Pujol (119) et au laboratoire, devraient nous permettre d'établir des liens entre les différentes souches.

En premier lieu, il est intéressant de vérifier si la provenance de la souche aurait un impact sur les différents groupements présents dans le dendrogramme. Lors de l'obtention de celui-ci, il nous a été possible d'observer que la provenance n'est pas un facteur qui permet de relier les souches entre-elles. De ce fait, les souches de provenance orale et vaginale sont distribuées de façon aléatoire dans le dendrogramme. Par la suite, nous

désirions vérifier l'importance de la capacité de formation de biofilm des différentes souches (Annexe 1-2-3) sur les groupements obtenus. Encore une fois, d'après les résultats obtenus, rien ne nous permet d'observer une parenté génétique évidente, dépendamment de cette production. Ainsi, une souche produisant beaucoup de biofilm peut se retrouver dans le même groupement qu'une souche en produisant peu et vice-versa. Le dernier lien permettant de regrouper les souches de *C. albicans*, est l'aptitude de celles-ci à répondre au farnésol. Malgré l'utilisation de dix amorces différentes, les souches Non-Répondeurs semblent posséder une parenté génétique faible.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les résultats obtenus. La technique RAPD est largement utilisée à l'obtention de profil de parenté génétique. Par contre, certains paramètres affectent l'apparition des bandes majeures et mineures. Ainsi, la concentration d'ADN, d'amorces utilisées et de magnésium affectent la reproductibilité de ces patrons (44). Il se pourrait que des différences, entre ces concentrations, affectent l'apparition de certaines bandes, qui pourraient éventuellement discriminer nos souches. Par contre, pour contrer ce problème, chacune des souches ont été testées en triplicata, pour justement permettre d'évaluer la variabilité entre des tests différents. À la suite des ces tests, nous pouvons affirmer qu'il est possible d'obtenir une bonne reproductibilité entre les patrons. En contrepartie, de légères différences dans la présence des bandes mineures pouvaient être observées. Nous avons donc utilisé le patron qui nous semblait posséder le moins de variations. Par exemple, il se pouvait que

certaines bandes mineures se retrouvent que sur deux des trois patrons. Nous avons donc éliminé le patron qui nous semblait inapte pour notre étude.

Il est envisageable que les amorces utilisées ne permettent pas de cibler les ressemblances génétiques selon la provenance, l'habileté à répondre au farnésol ainsi, que leur capacité à produire un biofilm, car ces amorces couvrent qu'une petite partie du génome. Par contre, il se peut très bien qu'il n'existe aucun lien génétique direct entre ces caractéristiques chez cette levure. Une étude de Duran démontre que chez des souches de *C. albicans*, la technique RAPD ne permet pas de dégager des polymorphismes génétiques selon la capacité à former un biofilm (42). Par contre, ils ont utilisé des amorces différentes des nôtres.

Il est également probable que le nombre d'amorce utilisée est trop élevé. Il est possible que l'utilisation de dix amorces dégage trop de polymorphismes génétiques différents, rendant les souches toutes différentes l'une des autres. Il est évident que toutes ces souches possèdent un bagage génétique différent, mais par contre, comme nous pouvons le constater à l'annexe 4, un dendrogramme de l'amorce OPA19 présente des souches de parenté génétique identique. Toutes les amorces individuelles utilisées ont la capacité de fournir un dendrogramme possédant plusieurs groupements et contenant des souches de parenté génétique identique pour ces amorces. Mais lorsqu'on vérifie les caractéristiques (provenance, la capacité de formation de biofilm et la réponse au farnésol) entre les différentes souches

présentes dans les groupements, il nous est encore impossible de mettre en relation ces caractéristiques et la parenté génétique. Il est important de mentionner que la plupart des études, qui font appel à la technique RAPD, utilisent environ d'une à quatre amorces pour obtenir leur patron génétique (32, 42, 59, 100, 107).

Les deux phénotypes de la souche ATCC[®] 10231 possèdent un degré de parenté génétique différent d'environ 20 %. Quelques hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, il est possible que les deux phénotypes soient vraiment différents génétiquement, car une répond au farnésol tandis que l'autre conserve son phénotype chevelue en présence de cet isoprénoïde. Une mutation peut-être survenue au fil des générations pour permettre ce changement de phénotype. Pour être certains que cette mutation ne s'était pas produite dans notre laboratoire, nous avons fait l'acquisition d'une nouvelle souche chez ATCC[®] et le résultat était identique. Nous avons pu conclure que cette souche possédait deux phénotypes. Donc, il se pourrait que ces deux variantes de la souche ATCC[®] 10231 soit bel et bien différent génétiquement. Aussi, il est prouvé qu'une des faiblesses de la technique RAPD est sa sensibilité. Lors de l'exécution du RAPD, une légère différence dans la concentration des constituants (amorces, Taq polymérase) peut avoir joué un rôle crucial dans la différence des patrons obtenus. Alors, il est possible que les deux patrons devraient être identique et que la technique n'a pas été efficace à nous fournir ce résultat.

Les souches Hornby lisse et chevelue sont aussi génétiquement différentes d'environ 20 %. Les mêmes raisons invoquées plus haut sont aussi valables pour expliquer ce résultat. Étrangement, ces souches sont très éloignées des souches ATCC[®] 10231. Encore une fois, il est impossible d'écarter la possibilité que la technique RAPD n'ait pas été efficace à discriminer les souches selon leur parenté génétique. Par contre, une contamination de la souche, dans le laboratoire de Hornby, est envisageable, ce qui expliquerait cette différence génétique entre ces souches et celles qui nous aient parvenues d'ATCC[®].

