



Spécificité antigénique de l'Als3p de *Candida albicans* et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte

Bertrand Beucher

► To cite this version:

Bertrand Beucher. Spécificité antigénique de l'Als3p de *Candida albicans* et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2007. Français. NNT : . tel-00346346

HAL Id: tel-00346346

<https://theses.hal.science/tel-00346346>

Submitted on 11 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Spécificité antigénique de l'Als3p de *Candida albicans* et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : MICROBIOLOGIE

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le : 16 novembre 2007

à : Angers

par : Bertrand BEUCHER

Devant le jury ci-dessous :

Christine IMBERT (rapporteur), Docteur, Université de Poitiers
Christophe HENNEQUIN (rapporteur), Docteur, Université de Paris 6
Jean Michel CAMADRO (examinateur), Directeur de recherche, CNRS, Université de Paris 7
Patrice LE PAPE (examinateur), Professeur, Université de Nantes
Marc TABOURET (examinateur), Docteur, Entreprise Biorad

Directeur de thèse : Raymond ROBERT, Professeur, Université d'Angers

Co-encadrante de thèse : Agnès MAROT-LEBLOND, Docteur, Université d'Angers

Nom et coordonnées du Laboratoire : Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasite (GEIHP), UPRES-EA 3142, 16 bd Daviers 49045 ANGERS

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Groupe des Interactions Hôte-Parasite (UPRES-EA 3142) sous la direction du Professeur Raymond ROBERT et co-encadré par le Docteur Agnès MAROT-LEBLOND.

Je remercie profondément le Professeur Raymond ROBERT de m'avoir fait partager son expérience, ses compétences et sa passion pour la recherche pendant ces années passées à Angers. Vous m'avez toujours fait confiance et les nombreux échanges que l'on a pu avoir durant ce travail ont toujours porté leur fruit d'une manière ou d'une autre. Merci pour votre disponibilité et votre rigueur dans le travail que j'ai su apprécier. Si j'ai pu poursuivre cette thèse dans d'excellentes conditions, c'est en partie grâce à vous.

Je remercie très chaleureusement le Docteur Agnès MAROT-LEBLOND, co-encadrante de ce travail de thèse. Tu fourmilles toujours d'idées et tes précieuses compétences et connaissances me font dire qu'il y aura toujours une solution à un problème donné. Ces années de travail passées ensemble se sont toujours passées sans le moindre problème preuve de ta constante gentillesse et ta disponibilité à toute épreuve. Je te remercie également de m'avoir donné le goût de la recherche et de la rigueur scientifique.

Je remercie le Docteur Christine IMBERT de l'Université de Poitiers et le Docteur Christophe HENNEQUIN de l'Université de Paris 6 qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie monsieur Jean Michel CAMADRO, directeur de recherche au CNRS à Paris, d'avoir accepté de juger ce travail. Je le remercie également pour les précieux conseils prodigués concernant la spectrométrie de masse.

Je remercie Messieurs le professeur Patrice LE PAPE de l'Université de Nantes et le Docteur Marc TABOURET de l'entreprise BIORAD d'avoir accepté de juger ce travail.

Toute ma gratitude va au Docteur Lois L. HOYER pour sa collaboration et son aide précieuse dans l'étude des Als.

J'associe également à mes remerciements le Docteur Sandrine BILLAUD pour ses conseils et ses compétences dans l'étude des interactions levures/plaquettes et aussi pour avoir donné un peu de soi si gentiment !!!

Je remercie aussi chaleureusement Nathalie CLEMENT, technicienne du laboratoire, pour sa gentillesse et pour avoir rendu bien plus simple et rapide les prélèvements sanguins !!!

Merci également aux personnes du GEIHP qui ont participé de loin ou de près à ce travail. Toute l'équipe a toujours été très gentille et à l'écoute du moindre questionnement.

Je remercie également Jean Jacques MONTAGNE de l'Institut Jacques Monod à l'Université Paris 7 pour ses compétences en spectrométrie de masse et pour son aide précieuse.

Mes remerciements s'adressent également à Pierre LEGRAS de l'animalerie de la faculté de médecine d'Angers pour sa collaboration et son talent sans égal dans l'injection par voie intraveineuse des souris !

Je remercie Marie, Samuel et Muriel pour leur amitié et les nombreuses discussions que l'on a pu avoir en tant que thésard. Ca y est, c'est la fin !!!

Je remercie Angers Agglomération pour l'aide financière qu'ils m'ont attribuée pour poursuivre cette thèse.

A Noémie, ma femme. Pour ton amour et ton soutien inébranlable dans ce long travail. Pour avoir été mon « infirmière » particulière durant ces derniers mois ! C'est à mon tour de t'aider et te soutenir dans ton travail de thèse et j'espère le faire aussi bien que tu l'as fait pour moi.

A mes parents. Ca y est, j'en ai vraiment fini des études et de ce long parcours qui n'aurait pas pu aboutir sans votre soutien. Maman, si tu lis ce mémoire c'est que j'ai réussi à le finir à temps !!!

A ma sœur Angélique et à toute la petite famille toulousaine pour leur envie de comprendre, leur curiosité et leur soutien.

Au Ramsès, Peter, Juju, Pierrot et Fredo, pour leur amitié. Merci de ne pas avoir fait avancer la science à l'heure de l'apéro autour d'une bonne Graffenwalder. C'est pas faute d'avoir essayé mais comme on dit : « Les chercheurs ça cherchent mais ça trouve jamais ! ». Alors autant en profiter !!!

ABBREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

2-ME : 2-MercaptoEthanol
5-FC : 5-FluoroCytosine
ABC : ATP Binding Cassette
AcM : Anticorps Monoclonal
Ag : Antigène
ALS : Agglutinin-Like Sequence
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ANOVA : ANalyse Of VAriance
ATCC : American Type Culture Collection
CEB : Cellules Epithéliales Buccales
BS : BlastoSpore
BSA : Bovine Serum Albumin
CBS : CentraalBureau voor Schimmelcultures
CECT : Coleccion Espagnola de Cultivos Tipo
CHAPS : 3-[(3-CHolamidopropyl)diméthylAmmonio]-1-PropaneSulfonate
ConA : Concanavaline A
DAB : DiAminoBenzidine
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DO : Densité Optique
DTT : DiThioThreitol
ECL : ElectroChemoLuminescence
EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
EHR : Epithélium Humain Reconstitué
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FFF : Facteur Fixant le Fibrinogène
GlcNAc : N-AcétylGlucosamine
GP IIb-IIIa : complexe protéique des GlycoProtéines plaquettaires **IIb** et **IIIa**
GPI : Glycosyl PhosphatidylInositol
HRPO : HorseRadish PerOxidase
HSP : Heat Shock Protein
HUVEC : Cellules Endothéliales isolées de Veine ombilicale **HU**maine
HWP1 : Hyphal Wall Protein 1
HYR1 : **HY**phal Regulated gene 1
IFI : ImmunoFluorescence Indirecte
IFN : InterFéroN
Ig : Immunoglobuline
IL : InterLeukine
kDa : kiloDalton
LSD : Least Significant Difference
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight
MAP kinase : Mitogen-Activated Protein **kinase**
MFS : Major Falcitator Superfamilies
MGG : May-Grünwald-Giemsa
MM : Masse Moléculaire
MTL : Mating Type Locus
NCPF : National Collection of Pathogenic Fungi
pb : paire de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction
pI : point Isoélectrique
PKA : Protéine Kinase A
PL : PhosphoLipase
PMP : Profil de Masses Peptidiques
PMN : cellule PolyMorphoNucléaire
PMSF : Phényl Méthyl Sulfonyl Fluoride
PRP : Plasma Riche en Plaquettes
RGD : séquence Arginine Glycine Asparagine
SAP : Secreted Aspartyl Proteinase
SDA : Sabouraud Dextrose Agar
SDA-C : SDA-Chloramphénicol
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Sér : Sérine
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
TBE : tampon Tris/Borate/EDTA
TDS : tampon Tris/Dextrose/chlorure de Sodium
TEMED : N,N,N' N'-TEtraMéthylEthylèneDiamine
TG : Tube Germinatif
Thr : Thréonine
TNF : Tumor Necrosis Factor
VC : Volume de Colonne
VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine
YPD : Yeast Peptone Dextrose

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I. BIOLOGIE DE CANDIDA	5
A. Taxinomie.....	5
B. Morphologie et reproduction.....	5
1. Reproduction asexuée.....	5
2. Reproduction sexuée chez <i>C. albicans</i>	6
3. Forme de résistance	7
C. Structure cellulaire.....	7
1. La paroi	7
a. Structure générale.....	7
b. La chitine.....	9
c. Les glucanes	10
d. Les protéines	11
e. Les lipides.....	14
2. L'espace périplasmique	14
3. La membrane plasmique	14
4. Les organites intracellulaires.....	14
D. Epidémiologie et pouvoir pathogène.....	15
1. Candidoses superficielles	15
2. Candidoses invasives.....	15
E. Traitements des candidoses	16
1. Traitement des candidoses superficielles	17
2. Traitement des candidoses invasives.....	18
3. Prophylaxie.....	19
4. Résistances	19
II. PHYSIOPATHOLOGIE DES CANDIDOSES	20
A. Facteurs de pathogénicité de <i>C. albicans</i>	21
1. Variabilité génotypique	21
2. Variabilité phénotypique	21
a. Variabilité morphologique.....	21
b. Variabilité intersouche	24
c. Variabilité antigénique	24
α. Antigène 3D9.....	25
β. Antigène 16B1	26
γ. La protéine Als3	27
δ. La protéine Hwp1	27
ε. La protéine Hyr1.....	28
3. Facteurs sécrétés.....	28
a. Les enzymes	29
b. Quorum Sensing ou communication intercellulaire.....	30
B. Adhérence de <i>C. albicans</i>	30
1. Adhérence de <i>C. albicans</i> aux cellules épithéliales et endothéliales	30
a. Adhérence aux cellules épithéliales.....	30

b. Adhérence aux cellules endothéliales.....	31
2. Interaction de <i>C. albicans</i> avec les constituants du sang et de la matrice extracellulaire.....	32
a. Facteurs du complément.....	32
b. Fibrinogène.....	32
c. Fibronectine.....	32
d. Laminine.....	33
e. Plaquettes sanguines.....	33
3. Interaction avec les monocytes/macrophages	35
4. Interaction avec des matériaux synthétiques.....	36
a. Adhérence aux cathéters et prothèses.....	36
b. Hydrophobicité de surface.....	37
III. LA FAMILLE DES Als ET L'Als3p	38
A. Les gènes <i>ALS</i>	38
1. Structure des gènes <i>ALS</i>	38
2. Variabilités alléliques des gènes <i>ALS</i>	39
3. Expression des gènes <i>ALS</i>	39
B. Les protéines Als	40
1. Structure et localisation des protéines Als	40
2. Fonctions des protéines Als.....	41
a. Propriétés d'adhérence des protéines Als.....	41
b. Formation de biofilm.....	42
c. Adhérence aux cellules de l'hôte.....	42
d. Adhérence en fonction de la longueur des allèles <i>ALS</i>	43
e. Rôle des régions riches en thréonine	44
f. Cas particulier de l'Als3p	44
IV. STRATEGIE DE DEFENSE DE L'HOTE	46
CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION DE L'Ag 3D9	49
I. MATERIELS ET METHODES	51
A. Obtention du matériel fongique.....	51
1. Souches utilisées	51
2. Entretien des souches	52
3. Obtention des blastospores et des tubes germinatifs.....	52
a. Obtention des blastospores	52
b. Obtention des tubes germinatifs et du mycélium	52
4. Extraits bruts de blastospores, de tubes germinatifs et de mycélium de <i>C. albicans</i>	53
5. Dosage des protéines et des polyosides totaux.....	53
a. Dosage des protéines	53
b. Dosage des polyosides	53
B. Production des AcM 3D9.3, 5B2, C7 et du sérum polyclonal anti-Als3p	54
1. Production et purification de l'AcM 3D9.3.....	54
a. Production de l'AcM 3D9.3	54
b. Purification de l'AcM 3D9.3 par chromatographie d'exclusion/diffusion	54
2. Production et purification de l'AcM 5B2.....	55
3. Production de l'AcM C7	55
4. Production du sérum polyclonal anti-Als3p.....	55

C. Purification de l'Ag 3D9	55
1. Purification de l'Ag 3D9 par chromatographie d'exclusion/diffusion.....	55
2. Purification de l'Ag 3D9 par chromatographie d'interactions hydrophobes	56
D. Caractérisation de l'Ag 3D9	56
1. ELISA.....	56
a. Immobilisation de l'Ag et saturation.....	56
b. Détection immunologique	57
2. Immunofluorescence indirecte (IFI).....	57
a. Préparation des lames	57
b. Révélation.....	57
3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS-PAGE)	58
4. Electrotransfert, immunodétection et affindétection	58
a. Electrotransfert semi-sec	58
b. Immunodétection.....	59
c. Affindétection par la Concanavalline A	59
5. Electrophorèse bidimensionnelle	60
E. Déglycosylation de l'Ag 3D9	60
F. Identification de l'Ag 3D9 par spectrométrie de masse.....	61
G. Etude de la taille des allèles du gène <i>ALS3</i>	61
II. RESULTATS	63
A. Purification de l'AcM 3D9.3	63
B. Réactivité de l'AcM 3D9.3 avec <i>C. albicans</i> et <i>C. dubliniensis</i> en IFI.....	64
C. Spécificité de l'expression de l'Ag 3D9 chez d'autres souches de référence de <i>C. albicans</i> et d'autres espèces	65
D. Purification de l'Ag 3D9.....	66
E. Analyse de l'Ag 3D9 par électrophorèse bidimensionnelle	70
F. Déglycosylation de l'Ag 3D9	70
G. Analyse de l'Ag 3D9 par spectrométrie de masse	71
H. Expression de l'Ag 3D9 chez un mutant <i>als3Δ/als3Δ</i>	72
I. Réactivité de l'Ag 3D9 purifié avec un sérum anti-Als3p.....	75
J. Réactivité de l'AcM 3D9.3 avec des souches de <i>S. cerevisiae</i> exprimant diverses Als3p à leur surface	75
K. Réactivité de l'AcM 3D9.3 vis à vis des deux protéines codées par les deux allèles du gène <i>ALS3</i>	76
L. Variabilité allélique du gène <i>ALS3</i> chez la souche <i>C. albicans</i> 66396.....	77
M. Réactivité de l'AcM C7 avec <i>C. albicans</i> et l'Als3p en IFI, ELISA et Western-Blot.....	79
N. Réactivité de l'AcM 5B2 avec <i>C. albicans</i> et l'Als3p en IFI, ELISA et Western-Blot.....	79
III. DISCUSSION	80

CHAPITRE 3 : INTERACTION <i>IN VITRO</i> DE L'Als3p AVEC LES CELLULES DE L'HÔTE.....	86
I. MATERIELS ET METHODES	89
A. Souches utilisées.....	89
B. Production des AcM 3D9.3 et 5B2.....	89
C. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/HUVEC.....	89
D. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/CEB	90
E. Etude de l'interaction tubes germinatifs/plaquettes sanguines	90
1. Marquage de surface à la biotine des blastospores et des tubes germinatifs.....	90
2. Obtention des plaquettes sanguines humaines	91
3. Etude des facteurs fongiques de tubes germinatifs de <i>C. albicans</i> impliqués dans l'interaction avec les plaquettes.....	91
4. Etude <i>in vitro</i> de l'interaction <i>C. albicans</i> /plaquettes	92
5. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/plaquettes avec des AcM	92
6. Analyses statistiques	93
II. RESULTATS	94
A. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/HUVEC	94
B. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/CEB.....	95
C. Etude de l'interaction tubes germinatifs/plaquettes sanguines.....	95
1. Mise en évidence d'un composé de surface de tubes germinatifs fixant les plaquettes natives lavées.....	95
2. Identification par Western-Blot du composé de surface de tubes germinatifs qui fixe les plaquettes natives lavées	97
3. Etude <i>in vitro</i> du rôle de la protéine Als3 dans l'interaction tubes germinatifs/plaquettes.....	98
4. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/plaquettes lavées avec l'AcM 3D9.3.....	101
III. DISCUSSION	103
CHAPITRE 4 : ETUDE <i>IN VIVO</i> DE L'EFFET PROTECTEUR DE L'AcM 3D9.3.....	108
I. MATERIELS ET METHODES	109
II. RESULTATS	110
III. DISCUSSION	111
CONCLUSION	112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
ANNEXE (Préparation des solutions).....	137

INTRODUCTION

Candida albicans est une levure polymorphique commensale de la cavité buccale et du tractus digestif qui peut entraîner des infections sévères particulièrement chez les patients immunodéprimés. A l'état commensal, la levure se présente sous forme de blastospores, alors qu'à l'état pathogène ces formes sont généralement observées en association avec des éléments filamenteux. Le processus de filamentation s'accompagne de modifications de la composition biochimique et antigénique de la paroi. Ce champignon possède ou peut exprimer plusieurs facteurs de pathogénicité. Ces particularités fongiques incluent la production et la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, les modifications morphologiques et fonctionnelles résultant de la transition de la forme levure à la forme mycélienne, l'adhérence à des substrats biologiques ou inertes, l'échappement aux mécanismes de défense de l'hôte et la variabilité antigénique.

Les variations antigéniques des mannoprotéines de la paroi cellulaire comme caractéristiques du polymorphisme ont été largement étudiées à l'aide d'anticorps polyclonaux et monoclonaux. Parmi ces derniers, trois anticorps monoclonaux (AcM), AcM 3D9.3, 16B1 et 3B7, se sont révélés, par immunofluorescence indirecte (IFI), être spécifiques de la phase mycélienne de *C. albicans*. Récemment, des approches en biologie moléculaire ont permis d'identifier quelques gènes codant pour des protéines spécifiquement exprimées à la surface de l'hyphe, (*HWP1* et *HYR1*), ainsi que d'autres gènes principalement exprimés durant la phase mycélienne comme le gène *ALS3*. Ces différents gènes pourraient contribuer aux différences structurales et fonctionnelles de la paroi fongique.

Dans des travaux antérieurs, un antigène spécifique de tubes germinatifs de *C. albicans* a été partiellement caractérisé grâce à l'utilisation de l'AcM 3D9.3. En IFI, l'AcM 3D9.3 s'est révélé être spécifique d'un antigène (Ag) localisé à la surface cellulaire de la phase mycélienne de *C. albicans*. Cet n'a pu être totalement identifié (168, 170).

La première partie du travail présenté évalue la spécificité de l'épitope reconnu par l'AcM 3D9.3 et décrit l'identification de l'Ag 3D9 comme étant l'Als3p, une protéine de la famille des protéines Agglutinin Like Sequence (ALS) (94).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les interactions de l'Als3p avec les constituants de l'hôte, particulièrement les cellules épithéliales buccales (CEB), les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) et les plaquettes sanguines. En effet, l'Als3p est connue pour jouer un rôle non négligeable dans l'adhérence de *C. albicans* aux constituants de l'hôte, notamment aux cellules épithéliales et aux cellules endothéliales. Par ailleurs, plusieurs auteurs se sont intéressés aux interactions des levures, dont *C. albicans*, avec les plaquettes sanguines et certains ont montré que les plaquettes se fixaient *in vitro* majoritairement sur les parties filamenteuses de la cellule fongique (230, 231). La seconde partie du travail évalue le rôle de l'AcM 3D9.3 dans l'inhibition de l'interaction de *C. albicans* aux cellules épithéliales et le rôle de l'Als3p, spécifiquement exprimées à la surface des parties filamenteuses de la cellule, dans l'interaction *C. albicans*/plaquettes sanguines humaines.

Enfin, dans une dernière partie, nous avons évalué le rôle protecteur *in vivo* de l'AcM 3D9.3.

CHAPITRE 1 :
REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. BIOLOGIE DE CANDIDA

A. Taxinomie

Les *Candida* sont des micromycètes, c'est-à-dire des champignons microscopiques. Ce sont des organismes eucaryotes appartenant au règne des champignons, au phylum des Ascomycètes, au sous-phylum des *Saccharomycotina*, de la classe des Saccharomycètes, de l'ordre des Saccharomycétales, du groupe des Saccharomycétales mitosporiques et du genre *Candida* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5476>, 16/11/07).

Le genre *Candida* comprend environ 200 espèces dont les plus rencontrées en pathologie humaine sont : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* et *C. dubliniensis* (55, 110, 147).

B. Morphologie et reproduction

Les levures du genre *Candida* se présentent sous forme de blastospores (blastoconidies). Ce sont de petites cellules de 2 à 5 µm par 3 à 7 µm, globulaires, ovoïdes ou cylindriques selon l'espèce.

1. Reproduction asexuée

Le mode de multiplication de *C. albicans* est principalement de type asexué excepté pour *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* et *C. lusitaniae* pour ne citer que les plus connues. La multiplication est assurée par bourgeonnement de la blastospore à un pôle particulier de la cellule, donnant naissance, après division du noyau par simple mitose et septation de la cellule, à une blastospore fille qui se dissocie ultérieurement de la blastospore mère (195). Sous certaines conditions (température, pH, composition du milieu de culture), la séparation ne se produit pas à la suite de la septation. Les cellules restent attachées les unes aux autres et forment une chaîne plus ou moins ramifiée appelée pseudomycélium. Toutes les levures du genre *Candida* sont capables de former un pseudomycélium excepté *C. glabrata*. Les conditions favorisant la formation de pseudomycélium favorisent également la formation de mycélium vrai chez *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*. Ce deuxième mode de multiplication végétative consiste en une croissance apicale, conduisant tout d'abord à la formation d'un tube germinatif puis d'un filament mycélien. Le filament mycélien se présente sous la forme d'articles cellulaires cylindriques uninucléés et séparés par des cloisons ou septa incomplets avec persistance d'un pore central assurant la continuité cytoplasmique (195, 196, 265) (Figure 1).

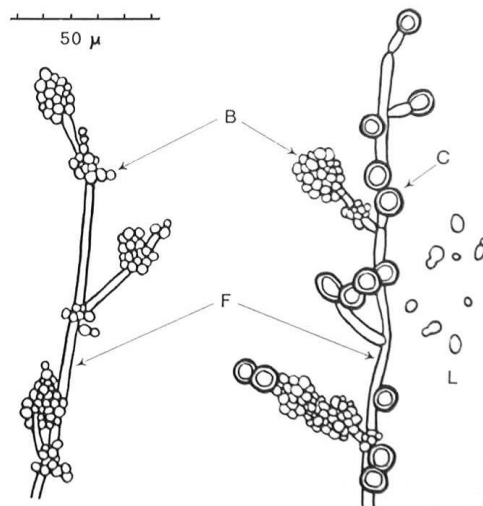


Figure 1 : Morphologie de *Candida* et de *C. albicans*. L : blastospores et blastospores bourgeonnantes, B : amas de blastospores, F : filaments mycéliens , C : chlamydospores caractéristiques de *C. albicans*. D'après Segretain *et al.* (246).

2. Reproduction sexuée chez *C. albicans*

C. albicans a été considéré pendant très longtemps comme un champignon diploïde asexué. Mais depuis la découverte du Mating Type Locus (MTL) et des conditions nécessaires à la reproduction de *C. albicans*, a été établi un cycle parasexuel (reproduction et réduction du génome mais sans méiose) comme possible modèle de reproduction sexuée de *C. albicans* (112) (**Figure 2**). En analysant le génome de *C. albicans*, une région similaire au MTL de *S. cerevisiae* a été identifiée montrant ainsi que *C. albicans* porte les deux allèles du MTL et que c'est un diploïde a/α (104). Les souches homozygotes pour le locus MTL sont compétentes pour le mating. La coïncubation des souches auxotrophiquement complémentaires a/a et α/α produit des tétraploïdes prototrophiques via la fusion intercellulaire (105, 156). Puis une réduction chromatique (sans méiose et donc sans brassage génétique par simple perte aléatoire de chromosome) permet de revenir au stade diploïde. Récemment, des études sur le mating et la transition phénotypique *white-opaque* ont montré que les cellules de phénotype *opaque* présentaient une capacité mille fois supérieure de développer ce type de sexualité (177). Ce *switch* semble donc nécessaire pour que *C. albicans* puisse établir une reproduction sexuée. Même si l'existence de ce cycle n'a pas encore été prouvée chez *C. albicans*, de nombreux indices existent pour conforter cette idée.

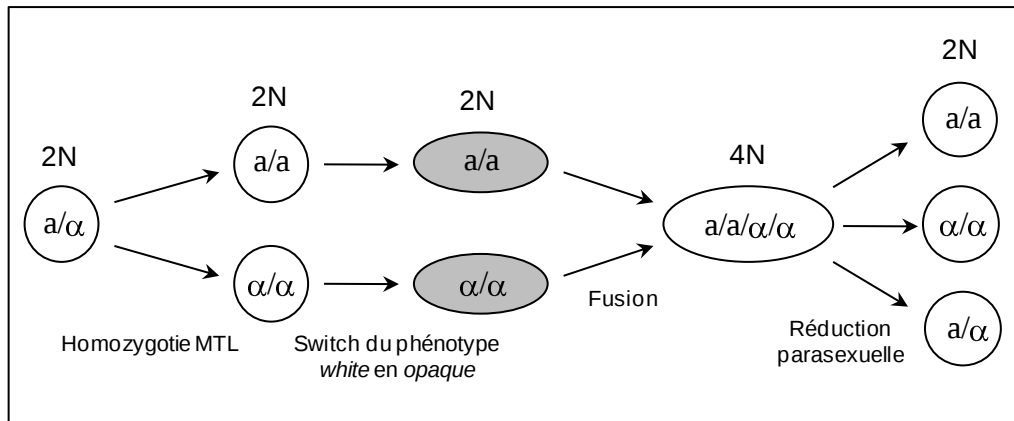


Figure 2 : Reproduction sexuée chez *C. albicans* impliquant obligatoirement deux étapes, l'homozygotie du locus MTL et le switch des cellules *white* en *opaque*. D'après Heitman (86).

3. Forme de résistance

Dans certaines conditions de culture, et seulement chez *C. albicans* et *C. dubliniensis*, on peut voir apparaître sur les filaments mycéliens, de grosses spores, rondes ou ovales, à paroi épaisse, de 6 à 12 μm de diamètre : ce sont des chlamydospores, considérées comme des formes de résistance de la levure (195).

C. Structure cellulaire

C. albicans est un eucaryote avec un noyau, une double membrane nucléaire, des chromosomes, des mitochondries, des inclusions lipidiques. Il existe également dans ces cellules des activités enzymatiques de type phosphatase, oxydase et peroxydase. La membrane plasmique est recouverte d'une paroi qui donne à la levure sa forme et sa stabilité mécanique. Elle est aussi une zone de contact entre la cellule et son environnement (21) et sa structure varie selon l'âge et le stade morphologique de la levure (29). La paroi est l'élément le plus étudié de la cellule.

1. La paroi

a. Structure générale

La paroi des *Candida* est une structure stratifiée cohérente dont l'architecture conditionne la morphologie cellulaire adoptée par cette levure. Son architecture générale a été bien étudiée (54, 126, 127) et son organisation, en constante évolution en fonction des phases du cycle cellulaire et du milieu, se développe à partir de l'espace périplasmique. Elle confère une protection à la cellule contre les agressions physiques, chimiques et biologiques et est

responsable de sa morphologie. C'est aussi la structure qui est la première à être en contact avec les cellules de l'hôte, qui porte d'importants déterminants antigéniques du champignon et qui est responsable de l'adhérence du pathogène. L'organisation générale de la paroi fongique de *C. albicans* est représentée dans la Figure 3.

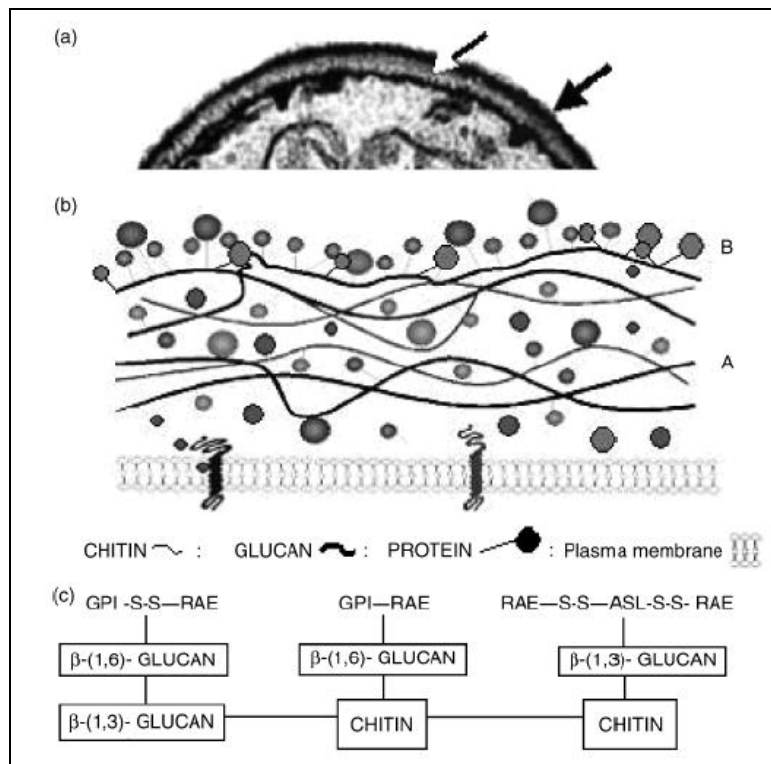


Figure 3 : Structure et représentation schématique de l'architecture de la paroi cellulaire de *C. albicans*. (a) Microphotographie électronique d'une section médiane de cellule de *C. albicans*. La couche interne transparente de la paroi (tête de flèche blanche) est constituée principalement de polysaccharides (β -glucanes et chitine) et de quelques protéines. La couche externe de la paroi (flèche noire) est constituée en grande partie de différents types de mannoprotéines. (b) Schéma de la paroi cellulaire : les chaînes de β -1,3/1,6 glucanes sont liées de façon covalente aux microfibrilles de chitine et, avec les protéines, constitue une trame de base (A). La surface externe de cette trame (B) est enrichie par différents types de protéines qui sont attachés par des liaisons non covalentes ou par un ensemble de liaisons covalentes. (c) Représentation schématique de l'organisation moléculaire de la paroi cellulaire. Les protéines de la paroi cellulaire sont liées principalement aux chaînes courtes des β -1,6 glucanes, à la chitine par l'intermédiaire des β -1,6 glucanes, ou directement à la chitine. GPI, protéines glycosyl phosphatidylinositol ; ASL, protéines attachées par des liaisons alcalosensibles ; RAE, protéines liées par des ponts disulfures. D'après Ruiz-Herrera *et al.* (235).

La paroi de la levure représente environ 15 à 25 % du poids sec de la cellule. C'est un arrangement ordonné de différents constituants. Certains sont liés par des liaisons covalentes alors que d'autres sont retenus dans la paroi par des liaisons hydrogènes, des interactions ioniques, ou encore par des interactions hydrophiles ou hydrophobes. Différents constituants comme les polysaccharides, la chitine (N-acétylglucosamine) et les protéines constituent cette paroi. Une structure rigide de polymères complexes de glucose (β -1,3 et β -1,6 glucanes) et de chitine enveloppe la cellule comme une armure et protège le champignon des stress environnementaux tels que la pression osmotique et définit sa forme (Figure 3).

Des observations microscopiques de sections fines des cellules fongiques ou de paroi isolée ont révélé l'existence de plusieurs couches dans la paroi. En fonction de la méthode d'analyse, la paroi de *C. albicans*, dont la composition relative varie en fonction du stade morphologique, contient de 4 à 8 couches (214).

b. La chitine

La chitine (Figure 4, a) est un composé relativement mineur (0,6 à 2 %) de la paroi (224) et se situe dans la couche interne de la paroi visible en microscopie (Figure 3, a). C'est un polysaccharide linéaire fait de plus de 2 000 unités de N-acétylglucosamine (GlcNAc) associées par des liaisons β -1,4 (30). Les chaînes de chitine sont associées par des liaisons hydrogène pour former des microfibrilles composées de 20 à 400 chaînes. La synthèse de la chitine implique une réaction de transglycosylation des résidus GlcNAc du substrat universel UDP-N-acétylglucosamine qui allonge la chaîne polysaccharidique. Cette réaction est réalisée par les chitine synthases et requiert un métal divalent, classiquement Mg^{2+} . La chitine synthase est accumulée dans le cytosol de *C. albicans* à l'intérieur de microvésicules spécialisées, les chitosomes, responsable du transfert de l'enzyme de son site de synthèse à son site d'action (7).

La chitine constitue la trame pariétale pour l'incorporation de nombreuses protéines diverses qui peuvent être attachées à la paroi de manière covalente ou qui résident à l'intérieur de cette structure telle que les protéines qui peuvent être extraites par les détergents.

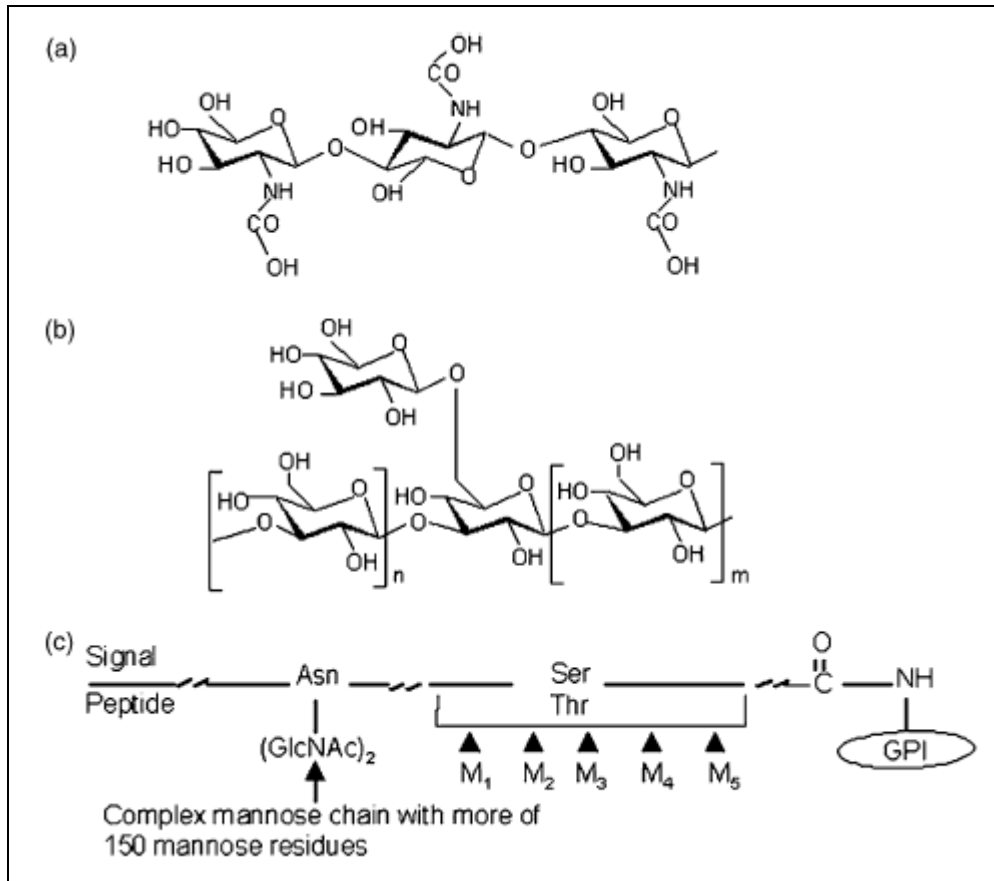


Figure 4 : Structures chimiques de la chitine (a), des β -1,3/1,6 glucanes (b) et d'une protéine GPI (c). Les protéines GPI sont riches en résidus Sér/Thr, avec un ou plusieurs sites de N-glycosylation, indiquant que ces protéines pourraient être fortement glycosylées. Le domaine hydrophobe N-terminal (peptide signal) et le domaine C-terminal GPI sont notés (235).

c. Les glucanes

C. albicans ne contient pas d' α -glucanes. La paroi de *C. albicans* contient uniquement des β -glucanes. Ce sont les polysaccharides les plus abondants de la paroi fongique et se situent dans la couche interne de la paroi visible en microscopie (Figure 3, a). Ils comptent pour 50-60 % de la masse totale de la paroi. Ils forment une chaîne principale composée de polymères de glucose liés par des liaisons glycosidiques de type β -1,3 et/ou β -1,6 (224) (Figure 4, b).

Les β -1,3-glucanes non branchés ont une structure microfibrillaire comme le révèle la microscopie électronique. La paroi de *C. albicans* contient des β -1,3 et des β -1,6 glucanes mais aucune liaison intr chaîne β -1,3/ β -1,6. L'existence d'une liaison covalente entre les β -1,6 glucanes et la chitine par l'intermédiaire d'une liaison glycosidique à la position 1 du glucose et 6 du N-acétylglucosamine a été démontrée chez *C. albicans* (277). Les glucanes, les complexes de β -glucanes sont relargués dans le milieu de culture et apparemment aussi

dans le sang des patients infectés. Ils sont encore à l'étude pour être utilisés dans le diagnostic des candidoses invasives (203) même si l'essentiel de ce diagnostic se fait par la recherche des mannanes circulants.

d. Les protéines

L'identification des protéines de la paroi de *C. albicans* a rapidement progressé depuis quelques années en raison de l'introduction de trois nouvelles approches méthodologiques : le séquençage complet du génome de *C. albicans*, l'analyse *in silico* du génome grâce aux programmes et algorithmes et les techniques d'analyse protéomique extrêmement sensibles (en particulier la spectrométrie de masse). Selon Ruiz-Herrera *et al.* (235), les « véritables protéines » liées à la paroi sont N- et/ou O-glycosylées et possèdent d'autres caractéristiques spécifiques telles que la présence d'un motif glycosyl phosphatidylinositol (GPI) ou de répétition interne spécifique. Chez *C. albicans*, les véritables protéines sont liées aux β -glucanes et à la chitine des couches internes. A l'inverse de ces « véritables protéines », les analyses spectrométriques ont révélé la présence de quelques protéines non glycosylées dans la paroi de *C. albicans* (209), dont la présence et les mécanismes de rétention restent obscures. Cependant, quelques études récentes ont montré la présence et une potentielle fonction de ces protéines liées de façon non covalente non seulement chez *C. albicans* (30, 209, 296, 297) mais aussi chez *Saccharomyces cerevisiae* et même chez des plantes (253).

Environ 6 à 25 % de la paroi sont constitués de protéines notamment de mannoprotéines, ou de phosphopeptidomannanes généralement appelés mannanes (32, 224). Le terme mannane ne se rapporte qu'à la partie glycosylée de ces glycoconjugués. Les mannoprotéines sont nombreuses à la surface de la paroi de *C. albicans* ([Figure 3](#), a), ainsi qu'au niveau de la cicatrice de bourgeonnement (91). Elles sont également présentes dans les couches internes de la paroi comme l'ont montré différentes techniques utilisant le marquage par la Concanavaline A ou par des anticorps (121, 162, 289). La partie mannane des mannoprotéines représentent 30 à 40 % des polysaccharides de la paroi de *C. albicans*. Les mannanes, dont la structure est présentée dans la [Figure 5](#), sont des polymères de mannoses liés en α -1,6, α -1,3, α -1,2 et β -1,2. Les deux mécanismes de N- et O-glycosylation permettent de lier les polysaccharides à la protéine (49, 218). La N-glycosylation génère la formation d'édifices moléculaires très complexes et hautement ramifiés. Le transfert du glycanes sur la protéine se produit en bloc. L'axe principal est composé de mannopyrannosides liés en α -1,6. Il est fixé sur la protéine par liaison covalente au niveau d'une asparagine, grâce à un dimère

de N-acétylglucosamine. L'ensemble constitue un noyau central, supportant des ramifications latérales formées de mannopyranosides liés en α -1,2, terminées parfois par de courtes séquences de mannoses liés en α -1,3 et β -1,2. Plusieurs chaînes N-glycosylées peuvent ainsi être liées à une seule et même protéine augmentant significativement sa masse moléculaire. Les étapes de la N-glycosylation sont résumées dans la [Figure 6](#). La O-glycosylation génère des structures simples, constituées de courtes chaînes non ramifiées de mannoses liés en α -1,3 et α -1,2 et branchées à un résidu hydroxyl d'une sérine (Sér) ou d'une thréonine (Thr). Les glycoconjugués O-glycosylés présentent des chaînes linéaires composées de une à sept unités de D-mannose liés en α -1,2, terminées par des résidus mannose liés en α -1,3. Les mannanes sont les composants antigéniques majeurs des levures. Les principaux déterminants antigéniques du mannane sont déterminés par la longueur des chaînes latérales, la position des liaisons α -1,3 et les liaisons phosphodiester.

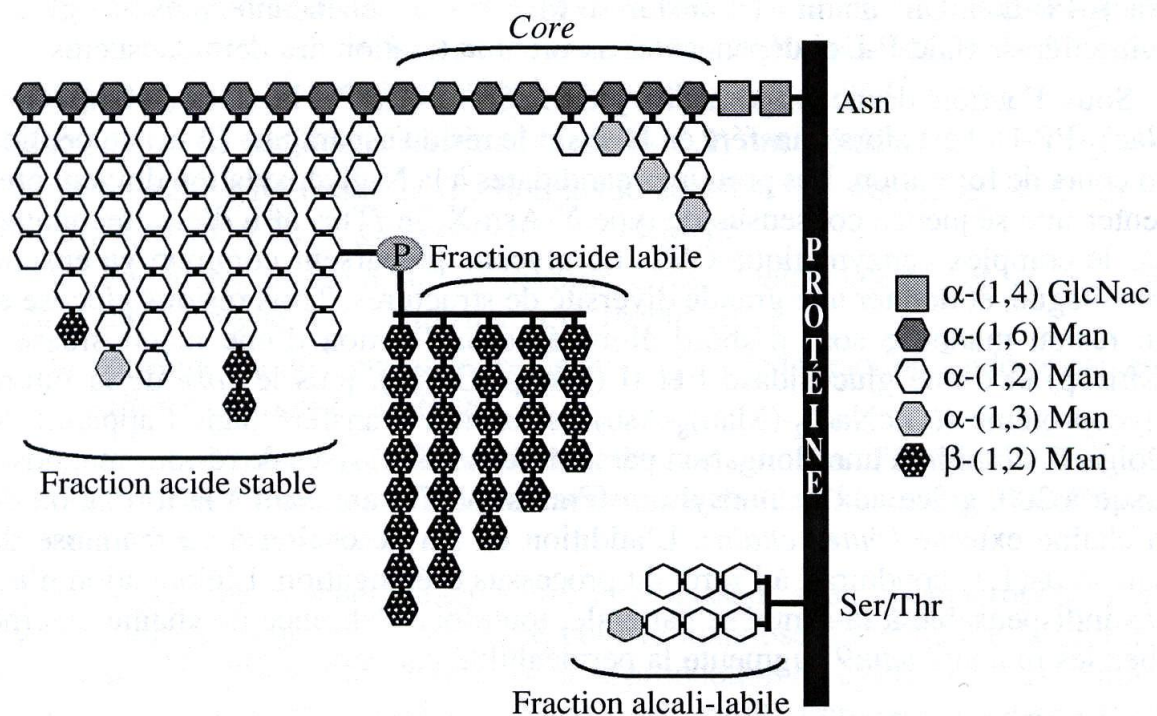


Figure 5 : Structure schématique du mannane de *C. albicans*. D'après Poulain *et al.* (213).

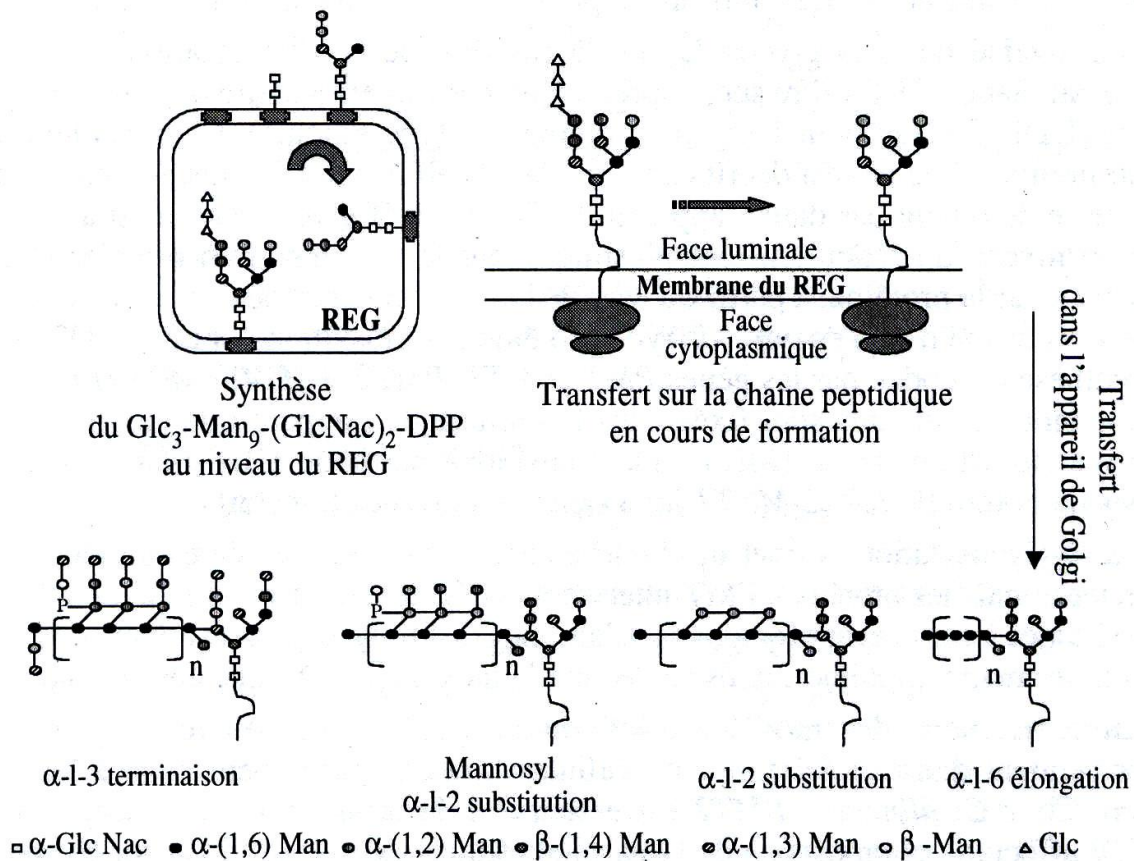


Figure 6 : Principales étapes de la N-glycosylation. D'après Dean (43).

Parmi les protéines de la paroi de *C. albicans*, les protéines GPI sont les plus importantes, quantitativement, et comptent pour environ 88 % de toutes les protéines liées de façon covalente à la paroi. Ces protéines sont liées par l'intermédiaire des β -1,3/ β -1,6 glucanes (90 %) ou par la chitine (10%) (162). Les protéines GPI sont riches en résidus Sérine et Thréonine et sont largement O-glycosylées (Figure 4, c).

La composition protéique de la paroi varie énormément entre les différents stades morphologiques de la levure telles que les formes blastospore, pseudohyphe ou mycélium (126, 257, 296). De plus, le profil d'expression des protéines de la paroi varie significativement dans le mycélium obtenu par l'action de différents stimuli (257). Une régulation appropriée de l'architecture de la surface cellulaire est essentielle pour l'adhérence et la colonisation de l'hôte. La structure polysaccharidique de base de la paroi, glucanes et chitine, est très similaire entre le champignon pathogène *C. albicans* et le non pathogène *S. cerevisiae*. Ainsi, l'une des principales différences entre les champignons pathogènes et non pathogènes réside la plupart du temps dans la composition en protéine de la paroi spécifique d'espèce. De plus, l'altération de cette composition peut entraîner une baisse de la virulence

de *C. albicans*. Ceci est vrai pour la protéine Hwp1 (15, 152, 248, 261, 262, 293), dont la suppression de l'expression conduit à une baisse d'adhérence et de la virulence de la levure.

e. Les lipides

Les lipides constituent les composés mineurs de la paroi de *C. albicans* et ne représentent que 5 à 17 % de la paroi après extraction par des solvants. La présence de phospholipides, de triglycérides et de stérols libres ou estérifiés a ainsi été observée. Un lipide intéressant de la paroi de *C. albicans* est le phospholipomannane (176). Jouault *et al.* (114) ont montré que le phospholipomannane induisait la production de Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) chez des macrophages murins et humains. Il a été suggéré que les lipides pariétaux pouvaient jouer un rôle dans l'adhérence (67) et dans l'activation de certaines voies de signalisation chez *C. albicans*.

2. L'espace périplasmique

Il est situé entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique et est le site d'activité de diverses enzymes digestives et d'enzymes participant à la synthèse de la paroi.

3. La membrane plasmique

Elle est constituée de deux feuilletts membranaires. Elle assure un rôle de transport actif d'acides aminés, d'oses et de différents ions, ainsi qu'un rôle passif dans la régulation de flux moléculaires servant à maintenir la pression osmotique. Cette membrane est également impliquée dans les processus de transport des molécules et de biosynthèse des constituants de la paroi.

4. Les organites intracellulaires

Dans le cytoplasme, tous les organites cellulaires classiques sont présents : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, noyau, vacuoles digestives. Seul le contenu protéique et notamment l'activité enzymatique varie en fonction du stade morphologique surtout durant la germination (161).

D. Epidémiologie et pouvoir pathogène

Les *Candida* sont des champignons opportunistes. Habituellement commensales des muqueuses digestives et urogénitales, chez l'Homme, ces levures sont susceptibles de devenir pathogènes et d'envahir les tissus superficiels ou profonds sur certains terrains immunodéprimés comme chez les individus âgés, ou encore ceux traités par chimiothérapie, ou souffrant de désordre hématologique (HIV-positif, leucémie), ou chez les sujets ayant un traitement antibiotique à large spectre ou un déséquilibre endocrinien (diabète, grossesse). Cette levure peut également affecter les nouveaux nés, les patients ayant subi une chirurgie profonde viscérale, ayant une alimentation parentérale ou bien ayant subi une radiothérapie. Le passage de l'état commensal à l'état pathogène est donc le plus souvent lié à une défaillance des systèmes de défense de l'hôte. *C. albicans* est capable de survivre comme commensal dans plusieurs sites anatomiques, chacun présentant ses propres pressions environnementales. Ceci explique les manifestations cliniques très diverses causées par ce champignon. Sur le plan clinique, il est habituel de distinguer les candidoses superficielles, invasives et allergiques.

1. Candidoses superficielles

Ces champignons levuriformes provoquent chez les patients infectés des candidoses superficielles, localisées au niveau digestif (muguet, candidose oesophagienne, gastrique, intestinale, anale et péri-anale), génital (vulvovaginite à *Candida*, balanite), cutané et unguéal (intertrigo, périonyxis et onyxis, etc...). Ces formes cutanéomuqueuses sont le plus souvent bénignes. Cependant des formes graves, chroniques ou récidivantes peuvent être observées.

Les *Candida* sont les plus fréquemment isolés de la cavité buccale et sont détectés chez environ 31 à 55 % des individus sains (72, 226). Les candidoses oropharyngées touchent environ 70 % des patients atteints par le SIDA et 70 % des femmes dans le monde (atteintes ou non par le VIH) font au moins un épisode de vaginite causée par *Candida* spp. et 20 % présentent des candidoses récurrentes (124).

2. Candidoses invasives

Candida peut occasionner des candidoses invasives. On parle généralement de ce type de candidose lorsqu'il se produit un passage des *Candida* au travers de la barrière cutanéomuqueuse. Ceci se traduit par une candidémie ou une septicémie qui conduit à la dissémination, par voie hématogène, des levures à travers l'organisme jusqu'à atteindre des

organes nobles (154). La symptomatologie clinique n'est pas spécifique. Une septicémie à *Candida* peut se manifester par une fièvre isolée, avec frissons, prolongée malgré une antibiothérapie à large spectre.

En ce qui concerne l'épidémiologie des candidoses profondes, *Candida* est désormais le quatrième organisme retrouvé dans les hémocultures de patients hospitalisés (4). De plus, une augmentation de l'incidence des infections fongiques à *Candida* a été observée chez les patients immunodéprimés comme les patients en soins intensifs, les patients en post-chirurgie et les patients neutropéniques (4, 9). Parmi les patients d'unité de soins intensifs, c'est la troisième cause de mortalité (312). La mortalité due à ces candidémies est évaluée entre 15 et 30 % (72, 226). Parmi les levures du genre *Candida*, *C. albicans* est de loin l'espèce la plus fréquemment isolée à partir de prélèvements pathologiques puisqu'elle représente 70 % des isolements cliniques chez l'Homme (206). Dans les années 90, *C. albicans* était responsable de 10 à 20 % des septicémies et de 80 % des infections fongiques nosocomiales (9). Par ailleurs, *C. glabrata* et *C. tropicalis* comptaient chacun pour 5 à 8 % des isolats alors que les autres espèces de *Candida* n'étaient retrouvées que très rarement (4, 9). Cependant, depuis quelques années, un accroissement important des *Candida* non *albicans* est observé. Il concerne notamment *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* et *C. dubliniensis* (309-311).

E. Traitements des candidoses

La paroi est une structure essentielle pour les champignons. Elle n'est pas présente chez les mammifères et constitue une cible de premier choix pour les antifongiques. L'ergostérol est le principal stérol de la membrane plasmique des champignons et régule la fluidité et l'asymétrie de la membrane. L'ergostérol est aussi important pour le fonctionnement de plusieurs enzymes liées à la membrane. L'ergostérol est depuis longtemps une molécule cible de choix pour les antifongiques puisque ce stérol n'est retrouvé que chez les levures et les algues. Cependant d'autres cibles ont été trouvées et les antifongiques reconnaissant ces cibles sont aussi efficaces. L'éventail de molécules antifongiques utilisables pour traiter une candidose superficielle ou invasive est résumé dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Activités, modes d'action des principales molécules anti-*Candida* et mécanismes de résistance des *Candida*. D'après Sanglard (237).

Antifongique	Spectre d'action	Mode d'action	Mécanismes de résistance observés chez des isolats cliniques
Polyènes			
Amphotéricine B	Bonne activité sur <i>Candida</i> spp. (excepté <i>C. lusitaniae</i>)	Se lie à l'ergostérol et déstabilise les fonctions de la membrane cellulaire	Altérations d'étapes spécifiques de la biosynthèse de l'ergostérol
Pyrimidines analogues			
5-fluorocytosine (5-FC)	Active sur <i>Candida</i> spp. Cependant, émergence rapide de résistance si la 5-FC est utilisée comme seul traitement	Altérations de la biosynthèse des acides nucléiques par formation d'antimétabolites toxiques	Diminution de l'utilisation du 5-FC ; diminution de la formation d'antimétabolites toxiques
Azols			
Fluconazole	Actif sur <i>Candida</i> spp., moins actif sur <i>C. glabrata</i> et inefficace sur <i>C. krusei</i>	Inhibition du cytochrome P450 14 α -lanostérol déméthylase	Augmentation de l'efflux par surexpression des gènes transporteurs multidrogues. Altérations de la cible par des mutations.
Itraconazole	Identique au fluconazole		Altérations d'étapes spécifiques de la voie de biosynthèse de l'ergostérol
Voriconazole	Identique au fluconazole		
Posaconazole	Un peu plus actif que l'itraconazole		
Echinocandines			
Caspofongine	Active sur <i>Candida</i> spp. Avec activité fongicide	Inhibition de l'enzyme β -1,3 glucane synthase qui joue un rôle dans la synthèse de la paroi	Inconnu

1. Traitement des candidoses superficielles

Le traitement de ces infections repose sur un diagnostic fiable qui peut être rapidement donné au clinicien grâce à l'examen direct réalisé après ou sans éclaircissement de la préparation et qui sera suivi de la culture sur milieu de Sabouraud. L'identification de l'agent pathogène suite à son isolement va guider le clinicien dans le choix du traitement. Il prescrira le plus souvent un antifongique topique, mais dans les cas sévères, il ajoutera un traitement systémique. Les antifongiques destinés à traiter les mycoses superficielles sont divisés en deux groupes : ceux à large spectre qui sont les azols et ceux qui ont une activité anti-*Candida* comme les polyènes (124).

2. Traitement des candidoses invasives

Tous les patients atteints par une candidémie doivent être traités par un antifongique et le plus tôt possible. La mortalité est inférieure à 15 % chez des patients atteints de candidémie et traités dans les 12 heures qui suivent les résultats de la culture et passe à 41 % chez les patients traités à partir du troisième jour (63, 181).

Les molécules antifongiques disponibles sur le marché pour traiter les candidémies incluent les azolés, les échinocandines et l'amphotéricine B dans sa formulation lipidique (202) (Tableau 1). Il est également recommandé d'enlever les cathéters puisqu'une étude démontre que ceci augmente la clairance des *Candida* du sang (225).

Le fluconazole est le traitement de référence pour les candidémies. Cet agent est actif sur la plupart des *Candida* en inhibant le cytochrome P450 14 α -lanostérol déméthylase de la cellule. Cet antifongique a peu d'effets secondaires et est relativement bon marché. Cependant, il est peu efficace contre *C. glabrata* et inactif contre *C. krusei*.

L'amphotéricine B, un polyène, a été le traitement de prédilection pendant les 30 dernières années pour soigner les candidémies. Elle agit en se fixant sur l'ergostérol et déstabilise les fonctions de la membrane de la cellule. Les effets secondaires importants liés à cette molécule, notamment une atteinte rénale, ont obligé les laboratoires pharmaceutiques à produire de l'amphotéricine B sous forme liposomale afin d'atténuer ces effets indésirables, mais ce n'est plus le traitement de choix pour soigner les candidémies.

La caspofongine est aussi efficace que l'amphotéricine B mais reste moins toxique pour les reins que cette dernière. Elle agit en inhibant l'enzyme β -1,3 glucane synthase qui joue un rôle dans la synthèse de la paroi. Il manque cependant des données fiables concernant l'efficacité de la caspofongine comparée au fluconazole ou à l'amphotéricine B.

Le voriconazole a un spectre d'action supérieur au fluconazole puisqu'il est actif sur quelques champignons filamenteux et sur les espèces de *Candida* résistantes comme *C. glabrata* et *C. krusei*. Son indication dans les candidoses comprend les infections graves à *Candida* résistantes au fluconazole et le traitement des candidémies chez les patients neutropéniques.

L'itraconazole a un spectre d'activité plus étendu que le fluconazole mais il reste peu indiqué dans le traitement des candidoses invasives en raison d'une mauvaise biodisponibilité orale et d'un risque de défaillance cardiaque sous forme intraveineuse.

D'autres antifongiques à activité anti-*Candida* ont vu le jour depuis quelques années comme la micafongine, une nouvelle échinocandine, ou le posaconazole. Des études restent

encore à entreprendre pour certaines de ces nouvelles molécules afin d'évaluer leur réelle efficacité comparée aux traitements déjà en place et pour pouvoir les proposer sur le marché (122).

3. Prophylaxie

Le fluconazole est, dans la majorité des cas, utilisé en prévention des candidoses chez les patients immunodéprimés en raison de sa meilleure tolérance par les patients tout au long du traitement comparée à l'amphotéricine B. Mais, l'utilisation prolongée de fluconazole comme prophylaxie et le traitement des candidoses orales récurrentes chez les patients atteints par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) conduisent à une augmentation du nombre de cas liés à des espèces résistantes à cette molécule. Ainsi, compte tenu de la possibilité de sélectionner des souches résistantes, l'utilisation d'antifongiques dans un but préventif doit être décidée avec circonspection (171).

4. Résistances

La résistance aux antifongiques est apparue parallèlement au développement de la chimiothérapie et repose sur différents mécanismes (217, 304) décrits succinctement dans le Tableau 1 et la Figure 7.

Le principal mécanisme de résistance aux antifongiques est lié à des altérations de la voie de biosynthèse de l'ergostérol par une surexpression du gène *ERG11* qui code pour l'enzyme 14 α -déméthylase ou par une altération des enzymes cibles (par mutation ponctuelle) qui mène à une affinité réduite pour le fluconazole (123, 139, 304). La réduction de l'accumulation intracellulaire des antifongiques (due à un efflux rapide) est un autre mécanisme prédominant de la résistance de *C. albicans* (182). Le plus souvent, les gènes codant pour des pompes d'efflux ATP Binding Cassette (ABC) et Major Facilitator Superfamilies (MFS), sont surexprimés dans les isolats de *C. albicans* résistants au fluconazole (74, 149, 216, 239, 303). Il est bien établi que les isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux azolés ont une activité transcriptionnelle augmentée des gènes codant pour les protéines des pompes d'efflux ABC (Cdr1p, Cdr2p) ou MFS (CaMdr1p) (74, 135, 238, 239, 303). Plus les gènes codant pour les pompes d'efflux sont surexprimés, plus l'efflux d'antifongique est important (74, 135, 216, 239). Enfin, l'inactivation des antifongiques, qui est un mécanisme connu pour les bactéries, n'a pas été observé chez *C. albicans* (39, 232, 239).