En conclusion, notre étude a permis de vérifier certaines de nos hypothèses. Tout d'abord, grâce à l'acquisition de souches de *C. albicans*, nous avons pu démontrer que le phénomène de déficit à la réponse au farnésol est aussi présent chez les souches vaginales. De plus, la prévalence des Non-Répondeurs est sensiblement identique à notre évaluation émise, soit près de 2 %. De plus, l'analyse de la production de biofilms démontre que les souches utilisées ne possèdent pas toutes la même capacité de formation de biofilm. L'évaluation de la formation de biofilm nous permet aussi de conclure que les Non-Répondeurs produisent plus de biofilm en moyenne que les Répondeurs, en absence et en présence de farnésol exogène. Ainsi, les Non-Répondeurs pourraient être des mutants dans la voie de signalisation du farnésol, dans sa production ou bien via l'absence d'un récepteur pour cette molécule. La conception de patrons génétiques, par la technique RAPD, nous ne fournit pas de résultats concrets de la relation

possible entre parenté génétique et les caractéristiques proposées (capacité de formation du biofilm, provenance des souches et aptitude à répondre au farnésol). L'utilisation d'un nombre trop élevé d'amorces ou tout simplement d'une inaptitude des amorces à dégager les polymorphismes génétiques peuvent en être la cause.

Grâce à ces propriétés anti-germination, la molécule de farnésol pourrait, dans l'avenir, devenir un agent thérapeutique prometteur permettant de contrôler la formation des biofilms chez *C. albicans*. De plus, l'existence de souches Non-Répondeurs pourrait permettre, ultérieurement, de connaître et de comprendre le mécanisme d'action du farnésol, de sa production à son activité au sein de la cellule.

Références

1. **Aframian, D. J., T. Davidowitz, and R. Benoliel.** 2006. The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Dis* **12**:420-3.
2. **Akpan, A., and R. Morgan.** 2002. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* **78**:455-9.
3. **Al-Fattani, M. A., and L. J. Douglas.** 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* **55**:999-1008.
4. **Al-Fattani, M. A., and L. J. Douglas.** 2004. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3291-7.
5. **Al Mosaid, A., D. J. Sullivan, and D. C. Coleman.** 2003. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4787-4789.
6. **Alem, M. A., M. D. Oteef, T. H. Flowers, and L. J. Douglas.** 2006. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell* **5**:1770-9.
7. **Anwar, H., J. L. Strap, and J. W. Costerton.** 1992. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:1347-51.
8. **Bahn, Y. S., J. Staab, and P. Sundstrom.** 2003. Increased high-affinity phosphodiesterase PDE2 gene expression in germ tubes counteracts CAP1-dependent synthesis of cyclic AMP, limits hypha production and promotes virulence of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **50**:391-409.
9. **Baillie, G. S., and L. J. Douglas.** 2000. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* **46**:397-403.
10. **Barbeau, J., J. Seguin, J. P. Goulet, L. de Koninck, S. L. Avon, B. Lalonde, P. Rompre, and N. Deslauriers.** 2003. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **95**:51-9.
11. **Bassler, B. L.** 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2**:582-7.
12. **Bendinger, B., H. H. Rijnaarts, K. Altendorf, and A. J. Zehnder.** 1993. Physicochemical Cell Surface and Adhesive Properties of Coryneform Bacteria Related to the Presence and Chain Length of Mycolic Acids. *Appl Environ Microbiol* **59**:3973-3977.
13. **Berman, J.** 2006. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **9**:595-601.
14. **Biswas, S., P. Van Dijck, and A. Datta.** 2007. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:348-76.

15. **Blankenship, J. R., and A. P. Mitchell.** 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* **9**:588-94.
16. **Bockmuhl, D. P., and J. F. Ernst.** 2001. A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* **157**:1523-30.
17. **Brint JM, O. D.** 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlRRhII, another set of regulators in strain LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol* **177**:7155-63
18. **Brown, B. R., and A. D. Johnson.** 1997. *A. D. Science* **277**:105.
19. **Brown, D. H., Jr., A. D. Giusani, X. Chen, and C. A. Kumamoto.** 1999. Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Mol Microbiol* **34**:651-62.
20. **Buffo, J., M. A. Herman, and D. R. Soll.** 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* **85**:21-30.
21. **Calderone, R. A.** 2002. *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington D.C.
22. **Cao, F., J. Li, X. Yan, Y. Wu, and D. Zhang.** 2005. Relationship between host survival and the type of immune response in different organs during disseminated candidiasis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **25**:141-3, 184.
23. **Cao, Y. Y., Y. B. Cao, Z. Xu, K. Ying, Y. Li, Y. Xie, Z. Y. Zhu, W. S. Chen, and Y. Y. Jiang.** 2005. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:584-9.
24. **Chaffin, W. L., J. L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martinez.** 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:130-80.
25. **Chandra, J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick, and M. A. Ghannoum.** 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* **183**:5385-94.
26. **Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy, and G. R. Fink.** 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:5048-52.
27. **Chong, P. P., Y. L. Lee, B. C. Tan, and K. P. Ng.** 2003. Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microbiol* **52**:657-66.
28. **Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, and E. H. Beachey.** 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* **22**:996-1006.
29. **Coco, B. J., J. Bagg, L. J. Cross, A. Jose, J. Cross, and G. Ramage.** 2008. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* **23**:377-83.