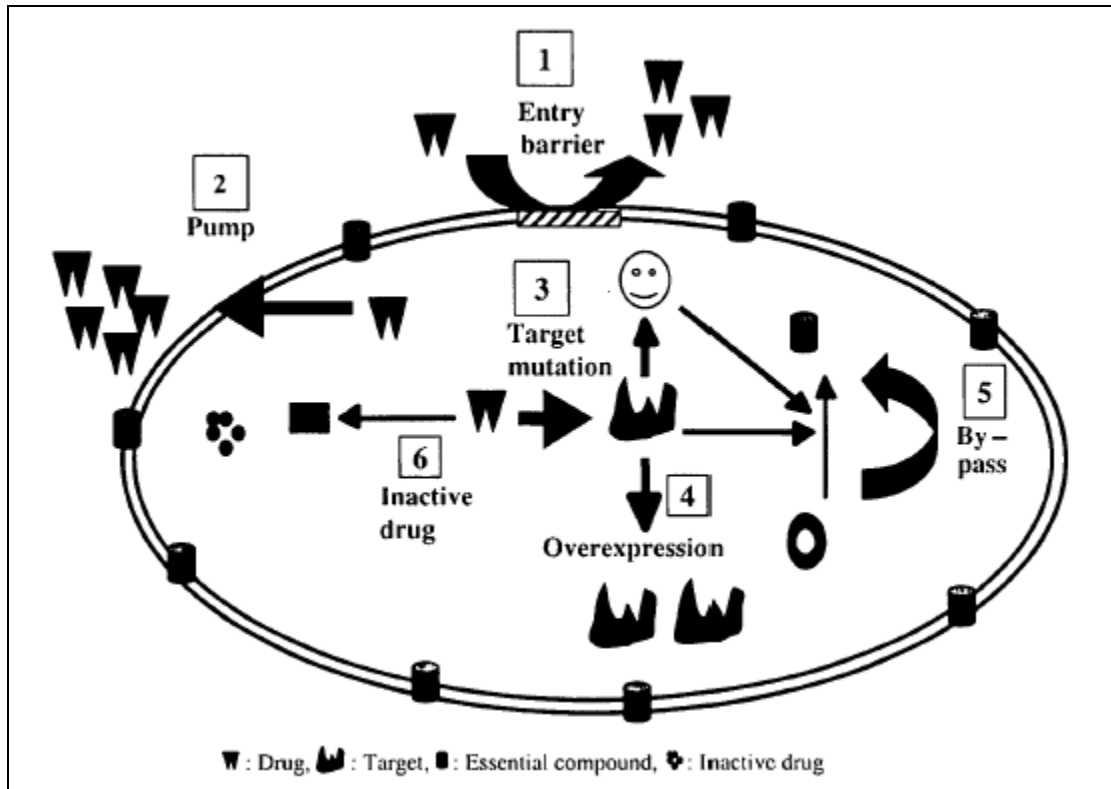


Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires de résistance aux antifongiques chez *Candida*. 1 : Altération de la membrane cellulaire et/ou de la paroi pour empêcher l'entrée des molécules antifongiques. 2 : Surexpression d'une pompe d'efflux pour réduire l'accumulation d'antifongique dans la cellule. 3 : Modification de la cible de l'antifongique pour empêcher l'antifongique de se fixer sur sa cible. 4 : Surexpression de la cible de l'antifongique pour empêcher l'antifongique d'agir sur toutes les cibles. 5 : Mutations géniques dans la voie de biosynthèse de la molécule cible de l'antifongique qui permet à la cellule de se passer de cette molécule cible. 6 : Inactivation ou destruction de la molécule antifongique. D'après Yang et Lo (314).

II. PHYSIOPATHOLOGIE DES CANDIDOSES

Pour passer d'un comportement commensal à un comportement pathogène, *Candida* doit développer des facteurs de pathogénicité qui lui permettent de pénétrer dans l'organisme hôte dont les plus importants sont l'adhérence aux constituants de l'hôte et la production d'enzymes lytiques. Il est maintenant bien établi que ces deux processus sont associés aux variations morphologiques. En opérant la transition dimorphique de l'état blastospore à l'état filamenteux, *C. albicans* augmente ses propriétés d'adhérence, ses capacités de pénétration intercellulaire et sa sécrétion de protéases.

A. Facteurs de pathogénicité de *C. albicans*

A l'inverse des pathogènes hyperspécialisés qui expriment un facteur majeur et unique de virulence, le champignon pathogène opportuniste *C. albicans* exprime de nombreux facteurs qui contribuent à sa virulence. Le terme facteur de pathogénicité est donc préférable au terme facteur de virulence pour *C. albicans*. La somme des effets des nombreux facteurs de pathogénicité de *C. albicans* mène à l'établissement d'une infection chez un hôte dont les défenses sont affaiblies. Sa pathogénicité est largement associée à la variabilité de son comportement en fonction de l'environnement, donc à sa capacité d'adaptation qui est liée à sa variabilité structurale et antigénique. Calderone *et al.* considèrent que la capacité d'adhérer aux composés de l'hôte, le dimorphisme et la sécrétion de protéases et de phospholipases sont les trois facteurs de pathogénicité principaux chez *C. albicans* (23).

1. Variabilité génotypique

C. albicans est une cellule diploïde et possède au total 8 chromosomes dont 7 sont numérotés de 1 à 7 par taille décroissante et un chromosome supplémentaire appelé chromosome R (307). Le génome de *C. albicans* est entièrement séquencé et disponible sur le site internet <http://www.candidagenome.org>. Le nombre de gènes se situe entre 6000 et 7000. Une particularité dans la traduction complique les travaux de biologie moléculaire chez *C. albicans*. En effet, le codon CUG est traduit en sérine à la place de la leucine. Ainsi, l'existence de ce code génétique alternatif empêche l'utilisation chez *C. albicans* de vecteurs ou de gènes rapporteurs développés chez d'autres levures comme *S. cerevisiae*. Certains auteurs présentent ce code génétique alternatif comme un avantage évolutif, favorisant la survie de *C. albicans* dans des conditions difficiles (241). Une revue de Taylor *et al.* dresse un inventaire très complet des différentes techniques utilisées dans le typage des champignons (281). Ces techniques couplées avec les analyses traditionnelles de microbiologie ont grandement facilité l'identification des souches isolées d'infections cliniques.

2. Variabilité phénotypique

a. Variabilité morphologique

La cellule fongique peut être considérée comme polymorphique, c'est-à-dire qu'elle pourra prendre plusieurs aspects, visibles en microscopie photonique. En microscopie électronique, ce sont certaines modifications pariétales qui apparaissent avec beaucoup plus d'évidence (70, 287).

Comme décrit précédemment, les principaux stades morphologiques sont la blastospore, la forme pseudo-mycélienne, le tube germinatif, la forme mycélienne vraie et enfin la chlamydospore. Ces différents stades morphologiques peuvent être obtenus par simple modification des paramètres environnementaux. Les transitions morphologiques dépendent de la nature, du nombre et de l'intensité de facteurs environnementaux mais aussi de l'activité des voies de signalisation. Plusieurs voies de signalisation ont été caractérisées chez *C. albicans* mais de nombreuses voies demandent encore à être élucidées. Deux voies principales de transduction ont été bien étudiées : la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) et la voie des ras-AMPC protéines kinases A (PKA) (306). Ces deux voies semblent être des éléments majeurs de la signalisation intracellulaire au cours de la transition morphologique et aboutissent à l'activation de facteurs de transcription.

Les différents facteurs de transcription en jeu dans la transition blastospore-mycélium sont regroupés dans la [Figure 8](#). Le régulateur le mieux caractérisé dans la morphogénèse des formes mycéliennes est le facteur de transcription Efg1p de type « hélice-boucle-hélice » (270). Des mutants *efg1/efg1* sont incapables de filamento, et les gènes spécifiques de l'hyphe ne sont pas induits. Le facteur de transcription Cph1p, homologue de Ste12p chez *S. cerevisiae*, joue aussi un rôle dans la régulation de la morphogénèse des formes mycéliennes (146). Efg1p et Cph1p ont été identifiés par leur capacité à induire la croissance mycélienne chez la levure non pathogène *S. cerevisiae*. La capacité chez *C. albicans* de Efg1p et Cph1p à induire la croissance mycélienne chez *S. cerevisiae* reflète la conservation des voies qui régulent la filamentation chez ces deux organismes.

D'autres facteurs jouent également un rôle dans la morphogénèse des formes mycéliennes. Parmi ceux-ci, Tup1, Nrg1p et Rfg1p sont des répresseurs de la croissance mycélienne et de l'expression des gènes spécifiques de la forme mycélienne. Par exemple, la disruption de Nrg1 lève la répression de la croissance mycélienne et provoque une avirulence de la souche mutée (184). Les mutants *tup1/tup1* sont capables de filamento dans n'importe quelle circonstance mais les formes obtenues se rapprochent plutôt du pseudo-mycélium. Ce facteur réprime l'expression de *HWP1*, gène spécifique de la forme mycélienne (16). Malgré l'évidence de l'existence de ces différentes voies de régulation, des analyses par Northern blot et par microarray montre que ces différentes voies convergent pour réguler un groupe de gènes qui inclut les gènes *ALS3*, *HWP1*, *SAP4*, *SAP5* et *SAP6* (140, 183). D'autres gènes codant des protéines exprimées durant la phase mycélienne et ayant des fonctions encore

inconnues sont également régulés par ces facteurs de transcription tels que *ECE1*, *DDR48* et *HYR1*.

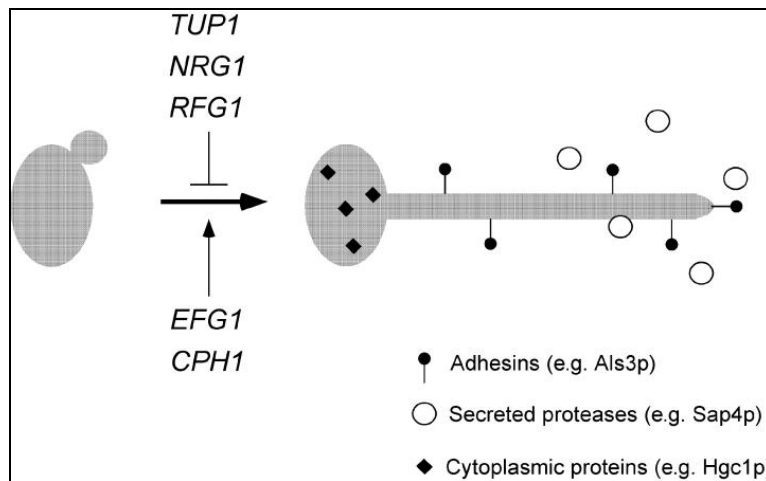


Figure 8 : La morphogénèse d'un mycélium de *C. albicans* coïncide avec l'expression de facteurs de pathogénicité. L'expression de ces facteurs de pathogénicité et la transition morphologique de la forme blastospore (à gauche) à la forme mycélienne (à droite) sont régulées par plusieurs facteurs de transcription. Parmi les facteurs de transcription les mieux caractérisés, Tup1p, Nrg1p et Rfg1p sont des répresseurs et Efg1p et Cph1p sont des activateurs. Rfg1p peut aussi être considéré comme un activateur de la croissance mycélienne sous certaines conditions. La protéine cytoplasmique Hgc1 (Hypha-specific G1 cyclin) est un acteur déterminant dans la morphologie cellulaire. Les facteurs de pathogénicité exprimés par les formes mycéliennes incluent les adhésines et les protéases sécrétées. D'après Kumamoto et Vincens (136).

Au moins trois fonctions des formes mycéliennes ont été proposées dans des études récentes (69, 136, 306) : les formes mycéliennes pourraient être importantes pour pénétrer la surface des tissus de l'hôte, pour s'échapper des cellules hôte après endocytose et échapper aux cellules phagocytaires.

Enfin, la variabilité morphologique peut s'observer en culture sur milieux gélosés en observant les colonies. En effet, les *Candida* peuvent donner des colonies dont l'aspect peut constituer un facteur aisé d'appréciation de cette variabilité (198, 254, 255, 258). On pourra citer par exemple les colonies « white » (W) et « opaque » (O) très utilisées pour l'étude génétique des mécanismes de « switching ».

Pour mieux comprendre les mécanismes globaux de morphogénèse chez *C. albicans*, Whiteway *et al.* (306) décrivent dans une revue toute la machinerie qui détermine la forme de la cellule, les différentes voies de signalisation qui contrôlent les décisions morphologiques et les liens qui existent entre la morphologie cellulaire et les défenses de l'hôte dans la pathogénicité de *C. albicans*.

b. Variabilité intersouche

La variabilité phénotypique peut être en relation avec l'origine géographique ou anatomique des souches de *C. albicans* (197, 291). Ainsi, les souches de *C. albicans* exogènes (sol, oiseaux) ont une capacité plus élevée d'adhérence aux cellules buccales humaines et une plus grande résistance à la phagocytose. La rapidité de commutation phénotypique est plus élevée chez les souches isolées de foyers infectieux profonds que chez celles isolées à partir de sites superficiels (113).

c. Variabilité antigénique

Plusieurs travaux, depuis une vingtaine d'années, font référence au patrimoine antigénique de *C. albicans* que ce soit de la forme levure, du stade tube germinatif ou du stade mycélien. Le but est d'identifier des antigènes spécifiques d'un stade ou d'un autre afin d'améliorer le diagnostic de candidose, l'identification de l'agent causal ou encore d'identifier des molécules pouvant être responsable du pouvoir pathogène plus important de cette espèce ou d'un stade donné. Par exemple la détection d'un antigène spécifique de tube germinatif chez un patient fébrile permettrait de poser le diagnostic de candidose invasive, le stade mycélien étant principalement rencontré dans ce type de pathologie.

La variabilité des antigènes de surface des *Candida* et plus particulièrement de *C. albicans*, a été démontrée par de nombreuses études immunochimiques utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre des antigènes spécifiques d'une espèce ou d'un stade morphologique :

- les travaux de Susuki sur les antigènes polysaccharidiques à l'aide de sérums mono spécifiques, ont permis une classification sérologique des *Candida* et l'identification de deux sérotypes (A et B) chez *C. albicans* (278).

- un antigène P dépendant de l'origine des blastospores de *C. albicans* a été mis en évidence (215).

De nombreuses études se sont attachées à montrer les différences de patrimoine antigénique qui pouvaient exister entre le stade blastospore et le stade mycélien des levures du genre *Candida* et plus particulièrement *C. albicans* (31, 212, 256, 276). Toutes ces études ont été réalisées en utilisant des immunsérums ou des anticorps monoclonaux afin de déterminer la spécificité de l'antigène reconnu. Ainsi plusieurs antigènes spécifiques de stade mycélien ont été identifiés montrant cette différence antigénique entre les deux stades (27, 167, 168,

275). Des anticorps monoclonaux spécifiques d'un stade morphologique ont été développés comme l'AcM 3D9.3 (168), l'AcM 16B1 (167) et l'AcM 3B7 (57) qui reconnaissent des glycoprotéines différentes, présentes sur le tube germinatif de *C. albicans* mais absentes des blastospores. D'autres anticorps monoclonaux ont été développés permettant d'identifier une espèce de *Candida* plus particulièrement. Ainsi, l'anticorps 6B3 a permis de définir un antigène spécifique de *C. krusei* (228) et l'anticorps 12F7 est spécifique d'un antigène localisé uniquement sur les blastospores de *C. dubliniensis* (166). De même, l'anticorps 3H8 (163) reconnaît un antigène présent uniquement sur et dans la paroi des levures du groupe *C. albicans/C. dubliniensis*.

Les antigènes et gènes spécifiques de tubes germinatifs et de mycélium de *C. albicans* ou majoritairement exprimés lors de ces phases comprennent les antigènes 3D9 et 16B1 et les protéines Als3, Hwp1 et Hyr1.

α. Antigène 3D9

Dans un premier travail, Marot-leblond *et al.* (168) ont identifié un antigène spécifique de la surface des tubes germinatifs de *C. albicans*. L'anticorps monoclonal (AcM) 3D9.3 qui reconnaît cet antigène a été obtenu après immunisation de souris avec des facteurs fixant le fibrinogène (FFF), contenus dans le surnageant de culture de tubes germinatifs, et purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de fibrinogène humain purifié. Cet AcM est une IgMκ. Cette spécificité de l'AcM 3D9.3 pour les tubes germinatifs a également été observée par Merson-Davies *et al.* (175) et par Ponton *et al.* (212). De plus, une étude réalisée *in vivo* montre que l'AcM 3D9.3 se fixe sur la surface des tubes germinatifs de *C. albicans* récupérés de vagin de rat (40).

Dans un autre travail, Marot-Leblond *et al.* (170) ont caractérisé partiellement cet Ag 3D9. Une chromatographie d'exclusion/diffusion suivi d'une chromatographie d'interactions hydrophobes ont été réalisées afin de purifier cet Ag. A l'issue de la purification, l'Ag 3D9 n'a pas été identifié. Mais après analyse par Sodium Dodécyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), coloration au bleu de Coomassie et immunodétection d'un extrait Zymolyase® de tubes germinatifs de *C. albicans*, l'Ag 3D9 est retrouvé comme présentant une masse moléculaire comprise entre 110 et 170 kDa.

β . Antigène 16B1

L'Ag 16B1 est un antigène spécifique de la surface des tubes germinatifs de *C. albicans* (167). L'AcM 16B1 qui reconnaît cet Ag a été isolé après immunisation avec les constituants hydrophobes de tubes germinatifs de *C. albicans*. L'AcM 16B1 est une IgG1 κ . L'étude de l'antigène reconnu par l'AcM 16B1 a été réalisée. Ainsi, l'expression de cet antigène a été étudiée en fonction des conditions de culture et des stades morphologiques. Quelles que soient les conditions expérimentales, l'antigène n'est pas détecté sur les blastospores de *C. albicans*. A titre d'exemple, en IFI, les tubes germinatifs, les éléments mycéliens présentent une forte fluorescence alors que les blastospores mères n'en présentent pas comme le montre la Figure 9. Cette fluorescence est homogène pour les tubes germinatifs et hétérogène à la surface du mycélium. Des études *in vivo* sur des abcès donnent les mêmes résultats.

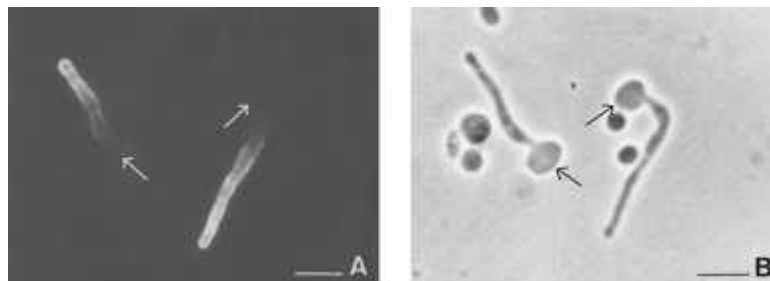


Figure 9 : A : Micrographie par IFI, fixation spécifique de l'AcM 16B1 sur des tubes germinatifs de *C. albicans*. B : Observation en contraste de phase du même champ. Les flèches montrent l'absence de fluorescence sur la blastospore. La fluorescence est plus intense à l'apex des tubes germinatifs. Trait = 1 μ m.

Remarque : le même type de réactivité est observé avec l'AcM 3D9.3.

L'expression de l'antigène 16B1 par les blastospores, le mycélium et les tubes germinatifs des genres autres que *Candida* et par d'autres espèces de *Candida* a été étudiée. Cet antigène n'est pas retrouvé sur les tubes germinatifs d'autres espèces de *Candida*, notamment *C. dubliniensis* ainsi que chez les autres genres de levure étudiés. L'antigène 16B1 est donc spécifique des tubes germinatifs de *C. albicans* et n'est retrouvé qu'à la surface de ce stade morphologique. Ce résultat a été renforcé par Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) sur différents extraits fongiques. Plusieurs résultats montrent que l'antigène 16B1 est de nature protéique comme la perte de fluorescence après traitement par la pronase E des tubes germinatifs, la perte d'activité en Dot-Blot d'un extrait Zymolyase® de tubes germinatifs traité pendant deux minutes à 100°C. L'AcM 16B1 reconnaît un épitope conformationnel ou natif dénaturé par le SDS. Ces résultats n'ont pas permis de déterminer la

masse moléculaire de cet antigène puisque l'épitope est sensible aux conditions expérimentales du SDS-PAGE. Des études par chromatographie d'exclusion/diffusion ont permis d'établir que l'Ag 16B1 a une masse moléculaire comprise entre 25 et 166 kDa.

γ. La protéine Als3

Les Agglutinine Like Sequence (ALS) constituent une famille de glycoprotéines impliquées dans l'adhérence du micro-organisme aux constituants de l'hôte. Huit gènes *ALS* ont été identifiés. L'expression de ces gènes varie d'une espèce à l'autre et en fonction du stade morphologique. Ainsi l'Als3p est majoritairement exprimée lors de la phase mycélienne de *C. albicans* (94). Les données concernant la famille des Als et l'Als3p sont détaillées dans la partie III du chapitre 1.

δ. La protéine Hwp1

L'Hyphal Wall Protein 1 (Hwp1) est présente spécifiquement à la surface de la forme mycélienne de *C. albicans* (263) et est liée de façon covalente aux glucanes de la paroi par l'intermédiaire de son ancre GPI (261). C'est la protéine la mieux étudiée parmi les adhésines de *C. albicans* (272). L'expression de l'Hwp1 apparaît être régulée par les activateurs et répresseurs qui contrôlent la morphologie de la levure (15, 17, 18, 248, 263). La protéine Hwp1 est très acide (pI de 3,37) contribuant ainsi aux nombreuses charges négatives présentes à la surface de l'hyphe. Le domaine antigénique amino-terminal est plus hydrophobe et a beaucoup plus de charge négative que le reste de la molécule. Les domaines central et carboxy-terminal de la protéine sont également riches en résidus Sérine et Thréonine. Il existe trois sites potentiels de glycosylation et la présence d'une ancre GPI est fortement probable (264). Des études *in vivo*, utilisant des souches mutantes déficientes en un allèle du gène ou dans les deux allèles, ont été ensuite réalisées. Il en est ressorti que les souches déficientes en un seul allèle du gène *HWP1* présentait une perte de virulence assez importante et que la délétion des deux allèles entraînait une perte presque totale de virulence de la souche *in vivo* dans un modèle murin de candidose systémique ou de candidose oro-oesophagienne (273, 274, 293).

Cette molécule joue donc un rôle important dans la pathogénicité de *C. albicans in vivo*. Des analyses fonctionnelles ont montré clairement que Hwp1 était impliquée dans la forte adhérence du champignon aux cellules épithéliales buccales (CEB), par l'intermédiaire d'un nouveau mécanisme (262). Le domaine amino-terminal de l'Hwp1 sert comme substrat

aux transglutaminases des mammifères qui lient de façon covalente l'Hwp1 aux protéines de surface de l'hôte. La fonction d'adhésine de Hwp1 en absence d'activité transglutaminase de l'hôte est moins sûr, mais cette possibilité n'est pas à exclure. Une autre fonction de l'Hwp1 dans l'adhérence entre cellule de *C. albicans* vient du fait que cette protéine est induite par des facteurs de mating (10, 320) et qu'elle est localisée à l'interface des deux partenaires de mating (38). Cette localisation pourrait expliquer cette fonction d'adhésine cellule/cellule.

Enfin, Nobile *et al.* (192) ont montré que Hwp1 est une protéine de surface cellulaire nécessaire à la formation d'un biofilm normalement structuré *in vitro* et *in vivo*. Leurs analyses des biofilms mutants supportent l'hypothèse que Hwp1 serait une adhésine cellule/cellule.

ε. La protéine Hyr1

Bailey *et al.* (3) ont isolé et caractérisé le gène *HYR1* régulé lors de la transition morphologique entre la phase blastospore et la phase mycélienne. Des études sur les transcrits ont montré que le gène *HYR1* est induit spécifiquement en réponse à la germination. Ce gène présente un cadre de lecture ouvert de 2810 pb codant pour 937 acides aminés et pour une masse totale de 94,1 kDa. Cette protéine compte 17 sites potentiels de glycosylation, un domaine riche en sérine/thréonine et pourrait avoir une ancre GPI. Cette protéine est également spécifique de la phase mycélienne de *C. albicans*. Des expériences sur des souches mutantes *hyr1/hyr1* n'ont pas montré de différences significatives en termes de morphologie et de croissance comparées à la souche sauvage. Les mêmes auteurs ont essayé de faire exprimer ce gène par des blastospores de *C. albicans* et de *S. cerevisiae*, mais là encore, aucune différence significative n'a été relevée. *HYR1* code donc pour une glycoprotéine de surface spécifique de l'hyphe de *C. albicans* mais sa fonction n'est pas essentielle à la bonne croissance de la levure.

3. Facteurs sécrétés

Outre les facteurs d'adhérence qui constituent des facteurs de pathogénicité, un certain nombre de composants sécrétés par le champignon peuvent contribuer à potentialiser son pouvoir pathogène.

a. Les enzymes

L'activité protéolytique de *C. albicans* lui permet d'utiliser les protéines comme seule source d'azote. Les protéases sont certainement les enzymes de *C. albicans* les mieux étudiées (234). Leurs activités ont été démontrées sur différents substrats comme la kératine, le système kallikréine-kinine, la cystadine A (75, 117, 294), etc... Cette activité protéolytique est due à la famille des gènes *SAP* qui codent pour des Secreted Aspartic Proteinases (266, 305). Cette famille comporte 10 membres dont les Sap1-8 qui sont sécrétées dans l'espace extracellulaire et les Sap9-10 qui sont des protéines attachées à la membrane par une ancre GPI. Le rôle des Sap comme facteurs de pathogénicité de *C. albicans* a été très étudié. Ainsi, la matrice extracellulaire et les protéines de surface de l'hôte telles que le collagène, la laminine, la fibronectine et la mucine sont dégradées par Sap2. Quelques protéines de la réponse inflammatoire ou immunitaire telles que la lactoferrine, l' α -2 macroglobuline, les immunoglobulines comme les IgA peuvent être également hydrolysées par Sap2 (8). Des différences d'expression des gènes *SAP* durant les infections à *C. albicans* ont été montrées *in vitro*, au cours de l'infection dans des modèles animaux expérimentaux et durant des infections systémiques (58, 243-245, 267). De plus, la construction de mutants pour chaque gène *SAP* a permis de mieux connaître le rôle des Sap. Ainsi, Schaller *et al.* ont montré que les Sap1-3, mais pas les Sap4-6, contribuaient significativement à l'infection expérimentale d'une muqueuse artificielle. En ce qui concerne la muqueuse vaginale, le rôle de Sap1 et Sap2, mais pas de Sap3-6, comme facteur de pathogénicité, a été démontré en testant différentes souches mutées pour les différents gènes *SAP* (103, 242-244).

D'autres enzymes sont sécrétées par *C. albicans* comme les phospholipases (PL) et les lipases. Le terme phospholipase décrit un groupe d'enzymes qui ont la capacité d'hydrolyser une ou plusieurs liaisons ester des glycérophospholipides. Chez *C. albicans*, les phospholipases extracellulaires sont considérées comme des facteurs de virulence. Différentes sous-classes ont été détectées chez *C. albicans* : PLA, PLB, PLC et PLD (5, 6, 89, 102, 219). La principale activité phospholipasique est attribuée à PLB. Les fonctions des phospholipases pendant une infection à *C. albicans* ne sont pas précisément connues mais elles sont impliquées dans la pénétration des cellules de l'hôte (219), l'adhérence aux cellules épithéliales (6), l'invasion d'un épithélium oral humain reconstitué (111) et peut être dans l'interaction avec les voies de transduction de l'hôte (52).

Même si les protéases et les phospholipases de *C. albicans* ont été bien étudiées, les lipases hydrolytiques sécrétées ont été négligées. Les estérases et les lipases ont été

caractérisées par leur capacité à catalyser l'hydrolyse des liaisons ester des mono-, di- et triacylglycérols et même des phospholipides. L'activité lipasique extracellulaire des espèces pathogènes de *Candida* a été décrite par Werner *et al.* (302) et une estérase sécrétée a été caractérisée plus tard par Tsuboi *et al.* (292).

b. Quorum Sensing ou communication intercellulaire

Depuis une vingtaine d'années, il a été montré que les bactéries étaient capables de sécréter des molécules de signaux intercellulaires, appelés *quorum sensing*. En 2001, Hornby *et al.* (92) ont décrit le même phénomène chez *C. albicans*, au cours duquel un composé lipophile introduit dans le milieu permettait d'empêcher la transition blastospore/mycélium. Ce composé a été identifié comme étant le farnesol (199). Le rôle du farnesol dans la pathogénicité de *C. albicans* est mal connu mais l'hypothèse qu'il jouerait un rôle dans la virulence du champignon est envisageable (26, 186, 187). Le farnesol peut induire des dommages oxydatifs chez d'autres espèces de champignon. Une étude montre ainsi que l'exposition de *S. cerevisiae* au farnesol arrête la croissance de la levure (155).

D'autres molécules lipidiques, telles que les *eicosanoïdes*, ont été décrites chez *C. albicans* et présentent des propriétés de *quorum sensing* (193). Ces molécules provoquent le début de la transition morphologique.

B. Adhérence de *C. albicans*

1. Adhérence de *C. albicans* aux cellules épithéliales et endothéliales

a. Adhérence aux cellules épithéliales

De nombreuses études ont montré la capacité des cellules de *Candida*, particulièrement la forme mycélienne, à se lier aux mono- ou disaccharides des cellules épithéliales grâce à des composés de surface de type lectin-like (25, 36, 283). La majorité des auteurs soulignent le rôle princeps des mannoprotéines de la surface du champignon : des résidus mannoprotéiques à activité lectinique pour des groupements glycosidiques fucosylés présents à la surface des cellules épithéliales ont été identifiés et caractérisés. Cependant cette spécificité semble restreinte à certaines souches dans la mesure où d'autres se fixent préférentiellement sur des résidus glucosamine ou N-acétyl glucosamine. Beaucoup d'autres composés fongiques ont été trouvés comme étant impliqués dans la liaison aux cellules épithéliales. Le déterminant spécifique du sérotype A semble impliqué dans ce type d'adhérence (178). Des phosphomannoprotéines (118, 119, 142), des structures de type

glycosphingolipide (318), des composants de nature lipidique (67) et aussi la chitine ont été reconnue comme facteur d'adhérence (141).

b. Adhérence aux cellules endothéliales

L'adhérence de *Candida* aux endothéliums implique que le champignon ait pénétré dans le réseau vasculaire et, à l'image de l'ensemble des éléments transitant dans le sang, qu'il puisse se fixer à la paroi endothéliale pour passer ultérieurement dans les tissus périvasculaires. Une lésion ou une érosion de ces endothéliums permet aussi d'envisager des liaisons avec les composants de la matrice extracellulaire. A l'inverse des cellules épithéliales, la fixation aux cellules endothéliales requiert des interactions de type protéine-protéine (21, 48) et pourrait faire intervenir les plaquettes (131). L'adhérence des éléments fongiques aux cellules endothéliales est suivie de l'internalisation du champignon par un mécanisme propre à la cellule endothéliale et est associée à une production de prostaglandine (51, 53, 129). Cette internalisation s'effectue de façon préférentielle pour les tubes germinatifs, les blastospores pouvant aussi pénétrer dans la couche endothéliale. La dégradation de l'endothélium par *Candida* est directement liée au degré de germination des blastospores (53). L'adhérence des *Candida* serait bloquée par des résidus Arginine-Glycine-Asparagine (RGD). Ces résidus injectés chez le lapin expérimentalement infecté par *Candida* diminuent le taux de dissémination du champignon (134). La reconnaissance des cellules endothéliales ou de leur matrice extracellulaire fait intervenir une molécule mimant un récepteur pour le complément de type CR3 qui a des propriétés et une structure s'apparentant à celle de la famille des intégrines (24) ; des structures de type CR2 semblent également jouer un rôle dans cette fixation.