30. **Coleman, D. C., D. E. Bennett, D. J. Sullivan, P. J. Gallagher, M. C. Henman, D. B. Shanley, and R. J. Russell.** 1993. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives/new approaches. *Crit Rev Microbiol* **19**:61-82.
31. **Correll, C. C., and P. A. Edwards.** 1994. Mevalonic acid-dependent degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **269**:633-8.
32. **Costa, F., C. M. Manaia, M. H. Figueiral, and E. Pinto.** 2008. Genotypic analysis of *Candida albicans* isolates obtained from removable prosthesis wearers. *Lett Appl Microbiol* **46**:445-9.
33. **Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**:435-64.
34. **Cox, G. M., and J. R. Perfect.** 1993. Fungal infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* **6**:422-426.
35. **Daniluk, T., G. Tokajuk, W. Stokowska, K. Fiedoruk, M. Sciepek, M. L. Zaremba, D. Rozkiewicz, D. Cylwik-Rokicka, B. A. Kedra, I. Anielska, M. Gorska, and B. R. Kedra.** 2006. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. *Adv Med Sci* **51 Suppl 1**:77-80.
36. **Davis-Hanna, A., A. E. Piispanen, L. I. Stateva, and D. A. Hogan.** 2008. Farnesol and dodecanol effects on the *Candida albicans* Ras1-cAMP signalling pathway and the regulation of morphogenesis. *Mol Microbiol* **67**:47-62.
37. **Davis, D., R. B. Wilson, and A. P. Mitchell.** 2000. RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **20**:971-8.
38. **Desmeules, S.** 2004. Étude entre le senseur de quorum farnesol et la formation de biofilms par la levure opportuniste *Candida albicans*, vol. Université de Montréal, Montréal (mémoire de maîtrise).
39. **Doedt, T., S. Krishnamurthy, D. P. Bockmuhl, B. Tebarth, C. Stempel, C. L. Russell, A. J. Brown, and J. F. Ernst.** 2004. APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**:3167-80.
40. **Douglas, L. J.** 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**:30-6.
41. **Douglas, L. J.** 2002. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* **19**:139-43.
42. **Duran, E. L., M. T. Mujica, V. M. Jewtuchowicz, J. L. Finquelievich, M. V. Pinoni, and C. A. Iovannitti.** 2007. [Examination of the genetic variability among biofilm-forming *Candida albicans* clinical isolates]. *Rev Iberoam Micol* **24**:268-71.
43. **Edwards, P. A., and J. Ericsson.** 1999. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem* **68**:157-85.

44. **Ellsworth, D. L., K. D. Rittenhouse, and R. L. Honeycutt.** 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* **14**:214-7.
45. **Elorza, M. V., H. Rico, D. Gozalbo, and R. Sentandreu.** 1983. Cell wall composition and protoplast regeneration in *Candida albicans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**:457-69.
46. **Engebrecht, J., K. Nealson, and M. Silverman.** 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**:773-81.
47. **Engebrecht, J., and M. Silverman.** 1987. Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res* **15**:10455-67.
48. **Ernst, J. F.** 2000. Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146 (Pt 8)**:1763-74.
49. **Fabry, W., E. N. Schmid, M. Schraps, and R. Ansorg.** 2003. Isolation and purification of chlamydo spores of *Candida albicans*. *Med Mycol* **41**:53-8.
50. **Gabrielson, J., M. Hart, A. Jarelov, I. Kuhn, D. McKenzie, and R. Mollby.** 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J Microbiol Methods* **50**:63-73.
51. **Gambello, M. J., and B. H. Iglewski.** 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* **173**:3000-9.
52. **Garcia-Sanchez, S., S. Aubert, I. Iraqui, G. Janbon, J. M. Ghigo, and C. d'Enfert.** 2004. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* **3**:536-45.
53. **Geiger, J., D. Wessels, S. Lockhart, and D. R. Soll.** 2003. Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infection and Immunity* **72**:667-677.
54. **Giaouris, E., N. Chorianopoulos, and G. J. Nychas.** 2005. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica enteritidis* PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *J Food Prot* **68**:2149-54.
55. **Goldmann, D. A., and G. B. Pier.** 1993. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin Microbiol Rev* **6**:176-92.
56. **Gristina, A. G.** 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* **237**:1588-95.
57. **Gumru, B., T. Kadir, B. Uygun-Can, and S. Ozbayrak.** 2006. Distribution and phospholipase activity of *Candida* species in different denture stomatitis types. *Mycopathologia* **162**:389-94.
58. **Harris, S. D., N. D. Read, R. W. Roberson, B. Shaw, S. Seiler, M. Plamann, and M. Momany.** 2005. Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* **4**:225-9.

59. **Hasan, F., I. Xess, X. Wang, N. Jain, and B. C. Fries.** 2009. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect* **11**:753-61.
60. **Hawser, S. P., and L. J. Douglas.** 1995. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:2128-31.
61. **Hawser, S. P., and K. Islam.** 1998. Binding of *Candida albicans* to immobilized amino acids and bovine serum albumin. *Infect Immun* **66**:140-4.
62. **Hazen, K. C., and J. E. Cutler.** 1979. Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun* **24**:661-6.
63. **Hazen, K. C., and J. E. Cutler.** 1983. Isolation and purification of morphogenic autoregulatory substance produced by *Candida albicans*. *J Biochem* **94**:777-83.
64. **Henriques, M., M. Martins, J. Azeredo, and R. Oliveira.** 2007. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* morphogenesis. *Lett Appl Microbiol* **44**:199-205.
65. **Hogan, D. A.** 2006. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell* **5**:613-9.
66. **Hornby, J. M., E. C. Jensen, A. D. Lisec, J. J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault, and K. W. Nickerson.** 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* **67**:2982-92.
67. **Hornby, J. M., B. W. Kebaara, and K. W. Nickerson.** 2003. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2366-9.
68. **Hui, F. M., and D. A. Morrison.** 1991. Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence analysis shows *comA*, a gene required for competence induction, to be a member of the bacterial ATP-dependent transport protein family. *J Bacteriol* **173**:372-81.
69. **Hunter, P. R., and C. A. Fraser.** 1989. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **27**:2156-60.
70. **Irimes, C., Séguin, J., Roy, S., Barbeau, J.** 2008. Investigations on farnesol low-responsiveness in *Candida albicans* : Influence of CO₂, temperature and expression of selected genes. *Am. Soc. Micro., New-York*, avril 2008.
71. **Jansons, V. K., and W. J. Nickerson.** 1970. Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydospore of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **104**:910-21.
72. **Jensen, E. C., J. M. Hornby, N. E. Pagliaccetti, C. M. Wolter, K. W. Nickerson, and A. L. Atkin.** 2006. Farnesol restores wild-type colony morphology to 96% of *Candida albicans* colony morphology variants recovered following treatment with mutagens. *Genome* **49**:346-53.
73. **Kebaara, B. W., M. L. Langford, D. H. Navarathna, R. Dumitru, K. W. Nickerson, and A. L. Atkin.** 2008. *Candida albicans* Tup1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *Eukaryot Cell* **7**:980-7.