Récemment, Phan *et al.* (207) ont montré *in vitro* que les formes mycéliennes de *C. albicans* étaient capables d'induire leur propre endocytose pour envahir les cellules endothéliales et les cellules épithéliales buccales. Ils ont également montré que la protéine Als3 était nécessaire pour fixer de multiples protéines de surface de l'hôte, et notamment les N-cadhérines des cellules endothéliales et les E-cadhérines des cellules épithéliales orales. L'Als3p serait une invasine qui agirait comme un leurre pour les cadhérines de cellules hôte et induirait ainsi l'endocytose de *C. albicans* en se fixant sur les N-cadhérines des cellules endothéliales et les E-cadhérines des cellules épithéliales buccales.

2. Interaction de *C. albicans* avec les constituants du sang et de la matrice extracellulaire

La dissémination de *C. albicans* implique obligatoirement le passage des levures dans la circulation sanguine. La levure se retrouve alors en contact direct avec les diverses cellules sanguines et les protéines plasmatiques. Certaines protéines plasmatiques ainsi que celles constituant la matrice extracellulaire sont directement impliquées dans le devenir de *C. albicans* chez son hôte. Le champignon exprime des récepteurs aussi bien pour des protéines circulantes telles que le fibrinogène ou la fibronectine, que pour des composants insolubles de la membrane basale lui permettant d'établir une niche écologique.

a. Facteurs du complément

C. albicans est capable de se lier directement à certaines sous unités du complément fonctionnel. Un récepteur (CR3-like) pour le C3bi a été mis en évidence à la surface de *C. albicans* (93). L'interaction de ce récepteur avec le C3bi requiert la présence de Ca^{2+} (260). Un récepteur (CR2-like) fixant le C3d a aussi été identifié à la surface de *C. albicans* (24, 299).

b. Fibrinogène

Le fibrinogène est une molécule de très grande importance dans l'organisme. Sous forme monomérique, il est soluble et disponible dans tout l'organisme, sous forme polymérisée insoluble la fibrine constitue un matériau essentiel de l'hémostase et de la réparation des tissus lésés. Il peut aussi interagir avec des microorganismes tels que *Staphylococcus aureus* (50).

La fixation du fibrinogène sur *C. albicans* et particulièrement sur les tubes germinatifs a été bien étudiée (12, 13, 172, 290). Elle implique des adhésines fongiques comprenant des constituants de 60, 68 et supérieurs à 200 kDa (1, 28). La fixation est spécifique, réversible et possède une constante d'affinité élevée.

La fixation du fibrinogène sur les éléments fongiques a été aussi démontrée *in vivo* chez l'animal (229), son rôle dans la physiopathologie des candidoses est envisagé.

c. Fibronectine

Plusieurs travaux ont établi la présence d'un récepteur pour la fibronectine sur *C. albicans* (116, 133, 251). Le récepteur fongique serait une glycoprotéine de 60 kDa pouvant

s'aggréger ou se polymériser (132). Ce récepteur pourrait être antigéniquement lié aux intégrines $\alpha 5 \beta$ (240).

d. Laminine

Des récepteurs pour la laminine ont été décrits à la surface de *C. albicans*. De même que pour le fibrinogène, cette fixation est spécifique, réversible et la constante d'affinité est élevée. Il apparaît que les molécules fongiques responsables de la fixation sont identiques à celles impliquées dans la liaison au fibrinogène mais elles sont aussi analogues à celles responsables de l'adhérence des tubes germinatifs au plastique (polystyrène), conduisant à la notion d'adhésine multifonctionnelle (14, 150).

e. Plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont connues pour jouer un rôle dans l'hémostase et la première réponse à un dommage vasculaire consiste en une adhérence des plaquettes sur la paroi du vaisseau endommagé ou sur les composés d'un tissu dégradé. Elles sont aussi impliquées dans les mécanismes de défense de l'hôte. Les plaquettes sanguines circulent comme des cellules inertes, discoïdes jusqu'à leur activation par plusieurs facteurs physiologiques tels que l'adénosine diphosphate (ADP), la thrombine ou le collagène qui sont tous responsables d'un changement de forme des plaquettes (61, 249). L'agrégation plaquettaire qui suit cette activation est généralement réalisée par le fibrinogène qui se fixe sur le complexe activé GPIIb-IIIa composé des deux glycoprotéines GPIIb et GPIIIa (164, 188, 204). La présence de deux sites de fixation sur le fibrinogène permet cette agrégation. Le complexe GPIIb-IIIa est le récepteur plaquettaire d'adhérence le plus abondant parmi toutes les glycoprotéines présentes à la surface des plaquettes. C'est un hétérodimère, calcium dépendant, qui est un récepteur pour le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine, le facteur de Von Willebrand et la thrombospondine. Il intervient dans l'agrégation plaquettaire, l'adhérence et la propagation de l'activation plaquettaire. Les plaquettes adhèrent à des protéines subendothéliales exposées à la suite d'une blessure ou d'une infection et s'activent par la suite. Les plaquettes activées s'agrègent entre elles pour former un bouchon plaquettaire, relarguer d'autres molécules activatrices permettant le recrutement d'autres plaquettes et ainsi augmenter le thrombus. L'activation plaquettaire mène à un changement conformationnel du complexe GPIIb-IIIa augmentant ainsi son affinité pour le fibrinogène soluble et d'autres molécules adhésives contenant le motif RGD.

Plusieurs études *in vitro* suggèrent que les plaquettes interagissent avec *Candida*. Maisch et Calderone ont démontré l'adhérence de *C. albicans* au caillot fibrino-plaquettaire (159, 160). D'autres auteurs ont montré que les fragments de paroi cellulaire de *C. albicans* étaient capables d'agréger les plaquettes (252). Klotz *et al.* ont étudié l'adhérence de *C. albicans* aux cellules endothéliales et à la matrice extracellulaire de ces cellules et ont montré que l'interaction entre la levure et les plaquettes se réalisait après l'agrégation plaquettaire (128, 131). Cependant, bien que ces auteurs aient détecté une agrégation plaquettaire avec le cytosol des blastospores, ils ont été incapables de produire une agrégation plaquettaire avec des levures viables. Une étude de Willcox *et al.* (308) conclut qu'à l'inverse des autres espèces, les plaquettes sont incapable de s'agréger autour de *C. albicans*. Cette étude montre également la capacité des plaquettes à tuer les espèces de *Candida* excepté *C. albicans*. Cependant, Yeaman *et al.* ont montré que les plaquettes sont activées par les différentes espèces de *C. albicans* et sécrètent des peptides plaquettaires microbicides actifs sur *Candida* (315-317).

Les interactions *in vivo* entre les espèces de *Candida* et les plaquettes ont été partiellement étudiées. Holder et Nathan (88) ont observé que l'injection d'un extrait obtenu par sonication de *Candida* chez des souris produisait une agrégation plaquettaire. Dans un modèle d'endocardite chez le lapin, causée par une destruction traumatique des valves aortiques, Calderone *et al.* (22) ont montré la présence de *Candida* dans le caillot fibrino-plaquettaire. L'activité plaquettaire anti-*Candida* a été décrite et jouerait un rôle dans la sévérité de l'endocardite expérimentale à *C. albicans* (316).

Parallèlement, d'autres études *in vitro* sur les relations entre les plaquettes et *C. albicans* ont permis de mettre en évidence, à l'aide de plaquettes natives d'origine humaine et en absence de protéines plasmatiques, que l'interaction fait intervenir un constituant fongique de 45 kDa se fixant sur le complexe GPIIb-IIIa. Les plaquettes activées peuvent aussi se fixer sur *C. albicans* par la thrombospondine externalisée pendant le processus d'activation (157, 158, 231). Tous ces phénomènes d'adhérence plaquettaire sont beaucoup plus intenses à la surface des éléments mycéliens qu'à la surface des formes blastospores (157, 158). L'étude de cette fixation par microscopie électronique à balayage montre que les plaquettes subissent des modifications morphologiques qui traduisent l'activation des plaquettes. De la forme discoïde caractéristique des plaquettes au repos, celles-ci s'arrondissent et émettent des pseudopodes adhérent à la surface des éléments fongiques. Elles s'étalent ensuite sur le champignon (Figure 10). La microscopie électronique à transmission montre bien l'intimité de la relation

existant entre la surface de la membrane plaquettaire et la paroi fongique. Au cours de cette transformation induite par le contact avec les *Candida*, les plaquettes sont activées (230).

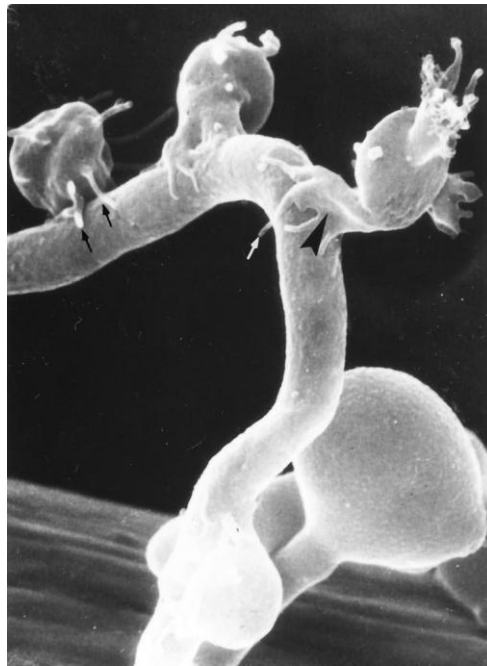


Figure 10 : Microphotographie de l'adhérence des plaquettes sanguines aux tubes germinatifs de *C. albicans* observées en microscopie électronique à balayage. Les plaquettes adhèrent plutôt sur le tube germinatif que sur la blastospore mère. Les petites flèches montrent les pseudopodes collés à la surface fongique et la tête de flèche montre l'étalement de la plaquette sur le tube germinatif. D'après Robert *et al.* (230).

3. Interaction avec les monocytes/macrophages

Chez la souris, il a été mis en évidence une corrélation entre l'élimination des macrophages spléniques et l'augmentation de la susceptibilité aux candidoses disséminées expérimentales (221).

L'adhérence correspond à la première étape de la prise en charge des éléments fongiques par le macrophage et semble analogue pour les macrophages situés dans des organes lymphoïdes différents (73).

Cutler *et al.* (37) ont observé *ex vivo* sur des coupes d'organes de souris la fixation de cellules de *C. albicans* sur les macrophages.

Chez la souris, le pouvoir fongicide des macrophages *in vitro* et *in vivo* varierait d'intensité, selon les espèces de *Candida*. D'après Calderone *et al.* (20), les macrophages auraient un rôle limité dans la protection contre *C. albicans*. Cette observation est basée sur le fait que ces cellules ont une faible capacité de destruction vis-à-vis des cellules fongiques tant qu'elles n'ont pas été activées par des cytokines telles que l'Interféron- γ (IFN- γ) et le

Granulocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Les macrophages ont deux types de récepteurs membranaires responsables de leur interaction avec *C. albicans* :

- le Macrophage Mannose Receptor (MMR) qui reconnaît des groupements mannoses liés en α (125).
- une protéine de 32 kDa correspondant à la galectine 3 ayant une affinité pour les β -1,2 oligomannosides (59, 115).

Ces adhésines macrophagiques et fongiques permettraient l'internalisation de la levure. Cependant, la phagocytose n'est pas suivie de la destruction des levures car *C. albicans* peut perturber une voie de signalisation du macrophage, empêchant ainsi la lyse du pathogène enfermé dans le phagosome. L'activation des macrophages par du mannane, des mannoprotéines ou des β -1,2 oligomannosides a comme conséquence la libération de TNF- α qui va exercer son activité microbicide de façon directe ou indirecte (114). Ainsi, l'induction de TNF- α peut être obtenue à partir de macrophages stimulés par des glycoprotéines de *C. albicans* contenant des oligomannosides liés en β -1,2 (115).

4. Interaction avec des matériaux synthétiques

a. Adhérence aux cathéters et prothèses

L'implantation de matériaux synthétiques dans l'organisme est très largement corrélée à une augmentation du risque de colonisation fongique (225). La formation de biofilms de levures à la surface de ces matériaux est plus importante avec *C. albicans* qu'avec les autres espèces de *Candida*. Elle varie aussi de façon significative avec les supports étudiés (77).

Les composants impliqués dans l'interaction de *C. albicans* avec le plastique sont analogues à ceux décrits dans l'interaction avec le fibrinogène et la laminine. Ceux-ci constituent un ensemble appelé "multifonctionnal adhesin of *Candida albicans*" et présentent la propriété d'être excrétés par le champignon au contact du plastique, surtout par la forme germinative, et d'y rester fortement adhérents (288).

Il est à noter que l'introduction d'un cathéter dans l'organisme est très rapidement suivie de la formation d'un dépôt constitué en partie de fibrinogène, de plaquettes et d'autres constituants plasmatiques. Il est vraisemblable que l'adhérence du champignon puisse être largement dépendante de ce phénomène.

b. Hydrophobicité de surface

L'adhérence de *C. albicans* aux surfaces synthétiques telles que le plastique et l'acrylique (cathéters et prothèses) serait due à des interactions de nature hydrophobe.

Pour une grande majorité des isolats de *C. albicans*, les blastospores cultivées à température ambiante ou sur milieu gélosé, ont une hydrophobicité de surface plus élevée que celles cultivées à 37°C ou en milieu liquide (84, 109). Les levures en phase stationnaire sont plus hydrophobes que celles en phase exponentielle de croissance (78). Cependant, il apparaît que la plus forte hydrophobicité de surface est observée pour les formes filamenteuses (tubes germinatifs), quelle que soit l'hydrophobicité de surface initiale de la blastospore mère (78, 109). L'apex du filament semble présenter d'avantage de sites hydrophobes que le reste de l'élément fongique et ces éléments mycéliens contiennent une plus grande diversité en constituants hydrophobes que le stade blastospore (148).

Au niveau ultrastructural, les études en microscopie électronique ont montré que les cellules hydrophobes ont une surface recouverte de courts fibrilles exprimés de façon hétérogène, alors que les cellules hydrophiles présentent une couche externe constituée de longs fibrilles disposés uniformément sur toute la surface cellulaire (82).

Au niveau moléculaire, des constituants hydrophobes de surface ont été partiellement caractérisés. Ils sont exprimés de façon constante quelle que soit l'hydrophobicité de surface de la levure et la température de culture (68, 82, 85). Les glycoprotéines hydrophobes présentent un degré de glycosylation moindre que les glycoprotéines hydrophiles (81). Des constituants remarquables ont été décrits comme spécifiques, d'autres sont exprimés en plus grande quantité par les levures hydrophiles ou hydrophobes (85, 169). Ces résultats s'expliquent par l'expression sur les cellules hydrophiles d'une couche fibrillaire constituée de glycoprotéines hydrophiles, de masse moléculaire élevée, masquant les constituants hydrophobes (82, 83). L'élévation de l'hydrophobicité de surface résulterait alors de l'élimination ou du réarrangement de cette couche hydrophile, permettant aux protéines hydrophobes d'être exposées en surface (68, 83).

III. LA FAMILLE DES Als ET L'Als3p

La famille des gènes Agglutinin-Like Sequence (*ALS*) de *C. albicans* code pour de grandes glycoprotéines de surface impliquées dans le processus d'adhérence aux cellules hôte. Le terme « Agglutinin-Like » a été choisi pour nommer les protéines Als en raison d'une similarité de séquence avec l' α -agglutinine de *S. cerevisiae* codée par le gène *AGA1* (101).

A. Les gènes *ALS*

1. Structure des gènes *ALS*

Huit gènes codant pour différentes Agglutinin-like protéines ont été jusqu'à présent décrits bien que 9 gènes aient été initialement mentionnés. Il s'est avéré plus tard que l'*ALS3* et l'*ALS8* (322) n'était qu'un seul et même gène. Tous les gènes *ALS* ont une structure similaire composée de trois domaines (Figure 11). Le domaine 5' qui est de 55 à 90 % identique parmi tous les gènes *ALS*, un domaine central constitué exclusivement d'un nombre variable de copies d'un motif répété de 108 pb et enfin un domaine 3' relativement variable en longueur et en séquence parmi les gènes *ALS* (94).



Figure 11 : Structure schématique d'un gène *ALS* en 3 domaines. Bien que la longueur du domaine 5' soit relativement constant parmi les gènes *ALS*, la longueur du domaine central constitué d'une séquence répétée et le domaine 3' sont très variables. Ainsi le nombre de répétition de la séquence dans le domaine central varie de 4 à 37 pour les gènes *ALS*. La coupure dans le domaine 3' indique la variabilité de longueur pour ce domaine. D'après Hoyer (94).

Ces 8 gènes peuvent être regroupés par sous-familles en fonction de la séquence du domaine central (96, 100, 121). Ainsi, il a été montré que les gènes *ALS1-ALS4* s'hybridaient avec les motifs répétés du gène *ALS1*, que les gènes *ALS5-ALS7* s'hybridaient avec les motifs répétés du gène *ALS5* et que l'*ALS9* était lié aux deux sous-familles. Il est intéressant de noter également que les gènes *ALS1*, *ALS3* et *ALS5* présentent 85 % d'identité au niveau du domaine 5' (97, 99, 101). Bien que le domaine 3' soit moins conservé parmi tous les gènes *ALS*, il existe certaines homologues entre gènes. Tel est le cas des gènes *ALS2* et *ALS4* et des gènes *ALS5* et *ALS6* qui présentent respectivement 95 % (100) et 93 % (98) de nucléotides identiques. Par ailleurs, un motif répété de 5 acides aminés Val-Ala-Ser-Glu-Ser (VASES) est

retrouvé dans les gènes *ALS5*, *ALS6* et *ALS7*. Ce motif est unique parmi les gènes *ALS* et dans le génome de *C. albicans* (98).

Ces gènes *ALS* sont localisés et distribués sur 3 chromosomes de *C. albicans*. *ALS1*, *ALS2*, *ALS4* et *ALS5* sont localisés sur le chromosome 6, *ALS6* et *ALS7* sur le chromosome 3 et *ALS3* sur le chromosome R (97, 99, 101).

Des travaux récents ont montré que les gènes *ALS* étaient également présents chez *C. dubliniensis* et *C. tropicalis* (96, 180). Bien que la structure en trois domaines semble conservée dans le genre *Candida*, la séquence des gènes *ALS* varie au sein des espèces non-*albicans*. Aucune identité n'a pu être établie entre les gènes *ALS* des espèces non-*albicans* et les 8 gènes *ALS* de *C. albicans*.

2. Variabilités alléliques des gènes *ALS*

Plusieurs types de variabilités géniques peuvent être décrits. La taille des *ALS* peut varier entre diverses souches de *C. albicans* en fonction du nombre de répétition du motif de 108 pb présent dans le domaine central (99, 101, 325). Un polymorphisme de séquence a également été observé pour un même gène *ALS* (97). Deux allèles différents pour un même gène et au sein d'une même souche ont été décrits (200, 319, 325, 327). La différence de taille de séquence entre deux allèles d'un même gène *ALS* dépend exclusivement du nombre de répétition du motif de 108 pb dans le domaine central du gène. Ainsi, suivant les souches, le nombre de copies du motif de 108 pb des allèles *ALS3* (200) varie de 6 à 19, de 2 à 10 pour les allèles *ALS5* et de 2 à 8 pour les allèles *ALS6* (325).

Une différence de régulation de l'expression d'un gène *ALS* entre les souches de *C. albicans* a aussi été décrite. Enfin, l'ensemble de ces 8 gènes n'est pas systématiquement présent dans une même souche ce qui pourrait expliquer les différences observées en terme d'adhérence de *C. albicans*. Par exemple certaines souches n'ont pas le gène *ALS5* (97).

3. Expression des gènes *ALS*

Les gènes *ALS* sont différemment régulés et exprimés en fonction des conditions de culture (pH, température, composition du milieu de culture, etc...) (99, 101), de la morphologie (98, 99) et de la phase de croissance de la levure (100). Ainsi l'expression de *ALS3* est observée principalement lors du développement des tubes germinatifs. Il est intéressant de noter également que l'activation de la transcription par les promoteurs *ALS1* et *ALS3* est beaucoup plus active que pour *ALS5*, *ALS6*, *ALS7* ou *ALS9*. Il semble qu'il y ait une

corrélation entre le niveau de transcription et la production de protéines Als et donc que certaines Als seraient plus abondantes que d'autres (71).

Argimon *et al.* (2) ont montré que le gène *ALS3* était régulé par de multiples facteurs au niveau transcriptionnel. L'analyse du promoteur *ALS3* révèle qu'il contient deux régions d'activation, une essentielle pour l'activation de la transition morphologique et l'autre pour l'augmentation de l'amplitude de cette activation. La transcription de l'*ALS3* est réprimée principalement par Nrg1 et Tup1, mais également par Rfg1. L'activation de la transcription d'*ALS3* est quant à elle réalisée essentiellement par Efg1, Tec1 et Bcr1. Les auteurs suggèrent qu'il existe de multiples voix de régulation du gène *ALS3* passant par son promoteur.

Cheng *et al.* (35) ont émis l'hypothèse que l'expression des gènes *ALS* était influencée par l'environnement de *C. albicans*. Ainsi ils ont montrés par RT-PCR chez des souches cliniques provenant de liquide vaginal, que les transcripts *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* et *ALS9* étaient détectés fréquemment et que *ALS4* et *ALS5* étaient moins souvent détectés. En revanche, dans un modèle d'épithélium vaginal humain reconstitué, l'expression de *ALS4*, *ALS5* et *ALS6* et *ALS7* étaient moins fréquemment retrouvée voire totalement absente pour l'*ALS4*. Les auteurs observent en effet que l'*ALS4* est fortement retrouvé dans les cellules de l'inoculum mais sous exprimé en contact avec un épithélium vaginal. De plus, Sandovsky-Losica *et al.* (236) ont étudié les changements transcriptionnels des gènes de *C. albicans* opérant lors de l'infection de cellules épithéliales HEP-2 par *C. albicans*. Parmi les gènes surexprimés, sont retrouvés les gènes *ALS2* et *ALS5*.

B. Les protéines Als

1. Structure et localisation des protéines Als

Le premier gène à avoir été décrit a été le gène *ALS1*. L'étude de la protéine codée par ce gène a révélé une similarité de séquence avec la glycoprotéine d'adhérence de surface α -agglutinine codée par le gène *AGA1* de *S. cerevisiae* (76, 144, 145). Chez *S. cerevisiae*, l'interaction entre l' α -agglutinine et la glycoprotéine de surface α -agglutinine facilite le mating entre les cellules haploïdes. Les travaux déjà réalisés sur l' α -agglutinine de *S. cerevisiae* permettant de montrer sa localisation cellulaire et la nature des différents motifs protéiques a servi de base pour l'analyse des protéines Als (153, 313).

Les protéines Als sont des protéines localisées de manière homogène à la surface de la cellule (95, 100). Le fait que les protéines Als présentent des séquences amino et carboxy-terminale hydrophobes qui servent de séquence signal de sécrétion et d'ancre GPI (41, 97,

100, 121) laisse penser à une localisation en surface de la cellule. Les protéines sont liées dans la paroi cellulaire aux β -1,6 glucanes (121). La même structure est retrouvée chez *C. dubliniensis* et *C. tropicalis* (96, 121).

Un autre point important est la forte glycosylation (N- et O-glycosylation) des protéines Als particulièrement au niveau des séquences répétées du domaine central riche en résidus Sérine/Thréonine et au niveau du domaine carboxy-terminal (121). Ceci permet à une protéine Als de tripler voire quintupler sa masse moléculaire. Ainsi, l'Als1p d'une masse moléculaire théorique de 125 ou 172 kDa suivant la séquence de l'allèle, présente, lorsqu'elle est glycosylée, une masse moléculaire observée de 600 kDa. De même, l'Als3p, prédite à 120 kDa, présente une masse moléculaire de 440 kDa. D'autres travaux mentionnent des tailles plus petites (66, 282) ; ceci pourrait s'expliquer par des méthodes d'extraction différentes ou encore par une déglycosylation plus ou moins partielle de la protéine étudiée.

2. Fonctions des protéines Als

a. Propriétés d'adhérence des protéines Als

Les similarités de séquence entre l'Als1p et AG α 1p laissaient penser que les protéines Als ont une fonction d'adhérence (101). Cette idée a été confortée par Klotz *et al.* (130) qui ont montré que l'Als1p et l'Als5p adhéraient à un grand nombre de peptides dégénérés. *C. albicans* pourrait donc fixer un grand nombre de protéines et de peptides, lui permettant d'adhérer à diverses cellules hôte. D'autres études ont montré que l'expression des gènes *ALS* de *C. albicans* chez un *S. cerevisiae* non adhérent conférait la possibilité à cet organisme d'adhérer à la surface de la cellule hôte et aux composants de la matrice extra-cellulaire (62, 65, 66) ou encore de s'autoaggréger (223). Il a été proposé que les propriétés d'adhérence de l' α -agglutinine de *S. cerevisiae* seraient regroupées dans la partie amino-terminale de la protéine qui porterait 3 domaines IgV-like. En ce basant sur ces données relatives à *S. cerevisiae*, certains auteurs proposent que ce serait la partie amino-terminale des Als qui est en jeu lors des interactions d'adhérence en raison d'un probable motif Immunoglobuline (Ig) dans ce domaine amino-terminal. La présence de tels domaines placerait l' α -agglutinine parmi les protéines de la superfamille des Ig, famille connue pour contenir de nombreuses molécules aux propriétés d'adhérence (34, 42, 313). D'autres analyses structurales tendent à conduire aux mêmes conclusions mais rien n'a encore été réellement prouvé. En ce qui concerne les Als, quelques analyses structurales sur la protéine Als5 ont été réalisées et tendent également à montrer, notamment par la présence de nombreux feuillets β anti-

parallèles dans la structure secondaire, qu'il pourrait exister une structure de type Immunoglobuline (97).

Des analyses structurales plus poussées et plus récentes (Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, dichroïsme circulaire) ont enfin montré que la partie amino-terminale portait bien des feuillettes β anti-parallèles, structure commune à beaucoup d'adhésines et d'invasines de la superfamille des Ig. La partie amino-terminale est donc bien impliquée lors de l'adhérence du champignon aux cellules hôtes et est hypervariable parmi toutes les protéines Als. Cette hypervariabilité pourrait permettre à *C. albicans* d'adhérer à une grande variété de protéines (250).

Le rôle du domaine amino-terminal dans les fonctions d'adhérence peut être également déduit à partir des résultats obtenus par Oh *et al.* (200). Les domaines carboxy-terminal et central, fortement glycosylés, permettraient d'exposer la partie amino-terminale non glycosylée au contact du milieu extracellulaire et ainsi augmenter les chances d'interagir avec les cellules hôtes. La partie carboxy-terminale de la protéine est ancrée dans la paroi et prolongée par le domaine central plus ou moins long en fonction du nombre de motifs répétés.

Enfin il a été montré par analyse de la partie amino-terminale de l'Als5p, qu'elle était de nature très hydrophobe (97). Son rôle dans l'adhérence aux cellules épithéliales peut être supposé étant donnés les résultats obtenus par Hazen *et al.* qui montraient que les cellules de *C. albicans* de nature plus hydrophobes avaient une plus forte adhérence aux cellules épithéliales que les cellules plus hydrophiles (79, 80).

b. Formation de biofilm

Une étude a montré par northern blot que les gènes *ALS* étaient plus exprimés en condition biofilm qu'en condition planctonique (33, 220). O'Connor *et al.* ont confirmé ce résultat en montrant, par RT-PCR, avec un modèle de biofilm développé sur élastomère de silicone, que le gène *ALS1* était surexprimé lors de la croissance de ces biofilms comparés à une croissance planctonique (194).

c. Adhérence aux cellules de l'hôte

Zhao *et al.* (326) ont étudié plus particulièrement les protéines Als2 et Als4 grâce à la réalisation de mutants incapables de produire l'une ou l'autre de ces deux protéines. Ainsi, la perte de la protéine Als4p provoque une formation de tubes germinatifs plus lente et une baisse d'adhérence aux cellules endothéliales vasculaires. En revanche, aucune différence n'a

été observée concernant l'adhérence aux cellules épithéliales buccales, l'adhérence et la destruction d'un épithélium oral humain reconstitué (EHR) et la formation de biofilm dans un modèle type cathéter. En ce qui concerne la perte de l'Als2p, une formation plus lente de tubes germinatifs, une diminution de l'adhérence aux cellules endothéliales vasculaires et à un EHR, une baisse de la destruction des EHR et une formation de biofilm diminuée ont été observées.

Récemment, Zhao *et al.* (324) ont montré que la délétion du gène *ALS9* réduit significativement l'adhérence de *C. albicans* aux cellules endothéliales vasculaires humaines. Cependant, aucune différence entre le mutant et la souche parente n'a été observée concernant l'adhérence aux cellules épithéliales buccales, à la laminine, à un EHR ou à sa destruction, la formation de tubes germinatifs ou la formation de biofilm sur un cathéter. De plus, les auteurs ont montré que le gène *ALS9* présentait deux allèles distincts, *ALS9-1* et *ALS9-2*, et que l'allèle *ALS9-2* était plus fréquemment retrouvé chez les souches de *C. albicans*. La pression de sélection pour maintenir cet allèle pourrait expliquer sa plus grande importance dans les interactions hôte-pathogène.

Dans cette analyse systématique du rôle de chaque Als par la réalisation de mutant pour chaque gène *ALS*, Zhao *et al.* (323) ont tout récemment étudié le cas de souches mutées pour les gènes *ALS5*, *ALS6* ou *ALS7*. Toutes ces souches mutées ont le même phénotype (croissance, germination, morphologie) ce qui n'est pas observé chez les autres souches mutées pour d'autres gènes *ALS*. Les auteurs ont montré que les souches mutées pour les gènes *ALS5*, *ALS6* ou *ALS7* sont plus adhérentes à une monocouche de cellules endothéliales vasculaires humaines et à des cellules épithéliales buccales comparées à la souche parente. Toutefois, une destruction tissulaire similaire est relevée quand l'expérience est réalisée sur des modèles d'infection d'épithélium reconstitué humain buccal ou vaginal.

d. Adhérence en fonction de la longueur des allèles ALS

Les allèles du gène *ALS3* ont été étudiés chez la souche de référence *C. albicans* SC5314. Ainsi Oh *et al.* (200) ont montré que cette souche présentait 9 copies de séquences répétées pour l'allèle « court » et 12 copies pour l'allèle « long ». Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'allèle « long » contribuerait à l'adhérence plus grande de la levure aux constituants de l'hôte. La « grande » protéine Als serait mieux exposée à la surface cellulaire et pourrait interagir plus facilement avec les constituants de l'hôte. La « petite » protéine Als3

n'aurait pas moins de capacité d'adhérence que la « grande » protéine Als3 mais serait simplement moins accessible. Le modèle proposé n'a pas encore été démontré.

Suivant la souche analysée, le nombre de copies de la séquence répétée de l'allèle *ALS3* varie de 6 à 19 et généralement une souche de *C. albicans* contient un allèle « court » et un allèle « long » *ALS3*. Par ailleurs, le nombre de copies du motif de 108 pb répété dans le domaine central pour le gène *ALS1* varie de 4 à 37 suivant les souches de *C. albicans* étudiées (151).

e. Rôle des régions riches en thréonine

Rauceo *et al.* (222) ont montré en faisant exprimer différents domaines de l'Als5p que les régions riches en thréonine de la partie amino-terminale et de la partie centrale jouait un rôle dans l'adhérence à la fibronectine et dans l'autoaggrégation.

f. Cas particulier de l'Als3p

Le gène *ALS3* est exprimé spécifiquement au niveau des formes mycéliennes, que ce soit tube germinatif ou mycélium vrai (99). Une immunorévélation par IFI montre que l'Als3p est distribuée partout sur le tube germinatif, et aucune révélation de la blastospore mère n'est observée. Pour étudier les fonctions d'adhérence de la protéine Als3, Zhao *et al.* (322) ont construit deux souches double mutées pour le gène *ALS3* ou pour le gène *ALS1*. L'étude de ces double mutants montre d'abord qu'il n'y a pas de déficience dans la germination. Le mutant *als3Δ/als3Δ* présente une plus faible adhérence aux cellules endothéliales isolées de veine ombilicale humaine (HUVEC) et aux cellules épithéliales buccales (CEB) que la souche sauvage. En revanche aucune différence d'adhérence n'a été constatée pour la fibronectine. Une baisse de l'adhérence n'a été notée que pour les HUVEC concernant le mutant *als1Δ/als1Δ*. Des études d'invasion et destruction d'un EHR ont montré que le mutant *als3Δ/als3Δ* était incapable d'adhérer et de détruire cet épithélium à l'inverse du mutant *als1Δ/als1Δ*. Ces travaux ont montré que l'Als1p et l'Als3p avaient des fonctions similaires mais que l'Als3p semblait avoir un rôle plus important dans l'adhérence aux cellules de l'hôte.

Dans d'autres études plutôt axées sur la formation de biofilm, la délétion du gène *ALS3* chez un mutant entraîne la formation d'un biofilm déstructuré ayant une biomasse 50 % plus faible que le biofilm formé par la souche sauvage. La réintégration du gène dans la souche mutée rétablit une structure et une quantité de biofilm comparable à celle de la souche

sauvage. La fonction d'adhérence de la partie amino-terminale de l'Als3p a été démontrée par inhibition de l'adhésion de *C. albicans* aux CEB en utilisant des immunoglobulines dirigées contre la séquence protéique de l'Als3p. Les auteurs suggèrent que les portions de la protéine en jeu dans l'adhérence aux CEB peuvent être différentes de celles impliquées dans la formation de biofilm (321). Par ailleurs, Nobile *et al.* ont montré, dans un modèle de formation de biofilm *in vitro*, que le facteur de transcription Bcr1 gouvernait la formation de biofilm (191) et que la protéine de surface Als3p était une cible clé sous le contrôle de Bcr1. Ils ont montré qu'un double mutant *als3Δ/als3Δ* était incapable de former un biofilm *in vitro* et que la surexpression de l'Als3p paliait l'incapacité de former un biofilm chez le mutant *bcr1*. Des résultats similaires ont été observés *in vivo*. Cependant, *in vivo*, le mutant *als3Δ/als3Δ* est capable de former un biofilm, vraisemblablement en raison de l'activation d'autres protéines par Bcr1. *ALS1* est également sous contrôle de Bcr1 (190).

Phan *et al* (207) ont montré *in vitro* que l'hyphe de *C. albicans* envahissait les cellules endothéliales et les cellules épithéliales buccales en induisant sa propre endocytose. Ils ont également montré que la protéine Als3 était nécessaire à *C. albicans* pour être endocyté par les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et par deux lignées de cellules épithéliales orales humaines. Des expériences de purification par affinité ont permis de montrer que l'Als3p était nécessaire pour fixer de multiples protéines de surface de l'hôte, et notamment les N-cadhérines des cellules endothéliales et les E-cadhérines des cellules épithéliales orales. Les paramètres de fixation entre l'Als3p et les N-cadhérines sont similaires à une fixation de type cadhérine-cadhérine. L'Als3p est donc une « invasine » qui mime les cadhérines de cellules et induit ainsi l'endocytose en se fixant sur les N-cadhérines des cellules endothéliales et les E-cadhérines des cellules épithéliales orales.

Enfin, Brena *et al.* (19) ont montré que l'AcM C7 réagissait avec une molécule de masse moléculaire supérieur à 200 kDa. Cette molécule a été identifiée comme étant l'Als3p. Des expériences complémentaires ont permis d'établir que l'AcM C7 se fixait sur la partie amino-terminale de la protéine.

IV. STRATEGIE DE DEFENSE DE L'HOTE

La possibilité pour un champignon de vivre et de proliférer dépend de l'environnement dans lequel il se trouve, c'est-à-dire de l'organisme hôte. Face à la nature invasive du champignon, de nombreuses barrières et systèmes sont mis en place par l'hôte et sont plus ou moins interconnectés, pour maintenir l'intégrité de l'hôte. Au niveau de la surface des muqueuses, les cellules de *Candida* captent les nutriments disponibles tout comme les autres organismes commensaux présents. Une peau intacte est bien protégée par les cellules kératinisées. Dans le tractus gastro-intestinal normal, les cellules fongiques sont entourées de mucines, d'IgA et de nombreuses bactéries de la flore. Mais il semble que même une légère modification de la surface peut entraîner un processus pathogène. La relation entre les mucines (87) et l'état de la muqueuse sont les principaux facteurs qui déterminent le comportement du champignon (227).

Dans la circulation sanguine, *C. albicans* est rapidement entouré de plaquettes qui s'étalent sur la surface du champignon. Dans des modèles murins, les cellules fongiques sont éliminées de la circulation sanguine en 10 à 15 minutes (157). Ce mécanisme peut mener à la destruction des éléments fongiques par des petits peptides sécrétés par les plaquettes activées, mais cela pourrait aussi permettre au champignon de se fixer sur les cellules endothéliales grâce aux plaquettes activées (315, 316).

L'invasion des cellules endothéliales par *C. albicans* stimule la production et la sécrétion extracellulaire de prostaglandines, probablement liées à un changement de la réponse leucocytaire à l'interface leucocytes-cellules endothéliales (51). La résistance des cellules endothéliales aux dommages provoqués par *C. albicans* est augmenté par l'IFN- γ (106). Si les couches supérieures de l'endothélium sont altérées, une réaction inflammatoire se produit.

Le rôle pivot dans les mécanismes de défense contre *C. albicans* est joué par les cellules phagocytaires : les cellules polymorphonucléaires (PMN) et les macrophages. Les PMN sont les premières cellules à rejoindre l'aire de combat en quelques heures et prennent en charge les cellules intruses. L'augmentation considérable des candidoses invasives liées à une neutropénie démontre le rôle majeur de ces cellules (279). La reconnaissance des éléments à englober pourraient être favorisée par des mécanismes d'opsonisation impliquant des récepteurs aux Fc des immunoglobulines et des récepteurs du complément. Les déficits des mécanismes de défense sont associés à une très grande sensibilité aux infections. Les PMN sont très importants en raison de leur capacité à phagocyter les cellules fongiques et à

produire de la lactoferrine et des intermédiaires oxygénés. Il a été montré que la lactoferrine avait une grande activité antifongique *in vitro* (189); Le burst oxydatif et les nombreuses enzymes contenus dans les granules des PMN sont aussi responsables de la destruction des cellules de *Candida* endocytées (268). De plus, la mort des PMN au niveau de l'abcès est suivie par le relargage d'une protéine de PMN de 30 kDa fongistatique (174). Les macrophages arrivent au niveau de la zone inflammatoire secondairement. Plusieurs antigènes fongiques (généralement de nature mannoprotéique) sont libérés pendant l'infection candidosique. Ces antigènes seraient potentiellement capables de moduler la réponse immunitaire dirigée contre *Candida* (120). Il est aujourd'hui admis que le mannane, polysaccharide de la paroi de *Candida*, a la capacité d'intervenir dans la régulation de nombreuses fonctions immunologiques (46). En effet, celui-ci pourrait être à l'origine du déficit immunitaire cellulaire spécifique observé au cours des phases aiguës des candidoses cutanéomuqueuses chroniques. Un excès de mannanes libres induirait des lymphocytes T suppresseurs et inhiberait la présentation normale des antigènes fongiques par les macrophages (64).

L'adhérence des cellules fongiques peut aussi être réalisée par un récepteur membranaire aux mannoses (125), par la vitronectine (143). L'activité fongistatique ou fongicide des macrophages est plus souvent corrélée à la production de monoxyde d'azote qu'à celle des radicaux oxygénés (11).

La migration des cellules phagocytaires, l'activation de leur métabolisme et particulièrement du burst oxydatif augmentent l'expression des récepteurs membranaires, tout ceci étant amplifié par la sécrétion localisée de cytokines inflammatoires et particulièrement d'IFN et de TNF (269, 301) qui à leur tour peuvent être modulées par les composés de *Candida* (115). D'autres cytokines sont aussi impliquées dans ces mécanismes : IL-2 (44), IL-8 (45), GM-CSF (300). Le rôle localisé des cytokines est très dépendant de la reconnaissance spécifique de l'antigène par les lymphocytes T. Deux sortes de cellules T helper ont été décrites (Th1 et Th2) et jouent des rôles antagonistes. Th1 est associé principalement à la production d'IFN- γ , d'IL-2 et Th2 à la production d'IL-4 et d'IL-10. Th1 participe à ce qui est désigné comme l'immunité à médiation cellulaire alors que Th2 contrôle la réponse humorale. Grâce à des modèles murins expérimentaux, il a été démontré que la protection contre les candidoses cutanéomuqueuses était associée à une réponse Th1 et qu'à l'inverse l'infection était liée à la réponse Th2 (233). L'activation de la voie Th1 plutôt que Th2 pourrait dépendre de plusieurs facteurs, tels que les cellules présentatrices de l'antigène, les molécules HLA de

classe II, la présence de cytokines particulières et aussi de la conformation stérique de l'antigène. Cependant, la corrélation entre la réponse immunitaire locale et le statut immun général est difficile à établir et les résultats restent controversés. Le rôle protecteur des anticorps dans la guérison d'une candidose systémique n'est pas bien établi. Malgré des résultats montrant l'augmentation des anticorps anti-énolase (60) et anti-Heat Shock Protein 90 (Hsp90) de *C. albicans* (173) chez des patients guéris d'une candidose systémique, il n'y a pas de corrélation claire entre l'immunité humorale et la résistance ou la sensibilité aux infections à *Candida*. Cependant, au niveau des muqueuses, la sécrétion d'IgA pourrait être impliquée dans une protection plutôt localisée (295, 298).

Les Hsp, également appelée "chaperones" sont très conservées tout au long de l'évolution des espèces (280) suggérant leur rôle majeur dans la biologie des cellules. L'Hsp90 de *Candida*, qui apparaît être un antigène majeur lors des infections à *Candida*, porte des épitopes communs à l'Hsp humaine, conduisant à une possible interférence entre la réactivité du soi et du non-soi (173). D'autres Hsp ont été décrites chez *Candida* (137).

CHAPITRE 2 :
IDENTIFICATION DE
L'Ag 3D9

Les immunsérums et les anticorps monoclonaux sont des outils indispensables pour étudier la variabilité antigénique qui peut exister entre différentes souches de *C. albicans* ou entre divers stades morphologiques du champignon. Ces anticorps permettent d'établir la spécificité de l'antigène reconnu. Dans le but d'identifier un antigène spécifique de stade mycélien de *C. albicans*, Marot-leblond *et al.* (168) ont développé l'AcM 3D9.3. L'hybridome 3D9.3 a été obtenu après fusion somatique des splénocytes de souris immunisés avec les facteurs fixant le fibrinogène (FFF) de *C. albicans* et le myélome Ag8. L'AcM 3D9.3 est une IgM et sa spécificité pour les tubes germinatifs a été démontrée. La spécificité de l'AcM 3D9.3 pour les parties filamenteuses de la levure a également été observé *in vivo* après récupération de tubes germinatifs de vagin de rat (40). Dans un autre travail de Marot-Leblond *et al.* (170), l'Ag 3D9 reconnu par cet AcM a été partiellement caractérisé comme étant une molécule de masse moléculaire comprise entre 110 et 170 kDa.

Ce chapitre s'intéresse plus précisément à la spécificité de l'épitope reconnu par l'AcM 3D9.3 et décrit l'identification de l'Ag 3D9 comme étant l'Als3p, une glycoprotéine de la famille des Agglutinin Like Protein (ALS) (94).

I. MATERIELS ET METHODES

A. Obtention du matériel fongique

1. Souches utilisées

La souche de *Candida albicans* ATCC 66396, isolée d'une hémoculture, a été utilisée tout au long de l'étude. Cette souche constitue la souche de référence du laboratoire. D'autres souches de *C. albicans*, d'autres espèces de *Candida* et d'autres espèces de levure comme *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées et proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), de la National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF, Bristol, UK), du Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Baarn, Netherlands) et de la Coleccion Espagnola de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, Spain). Pour quelques études d'identification d'antigène, nous avons utilisé la souche de référence *C. albicans* SC5314, les souches de *C. albicans* CAI12 type sauvage, 1843 (*als3Δ/als3Δ*, gène *ALS3* muté), 1467 (*als1Δ/als1Δ*, gène *ALS1* muté) et deux mutants hétérozygotes pour chaque allèle *ALS3*, 1702 (*ALS3SA/als3laΔ*, allèle « court » *ALS3* exprimé et allèle « long » *ALS3* muté) et 1704 (*ALS3LA/als3saΔ*, allèle « long » *ALS3* exprimé et allèle « court » *ALS3* muté) (Tableau 2). La souche *C. albicans* CAI12 nous a été gracieusement donnée par le Dr William Fonzi (Georgetown University, Washington, DC, USA). Les souches *C. albicans* 1843, 1467, 1702, 1704 et des souches de *S. cerevisiae* transformées et exprimant soit l'Als1p (1022), l'Als3p (1023), l'Als5p (1017) ou aucune Als (1024) nous ont été gracieusement fournies par le Dr Lois L. Hoyer (University of Illinois, Urbana, IL, USA).

Tableau 2 : Génotype des principales souches de *C. albicans* utilisées pour la caractérisation de l'Ag 3D9.

Souche	Parent	Génotype	Source/Références
SC5314			
CAI12	CAI4	<i>iro1-ura3Δ::λimm434 / IRO1 URA3</i>	(56)
1843	CAI12	<i>iro1-ura3Δ::λimm434 / iro1-ura3Δ::λimm434 als3laΔ/als3saΔ-URA3</i>	(322)
1467	CAI12	<i>iro1-ura3Δ::λimm434 / iro1-ura3Δ::λimm434 als1saΔ/als1laΔ-URA3</i>	(322)
1702	CAI4	<i>iro1-ura3Δ::λimm434 / iro1-ura3Δ::λimm434 ALS3SA/als3laΔ-URA3</i>	(322)
1704	CAI4	<i>iro1-ura3Δ::λimm434 / iro1-ura3Δ::λimm434 ALS3LA/als3saΔ-URA3</i>	(322)

2. Entretien des souches

Les souches ont été entretenues par repiquage bimensuel sur milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA) contenant du chloramphénicol à 1 g/l (SDA-C). Pour cela, les levures ont été mises en culture 48 h à 37°C puis conservées à 4°C ou conservées à long terme sur cryobilles à -80°C.

Les souches de *S. cerevisiae* transformées ont été entretenues sur milieu Yeast Nitrogen Base (YNB) additionné de Complete Supplement Mixture sans Uridine (YNB+CSM-ura). Les levures ont été mises en culture 48 h à 30°C puis conservées à 4°C.

3. Obtention des blastospores et des tubes germinatifs

a. Obtention des blastospores

Les cultures de blastospores ont été réalisées sur milieu gélosé. Les blastospores de *C. albicans* ont été obtenues par culture de 48 h à 37°C sur milieu SDA-C puis récupérées par raclage de la gélose en présence d'eau distillée stérile. La suspension obtenue a été centrifugée à 900 *g* pendant 10 min. Pour certaines expériences, les blastospores ont été cultivées en bouillon à raison de 2.10^5 cellules par millilitre dans du milieu Yeast Peptone Dextrose (YPD) pendant 18 h à 37°C.

Les blastospores des souches de *S. cerevisiae* transformées ont été cultivées sur milieu YNB+CSM-ura pendant 48 h à 30°C.

b. Obtention des tubes germinatifs et du mycélium

Pour la préparation des tubes germinatifs et du mycélium, des blastospores ont été inoculées à raison de 2.10^6 cellules par millilitre dans du milieu 199 stérile (GIBCO) préalablement dilué au 1/3, préchauffé à 37°C et ajusté à pH neutre en flacon en verre. La suspension a alors été incubée sous agitation rotative (100 rpm) à 37°C pendant 3 heures pour les tubes germinatifs et 24 h pour le mycélium. Après avoir contrôlé microscopiquement que 90 % des blastospores avaient germé, les tubes germinatifs et le mycélium ainsi obtenus ont été récupérés par filtration du milieu sur membrane de porosité de 1,2 µm. Selon le cas, les tubes germinatifs et le mycélium ont été remis en suspension ou congelés à -20°C puis lyophilisés.

4. Extraits bruts de blastospores, de tubes germinatifs et de mycélium de *C. albicans*

Les cellules lyophilisées ont été traitées par une solution de Zymolyase® 20T à 2 mg/ml (ICN) contenant du phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF) à 1 mM, à raison de 10 ml de solution pour 320 mg de matériel cellulaire lyophilisé. La suspension cellulaire a été incubée sous agitation rotative à 37°C pendant 1 h 30 puis centrifugée à 10 000 *g* pendant 10 min. Le surnageant contenant les constituants solubilisés a été récupéré, aliquoté et conservé à -20°C.

5. Dosage des protéines et des polysides totaux

a. Dosage des protéines

Les protéines contenues dans les extraits de blastospores et de tubes germinatifs de *C. albicans* ou dans les différentes fractions obtenues au cours de la purification de l'Ag 3D9 ont été dosées à l'aide du kit de quantification de protéines : le BC Assay (Uptima). Deux millilitres de réactif ont été ajoutés à 100 µl d'une solution standard d'albumine bovine (BSA) à diverses concentrations ou d'échantillons. Après incubation pendant 30 minutes à 37°C, la densité optique (DO) a été lue à une longueur d'onde de 562 nm. La concentration protéique des différents échantillons a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec la BSA.

b. Dosage des polysides

Les résidus osidiques des extraits de blastospores et de tubes germinatifs de *C. albicans* ou contenus dans les différentes fractions obtenues au cours de la purification de l'Ag 3D9 ont été dosés par la méthode de Dubois *et al.* (47). Cent microlitres de phénol à 5 % et 500 µl d'acide sulfurique à 37 M ont été additionnés à 100 µl d'une solution standard de D-glucose à diverses concentrations ou d'échantillons. Le mélange a été chauffé à 100°C pendant 5 minutes. La lecture des DO a été effectuée à une longueur d'onde de 492 nm et sur 100 µl d'échantillon. La concentration en résidus osidiques des différents échantillons a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec le D-glucose.

B. Production des AcM 3D9.3, 5B2, C7 et du sérum polyclonal anti-Als3p

1. Production et purification de l'AcM 3D9.3

a. Production de l'AcM 3D9.3

L'hybridome 3D9.3 sécrétant l'AcM 3D9.3, une IgM spécifique d'un épitope présent à la surface de la partie filamenteuse de *C. albicans*, a été obtenu par Marot *et al.* (168).

L'hybridome 3D9.3 a été cultivé en flacon de 200 ml (Falcon) dans du milieu RPMI 1640 additionné de sérum de veau fœtal décomplémenté à 10 % (v/v), de gentamycine à 50 µg/ml et de glutamine à 2 mM. Le surnageant de culture a été centrifugé pendant 10 min à 10 000 *g*, récupéré et filtré successivement sur membrane de porosité de 1,2 µm et de 0,45 µm. L'AcM a été précipité avec du sulfate d'ammonium à 2 M. Cette suspension a été conservée à 4°C.

b. Purification de l'AcM 3D9.3 par chromatographie d'exclusion/diffusion

La suspension d'AcM 3D9.3 a été centrifugée à 10 000 *g* pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris avec le minimum de tampon phosphate salin (PBS) pH 7,2.

La purification de l'AcM 3D9.3 a été achevée par filtration moléculaire. Après équilibration de la colonne Sephacryl S300 Hiprep 26/60 (23 ml) (Amersham Pharmacia Biotech) avec du PBS (2 volumes de colonne, VC), l'échantillon contenant l'AcM a été introduit dans la colonne puis les différents constituants ont été séparés en fonction de leur "taille". Les fractions susceptibles de contenir l'AcM 3D9.3 ont été analysées par SDS-PAGE. Celles contenant l'AcM 3D9.3 et contenant le moins d'impuretés ont été regroupées puis la concentration de la solution d'AcM a été déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 280 nm. Le taux d'anticorps a été déduit de la relation :

$$DO = \epsilon lc$$

avec ϵ : coefficient d'extinction molaire $\text{ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ($\epsilon = 1,38$ pour les Immunoglobulines)

l : longueur du trajet lumineux dans la cuve en cm

c : concentration de l'anticorps en mg.ml^{-1}

(λ : 280 nm)

L'AcM purifié a été précipité avec du sulfate d'ammonium à 2 M. Cette suspension a été conservée à 4°C.

2. Production et purification de l'AcM 5B2

L'AcM 5B2, d'isotype IgM, a été produit à partir de l'hybridome 5B2 développé par l'équipe INSERM E0360 de Lille. Cet anticorps reconnaît un épitope présent à la surface, dans la paroi et dans le cytoplasme des blastospores et des éléments filamenteux de *C. albicans* (90). Il reconnaît les résidus mannopyranosylés liés en β -1,2 (285). L'AcM 5B2 a été produit selon le même protocole que l'AcM 3D9.3. Le protocole de purification de l'AcM 5B2 est identique à celui utilisé pour l'AcM 3D9.3.

3. Production de l'AcM C7

L'AcM C7 purifié nous a été gracieusement fourni par le Pr Jose Ponton (Universidad del País Vasco, Bilbao, Espagne). Cet anticorps a été développé par Moragues *et al.* (19, 179) et reconnaît un épitope protéique de l'Als3p.

4. Production du sérum polyclonal anti-Als3p

Le sérum polyclonal anti-Als3p nous a été gracieusement fourni par le Dr Lois L. Hoyer (University of Illinois, Urbana, IL, USA). Un sérum polyclonal anti-Als a été obtenu par immunisation d'un lapin blanc New Zealand avec la partie amino-terminale purifiée de l'Als5p de *C. albicans* (97). Puis, le sérum polyclonal anti-Als3p a été produit par adsorption du sérum polyclonal anti-Als avec les tubes germinatifs du double mutant *C. albicans als3Δ/als3Δ*.

C. Purification de l'Ag 3D9

1. Purification de l'Ag 3D9 par chromatographie d'exclusion/diffusion

Une colonne Superdex 200 HR 10/30 (23,562 ml) (Amersham Pharmacia Biotech), de domaine de fractionnement 10 000 à 600 000 Da, a été utilisée pour la chromatographie. Après équilibration de la colonne avec le tampon d'élution HCl-glycine 0,15 M pH 3, 2 ml d'extrait Zymolyase® de tubes germinatifs de la souche *C. albicans* 66396 ont été injectés puis les constituants ont été élués par 1,5 VC de tampon d'élution.

Chaque fraction collectée sous un volume de 5 ml a été testée en ELISA avec l'AcM 3D9.3 afin de repérer celles contenant l'Ag spécifiquement reconnu. Ces dernières ont été regroupées pour être dialysées et analysées.

2. Purification de l'Ag 3D9 par chromatographie d'interactions hydrophobes

Les différentes fractions contenant l'Ag 3D9 issues de la chromatographie d'exclusion/diffusion ont été reprises par du sulfate d'ammonium jusqu'à atteindre une concentration finale en sulfate d'ammonium de 2 M. Après 15 minutes d'incubation, l'échantillon a été centrifugé à 10 000 *g* pendant 10 minutes, afin d'éliminer les constituants non solubles à cette concentration de sulfate d'ammonium, puis injecté dans la colonne.

La chromatographie a été réalisée à 4°C sur gel de Phenyl Sepharose® 6 fast flow (Amersham Pharmacia Biotech) d'un volume de 1,5 ml. Après équilibration de la colonne avec du tampon sulfate d'ammonium (2 M)-phosphate disodique monopotassique (50 mM), puis introduction de l'échantillon, l'élution des constituants adsorbés a été réalisée à l'aide d'un gradient discontinu décroissant pour des concentrations en sulfate d'ammonium de 2 M à 0,1 M à raison de 0,1 M par palier, puis par du tampon phosphate 50 mM, de l'éthanol 20 % et enfin de l'eau distillée, chaque palier contenant 15 ml d'éluat. Le suivi de la chromatographie a été assuré par mesure de l'absorbance à 280 nm. Les fractions obtenues ont été ensuite testées par ELISA avec l'AcM 3D9.3. Les fractions contenant l'Ag 3D9 purifié ont été regroupées, dialysées et analysées.

Remarque : toutes les chromatographies ont été réalisées sur le système AKTA Explorer 10S (Amersham Pharmacia Biotech)

D. Caractérisation de l'Ag 3D9

1. ELISA

a. Immobilisation de l'Ag et saturation

Cent microlitres d'extraits antigéniques bruts, d'extraits prépurifiés ou d'extraits purifiés dilués en tampon carbonate-bicarbonate de sodium 0,05 M pH 9,6 ont été distribués dans chaque puits de plaques pour microtitration Polysorb® (Greiner). Après 1 h 30 d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés avec 250 µl de PBS. La saturation des puits a été réalisée avec 250 µl de PBS-lait écrémé 10 % (Régilait®) par puits pendant 18 h à 4°C.

b. Détection immunologique

Après 3 lavages avec 250 µl de PBS-Tween 0,5 ‰, 100 µl d'AcM 3D9.3 (30 µg/ml), d'AcM C7 ou d'AcM 5B2 dilués en PBS ont été déposés et laissés 1 h à 37°C. Les puits ont été à nouveau lavés 3 fois avec 250 µl de PBS-Tween 0,5 ‰ puis 100 µl d'anticorps de chèvre anti-IgM (µ-spécifique) de souris marqués à la peroxydase du raifort (Caltag), dilués au 1/2 000 en PBS-Tween 0,5 ‰-lait 1 %, ont été déposés et incubés pendant 1 heure à 37°C. Trois lavages avec 250 µl de PBS-Tween 0,5 ‰ ont été effectués puis la révélation a été réalisée par addition dans chaque puits de 200 µl d'une solution de tampon citrate-phosphate 0,15 M pH 5, contenant le chromogène (orthophénylène-diamine) et le substrat (H₂O₂). Après 25 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la réaction enzymatique a été arrêtée par addition de 50 µl d'acide sulfurique 1 M. La lecture des densités optiques a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (Elx800, Bio-Tek instruments) à 492 nm.

2. Immunofluorescence indirecte (IFI)

a. Préparation des lames

Vingt microlitres d'une suspension de tubes germinatifs fraîchement préparés de diverses souches de *C. albicans* ou de *S. cerevisiae* ont été déposés dans chaque puits à raison de 10⁷ cellules/ml. Après fixation par séchage, les lames ont été conservées à -20°C.

b. Révélation

Vingt microlitres d'AcM 3D9.3, C7 ou 5B2 purifiés dilués ou non en PBS ont été déposés par puits de lame pour immunofluorescence. Après 1 heure d'incubation à 37°C en chambre humide, les lames ont été lavées pendant 8 min avec du PBS puis séchées. Ensuite, 20 µl d'anticorps de chèvre anti-IgM (µ-spécifique) de souris, couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (Caltag), dilués au 1/300 en PBS, ont été déposés dans les puits. Après incubation d'1 h à 37°C en chambre humide, les lames ont été lavées pendant 8 min avec du PBS, puis séchées et enfin montées en glycérine tamponnée (9 volumes de glycérol pour 1 volume de PBS). L'observation a été réalisée avec un microscope équipé pour l'examen en épifluorescence (Nikon Fluophot).

3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS-PAGE)

Les constituants contenus dans les extraits fongiques (bruts, prépurifiés, purifiés) ont été séparés en fonction de leur masse moléculaire. La migration a été réalisée sous réfrigération, à voltage constant (300 V) et à ampérage variant de 80 mA en début de migration et 10 mA en fin de migration pendant 3 h environ (système HOEFER SE 600 Ruby). Une concentration en polyacrylamide de 4 % pour le gel d'empilement et des gels de séparation en gradient de 5 à 15 % ont été utilisés.

Coloration des gels de polyacrylamide

Pour la coloration au bleu de Coomassie, après séparation électrophorétique, les gels ont été fixés pendant 1 h à l'aide d'un mélange isopropanol-acide acétique (25 %-10 %), puis colorés au bleu de Coomassie à 0,025 % dans un mélange méthanol-acide acétique (40 %-7 %). Le gel a été ensuite décoloré par bains successifs dans un mélange méthanol-acide acétique (40 %-7 %).

Les gels de polyacrylamide ont également été colorés au Nitrate d'argent. Le protocole de cette coloration est présenté en annexe.

L'acquisition des images a été réalisée grâce au logiciel Biocapt® (Vilbert Lourmat, France) et l'analyse des profils électrophorétiques a été réalisée grâce au logiciel Bioprofil® ID (Vilbert Lourmat, France).