74. **Kim, S., E. Kim, D. S. Shin, H. Kang, and K. B. Oh.** 2002. Evaluation of morphogenic regulatory activity of farnesoic acid and its derivatives against *Candida albicans* dimorphism. *Bioorg Med Chem Lett* **12**:895-8.
75. **Kojic, E. M., and R. O. Darouiche.** 2004. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**:255-67.
76. **Koopmans, A. S., N. Kippuw, and J. de Graaff.** 1988. Bacterial involvement in denture-induced stomatitis. *J Dent Res* **67**:1246-50.
77. **Kruppa, M., B. P. Krom, N. Chauhan, A. V. Bambach, R. L. Cihlar, and R. A. Calderone.** 2004. The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **3**:1062-5.
78. **Kuhn, D. M., J. Chandra, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum.** 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* **70**:878-88.
79. **Kumamoto, C. A.** 2002. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* **5**:608-11.
80. **Kumamoto, C. A., and M. D. Vines.** 2005. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol* **59**:113-33.
81. **Kvaal, C. A., T. Srikantha, and D. R. Soll.** 1997. Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun* **65**:4468-75.
82. **Lachke, S. A., S. R. Lockhart, K. J. Daniels, and D. R. Soll.** 2003. Skin facilitates *Candida albicans* mating. *Infect Immun* **71**:4970-6.
83. **LaFleur, M. D., C. A. Kumamoto, and K. Lewis.** 2006. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3839-46.
84. **Landry, M. J., Séguin, J., Barbeau, J. .** 2002. Biofilm forming capacity of *Candida albicans* and modulation by farnesol. *Eur. J. Physiol.* 2002; 444 : R41-R77. Physiome 2002, Abstracts of the 70th Annula Meeting 18-20 September 2002, Québec, Canada (S5 53).
85. **Lewis, K.** 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* **5**:48-56.
86. **Lewis, K.** 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:999-1007.
87. **Li, X., Z. Yan, and J. Xu.** 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* **149**:353-62.
88. **Lo, H. J., J. R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G. R. Fink.** 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**:939-49.
89. **Lockhart, S. R., C. Pujol, K. J. Daniels, M. G. Miller, A. D. Johnson, M. A. Pfaller, and D. R. Soll.** 2002. In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type. *Genetics* **162**:737-45.

90. **Machida, K., T. Tanaka, Y. Yano, S. Otani, and M. Taniguchi.** 1999. Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism. *Microbiology* **145 (Pt 2)**:293-9.
91. **Martin, S. W., L. M. Douglas, and J. B. Konopka.** 2005. Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydozoospores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryot Cell* **4**:1191-202.
92. **Mateus, C., S. A. Crow, Jr., and D. G. Ahearn.** 2004. Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3358-66.
93. **Meigs, T. E., D. S. Roseman, and R. D. Simoni.** 1996. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase degradation by the nonsterol mevalonate metabolite farnesol in vivo. *J Biol Chem* **271**:7916-22.
94. **Meigs, T. E., and R. D. Simoni.** 1997. Farnesol as a regulator of HMG-CoA reductase degradation: characterization and role of farnesyl pyrophosphatase. *Arch Biochem Biophys* **345**:1-9.
95. **Miller, M. B., and B. L. Bassler.** 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**:165-99.
96. **Miller, M. G., and A. D. Johnson.** 2002. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**:293-302.
97. **Miller, S. E., B. O. Spurlock, and G. E. Michaels.** 1974. Electron microscopy of young *Candida albicans* chlamydozoospores. *J Bacteriol* **119**:992-9.
98. **Mohanty, S., I. Xess, F. Hasan, A. Kapil, S. Mittal, and J. E. Tolosa.** 2007. Prevalence & susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis. *Indian J Med Res* **126**:216-9.
99. **Mukherjee, P. K., J. Chandra, D. M. Kuhn, and M. A. Ghannoum.** 2003. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* **71**:4333-40.
100. **Muthig, M., A. Hebestreit, U. Ziegler, M. Seidler, and F. M. Muller.** 2009. Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Med Mycol*:1-8.
101. **Natarajan, K., M. R. Meyer, B. M. Jackson, D. Slade, C. Roberts, A. G. Hinnebusch, and M. J. Marton.** 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**:4347-68.
102. **Navarathna, D. H., J. M. Hornby, N. Hoerrmann, A. M. Parkhurst, G. E. Duhamel, and K. W. Nickerson.** 2005. Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. *J Antimicrob Chemother* **56**:1156-9.
103. **Nett, J., and D. Andes.** 2006. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* **9**:340-5.

104. **Nett, J. E., A. J. Lepak, K. Marchillo, and D. R. Andes.** 2009. Time course global gene expression analysis of an in vivo *Candida* biofilm. *J Infect Dis* **200**:307-13.
105. **Newton., A.** 1962. Denture sore mouth: a possible aetiology. *BR Dent J* **112**:357-60.
106. **Nickerson, K. W., A. L. Atkin, and J. M. Hornby.** 2006. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol* **72**:3805-13.
107. **Noumi, E., M. Snoussi, F. Saghrouni, M. Ben Said, L. Del Castillo, E. Valentin, and A. Bakhrouf.** 2009. Molecular typing of clinical *Candida* strains using random amplified polymorphic DNA and contour-clamped homogenous electric fields electrophoresis. *J Appl Microbiol*.
108. **Ochsner UA, R. J.** 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:6424–28
109. **Odds, F.** 1987. *Candida* infections: an overview. *Crit. Rev. Microbiol* **15 (1)**:1-5.
110. **Odds, F. C.** 1994. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* **31**:S2-5.
111. **Palmer, J., S. Flint, and J. Brooks.** 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**:577-88.
112. **Paulitsch, A. H., B. Willinger, B. Zsalatz, E. Stabentheiner, E. Marth, and W. Buzina.** 2009. In-vivo *Candida* biofilms in scanning electron microscopy. *Med Mycol*:1-7.
113. **Pearson, J. P., K. M. Gray, L. Passador, K. D. Tucker, A. Eberhard, B. H. Iglewski, and E. P. Greenberg.** 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:197-201.
114. **Pearson, J. P., C. Van Delden, and B. H. Iglewski.** 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**:1203-10.
115. **Peeters, E., H. J. Nelis, and T. Coenye.** 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* **72**:157-65.
116. **Pettit, R. K., C. A. Weber, M. J. Kean, H. Hoffmann, G. R. Pettit, R. Tan, K. S. Franks, and M. L. Horton.** 2005. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2612-7.
117. **Pitts, B., M. A. Hamilton, N. Zelver, and P. S. Stewart.** 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods* **54**:269-76.
118. **Prasad, R., S. L. Panwar, and Smriti.** 2002. Drug resistance in yeasts--an emerging scenario. *Adv Microb Physiol* **46**:155-201.

119. **Pujol, C., S. Joly, S. R. Lockhart, S. Noel, M. Tibayrenc, and D. R. Soll.** 1997. Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **35**:2348-58.
120. **Ramage, G., S. P. Saville, D. P. Thomas, and J. L. Lopez-Ribot.** 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* **4**:633-8.
121. **Ramage, G., S. P. Saville, B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot.** 2002. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol* **68**:5459-63.
122. **Reasoner, D. J., and E. E. Geldreich.** 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* **49**:1-7.
123. **Riendeau, M.-C.** 2002. La commutation phénotypique chez *Candida albicans* : une étude comparative du RAPD-PCR afin de catégoriser différentes souches selon leur empreinte génomique.
124. **Runhnke, M., and G. Maschmeyer.** 2002. Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer-review of the literature. *EUR.J.Med.Res.* **7**:227-35
125. **S. Desmeules , J. S., J. Barbeau.** 2003. Biofilm Formation of *Candida albicans* : Responders vs Non-Responders to Farnesol. ASM 103rd General Meeting, Mai 2003, Washington.
126. **Sakki, T. K., M. L. Knuutila, E. Laara, and S. S. Anttila.** 1997. The association of yeasts and denture stomatitis with behavioral and biologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **84**:624-9.
127. **Santarpia, R. P., 3rd, J. J. Pollock, R. P. Renner, and E. Spiechowicz.** 1990. An in vivo replica method for the site-specific detection of *Candida albicans* on the denture surface in denture stomatitis patients: correlation with clinical disease. *J Prosthet Dent* **63**:437-43.
128. **Saville, S. P., D. P. Thomas, and J. L. Lopez Ribot.** 2006. A role for Efg1p in *Candida albicans* interactions with extracellular matrices. *FEMS Microbiol Lett* **256**:151-8.
129. **Séguin, J., Messier, C., Barbeau, J.** 2002. Effect of farnesol on the switch pattern of *Candida albicans*. *Eur. J. Physiol.* 2002; 444 : R41-R77. Physiome 2002, Abstracts of the 70th Annula Meeting 18-20 September 2002, Québec, Canada (S5 50).
130. **Semighini, C. P., J. M. Hornby, R. Dumitru, K. W. Nickerson, and S. D. Harris.** 2006. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol* **59**:753-64.
131. **Sentandreu, R., J. P. Martinez, M. V. Elorza, and S. Mormeneo.** 1991. Relationship between dimorphism, cel wall structure, and surface activities in *Candida albicans*. *Cellular & Molecular Biology*:72-78.
132. **Shea, J. M., and M. Del Poeta.** 2006. Lipid signaling in pathogenic fungi. *Curr Opin Microbiol* **9**:352-8.
133. **Shepherd, M. G.** 1987. Cell envelope of *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* **15**:7-25.

134. **Shepherd, M. G., R. T. Poulter, and P. A. Sullivan.** 1985. *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. *Annu Rev Microbiol* **39**:579-614.
135. **Shirtliff, M. E., B. P. Krom, R. A. Meijering, B. M. Peters, J. Zhu, M. A. Scheper, M. L. Harris, and M. A. Jabra-Rizk.** 2009. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:2392-401.
136. **Slutsky, B., M. Staebell, J. Anderson, L. Risen, M. Pfaller, and D. R. Soll.** 1987. "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **169**:189-97.
137. **Sobel, J. D.** 1989. Pathogenesis of *Candida* vulvovaginitis. *Curr Top Med Mycol* **3**:86-108.
138. **Soll, D. R.** 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* **13**:332-70.
139. **Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl, and J. F. Ernst.** 1999. Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**:5514-7.
140. **Staab, J. F., C. A. Ferrer, and P. Sundstrom.** 1996. Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **271**:6298-305.
141. **Sudbery, P., N. Gow, and J. Berman.** 2004. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **12**:317-24.
142. **Sullivan, D. J., M. C. Henman, G. P. Moran, L. C. O'Neill, D. E. Bennett, D. B. Shanley, and D. C. Coleman.** 1996. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *J Med Microbiol* **44**:399-408.
143. **Sullivan, P. A., C. Y. Yin, C. Molloy, M. D. Templeton, and M. G. Shepherd.** 1983. An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. *Can J Microbiol* **29**:1514-25.
144. **Tellier, R., M. Krajden, G. A. Grigoriew, and I. Campbell.** 1992. Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:1619-25.
145. **Thinkhamrop, J., P. Lumbiganon, P. Thongkrajai, C. Chongsomchai, and M. Pakarasang.** 1999. Vaginal fluid pH as a screening test for vaginitis. *Int J Gynaecol Obstet* **66**:143-8.
146. **Tripathi, G., C. Wiltshire, S. Macaskill, H. Tournu, S. Budge, and A. J. Brown.** 2002. Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. *EMBO J* **21**:5448-56.
147. **Tunney, M. M., S. Patrick, S. P. Gorman, J. R. Nixon, N. Anderson, R. I. Davis, D. Hanna, and G. Ramage.** 1998. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br* **80**:568-72.
148. **Whiteway, M., and C. Bachewich.** 2007. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **61**:529-53.