4. Electrotransfert, immunodétection et affinodétection

a. Electrotransfert semi-sec

Après séparation par SDS-PAGE, les constituants ont été transférés sur une membrane d'Immobilon® (Millipore) selon le protocole établi par Twobin *et al.* (284). Cette membrane a d'abord été réhydratée par passage pendant quelques secondes dans un bain de méthanol, dégraissée pendant 10 min dans une solution de Tween 20 à 5 % puis lavée avec de l'eau distillée. La membrane a été ensuite équilibrée avec le tampon de transfert puis placée sur 3 épaisseurs de papier Whatman® saturé du même tampon. Le gel, préalablement équilibré avec le tampon de transfert, a été disposé sur la membrane et recouvert de 2 épaisseurs de papier Whatman® également saturé. Le transfert a été réalisé à 2,5 mA/cm² de gel et à voltage limité à 45 V pendant 1 h (système SEMI-BLOTTER II TEBU). Après transfert, la partie de

la membrane sur laquelle se trouvent les marqueurs de masse moléculaire a été découpée puis colorée pendant 10 min dans une solution d'amidoschwarz à 0,1 %. La décoloration a été réalisée par un mélange méthanol-acide acétique (40 %-7 %).

b. Immunodétection

Après transfert, la membrane a été saturée avec une solution de lait écrémé (Régilait®) à 10 % dans du PBS pendant 18 h à 4°C puis rincée en PBS-Tween 0,5 ‰. La membrane a été incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'AcM 3D9.3 à une concentration de 100 µg/ml en PBS, avec l'AcM C7, avec l'AcM 5B2 ou avec le sérum anti-Als3p dilué en PBS. Après 3 lavages avec du PBS-Tween 0,5 ‰, la membrane a été incubée avec une solution d'anticorps de chèvre anti-IgM (µ-spécifique) de souris couplés à la peroxydase (Caltag) ou avec une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin couplés à la peroxydase (Caltag) dilués au 1/300 en PBS-Tween 0,5 ‰-Lait 1 %. Après 3 lavages en PBS-tween 0,5 ‰, la révélation a été réalisée grâce à un chromogène, la 3,3'diaminobenzidine (DAB) en solution dans un tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 en présence d'eau oxygénée. La réaction a été arrêtée avec une solution d'acide acétique à 5 %.

Pour certaines expériences, la révélation a été réalisée grâce à une méthode plus sensible : l'électrochemoluminescence (ECL). Deux kits ont été utilisés, l'Uplight One Spray (Interchim) et l'ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit (Amersham). La révélation a été effectuée en respectant le protocole décrit par chaque fournisseur.

c. Affinodétection par la Concanavaline A

Après transfert, la membrane a été saturée avec une solution de Bovine Serum Albumin (BSA) à 3 % dans du PBS pendant une nuit à 4°C puis rincée avec du PBS-Tween 0,5 ‰. La membrane a été incubée pendant 1 heure à température ambiante avec une solution de Concanavaline A (ConA)-peroxydase (6 µg/ml) (Sigma) diluée dans du PBS contenant 0,1 mM de Ca²⁺ et 0,1 mM de Mg²⁺. La révélation de l'activité peroxydase a été réalisée suivant le protocole décrit dans le paragraphe précédent.

5. Electrophorèse bidimensionnelle

Cent cinquante microgrammes de protéines contenant l'Ag 3D9 issus de la chromatographie d'exclusion/diffusion ont été lyophilisés et repris par 250 µl de solution de réhydratation contenant de l'urée 6 M, du thio-urée 2 M, 4 % de 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1 % de Dithiothreitol (DTT), 0,5 % d'Immobiline pH Gradient (IPG) Buffer (Amersham Biosciences) et du bleu de Bromophénol. Cette solution a été ensuite déposée dans un sarcophage d'isoélectrofocalisation recouvert par une Immobiline DryStrip pH 3-10 de 13 cm (Amersham Biosciences) et de l'IPG cover fluid. L'isoélectrofocalisation a été réalisée grâce à l'Ettan™ IPGphor™ II IEF System (Amersham Biosciences) après une réhydratation de 12 h suivie d'une isoélectrofocalisation par gradient de voltage allant de 200 à 8000V pour 50 µA par Strip.

La migration en deuxième dimension a été réalisée par SDS-PAGE avec un gel en gradient de polyacrylamide de 5 à 15 %. Les Strip ont été incubés dans une solution d'équilibration, déposés en haut du gel d'acrylamide puis recouvert par une solution d'agarose. La migration a été réalisée selon le protocole décrit précédemment. Le gel a été utilisé pour effectuer un électrotransfert suivi d'une immunodétection avec l'AcM 3D9.3.

E. Déglycosylation de l'Ag 3D9

La déglycosylation de l'Ag 3D9 a été réalisée en utilisant l'« Enzymatic Protein Deglycosylation Kit » (Sigma) et en respectant les indications du fabricant. Dans un microtube, 15 µg d'Ag 3D9 purifié ont été repris par 30 µl d'eau distillée, puis 10 µl de tampon de réaction 5x ainsi que 2,5 µl de solution dénaturante ont été ajoutés. Après homogénéisation, le mélange réactionnel a été chauffé à 100°C pendant 5 min. Après un retour à température ambiante, 2,5 µl d'une solution de Triton X-100 ont été ajoutés, puis 1 µl de chaque enzyme (Peptide-N glycosidase, O-glycosidase, α -2(3,6,8,9)-Neuraminidase, β -(1,4)-galactosidase et β -N-Acétylelglucosaminidase) a été ajouté. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 1 ou 7 jours puis a été analysé par électrophorèse avec un gel en gradient 5-15 % de polyacrylamide. Le gel a ensuite été transféré et analysé par immunodétection avec l'AcM 3D9.3.

F. Identification de l'Ag 3D9 par spectrométrie de masse

Les fragments de gels SDS-PAGE d'intérêt ont été excisés puis lavés sous agitation successivement 2 fois avec 1 ml d'une solution de NH_4HCO_3 25 mM pendant 20 minutes, avec 1 ml d'une solution d'acétonitrile à 50 % dilué dans du NH_4HCO_3 25 mM pendant 15 minutes, avec 1 ml d'une solution de NH_4HCO_3 25 mM pendant 15 minutes puis avec 1 ml d'eau pendant 15 minutes. Une fois déshydraté grâce à un Speed Vac Concentrator (Savant), le gel a été réhydraté par 20 μl d'une solution de trypsine (20 ng/ μl dans une solution de NH_4HCO_3 25 mM et de CaCl_2 5 mM). Ce mélange a été ensuite incubé 18 h à 37°C et incubé 2 h supplémentaires sous agitation après addition de 50 μl d'eau.

Le gel a été ensuite lavé successivement avec 50 μl d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1 % pendant 10 min et 2 fois par 50 μl d'acétonitrile 100 % pendant 10 min sous agitation. A chaque étape de lavage, les surnageants ont été récupérés et regroupés pour être évaporés au Speed Vac Concentrator. Les peptides ont été repris par 15 μl de TFA à 0,1 % puis la solution a été déssalée sur cônes ZipTip® U-C18 (Millipore).

Sur une plaque de téflon, 1 μl d'échantillon et 1 μl de matrice ont été déposés. Après calibration, chaque échantillon a été analysé grâce à un spectromètre de masse de type Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight (MALDI-TOF) (Voyager-DE PRO, Perseptive Biosystems). Tous les spectres de masse ont été calibrés en utilisant un mélange de peptides standardisés. Les cartes peptidiques obtenues ont été utilisées pour interroger la banque de données complète du génome de *C. albicans*, CandidaDB (www.genolist.pasteur.fr/CandidaDB), grâce au programme Mascot (205).

G. Etude de la taille des allèles du gène *ALS3*

La taille du domaine constitué par les séquences répétées de chaque allèle *ALS3* de la souche *C. albicans* 66396 a été déterminée par PCR. Les blastospores de diverses souches de *C. albicans* ont été cultivées pendant 18 h à 37°C dans 5 ml de milieu YPD à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par millilitre puis récupérées par centrifugation. Les culots de blastospores ont été repris par 400 μl de tampon de lyse (Triton X-100 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tampon Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), et par 400 μl d'un mélange de phénol/chloroforme (1:1), puis 0,2 g d'un mélange 1/1 de billes de verre de 0,25 et 1 mm de diamètre ont été ajoutés. Le mélange a été vortexé pendant 2 min. Après centrifugation, la phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube et 1 ml d'éthanol a été ajouté pour précipiter l'ADN. Après centrifugation, le culot a été remis en suspension dans 200 μl de tampon TE (Tris buffer

10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) et traité avec 10 µg/ml d'RNase A. L'ADN a été ensuite précipité par 20 µl d'une solution d'acétate d'ammonium 7,5 M et 400 µl d'éthanol. Enfin, après centrifugation, l'ADN a été repris par 100 µl de tampon TE.

La paire d'amorce ALS3GenoF (5'-ACC TTA CCA TTC GAT CCT AAC C-3') et ALS3GenoR (5'-GAT GGG GAT TGT GAA GTG G-3') a été utilisée comme décrit par Oh *et al.* (200). Les réactions d'amplification ont été réalisées par aliquots de 30 µl contenant 3 µl de tampon 10X pour polymérase, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM de chaque dNTP, 0,4 µM de chaque amorce, 1,5 U de SurePrime™ DNA polymérase (Q-biogene, Irvine, CA) et 1,5 µl d'échantillon d'ADN extraits. Les tubes PCR ont été chauffés pendant 15 min à 94°C et ont subi 35 cycles comprenant la séquence 94°C pendant 1 min, 57°C pendant 1 min et 72°C pendant 3 min. Une extension finale à 72°C pendant 7 min a permis de finir la réaction. Les produits de PCR ont été séparés sur des gels de 0,8 % d'agarose (Sigma) en Tampon Tris/borate/EDTA 1X (TBE) (Sigma) et visualisés par le bromure d'éthidium. La taille des amplicons a été déterminée par comparaison à un marqueur de taille Felix™ marker (Q-biogene) et avec la taille des produits d'amplification du gène *ALS3* de l'ADN génomique de la souche *C. albicans* SC5314.

II. RESULTATS

A. Purification de l'AcM 3D9.3

L'AcM 3D9 a été purifié par chromatographie d'exclusion/diffusion. Le chromatogramme de cette purification est présenté dans la [Figure 12](#). L'AcM 3D9.3 est relativement bien séparé de l'albumine, contaminant majoritaire. La masse moléculaire d'une IgM étant de 900 kDa, l'AcM 3D9.3 est élué en début de chromatographie puisque le domaine de fractionnement de la colonne est de 10 000 à 600 000 Da.

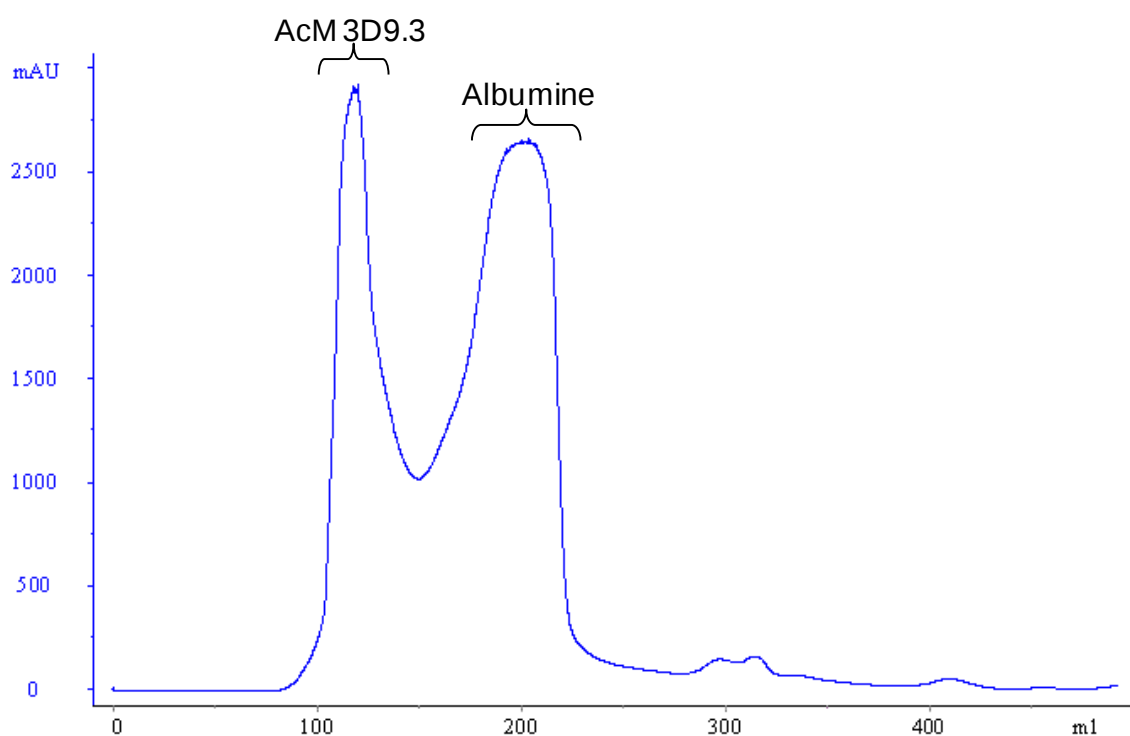


Figure 12 : Profil d'élution (—) de la purification de l'AcM 3D9.3 par chromatographie d'exclusion/diffusion.

Chaque fraction chromatographique a été testée par IFI et par SDS-PAGE, l'IFI permettant d'identifier les fractions contenant l'AcM par la présence d'une fluorescence significative, et le SDS-PAGE contrôlant le degré de pureté de ces fractions. La [Figure 13](#) présente les profils électrophorétiques des produits purifiés après SDS-PAGE en condition réductrice ou non et colorés par le bleu de Coomassie. L'AcM 3D9 présente, en condition non réductrice, une masse moléculaire très élevée égale à 900 kDa ([Figure 13](#), piste 1) correspondant à l'IgM entière qui se décompose en 3 composés d'environ 180, 75 et 28 kDa ([Figure 13](#), piste 2) en condition réductrice correspondant respectivement à une sous-unité, à une demie sous-unité et à la chaîne légère des IgM.

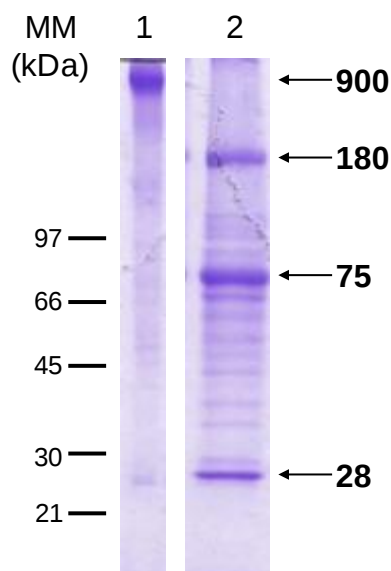


Figure 13 : Analyse par SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie, de l'AcM purifié 3D9.3 (pistes 1 et 2) en condition non réductrice (piste 1) et en condition réductrice (piste 2). MM : marqueurs de masse moléculaire en kDa.

B. Réactivité de l'AcM 3D9.3 avec *C. albicans* et *C. dubliniensis* en IFI

La réactivité de l'AcM 3D9.3 a tout d'abord été testée sur des blastospores et des tubes germinatifs de la souche de référence du laboratoire *C. albicans* 66396. La fixation de l'AcM 3D9.3 a été visualisée par IFI. Aucune fluorescence n'est observée avec les blastospores. Par contre, l'AcM 3D9.3 se fixe de façon homogène uniquement sur la partie filamenteuse des cellules (Figure 14). L'AcM 3D9.3 se fixe dès qu'un tube germinatif émerge de sa blastospore mère comme en témoignent les petites excroissances fluorescentes.

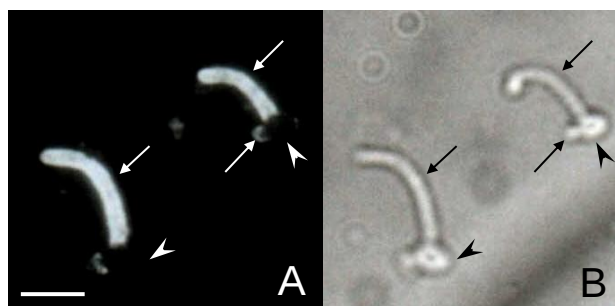


Figure 14 : A : Micrographie par IFI, fixation spécifique de l'AcM 3D9 sur des tubes germinatifs de la souche *C. albicans* 66396. B : Observation en contraste de phase du même champ. Noter le marquage fluorescent localisé uniquement au niveau des parties filamenteuses (flèches) et l'absence de marquage de la cellule mère (têtes de flèche). Trait = 10 μ m.

La réactivité de l'AcM 3D9.3 a ensuite été testée sur des blastospores et des tubes germinatifs de 7 souches de *C. dubliniensis* en IFI. Quelle que soit la souche testée, aucune fluorescence n'est détectée au niveau des blastospores et des tubes germinatifs.

C. Spécificité de l'expression de l'Ag 3D9 chez d'autres souches de référence de *C. albicans* et d'autres espèces

Pour évaluer la spécificité de souche et d'espèce de l'Ag 3D9, des extraits bruts à taux de protéines constant des souches de référence de *C. albicans*, d'autres espèces de *Candida* et d'une souche de *S. cerevisiae* ont été analysés en ELISA. Les blastospores ont été cultivées sur SDA-C à 22°C pendant 48 h. A partir des blastospores de *C. albicans* et de *C. dubliniensis*, une culture de 3 h ou 24 h a été réalisée dans du milieu 199 (pH 6,7) à 37°C. Ces cultures ont permis l'obtention de tubes germinatifs et de mycélium. Le même type de culture a été réalisé pour les autres levures et les éléments obtenus ont été utilisés comme témoin. La plupart des espèces testées ont formé des tubes germinatifs et du mycélium vrai. Dans le genre *Candida* et quel que soit le type d'extrait, aucune fixation de l'AcM 3D9.3 n'est observée pour toutes les espèces non-*C. albicans*, notamment les souches de *C. dubliniensis* (Figure 15). Tous les extraits de blastospores provenant des souches de référence de *C. albicans* sont négatifs pour la présence de l'épitope 3D9 et ceux provenant de tubes germinatifs et de mycélium sont positifs. Toutefois, des différences de densité optique plus ou moins importantes (0,2 à 2) sont observées parmi les souches de *C. albicans* donnant un signal positif. L'absence de signal en IFI pour les blastospores de toutes les souches est confirmée dans cette étude par ELISA. L'Ag 3D9 est absent du stade blastospore toutes espèces confondues.

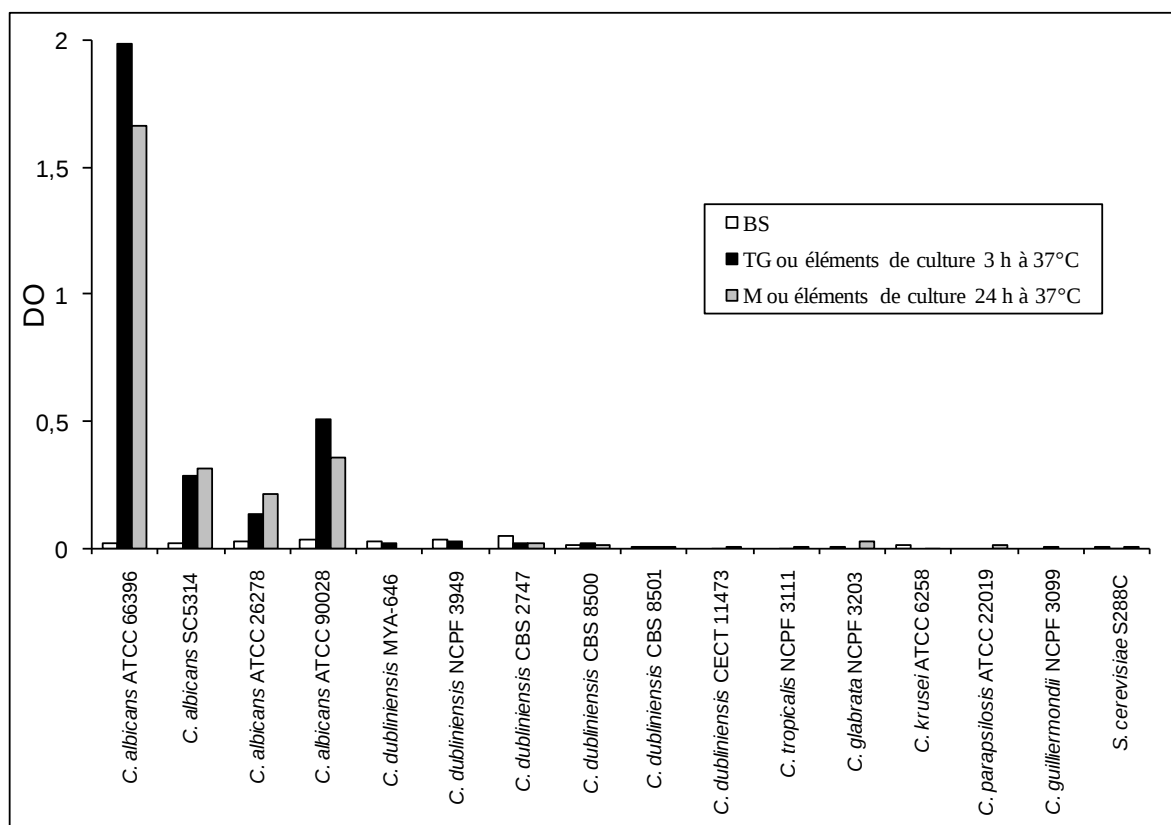


Figure 15 : Réactivité de l'AcM 3D9.3 par ELISA vis à vis d'extraits Zymolyase® de diverses souches de *C. albicans* et diverses souches d'espèces ou de genre autre que *C. albicans*. BS, blastospores; TG, tubes germinatifs ou éléments de culture 3 h à 37°C; M, mycélium ou éléments de culture 24 h à 37°C.

D. Purification de l'Ag 3D9

La purification de l'Ag 3D9 à partir de l'extrait brut de tubes germinatifs obtenus par digestion par la Zymolyase® a été réalisée afin d'identifier cette protéine spécifique de l'hyphe. Un fractionnement de l'extrait Zymolyase® de tubes germinatifs de *C. albicans* 66396 par chromatographie d'exclusion/diffusion (Figure 16) a été réalisé puis les fractions enrichies en Ag 3D9 ont été soumises à une chromatographie d'interactions hydrophobes (Figure 17).

La purification de l'Ag 3D9 par chromatographie d'exclusion/diffusion a été effectuée à pH acide afin de dissocier l'Ag 3D9 des autres constituants fongiques fixés à cette molécule par des interactions spécifiques ou non. L'ELISA permet de localiser l'Ag 3D9 dans le premier pic d'éluion et la faible amplitude de ce pic révèle une faible concentration protéique. L'Ag 3D9 est donc élué avec des composés de masse moléculaire élevée (Figure 16).

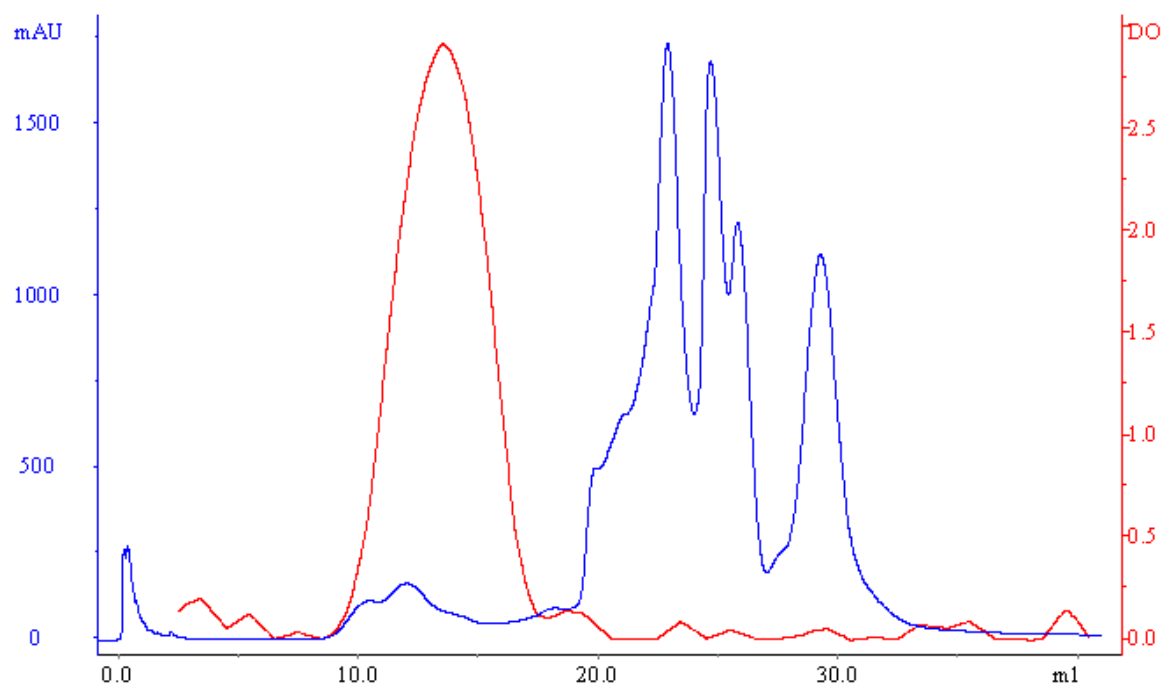


Figure 16 : Profil d'élution de la chromatographie d'exclusion/diffusion (—) réalisée avec l'extrait Zymolyase® de tubes germinatifs de *C. albicans* et localisation de l'Ag 3D9 par immunodétection avec l'AcM 3D9 (ELISA) (—).

La chromatographie d'interactions hydrophobes a ensuite été réalisée sur le pool des fractions contenant l'Ag 3D9 issues de la chromatographie d'exclusion/diffusion afin de séparer cet Ag des contaminants encore présents. L'analyse par ELISA montre l'élution de l'Ag 3D9 dans les fractions correspondant aux concentrations en sulfate d'ammonium comprises entre 1 et 0,5 M (Figure 17). L'Ag 3D9 fait partie des constituants les plus hydrophobes de la levure.

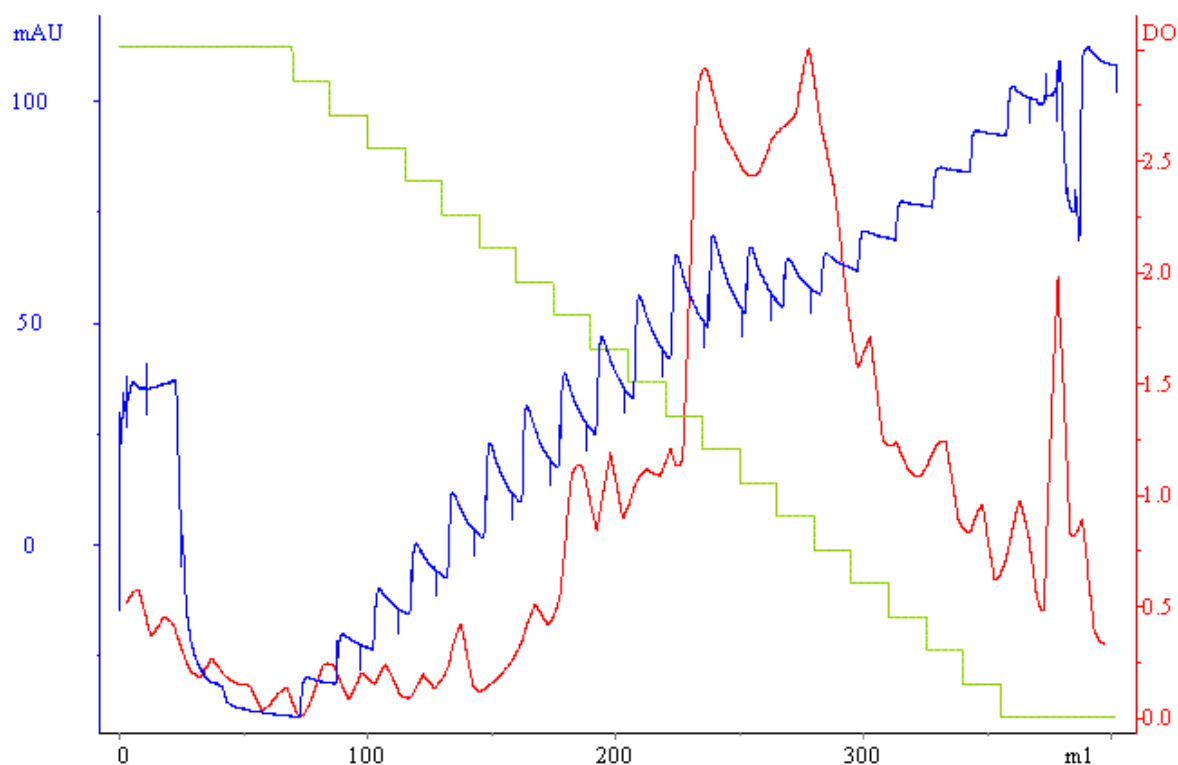


Figure 17 : Profil d'élution de la chromatographie d'interactions hydrophobes (—) réalisée avec l'Ag 3D9 prépurifié par chromatographie d'exclusion/diffusion et localisation de l'Ag 3D9 par immunodétection avec l'AcM 3D9 (ELISA) (—). L'élution des constituants hydrophobes a été réalisée en utilisant un gradient en sulfate d'ammonium allant de 2 M à 0,1 M par palier de 0,1 M (—).

A chaque étape de la purification, un SDS-PAGE avec révélation au Nitrate d'Argent et une affinodétection avec la Concavaline A ou avec l'AcM 3D9.3 ont été réalisés ([Figure 18](#)). La coloration au Nitrate d'Argent de l'extrait brut de tubes germinatifs révèle une composition très riche en protéines situées dans une gamme de masse moléculaire comprise entre 10 et 400 kDa ([Figure 18](#), piste A1). L'Ag 3D9 a pu être repéré dans cet extrait grâce à l'AcM 3D9.3 et correspond à une zone intensément révélée et diffuse de masse moléculaire apparente de 120 à 220 kDa ([Figure 18](#), piste A3). La révélation par la Concanavaline A montre une zone de marquage au niveau de l'Ag 3D9, preuve de la présence dans cette zone de constituants glycosylés ([Figure 18](#), piste A2). L'analyse de l'Ag 3D9 prépurifié après la chromatographie d'exclusion/diffusion montre les mêmes résultats comparés à ceux de l'analyse de l'extrait brut de tubes germinatifs, bien que la zone de 120 à 220 kDa soit plus intense ([Figure 18](#), pistes B1, B2 et B3) et que les constituants de faible masse moléculaire aient été partiellement éliminés. Après le dernier fractionnement par chromatographie d'interactions hydrophobes, les fractions de 1 à 0,5 M de sulfate d'ammonium ont été poolées,

dialysées et ensuite analysées. L'Ag 3D9 est bien purifié. Deux bandes diffuses de 140 et 180 kDa apparaissent lors de la révélation au Nitrate d'Argent, par la Concanavaline A et de l'immunodétection par l'AcM 3D9.3 (**Figure 18**, pistes C1, C2 et C3). Aucune autre protéine n'est présente à l'issue de la purification.