149. **Wightman, R., S. Bates, P. Amornrattanapan, and P. Sudbery.** 2004. In *Candida albicans*, the Nim1 kinases Gin4 and Hsl1 negatively regulate pseudohypha formation and Gin4 also controls septin organization. *J Cell Biol* **164**:581-91.
150. **Wu, W., S. R. Lockhart, C. Pujol, T. Srikantha, and D. R. Soll.** 2007. Heterozygosity of genes on the sex chromosome regulates *Candida albicans* virulence. *Mol Microbiol* **64**:1587-604.
151. **Yang, Y. L.** 2003. Virulent factors of *Candida* species. *Journal of Microbiol Immunol Infect* **36**:223-228.
152. **Zordan, R. E., D. J. Galgoczy, and A. D. Johnson.** 2006. Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12807-12.
153. **Zordan, R. E., M. G. Miller, D. J. Galgoczy, B. B. Tuch, and A. D. Johnson.** 2007. Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol* **5**:e256.

ANNEXE I

Tableau 10. Densité optique (570 nm) des souches orales
représentant la quantité de biomasse formée (les Non-Répondeurs sont représentés en rouge).

Souches	Avec farnésol		Sans Farnésol	
	moyenne	ecart-type	moyenne	écart-type
OR1	0,124	0,036	0,806	0,297
OR8	0,155	0,067	0,783	0,110
OR5	0,292	0,112	0,856	0,185
OR6	0,143	0,047	0,723	0,110
OR3	0,411	0,064	1,148	0,147
BL52	0,509	0,121	0,991	0,084
OR9	0,367	0,14	1,198	0,162
OR11	0,234	0,096	0,886	0,303
E3	0,119	0,048	0,712	0,252
E4	0,183	0,063	0,766	0,168
E5	0,361	0,200	1,236	0,365
OR18	0,075	0,003	0,595	0,061
SS	0,523	0,115	1,145	0,086
OR21	0,230	0,076	0,767	0,143
2M	0,525	0,132	1,037	0,062
3M	0,464	0,106	1,113	0,194
1M	0,417	0,090	0,919	0,072
OR24	0,286	0,057	0,977	0,070
OR33	0,117	0,051	0,365	0,085
OR36	0,119	0,044	0,696	0,184
OR40	0,590	0,065	1,270	0,079
OR42	0,082	0,005	0,608	0,046
OR45	0,221	0,036	1,070	0,128
SP18	0,757	0,084	1,201	0,104
BL29	0,118	0,026	0,457	0,074
BL30	0,114	0,018	0,665	0,111
BL35	0,211	0,064	0,871	0,106
BL36	0,286	0,047	1,190	0,115
BL38	0,061	0,004	0,412	0,067
BL41	0,101	0,008	0,636	0,116
BL42	0,095	0,008	0,573	0,074
BL43	0,394	0,079	1,293	0,044
BL45	0,083	0,011	1,098	0,077
BL46	0,112	0,010	0,822	0,220

BL47	0,183	0,188	1,168	0,102
BL48	0,136	0,042	0,984	0,132
BL51	0,135	0,012	0,887	0,132
BL53	0,150	0,013	0,855	0,072
BL54	0,235	0,063	1,391	0,064
BL55	0,203	0,158	0,935	0,197
BL57	0,126	0,045	0,718	0,153
O40	0,869	0,161	1,526	0,130
O105	0,163	0,035	0,720	0,187
O129	0,101	0,005	0,433	0,102
O171	0,235	0,085	0,794	0,113
O260	0,166	0,026	0,228	0,060
O296	0,250	0,073	0,990	0,217
O344	0,609	0,128	1,289	0,194
O347	0,588	0,154	1,319	0,320
BL007	0,290	0,073	0,949	0,212

Tableau 11. Densité optique (490 nm) des souches orales
représentant l'activité métabolique des cellules composant le biofilm (les Non-Répondeurs sont représentés en rouge).

Souches	Avec farnésol		Sans Farnésol	
	moyenne	ecart-type	moyenne	écart-type
OR1	0,091	0,033	0,182	0,045
OR8	0,126	0,052	0,252	0,05
OR5	0,150	0,018	0,226	0,046
OR6	0,098	0,032	0,177	0,052
OR3	0,167	0,037	0,245	0,083
BL52	0,090	0,014	0,124	0,016
OR9	0,206	0,060	0,256	0,056
OR11	0,158	0,069	0,213	0,053
E3	0,110	0,042	0,164	0,038
E4	0,164	0,041	0,235	0,086
E5	0,176	0,023	0,201	0,054
OR18	0,079	0,019	0,231	0,001
SS	0,368	0,049	0,485	0,030
OR21	0,276	0,016	0,404	0,018
2M	0,349	0,108	0,448	0,113
3M	0,380	0,113	0,475	0,061
1M	0,370	0,033	0,441	0,026
OR24	0,147	0,011	0,187	0,019

OR33	0,075	0,022	0,164	0,008
OR36	0,091	0,025	0,231	0,007
OR40	0,261	0,009	0,253	0,014
OR42	0,082	0,040	0,235	0,009
OR45	0,195	0,039	0,366	0,012
SP18	0,354	0,025	0,441	0,020
BL29	0,099	0,013	0,144	0,013
BL30	0,059	0,017	0,144	0,051
BL35	0,072	0,018	0,115	0,008
BL36	0,062	0,008	0,104	0,007
BL38	0,137	0,038	0,192	0,037
BL41	0,082	0,031	0,245	0,011
BL42	0,069	0,019	0,185	0,023
BL43	0,067	0,008	0,114	0,003
BL45	0,036	0,004	0,079	0,008
BL46	0,163	0,048	0,279	0,039
BL47	0,053	0,018	0,121	0,009
BL48	0,061	0,012	0,098	0,007
BL51	0,118	0,028	0,548	0,104
BL53	0,141	0,039	0,468	0,070
BL54	0,114	0,008	0,670	0,051
BL55	0,108	0,024	0,293	0,017
BL57	0,063	0,024	0,121	0,011
O40	0,287	0,030	0,352	0,044
O105	0,047	0,013	0,046	0,005
O129	0,050	0,014	0,161	0,057
O171	0,077	0,008	0,104	0,010
O260	0,047	0,015	0,085	0,009
O296	0,043	0,007	0,081	0,033
O344	0,065	0,009	0,099	0,018
O347	0,055	0,009	0,093	0,008
BL007	0,218	0,052	0,201	0,025

ANNEXE II

Tableau 12. Densité optique (570 nm) des souches vaginales
représentant la biomasse formée (les Non-Répondeurs sont représentés en rouge).

Souches	Avec farnésol		Sans Farnésol	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
18 3715 HVS large	0,090	0,005	0,438	0,076
129 4954 HVS	0,177	0,033	0,905	0,096
140 31008 HVS	0,153	0,033	0,678	0,102
133 4947 HVS	0,082	0,009	0,435	0,061
87 4944 4494 HVS	0,083	0,012	0,330	0,029
22 3631 HVS	0,095	0,025	0,663	0,070
2 3707 ECS	0,074	0,006	0,617	0,082
12 3640 HVS	0,114	0,010	0,683	0,037
33 4846 HVS	0,087	0,006	0,622	0,094
5 3701 HVS	0,089	0,009	0,275	0,031
156 4968 HVS large	0,322	0,035	1,456	0,135
143 4932 HVS	0,088	0,008	0,167	0,016
158 4962 HVS	0,528	0,080	1,049	0,108
189 Rec11 V.pâle	0,094	0,006	0,625	0,117
152 4973 HVS	0,482	0,089	0,837	0,110
49 4872 HVS	0,169	0,033	0,922	0,128
26 3648 ECS	0,582	0,040	1,098	0,072
88 4986 ECS	0,081	0,005	0,352	0,031
189 Rec 11 V.foncé	0,089	0,007	0,336	0,027
61 4880 HVS	0,117	0,016	0,775	0,072
66 3712 HVS	0,067	0,007	0,654	0,038
83 4990 ECS	0,076	0,008	0,881	0,122
3702 HVS	0,093	0,007	0,298	0,025
126 5025 HVS	0,102	0,015	0,797	0,083
28 3691 HVS	0,120	0,014	0,716	0,072
4 3719 ECS	0,117	0,008	0,669	0,129
23 3696 ECS	0,079	0,005	0,300	0,049
90.5007	0,454	0,051	0,711	0,092
101 5031 ECS	0,101	0,015	0,441	0,051
114 4959 ECS	0,093	0,008	0,215	0,018
6 3697 ECS	0,080	0,004	0,302	0,033
133 NR	0,236	0,025	0,443	0,026
7 ECS 3683	0,060	0,006	0,445	0,050
1H1 30955 HVS	0,695	0,082	1,375	0,084

653 711	0,099	0,034	0,625	0,058
99 5032 ECS large	0,105	0,007	0,419	0,030
17 3676 HVS	0,119	0,007	0,549	0,081
48 4868 HVS	0,101	0,010	0,612	0,086
85 4992 ECS	0,100	0,012	0,427	0,057
185 Rec 6	0,104	0,008	0,643	0,049
115 4947 HVS	0,116	0,011	0,479	0,033
20 3694 HVS Large	0,109	0,026	0,959	0,067
112 4960 HVS	0,091	0,005	0,406	0,053
27 3687 vulval	0,054	0,014	0,313	0,043
46 4861 HVS	0,075	0,009	0,246	0,036
111 4952 Small ECS	0,040	0,003	0,150	0,021
123 5023 HVS	0,097	0,006	0,141	0,035
86 4993 HVS	0,068	0,003	0,206	0,015
45 4858 HVS	0,070	0,006	0,503	0,059
43 4832 ECS	0,126	0,013	1,162	0,141
40 4905 HVS	0,203	0,023	1,138	0,137
7. 348. 4888	0,063	0,003	0,526	0,119
182 Rec 24	0,069	0,008	0,628	0,163

Tableau 13. Densité optique (490 nm) des souches vaginales
 représentant l'activité métabolique des cellules à l'intérieur du biofilm (les Non-Répondeurs sont représentés en rouge).

Souches	Avec farnésol		Sans Farnésol	
	moyenne	ecart-type	moyenne	écart-type
18 3715 HVS large	0,116	0,062	0,280	0,064
129 4954 HVS	0,208	0,092	0,342	0,122
140 31008 HVS	0,183	0,077	0,316	0,112
133 4947 HVS	0,116	0,057	0,272	0,086
87 4944 4494 HVS	0,094	0,042	0,354	0,075
22 3631 HVS	0,047	0,011	0,285	0,013
2 3707 ECS	0,043	0,008	0,142	0,016
12 3640 HVS	0,130	0,011	0,159	0,013
33 4846 HVS	0,067	0,022	0,182	0,010
5 3701 HVS	0,164	0,042	0,297	0,020
156 4968 HVS large	0,096	0,013	0,170	0,013
143 4932 HVS	0,055	0,010	0,179	0,011
158 4962 HVS	0,249	0,015	0,260	0,011
189 Rec11 V.pâle	0,047	0,013	0,164	0,007
152 4973 HVS	0,139	0,008	0,158	0,008
49 4872 HVS	0,063	0,012	0,179	0,006
26 3648 ECS	0,245	0,015	0,296	0,014
88 4986 ECS	0,043	0,011	0,217	0,007
189 Rec 11 V.foncé	0,068	0,018	0,135	0,004
61 4880 HVS	0,151	0,029	0,364	0,031
66 3712 HVS	0,076	0,023	0,201	0,039
83 4990 ECS	0,073	0,010	0,302	0,013
3702 HVS	0,051	0,018	0,196	0,008
126 5025 HVS	0,066	0,018	0,269	0,015
28 3691 HVS	0,158	0,032	0,377	0,021
4 3719 ECS	0,189	0,033	0,467	0,033
23 3696 ECS	0,080	0,023	0,297	0,030
90.5007	0,199	0,020	0,241	0,021
101 5031 ECS	0,079	0,018	0,250	0,010
114 4959 ECS	0,042	0,004	0,146	0,013
6 3697 ECS	0,041	0,009	0,113	0,008
133 NR	0,342	0,024	0,463	0,017
7 ECS 3683	0,066	0,021	0,268	0,011
1H1 30955 HVS large	0,251	0,017	0,328	0,023
653 711	0,041	0,005	0,113	0,005