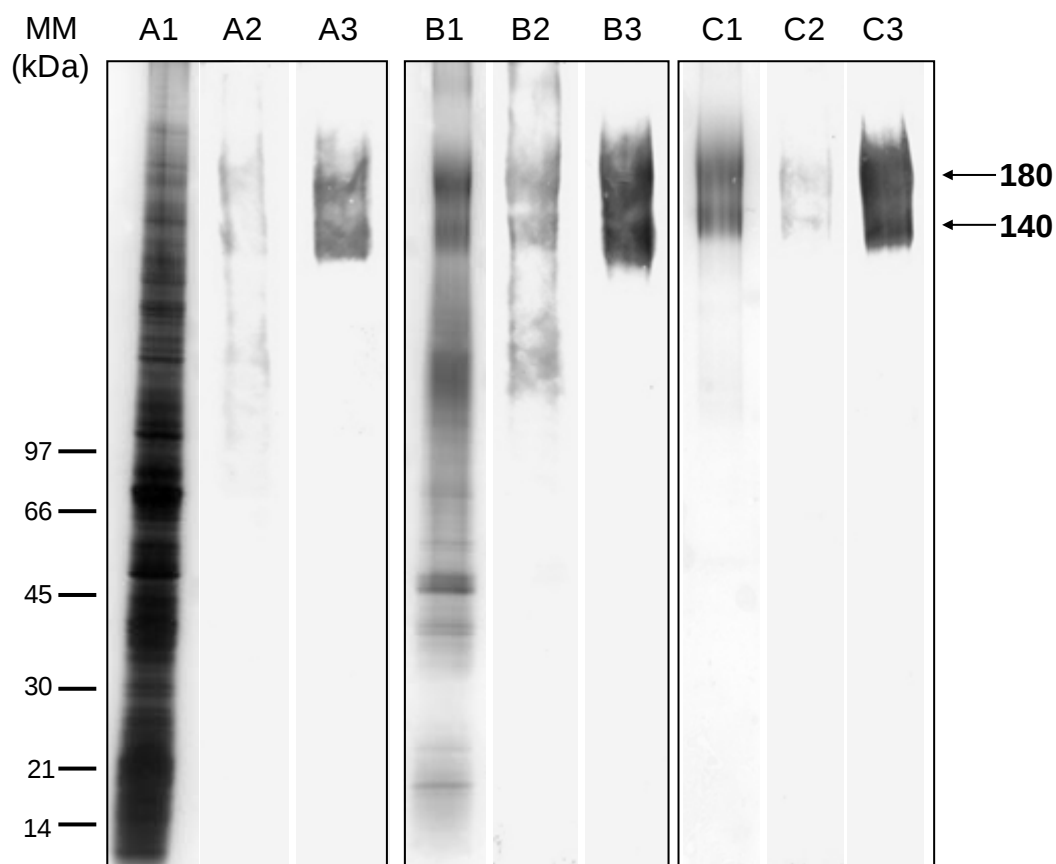


Figure 18 : Analyse de la purification de l'Ag 3D9 par SDS-PAGE (gel gradient 5-15 % d'acrylamide) à taux de protéines constant et transfert électrophorétique. A, extrait Zymolyase® de tubes germinatifs de *C. albicans* ; B, Fractions poolées ayant une réactivité avec l'AcM 3D9.3 à l'issue de la chromatographie d'exclusion/diffusion; C, Fractions poolées ayant une réactivité avec l'AcM 3D9.3 à l'issue de la chromatographie d'interactions hydrophobes et éluées par des concentrations de sulfate d'ammonium allant de 1 à 0,5 M. Pistes 1, révélation au Nitrate d'Argent; pistes 2, révélation par la Concanavalin A; pistes 3, immunodétection avec l'AcM 3D9.3; MM, marqueurs de masse moléculaire (kDa).

E. Analyse de l'Ag 3D9 par électrophorèse bidimensionnelle

L'Ag 3D9 prépurifié par chromatographie d'exclusion/diffusion a été analysé par électrophorèse bidimensionnelle. L'immunodétection après électrotransfert du gel 2-dimensions a permis de révéler plus spécifiquement l'Ag correspondant et notamment de déterminer son point isoélectrique (pI). L'Ag reconnu par l'AcM 3D9.3 présente, comme en SDS-PAGE, un aspect diffus avec les deux zones de marquage à 140 et 180 kDa ainsi qu'un pI de 4 à 5 ([Figure 19](#)). Cette hétérogénéité en masse et en pI peut s'expliquer par des degrés de glycosylation voire de phosphorylation variables.

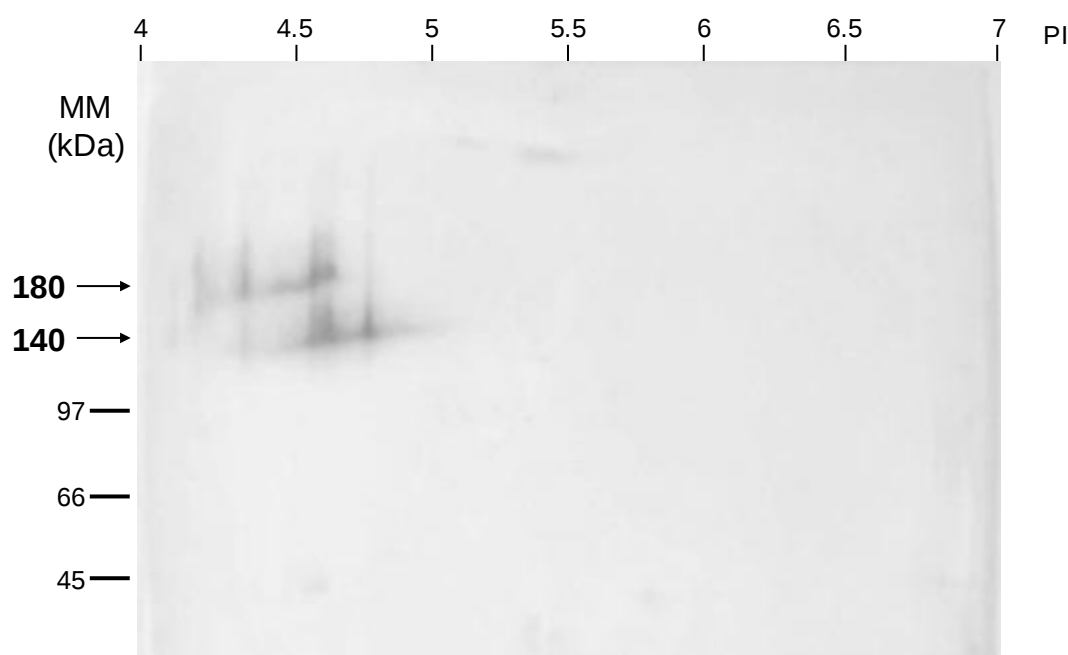


Figure 19 : Immunodétection avec l'AcM 3D9.3 de l'Ag 3D9 prépurifié par chromatographie d'exclusion/diffusion après séparation par électrophorèse bidimensionnelle et électrotransfert (150 µg de protéines déposés).

F. Déglycosylation de l'Ag 3D9

Afin de faciliter l'analyse en spectrométrie de masse et l'obtention d'une identification correcte, une déglycosylation de l'Ag 3D9 a été réalisée en utilisant un kit commercial regroupant un panel d'enzymes pour cliver les liaisons O- et N-glycosidiques. La [Figure 20](#) présente les profils électrophorétiques obtenus après révélation par le Nitrate d'Argent et par immunodétection avec l'AcM 3D9.3. L'Ag 3D9 purifié ([Figure 20](#), pistes A1 et A2) présente deux zones de marquage plus intense à 140 et 180 kDa. Après incubation avec les enzymes de

déglycosylation, ces deux zones de marquage sont toujours présentes et une nouvelle zone de marquage apparaît aux alentours de 600 kDa (Figure 20, pistes B1 et B2).

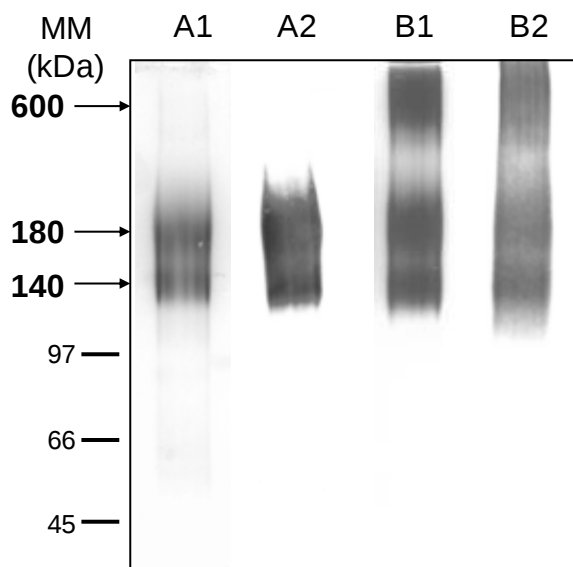


Figure 20 : Analyse par SDS-PAGE (gel gradient 5-15 % d'acrylamide) de l'Ag 3D9 après digestion par des enzymes de déglycosylation et transfert électrophorétique. A, Ag 3D9 purifié ; B, Ag 3D9 purifié et incubé pendant une semaine avec les enzymes de déglycosylation; Pistes 1, révélation au Nitrate d'Argent; pistes 2, immunodétection avec l'AcM 3D9.3; MM, marqueurs de masse moléculaire (kDa).

G. Analyse de l'Ag 3D9 par spectrométrie de masse

Les protéines immunoréactives correspondant aux spots 140 et 180 et détectées par l'AcM 3D9.3 ont été excisées des gels de SDS-PAGE à 1 dimension colorés au bleu de Coomassie ou au Nitrate d'Argent et soumis à une digestion trypsique directement dans le gel. L'analyse des profils de masses peptidiques (PMP) des deux spots (140 et 180) par comparaison à la récente base de données génomique publique de la souche *C. albicans* SC5314 n'a pas permis l'identification d'une protéine particulière avec un score suffisant (Tableau 3).

Néanmoins, après analyse manuelle, 11 peptides du PMP du spot 180 et 9 peptides du PMP du spot 140 correspondent aux peptides du PMP théorique de l'Als3p, une protéine principalement exprimée durant la phase mycélienne. Ces résultats montrent que l'Als3p est présente dans les deux spots 140 et 180 et qu'elle pourrait correspondre à l'Ag 3D9.

Tableau 3 : Proposition d'identification de l'Ag 3D9 par comparaison à la base de données génomique publique de la souche *C. albicans* SC5314 avec le programme Mascot. ND : non déterminé.

Spots analysés	identification	Score d'identification	Nombre de Peptides "matchant"	Masse moléculaire théorique (kDa)	Point isoélectrique théorique
180	1. CA0591 : Agglutinin-like protein, 5' end (ALS3)	44	12	95,732	4,65
	2. CA5438 : unknown fonction	32	16	160,514	ND
	3. CA 1578 : nuclear migration protein (par homologie)	30	17	239,064	ND
140	ND	-	-	-	-

H. Expression de l'Ag 3D9 chez un mutant *als3Δ/als3Δ*

Pour vérifier l'hypothèse que l'Ag 3D9 correspond à l'Als3p, l'AcM 3D9.3 a été testé sur deux mutants *als3Δ/als3Δ* et *als1Δ/als1Δ*, la souche parentale CAI12 et la souche SC5314 par IFI, ELISA et Western-Blot.

L'expression à la surface cellulaire de l'Ag 3D9 de la forme blastospore et de la forme tube germinatif a été analysée par IFI ([Figure 21](#)). L'incubation avec l'AcM 3D9.3 révèle que l'Ag 3D9 n'est pas détectable sur les blastospores de toutes les souches testées. Quand la filamentation commence, les blastospores parentes ne sont toujours pas marquées mais les tubes germinatifs qui émergent montrent une fluorescence forte et homogène à leur surface ([Figure 21](#), A, B, E et F). Seul le mutant *C. albicans als3Δ/als3Δ* ne montre aucune fluorescence sur les tubes germinatifs ([Figure 21](#), C et D).



Figure 21 : Microphotographies en contraste de phase (B et D) et en immunofluorescence indirecte (A et C) des mêmes champs microscopiques de *C. albicans* SC5314 (A, B) et de la souche *als3Δ/als3Δ* (C et D), et microphotographies en immunofluorescence de la souche parente *C. albicans* CAI12 (E), et de la souche *als1Δ/als1Δ* (F) cultivés en milieu 199 pendant 3 h à pH neutre et révélés avec l'AcM 3D9.3. Noter le marquage fluorescent localisé uniquement au niveau des parties filamenteuses (têtes de flèche) et l'absence de marquage de la cellule mère (petites flèches) et de tubes germinatifs la souche *C. albicans als3Δ/als3Δ* (flèches). Trait = 10 μ m.

L'expression de l'Ag 3D9 sur ces différentes souches de *C. albicans* a également été étudiée par ELISA (Figure 22) et Western-Blot (Figure 23) en travaillant à un taux de protéines constant quel que soit l'extrait Zymolyase® analysé (blastospore, tube germinatif et mycélium). Aucune réaction avec l'AcM 3D9.3 n'est détectée pour *C. albicans* mutant *als3Δ/als3Δ* quel que soit le stade morphologique analysé (Figure 22 et Figure 23, piste 4), alors que les souches SC5314, parentale CAI12 et mutant *als1Δ/als1Δ* donnent un signal positif uniquement avec les extraits de tubes germinatifs et de mycélium (Figure 22 et Figure 23, pistes 2, 3 et 5). En Western-Blot, la zone de marquage intense et polydispersée se situe entre 120 et 220 kDa (Figure 23, pistes 2, 3 et 5).

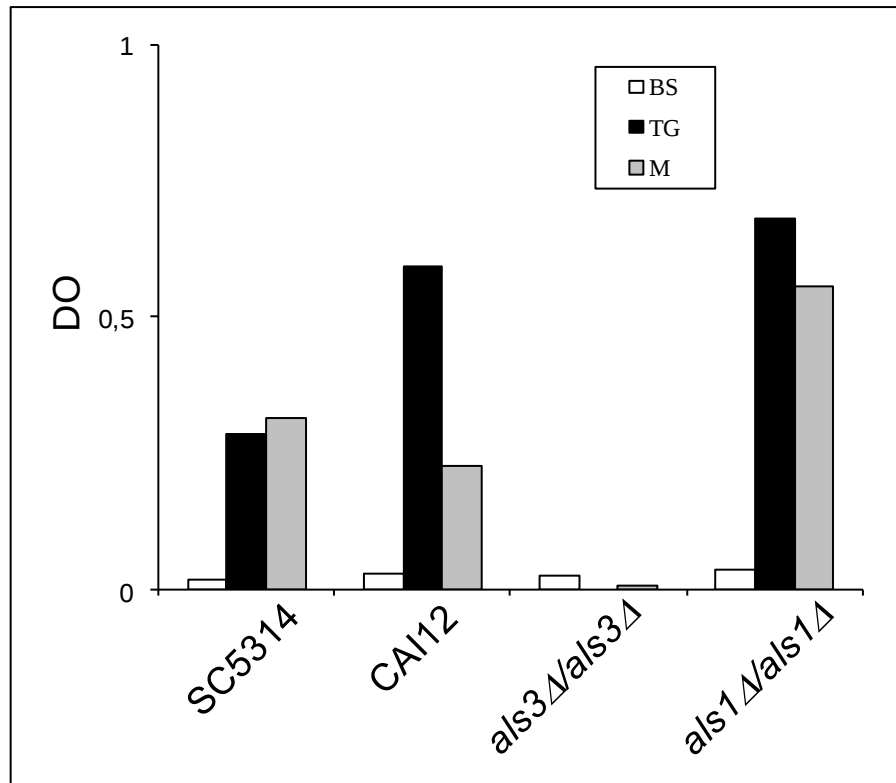


Figure 22 : Réactivité de l'AcM 3D9.3 par ELISA vis à vis d'extraits Zymolyase® de la souche de référence *C. albicans* SC5314, de la souche parente *C. albicans* CAI12 et des deux souches mutantes *als3Δ/als3Δ* et *als1Δ/als1Δ*. BS, blastospores; TG, tubes germinatifs; M, mycélium.

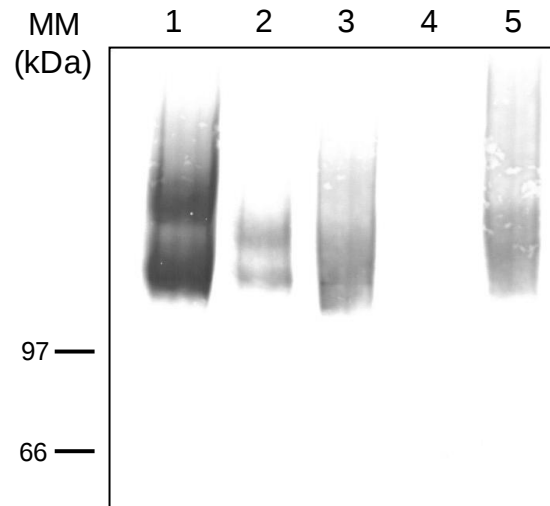


Figure 23 : Réactivité de l'AcM 3D9.3 vis à vis d'extraits Zymolyase® de tubes germinatifs de différents *C. albicans*. Piste 1: *C. albicans* ATCC 66396; piste 2 : *C. albicans* SC5314; piste 3 : *C. albicans* parent CAI12; piste 4 : *C. albicans* 1843 (*als3Δ/als3Δ*); piste 5 : *C. albicans* 1467 (*als1Δ/als1Δ*); MM, marqueurs de masse moléculaire (kDa).

I. Réactivité de l'Ag 3D9 purifié avec un sérum anti-Als3p

La réactivité de l'Ag 3D9 purifié avec un sérum anti-Als3p a été étudiée par Western-Blot. L'immunoblot de l'Ag 3D9 purifié révèle avec le sérum anti-Als3p un composé polydispersé avec une masse moléculaire allant de 120 à 220 kDa ([Figure 24](#), piste 3) et correspondant exactement au profil obtenu avec l'AcM 3D9.3 ([Figure 24](#), piste 2).

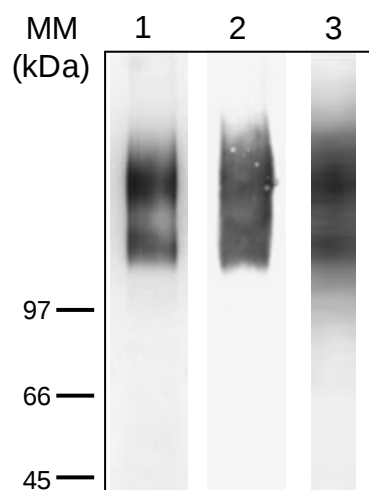


Figure 24 : Analyse de l'Ag 3D9 purifié après SDS-PAGE sur gel en gradient 5-15 % de polyacrylamide et électrotransfert. Piste 1 : révélation au Nitrate d'Argent; piste 2 : immunodétection avec l'AcM 3D9.3; piste 3 : immunodétection avec le sérum anti-Als3p; MM, marqueurs de masse moléculaire (kDa).

J. Réactivité de l'AcM 3D9.3 avec des souches de *S. cerevisiae* exprimant diverses Alsps à leur surface

La présence de l'Als1p, de l'Als3p ou de l'Als5p à la surface des souches de *S. cerevisiae* transformées a tout d'abord été confirmée en IFI avec un sérum anti-Alsps gracieusement fourni par le Dr Lois L. Hoyer (University of Illinois, Urbana, IL , USA). Ces 3 souches de *S. cerevisiae* transformées ont été ensuite testées en IFI après incubation avec l'AcM 3D9.3. Une souche de *S. cerevisiae* contenant juste le plasmide "blanc" a été utilisée comme témoin négatif. Aucune fluorescence n'est détectée avec l'AcM 3D9.3 quelle que soit la souche étudiée, y compris la souche exprimant à sa surface l'Als3p.

K. Réactivité de l'AcM 3D9.3 vis à vis des deux protéines codées par les deux allèles du gène *ALS3*

L'analyse de la spécificité de l'AcM 3D9.3 a été réalisée sur deux souches hétérozygotes pour l'allèle *ALS3*, la souche *ALS3SA/als3laΔ* (seul l'allèle « court » est exprimé) et la souche *ALS3LA/als3saΔ* (seul l'allèle « long » est exprimé). En IFI, les deux souches hétérozygotes sont reconnues par l'AcM 3D9.3. En Western-Blot, l'AcM 3D9.3 révèle chez la souche *C. albicans* SC5314 une zone de marquage intense et polydispersée avec une masse moléculaire apparente allant de 120 à 170 kDa présentant deux bandes plus intenses à 140 et 165 kDa (Figure 25, piste 2). Quand la souche hétérozygote exprimant seulement le grand allèle *ALS3* est testée, seule la bande intense de 165 kDa est révélée (Figure 25, piste 4). Inversement, seule la bande intense de 140 kDa est reconnue pour la souche exprimant seulement le petit allèle *ALS3* (Figure 25, piste 3). De plus, le mélange des deux souches hétérozygotes pour chaque allèle *ALS3* (Figure 25, piste 5) présente, après immunodétection avec l'AcM 3D9.3, un profil similaire à celui obtenu pour la souche SC5314.

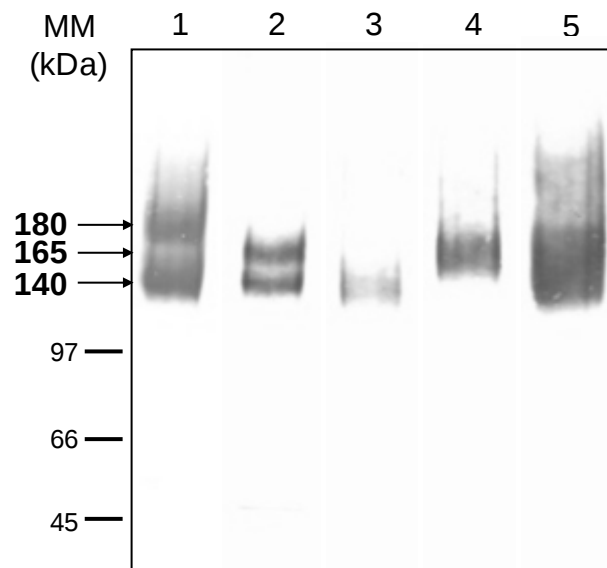


Figure 25 : Réactivité de l'AcM 3D9.3 vis à vis d'extraits Zymolyase® de tubes germinatifs de différents *C. albicans*. Piste 1 : *C. albicans* 66396; piste 2: *C. albicans* SC5314; piste 3 : *C. albicans* 1702 (*ALS3SA/als3laΔ*); piste 4 : *C. albicans* 1704 (*ALS3LA/als3saΔ*); piste 5 : mélange des souches *C. albicans* 1702 et 1704; MM, marqueurs de masse moléculaire (kDa).

L. Variabilité allélique du gène *ALS3* chez la souche *C. albicans* 66396

La taille des allèles *ALS3* a été analysée par PCR afin de déterminer le nombre de copies de la séquence répétée dans chaque allèle *ALS3* de la souche *C. albicans* 66396. Les produits d'amplification de chaque allèle *ALS3* pour cette souche ont été comparés à ceux des souches *C. albicans* SC5314, parente CAI12, 1843 (*als3Δ/als3Δ*), 1467 (*als1Δ/als1Δ*), 1702 (*ALS3SA/als3laΔ*) et 1704 (*ALS3LA/als3saΔ*) qui possède respectivement un allèle « court » et « long » *ALS3* avec respectivement 9 et 12 copies de la séquence répétée. La comparaison de la longueur du domaine central pour le gène *ALS3* montrent que les deux souches *C. albicans* 66396 et SC5314 ont une taille similaire pour l'allèle « court » mais différent nettement pour la taille de l'allèle « long » (Figure 26).

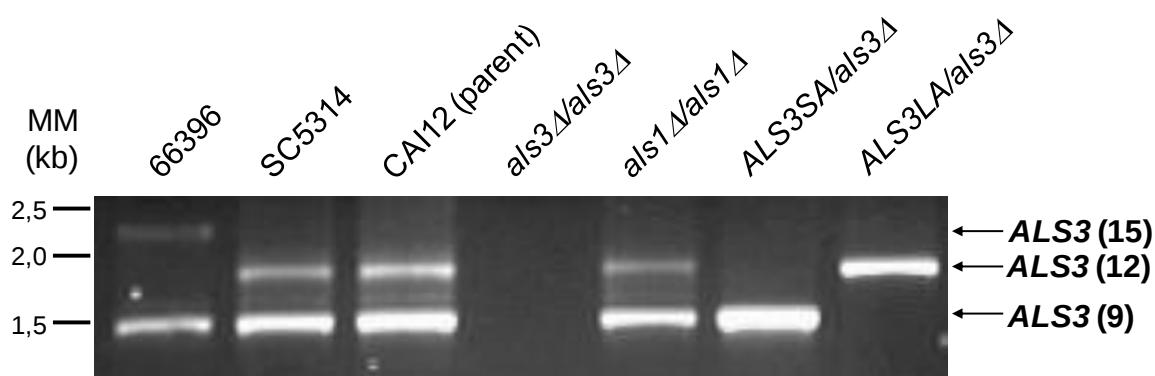


Figure 26 : Taille des allèles du gène *ALS3* chez différentes souches de *C. albicans*. Le nombre de copies de la séquence répétée de 108 pb de chaque forme allélique est noté sur la droite. MM : marqueurs de taille (kb).

Comme la souche SC5314, *C. albicans* 66396 possède 9 copies de la séquence répétée pour l'allèle « court ». Cependant, l'allèle « long » *ALS3* de *C. albicans* 66396 est plus long de 690 pb que l'allèle « court » de la même souche. Une séquence répétée consiste en un motif de 108 pb. L'allèle « long » *ALS3* de *C. albicans* 66396 est plus long de 6 copies de la séquence répétée que l'allèle « court » *ALS3* de la même souche (Tableau 4). Ainsi, l'allèle « court » *ALS3* de *C. albicans* 66396 possède 9 copies de séquences répétées alors que l'allèle « long » *ALS3* possède 15 copies.

Tableau 4 : Détermination du nombre de copies de la séquence répétée pour chaque allèle de la souche *C. albicans* 66396 par comparaison de la taille des fragments amplifiés par PCR du domaine central du gène *ALS3*.

Souches	Taille des fragments amplifiés par PCR		Différence du nombre de copies de la séquence répétée entre allèles (LA-SA)/108	Nombre de copies de la séquence répétée par allèle
	Petit allèle (SA)	Grand allèle (LA)		
<i>C.albicans</i> SC5314	1500	1860	3	SA : 9 LA : 12
<i>C. albicans</i> 66396	1500	2190	6	SA : 9 LA : 15

La taille des produits d'expression de chacun des allèles *ALS3* a également été étudiée par Western-Blot. La différence de masse moléculaire observée pour chacun des produits permet de calculer le nombre apparent de copies de séquence répétée (masse moléculaire de la séquence répétée = 3,9 kDa) des souches *C. albicans* 66396 (Figure 25, piste 1) et *C. albicans* SC5314 (Figure 25, piste 2). Ce nombre a ensuite été comparé au nombre réel de copies de la séquence répétée pour chaque allèle *ALS3* calculé précédemment à partir de l'amplification par PCR du domaine central de chaque allèle *ALS3* (Tableau 5). Ainsi, une différence de 6 copies de la séquence répétée est calculée pour la souche *C. albicans* SC5314. L'allèle « court » *ALS3* contenant 9 copies de la séquence répétée, l'allèle « long » *ALS3* en contient 15. De même, pour la souche *C. albicans* 66396, une différence de 10 copies de la séquence répétée est calculée, soit 9 copies pour l'allèle « court » et 19 copies pour l'allèle « long » *ALS3*. Le nombre de copies, calculé à partir du Western-Blot, est surévalué de 3 copies pour la souche *C. albicans* SC5314 et de 4 copies pour la souche *C. albicans* 66396 comparé au nombre réel de copies calculé par amplification du domaine central du gène *ALS3*.

Tableau 5 : Détermination du nombre de copies de la séquence répétée pour chaque allèle des souches *C. albicans* 66396 et SC5314 à partir des masses moléculaires observées lors de l'immunodétection avec l'AcM 3D9.3. Masse moléculaire de la séquence répétée : 3,9 kDa.

Souches	Masse moléculaire observée de la protéine Als3 (en kDa)		Différence <u>calculée</u> du nombre de copies de la séquence répétée entre allèle (LA-SA)/3,9	Nombre <u>calculé</u> de copies de la séquence répétée par allèle	Nombre <u>réel</u> de copies de la séquence répétée par allèle
	Petit allèle (SA)	Grand allèle (LA)			
<i>C.albicans</i> SC5314	140	165	6	SA : 9 LA : 15	SA : 9 LA : 12
<i>C. albicans</i> 66396	140	180	10	SA : 9 LA : 19	SA : 9 LA : 15

M. Réactivité de l'AcM C7 avec *C. albicans* et l'Als3p en IFI, ELISA et Western-Blot

La réactivité de l'AcM C7 a été testée sur des blastospores et des tubes germinatifs des souches *C. albicans* 66396, SC5314, parente CAI12, *als3Δ/als3Δ*, *als1Δ/als1Δ*, *ALS3SA/als3laΔ* et *ALS3LA/als3saΔ*. La fixation de l'AcM C7 a été visualisée par IFI. Une fluorescence homogène est observée quel que soit le stade morphologique étudié et pour toutes les souches étudiées, y compris la souche n'exprimant pas l'Als3p.

Un Western-Blot et une ELISA ont également été effectués en utilisant l'Ag 3D9/Als3p purifié. Une réaction négative a été obtenue avec les deux techniques indiquant la non reconnaissance de l'Ag 3D9/Als3p par l'AcM C7.

N. Réactivité de l'AcM 5B2 avec *C. albicans* et l'Als3p en IFI, ELISA et Western-Blot

Des expériences identiques à celles étudiant la réactivité de l'AcM C7 avec les différentes souches de *C. albicans* et l'Ag 3D9/Als3p purifié ont été réalisées avec l'AcM 5B2.

Pour les trois méthodes, IFI, ELISA et Western-Blot, les résultats sont identiques à ceux de l'AcM C7. En IFI, l'AcM 5B2 se fixe sur toutes les souches dont la souche mutée pour le gène *ALS3* et, en ELISA et en Western-Blot, l'AcM 5B2 ne se fixe pas sur l'Ag 3D9/Als3p.

III. DISCUSSION

L'étude de la variabilité antigénique de surface des *Candida* et plus particulièrement de *C. albicans* se base principalement sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux ou d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes spécifiques d'une espèce ou d'un stade morphologique (31, 212, 256, 276). Ainsi plusieurs antigènes spécifiques de stade mycélien, dont l'Ag 3D9 fait partie, ont été identifiés témoignant de la variabilité antigénique entre les deux stades (27, 167, 168, 275).