99 5032 ECS large	0,108	0,024	0,222	0,008
17 3676 HVS	0,099	0,026	0,344	0,017
48 4868 HVS	0,088	0,030	0,272	0,020
85 4992 ECS	0,067	0,014	0,295	0,028
185 Rec 6	0,182	0,042	0,348	0,043
115 4947 HVS	0,121	0,027	0,290	0,026
20 3694 HVS Large	0,162	0,033	0,356	0,031
112 4960 HVS	0,132	0,054	0,278	0,008
27 3687 vulval	0,099	0,028	0,300	0,011
46 4861 HVS	0,126	0,020	0,288	0,011
111 4952 Small ECS	0,038	0,003	0,136	0,005
123 5023 HVS	0,032	0,001	0,037	0,005
86 4993 HVS	0,044	0,009	0,158	0,006
45 4858 HVS	0,067	0,021	0,202	0,010
43 4832 ECS	0,122	0,015	0,223	0,036
40 4905 HVS	0,198	0,012	0,313	0,031
7. 348. 4888	0,055	0,013	0,182	0,013
182 Rec 24	0,076	0,009	0,211	0,007

ANNEXE III

Tableau 14. Densité optique (490 nm) des souches autres ou de source inconnue représentant l'activité métabolique, à l'intérieur du biofilm (les Non-Répondeurs sont représentés en rouge).

	Avec farnésol		Sans Farnésol	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
LAM1	0,153	0,059	0,265	0,102
ATCC36802	0,474	0,113	0,400	0,085
10231 Chevelue	0,248	0,021	0,224	0,010
10231 Lisse	0,090	0,008	0,202	0,008
Hornby Chevelue	0,173	0,020	0,167	0,009
Hornby Lisse	0,105	0,017	0,163	0,011
HM1	0,298	0,080	0,291	0,077

Tableau 15. Densité optique (570 nm) des souches autres ou de source inconnue représentant la biomasse formée (les Non-Répondeurs sont représentés en rouge).

	Avec farnésol		Sans Farnésol	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
Hornby Chevelue	0,899	0,213	1,086	0,171
Hornby lisse	0,265	0,059	1,492	0,113
10231 chevelue	1,212	0,096	1,367	0,182
10231 Lisse	0,283	0,020	1,761	0,145
LAM1	0,131	0,015	0,909	0,142
ATCC36802	0,667	0,118	0,955	0,207
HM1	1,412	0,224	1,402	0,166

ANNEXE IV

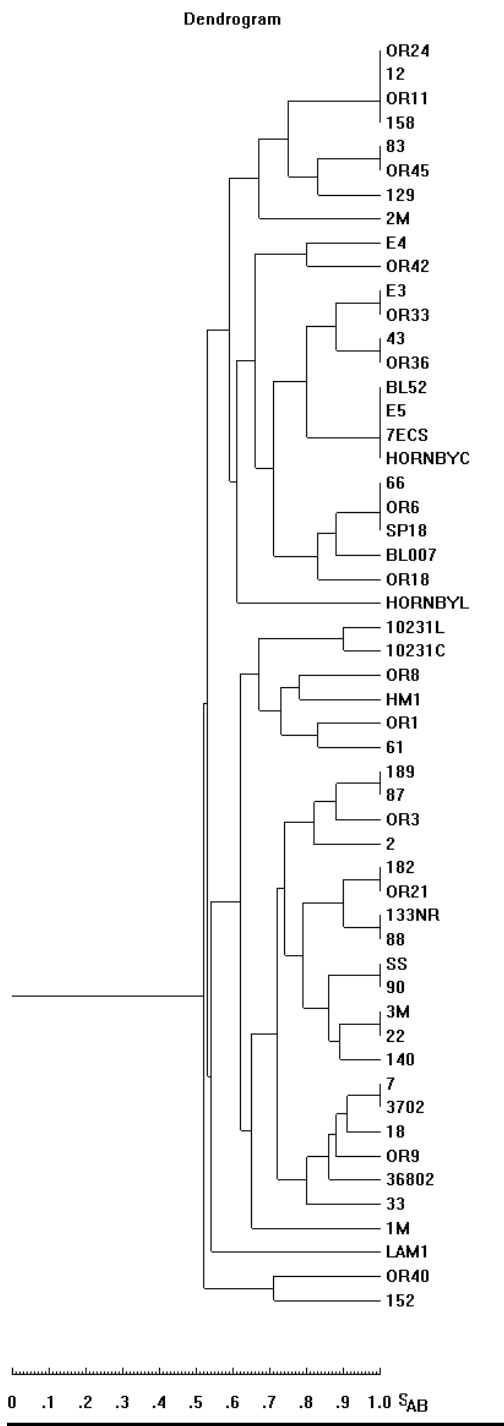


Figure 26. Dendrogramme obtenu avec l'amorce OPA19 sur 53 souches de *Candida albicans*