L'Ag 3D9, reconnu par l'AcM 3D9.3, est localisé uniquement à la surface des tubes germinatifs ou du mycélium de *C. albicans*. Dans le travail présenté ici, la purification de l'Ag 3D9 ont été réalisée par chromatographie d'exclusion/diffusion puis par chromatographie d'interactions hydrophobes. Avec l'Ag 3D9 purifié, nous avons obtenu des profils d'immunoblot et d'affinoblot (ConA) similaires à ceux qu'avaient obtenus Marot *et al.* (170). Ces profils montrent, pour la souche de *C. albicans* 66396, la présence d'une glycoprotéine polydispersée de masse moléculaire allant de 120 à 220 kDa avec deux bandes plus intenses de 140 et 180 kDa. La localisation de ces deux bandes sur les blots peut varier en fonction des souches de *C. albicans*. En effet, pour la souche *C. albicans* SC5314, ces deux bandes sont localisées à 140 et 165 kDa. L'analyse en électrophorèse bidimensionnelle de l'Ag 3D9 (*C. albicans* 66396) apporte comme seule information supplémentaire le pI de l'Ag qui est compris entre 4 et 5. Les deux zones de marquage à 140 et 180 kDa pour la souche *C. albicans* 66396 sont retrouvées mais l'aspect de l'immunodétection par l'AcM 3D9.3 reste très diffus en raison vraisemblablement de degrés de glycosylation et de phosphorylation variables de la protéine (208). Cette hétérogénéité de masses ne permet pas de visualiser un spot bien défini sur le gel et donc d'effectuer une analyse précise en spectrométrie de masse. C'est pour cela que l'excision des spots a été réalisée à l'issue d'une électrophorèse à une dimension pour récupérer l'ensemble de chaque zone de 140 et 180 kDa dont les contours sont mieux définis. Une déglycosylation a aussi été réalisée pour rendre l'analyse en spectrométrie de masse plus aisée mais le procédé n'a pas permis de déglycosyler au niveau des sites de O- ou N-glycosylation malgré le panel très large d'enzymes utilisées. La complexité des résidus glycosylés pourraient expliquer l'inactivité des enzymes de déglycosylation en raison d'une mauvaise accessibilité de la séquence cible.

A l'issue de la déglycosylation, une zone de masse moléculaire plus élevée (600 kDa environ) que celle de l'Ag 3D9 purifié apparaît et ne s'explique pas obligatoirement par une déglycosylation de la protéine. Lors des essais de déglycosylation de l'Ag 3D9, nous avons

évalué l'effet de la solution dénaturante fournie dans le kit de déglycosylation sur cet Ag. Ce dernier a été incubé avec la solution dénaturante pendant 1 et 7 jours. Pour ces deux temps d'incubation, les profils électrophorétiques se sont révélés identiques à celui observé pour l'Ag 3D9 traité par l'ensemble des réactifs du kit et qui présentait une zone de masse moléculaire élevée (600 kDa environ). C'est donc la solution dénaturante qui est responsable de l'augmentation de la masse moléculaire relative de l'Ag 3D9. Elle pourrait être due à une désorganisation des structures secondaires et tertiaires mais sans perte d'antigénicité de l'Ag 3D9, dont l'épitope est porté par la partie protéique.

L'accès récent à la base de données sur le génome de la souche de référence *C. albicans* SC5314 (CandidaDB) et les nouveaux progrès en analyse protéomique ont permis l'identification de nombreuses protéines. Cependant, certaines protéines ne peuvent être identifiées en utilisant la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF ou de type MALDI-TOF-TOF en raison de propriétés physiques ou chimiques du matériel extrait incompatible avec ce type de technique. L'Ag 3D9, bien que purifié, n'a pas pu être identifié par l'une ou l'autre des méthodes. La présence de nombreuses glycosylations, une masse moléculaire élevée ou une trop faible quantité de protéine dans l'échantillon pourraient expliquer cet échec (208). Cependant, une analyse comparative manuelle entre les pics de spectres de masses théoriques et les pics de spectres de masses expérimentaux obtenus après analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF de l'Ag 3D9 purifié nous a permis de montrer que la protéine Als3 était bien présente dans les deux bandes plus intenses de 140 et 180 kDa. De plus, quelques caractéristiques propres à l'Als3p correspondent à celles de l'Ag 3D9. Les deux protéines, l'Als3p et l'Ag 3D9, sont toutes les deux fortement glycosylées, présentent une masse moléculaire élevée et sont principalement exprimées à la surface des tubes germinatifs et du mycélium de *C. albicans* (94, 99, 168, 170, 322).

Les résultats de l'analyse, par ELISA et immunoblot, de la réactivité de l'AcM 3D9.3 sur le mutant *C. albicans als3Δ/als3Δ* et la réactivité du sérum anti-Als3p sur l'Ag 3D9 purifié, démontre que l'Ag 3D9 correspond à l'Als3p. L'AcM 3D9.3 reconnaît un épitope spécifique de tubes germinatifs de *C. albicans* porté par l'Als3p.

Lors de l'étude des souches de *S. cerevisiae* transformées, les protéines Als (Als1p, Als3p ou Als5p) sont bien exprimées à la surface cellulaire comme le confirme l'immunodétection avec un sérum anti-Als3p, mais l'AcM 3D9.3 ne se fixe pas sur la surface des blastospores de la souche exprimant l'Als3p. Cette observation pourrait s'expliquer par un masquage de l'épitope reconnu par l'AcM 3D9.3 ou par une différence de conformation de

l'Als3p au sein de la paroi de *S. cerevisiae* changeant ainsi les caractéristiques antigéniques de l'épitope reconnu par l'AcM 3D9.3.

La famille des gènes *ALS* de *C. albicans* code pour 8 grandes glycoprotéines de surface cellulaire qui sont caractérisées par 3 domaines. Le domaine carboxy-terminal est relativement conservé parmi les protéines Als et dans l'Als3p mature, cette région est fortement glycosylée en raison de la présence de séquences riches en Sérine/Thréonine. Ensuite, le domaine central consiste en la répétition d'un motif de 3,9 kDa. Le domaine amino-terminal est relativement variable en longueur et en séquence (94-96, 99, 250, 322). Selon Oh *et al.* (200), la souche *C. albicans* SC5314 possède deux allèles *ALS3*. La longueur de ces deux allèles dépend du nombre de copies de la séquence répétée de 108 pb dans le domaine central de la région codante. Cette souche a un allèle « court » *ALS3* avec 9 copies de la séquence répétée et un allèle « long » *ALS3* avec 12 copies de la séquence répétée. Les différences de taille entre allèles dues à la variabilité du nombre de copies du motif de 108 pb est fréquente pour les gènes *ALS* (151, 319, 322) et Hoyer *et al.* (200) ont montré que le nombre de copies de la séquence répétée variait en fonction de la souche de *C. albicans* utilisée. Ils ont montré également que suivant les souches, le nombre de copies de la séquence répétée des allèles *ALS3* allait de 6 à 19 et que généralement, les deux allèles *ALS3* d'une souche code pour une « petite » et une « grande » Als3p. La présence des deux zones de marquage plus intense en Western-Blot avec l'Ag 3D9/Als3p démontre que l'AcM 3D9.3 reconnaît une partie commune aux deux protéines codées par les deux allèles *ALS3*.

Nous avons vérifié combien de copies de la séquence répétée étaient présentes dans les allèles *ALS3* de *C. albicans* 66396 et si ce nombre de copies pouvait expliquer les différences observées entre les profils d'immunoblot avec l'AcM 3D9.3 obtenus avec les souches *C. albicans* 66396 et *C. albicans* SC5314. Les analyses moléculaires démontrent que *C. albicans* 66396 possède 15 copies de la séquence répétée dans le domaine central de l'allèle « long » *ALS3* au lieu de 12 chez *C. albicans* SC5314. Ces résultats ont été confirmés par le profil d'immunodétection avec l'AcM 3D9.3 de ces deux souches. En effet, l'allèle « court » *ALS3* des deux souches codent pour une protéine Als3 de 140 kDa alors que l'allèle « long » *ALS3* code pour deux Als3p différentes, de 165 kDa pour *C. albicans* SC5314 et de 180 kDa pour *C. albicans* 66396. Dans le gène *ALS3*, une copie du motif de 108 pb correspond à une séquence de 36 acides aminés de 3,9 kDa (101). Comme l'allèle « long » *ALS3* de *C. albicans* 66396 contient 3 copies de plus du motif répété de 108 pb que l'allèle « long » *ALS3* de *C. albicans* SC5314, la « grande » Als3p de *C. albicans* 66396 devrait avoir 11,7 kDa de plus

comparé à la « grande » Als3p de *C. albicans* SC5314. Cependant, une différence de 15 kDa a été calculée en comparant les deux profils d'immunodétection entre le « grand » allèle de ces deux souches. Les Als3p de *C. albicans* SC5314 ne sont pas retrouvées aux masses moléculaires calculées à partir des séquences des allèles du gène *ALS3* c'est-à-dire à 120 et 132 kDa (99) mais à 140 et 165 kDa. De même, les Als3p codées par les deux allèles *ALS3* de *C. albicans* 66396 (taille calculée de 120 kDa et 143 kDa) sont retrouvées à 140 et 165 kDa. Ces différences de masse moléculaire pourraient s'expliquer par la présence de glycosylation due aux séquences riches en Sér/Thr, qui correspondent aux sites de N-glycosylation, dont est particulièrement riche le domaine central du gène *ALS3* (99). Hoyer *et al.* (94) ont montré que les masses moléculaires des Als peuvent augmenter grâce aux glycosylations. Ainsi, l'Als3p peut tripler sa masse moléculaire, en passant de 120 kDa pour la protéine simple à 440 kDa pour la protéine glycosylée (94).

Les protéines de la paroi des tubes germinatifs de *C. albicans* ont été extraites par la Zymolyase®, une β -1,3 glucanase. Cette méthode d'extraction a permis d'obtenir les deux Als3p codées par les deux, « court » et « long », allèles *ALS3*. La masse moléculaire de l'Als3p obtenue par Kapteyn *et al.* (121) en utilisant pour son extraction une β -1,6 glucanase est compris entre 440 et 600 kDa. La différence observée entre nos résultats et celui de ces auteurs pourrait s'expliquer par une modification de la conformation des deux Als3p qui serait plus « déstructurée » et présenteraient alors une masse moléculaire apparente plus élevée. A l'inverse, les coupures engendrées par une β -1,3 glucanase (Zymolyase®) permettrait à la protéine Als3 de garder une conformation plus compacte.

Dans une étude récente, Moragues *et al.* (179) ont développé un AcM, l'AcM C7, qui reconnaît un épitope protéique d'une mannoprotéine de masse moléculaire supérieure à 200 kDa principalement exprimée à la surface de la paroi des tubes germinatifs de *C. albicans*. Cet AcM possède des activités antifongiques et anti-tumorales (19, 247). Brena *et al.* (19) ont continué la caractérisation de l'AcM C7 et ont montré qu'il reconnaissait une protéine recombinante correspondant à la partie N-terminale de l'Als3p. Nous avons voulu confirmer ces résultats en testant cet AcM sur la souche mutée pour le gène *ALS3* en IFI. Nous avons observé une réactivité de l'AcM C7 avec la souche délétée pour le gène *ALS3*. Par contre, aucune réactivité n'a été observée en ELISA et en Western-Blot avec l'Ag 3D9/Als3p purifié. Cet AcM ne reconnaît donc pas un motif protéique porté uniquement par l'Als3p puisqu'il se fixe sur la surface de la paroi des cellules même quand la protéine Als3 est absente. Dans une autre étude, Omaetxebarria *et al.* (201) ont montré que l'AcM C7 reconnaît un épitope présent

sur l'Ag de 200 kDa mais aussi présent sur plusieurs Ag de la paroi des blastospores et des tubes germinatifs de *C. albicans*, incluant l'énolase. L'AcM C7 reconnaît également des Ag présents chez *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, mais aussi *Cryptococcus neoformans*, *Scedosporium prolificans* et *Aspergillus fumigatus*. Au vue de ces résultats et de ceux de Hoyer *et al.* (96) qui montrent que les séquences des Als sont différentes entre espèces de *Candida* comme *C. tropicalis* ou *C. dubliniensis*, il est peu probable que l'épitope protéique soit porté uniquement par l'Als3p. Il correspondrait à un motif ou à une conformation ubiquitaire ce qui expliquerait sa réactivité avec l'Als3p et avec les autres Ag des autres espèces de *Candida* et des autres genres que *Candida*.

Nous avons également montré que l'AcM 5B2 ne reconnaissait pas l'Ag 3D9/Als3p purifié en Western-Blot et ELISA. Cet anticorps reconnaît les résidus mannopyranosylés liés en β -1,2 présents à la surface, dans la paroi et dans le cytoplasme des blastospores et des éléments filamenteux de *C. albicans* (90, 285). Pratiquement toutes les mannoprotéines de la paroi de *C. albicans* contiennent des mannosylations liées en β -1,2. Nos résultats montrent ainsi que l'Als3p, malgré ses nombreuses glycosylations, ne contient pas de mannosylation liées en β -1,2. Toutefois, Trinel *et al.* (286) ont montré que les conditions de culture, particulièrement la température, peuvent modifier le nombre d'épitopes reconnus par l'AcM 5B2. Ainsi, l'expression des épitopes β -1,2 oligo-mannosides est plus faible à une température d'incubation de 37°C qu'à 28°C. Des méthodes d'extraction différentes pourraient également modifier la composition et le nombre de mannosylation pour une protéine et expliquerait l'absence de mannosylations liées en β -1,2 pour l'Als3p.

L'étude de la spécificité de l'expression de l'Ag 3D9 chez différentes souches de *C. albicans* et aussi chez des souches de *C. dubliniensis* a été réalisée. Des travaux antérieurs (168) ont montrés que l'AcM 3D9.3 ne reconnaissait pas les espèces du genre *Candida* autres que *C. albicans* mais l'espèce *C. dubliniensis* n'avait pas été testée. *C. dubliniensis* est une espèce pathogène décrite après les travaux de Marot *et al.* (168, 170) et initialement isolée de patients souffrant d'une infection au virus de l'immunodéficience humaine et de candidoses orales récurrentes (271). Bien que de fortes ressemblances phénotypiques et génotypiques existent entre *C. dubliniensis* et *C. albicans* (180), nous n'avons observé aucune réactivité de l'AcM 3D9.3 avec les souches de *C. dubliniensis* quel que soit le stade morphologique testé (blastopore, tube germinatif et mycélium). Ce résultat est en accord avec ceux de Hoyer *et al.* (96) qui ont montré que la famille des Als3p est présente chez les espèces non-*albicans* mais n'est pas identique à celle de *C. albicans*. L'absence de fixation de l'AcM 3D9.3 sur *C.*

dublinsiensis pourrait s'expliquer par la différence de séquences des Alsp entre *C. dubliniensis* et *C. albicans*. Les séquences étant différentes, la probabilité pour que l'épitope protéique reconnu par l'AcM 3D9.3, présent chez *C. albicans*, soit présent chez *C. dubliniensis* est faible.

Les travaux décrits ici démontrent que l'Als3p porte un épitope protéique spécifique pour l'espèce *C. albicans* et pour le stade tube germinatif et qui est reconnu par l'AcM 3D9.3. L'AcM 3D9.3 reconnaît les « petite » et « grande » protéines Als3 des souches de *C. albicans*.

CHAPITRE 3 :
INTERACTION *IN VITRO*
DE L'AIs3p AVEC LES
CELLULES DE L'HÔTE

Ce chapitre présente les résultats des travaux réalisés sur les interactions *in vitro* de l'Als3p avec les cellules de l'hôte telles que les cellules épithéliales buccales (CEB), les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) et les plaquettes sanguines.

Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle inhibiteur de l'AcM 3D9.3, qui reconnaît un épitope porté par l'Als3p, dans l'interaction des tubes germinatifs de *C. albicans* avec les HUVEC et les CEB. En effet, il a été démontré que les protéines Als participent à l'adhérence notamment aux cellules endothéliales, épithéliales buccales ou encore à la fibronectine (95, 97, 99, 200, 322, 323). Nous avons évalué le rôle de l'épitope reconnu par l'AcM 3D9.3 dans l'adhérence de *C. albicans* aux cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et aux cellules épithéliales buccales.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'interaction des plaquettes sanguines natives avec les tubes germinatifs de *C. albicans*. Les plaquettes sont essentiellement connues pour leur rôle dans les phénomènes d'hémostase. Elles ont cependant d'autres fonctions, notamment dans la défense contre les agents infectieux (*S. aureus*, *Candida spp.*). Le rôle des plaquettes dans la physiopathologie des candidoses n'est pas encore clairement défini, malgré les nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* sur les interactions entre ces deux types cellulaires.

In vivo, Nail a montré que tous les *Candida* fixent les plaquettes. Concernant *C. albicans*, les deux stades morphologiques testés, blastospores et tubes germinatifs, ont la capacité d'interagir avec les plaquettes (185). L'auteur a également montré que l'interaction *in vivo* de *C. albicans* avec les plaquettes fait intervenir une liaison de type ligand-affinant. En effet, cette interaction est réversible comme l'attestent les résultats d'une étude *ex vivo* montrant que des agents tels que l'EDTA ou le citrate de sodium permettaient une désorption élevée des plaquettes préalablement fixées *in vivo* sur *C. albicans*. Cette interaction *C. albicans*-plaquettes peut être également inhibée par différents antiagrégants tels que l'héparine.

La fixation des plaquettes natives peut être, selon les travaux de Mahaza *et al.* (158):

- directe sur les tubes germinatifs, en faisant intervenir une mannoprotéine de 45 kDa de *C. albicans* qui se fixerait sur la GPIIb-IIIa des plaquettes natives
- indirecte sur les blastospores, par l'intermédiaire d'une protéine plasmatique encore non identifiée.

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à l'identification de l'adhésine fongique intervenant directement dans l'interaction des tubes germinatifs de *C. albicans* avec les plaquettes natives lavées.

I. MATERIELS ET METHODES

A. Souches utilisées

La souche de référence du laboratoire *Candida albicans* ATCC 66396 et les souches *C. albicans* SC5314, *C. albicans* CAI12 type sauvage, *als3Δ/als3Δ*, *als1Δ/als1Δ*, *ALS3SA/als3laΔ* et *ALS3LA/als3saΔ* ont été utilisées. La provenance et le génotype des différentes souches mutées sont décrits dans le Matériels et Méthodes du Chapitre 2.

B. Production des AcM 3D9.3 et 5B2

Les AcM 3D9.3 et 5B2 ont été produits et purifiés selon le même protocole que celui décrit dans le Matériels et Méthodes du Chapitre 2.

C. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/HUVEC

L'étude de l'inhibition de l'interaction entre les tubes germinatifs et les HUVEC ou les CEB a été effectuée au sein du « Department of Pathobiology » de l'Université de l'Illinois (Urbana, IL , USA) sous la direction du Dr Lois L. Hoyer.

La concentration en IgM a été mesurée en utilisant un kit ELISA quantitatif d'IgM de souris (ZeptoMetrix). La méthode pour l'étude de l'adhérence aux HUVEC a été publiée (322). Les quelques modifications apportées sont décrites ici. Les cellules de la souche de *C. albicans* CAI12 ont été cultivées sur milieu YPD (10 g/l d'extrait de levure, 20 g/l de peptone, 20 g/l de glucose) en utilisant la méthode publiée et la formation des tubes germinatifs a été induits en inoculant 7.10^3 cellules dans 7 ml de milieu RPMI 1640 préchauffé à 37°C dans un tube Falcon de 50 ml. Après 30 min d'incubation à 37°C et 5 % CO₂, l'AcM 3D9.3 ou une IgM témoin ne se fixant pas à *C. albicans* (BioLegend) ont été ajoutés au tube Falcon à une concentration de 10 µg/ml et le tube a été agité (200 rpm) à 37°C pendant 30 min supplémentaires. Un autre tube témoin, dans lequel seul du PBS a été ajouté, a été également incubé. Les monocouches d'HUVEC ont été cultivées dans une plaque 6 puits et ont été ensuite lavées 2 fois avec du milieu RPMI 1640 préchauffé à 37°C. Puis, 1 ml de milieu RPMI 1640 contenant 10^3 tubes germinatifs ont été ajoutés dans chacun des 6 puits. La plaque a été incubée pendant 30 min à 37°C sous CO₂ pour permettre l'adhérence de *C. albicans* à la monocouche d'HUVEC. Les cellules non adhérentes ont été éliminées par lavage comme décrit par Zhao *et al.* (322). La viabilité des cellules de *C. albicans* a été vérifiée dans chaque puits de la plaque en le remplissant avec du milieu gélosé YPD et par ensemencement de 100

μ l de l'inoculum initial de *C. albicans* sur gélose YPD en triplicata. Les plaques 6 puits et les géloses de viabilité de *C. albicans* ont été incubées à 37°C et les unités formant colonie (UFC) ont été dénombrées. Le pourcentage d'adhérence pour chaque traitement anticorps ou pour le traitement témoin sans anticorps a été calculé par l'équation suivante : (moyenne des UFC adhérentes/ moyenne des UFC totales)x100. Les études d'adhérence ont été réalisées dans 6 puits par jour et sur 4 jours différents. Les résultats ont été évalués statistiquement en utilisant une ANOVA (PROC MIXED dans SAS®). La comparaison multiple des moyennes a été réalisée en utilisant l'option LSMEAN.

D. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/CEB

Cette étude a été réalisée comme décrit dans le travail de Zhao *et al.* (322) avec quelques modifications. Brièvement, un total de 2.10^6 blastospores cultivées sur milieu YPD et lavées avec du PBS ont été inoculées dans 4 ml de milieu RPMI 1640 dans un Erlenmeyer de 25 ml. La culture a été incubée à 37°C sous agitation orbitale (200 rpm) pour induire la formation de tubes germinatifs. L'AcM 3D9.3 ou l'IgM témoin qui ne se fixe pas à *C. albicans* (Biolegend) ont été ajoutés à la culture à une concentration finale de 10 μ g/ml. Du PBS, sans anticorps, a été ajouté dans un troisième flacon. Les flacons ont été incubés 30 min, puis 2.10^4 CEB ont été ajoutées dans chaque flacon. Après une incubation de 30 min à 37°C sous agitation orbitale (200 rpm), les CEB ont été récupérées par filtration sur filtre de 12 μ m de porosité, lavées, transférées sur lame microscopique en verre et fixées selon le protocole décrit par Zhao *et al.* (322). Le nombre total de tubes germinatifs adhérents à 50 CEB a été évalué et la moyenne du nombre de tubes germinatifs fixés pour une CEB a été calculée. L'étude a été réalisée sur trois jours différents. Une ANOVA (PROC MIXED dans SAS®) a été utilisée pour étudier les différences entre traitements. La comparaison multiple des moyennes a été réalisée avec l'option LSMEAN.

E. Etude de l'interaction tubes germinatifs/plaquettes sanguines

1. Marquage de surface à la biotine des blastospores et des tubes germinatifs

Les blastospores cultivées sur SDA-C et les tubes germinatifs obtenus en milieu 199 ont été filtrés et récupérés sur membrane 1,2 μ m, puis lavés avec le tampon borate de sodium

0,1 M pH 8,8. La suspension a été ensuite centrifugée à 900 *g* pendant 10 minutes. Le culot a été repris par du tampon de marquage et de la biotine-N-hydroxysuccinimide-ester (biotine-NHS) (Sigma) à raison de 10 ml de tampon de marquage et 800 µl de biotine-NHS (800 µg/ml) pour 1.10^{10} blastospores ou tubes germinatifs. La suspension a été incubée pendant 4 heures à température ambiante et sous agitation rotative puis les cellules ont été lavées 3 fois avec de l'eau distillée.

Un aliquot de la suspension a été prélevé et testé en IFI avec le conjugué Streptavidine-FITC (Amersham) pour vérifier l'efficacité du marquage par la biotine à la surface des cellules.

Après une dernière centrifugation à 900 *g* pendant 10 minutes, les culots ont été congelés à -20°C puis lyophilisés.

2. Obtention des plaquettes sanguines humaines

Le sang collecté sur EDTA provient de donneurs sains. Le plasma riche en plaquettes (PRP) a été obtenu par centrifugation à 450 *g* pendant 5 min. Les plaquettes ont été ensuite récupérées par centrifugation à 5000 *g* pendant 5 min, lavées 3 fois avec du tampon Tris 25 mM, Dextrose 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 (TDS) additionné d'EDTA à 2 mM (TDS-EDTA) et finalement remises en suspension dans le même tampon pour obtenir une concentration de 8.10^8 plaquettes par millilitre. La présence d'EDTA à 2 mM permet aux plaquettes sanguines de rester natives.

3. Etude des facteurs fongiques de tubes germinatifs de *C. albicans* impliqués dans l'interaction avec les plaquettes

Les composés de surface biotinylés de blastospores et de tubes germinatifs ont été extraits par la Zymolyase® comme décrit dans le Matériels et Méthodes du Chapitre 2. Trois cents microlitres d'extraits fongiques biotinylés (6 mg de protéines par ml) ont été incubés directement pendant 45 min à 37°C sous agitation orbitale (100 rpm) avec 600 µl d'une suspension de plaquettes lavées 3 fois en tampon TDS-EDTA (1.10^8 plaquettes/ml). Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé 3 fois en tampon TDS-EDTA. Le dernier culot a été repris par 100 µl de tampon échantillon pour SDS-PAGE et analysé après électrophorèse, électrotransfert et immunodétection avec un conjugué Streptavidine marqué à la Peroxydase (Caltag).

La même expérience a été réalisée avec des extraits fongiques non biotinylés. Dans ce dernier cas, l'immunodétection a été effectuée avec l'AcM 3D9.3 et une solution d'anticorps de chèvre anti-IgM (μ -spécifique) de souris couplés à la peroxydase (Caltag). La révélation a été réalisée grâce au chromogène DAB ou grâce à l'ECL Advancetm Western Blotting Detection Kit (Amersham).

4. Etude *in vitro* de l'interaction *C. albicans*/plaquettes

Les tubes germinatifs ont été produits en boîte de Pétri de 35 mm de diamètre par inoculation de 2.10^6 blastospores par millilitre dans du milieu 199 stérile (GIBCO) préalablement dilué au 1/3, préchauffé à 37°C et ajusté à pH neutre. La suspension (3 ml/boîte de Pétri) a alors été incubée sous agitation orbitale à 37°C pendant 3 heures afin de permettre la germination des blastospores. Au cours de cette incubation, les tubes germinatifs se sont fixés sur le fond de la boîte de Pétri. Après 4 lavages avec 2 ml de tampon PBS, 2 ml de PBS contenant 0,1 % d'azide de sodium ont été ajoutés dans la boîte de Pétri pour bloquer la germination. Trois millilitres d'une solution d'albumine bovine à 1 % en PBS ont été ajoutés et incubés pendant 1 h à 37°C pour saturer le fond de la boîte de Pétri. Après 4 lavages des boîtes de Pétri avec du TDS, 3 ml de plaquettes natives (8.10^8 /ml) en tampon TDS-EDTA ont été déposés dans chaque boîte et incubés à 37°C pendant 30 min. Puis 4 lavages avec du TDS ont été réalisés afin d'éliminer les plaquettes non-fixées. Les boîtes de Pétri ont ensuite été examinées en microscopie photonique après coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG). Le nombre moyen de plaquettes fixées par tube germinatif a été calculé après observation de 50 tubes germinatifs. Le pourcentage d'adhérence des plaquettes aux tubes germinatifs de chacune des souches testées a été calculé en prenant arbitrairement le nombre de plaquettes fixées sur les tubes germinatifs de la souche *C. albicans* sauvage CAI12 comme correspondant à 100 % de fixation.

5. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/plaquettes avec des AcM

L'inhibition de l'interaction tubes germinatifs/plaquettes avec des AcM a été réalisée pour les souches de *C. albicans* CAI12 et *als1 Δ /als1 Δ* (gène *ALS1* muté). Cette étude repose sur la même méthodologie utilisée pour l'étude de l'interaction *C. albicans*/plaquettes *in vitro* mais avec quelques modifications. Après avoir saturé les boîtes de Pétri avec la solution d'albumine bovine en PBS, celles-ci ont été lavées 4 fois avec du PBS puis 3 ml d'AcM

3D9.3 ou d'AcM 5B2 ont été ajoutés à une concentration de 100 µg/ml en PBS et incubés pendant 1 h à 37°C. Quatre lavages ont été réalisés avec 2 ml de PBS contenant 0,05 % de Tween 20 pour éliminer les AcM non fixés puis 3 ml de plaquettes natives ($8 \cdot 10^8$ /ml) diluées en tampon TDS-EDTA ont été déposés dans chaque boîte. Après une incubation à 37°C pendant 30 min, 4 lavages avec du TDS ont été réalisés afin d'éliminer les plaquettes non fixées. Les boîtes de Pétri ont ensuite été examinées en microscopie photonique après coloration au MGG. Le nombre moyen de plaquettes fixées par tube germinatif a été calculée par observation de 50 tubes germinatifs. Le pourcentage d'adhérence de plaquettes aux tubes germinatifs en présence de chaque AcM a été calculé en prenant comme référence 100 % de fixation pour la souche sauvage *C. albicans* CAI12 ou pour la souche double mutée pour le gène *ALS1*.

6. Analyses statistiques

Les données issues des études de fixation des plaquettes sur les tubes germinatifs avec ou sans AcM ont été analysées en utilisant le logiciel Statgraphics® (Sigma Plus). Une comparaison entre les moyennes a été effectuée grâce à une analyse de variance à un facteur (ANOVA, $p < 0,05$) suivie d'une comparaison multiple entre moyennes grâce au test LSD (Least Significant Difference, $p < 0,05$).

II. RESULTATS

A. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/HUVEC

Pour vérifier que l'adhésiotope participant à l'interaction de la protéine Als3 avec les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine pouvait correspondre à l'épitope 3D9, nous avons réalisé des essais d'inhibition avec l'AcM 3D9.3. La souche CAI12 a été cultivée dans du milieu RPMI pour former des tubes germinatifs et a été préincubée avec l'AcM 3D9.3 ou avec une IgM ne se fixant pas à *C. albicans* servant de témoin avant d'être incubée avec les HUVEC. Comparée aux cellules qui n'ont pas été préincubées avec un anticorps, la préincubation avec l'IgM témoin ne diminue pas significativement l'adhérence de la souche CAI12 aux HUVEC (Figure 27). La préincubation avec l'AcM 3D9.3 réduit significativement l'adhérence comparée à l'anticorps témoin.

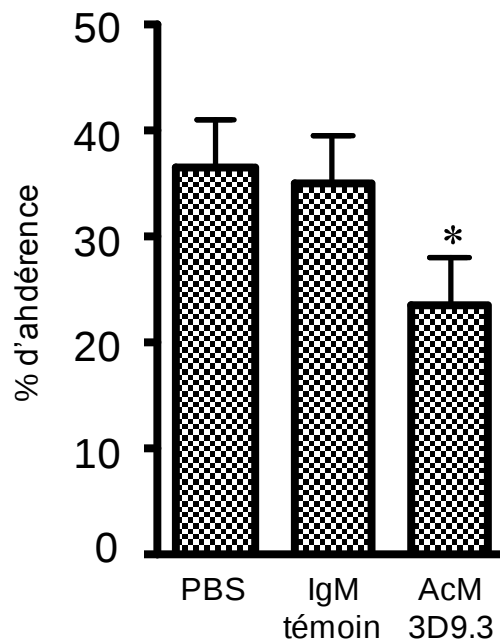


Figure 27 : Etude de l'inhibition par l'AcM 3D9.3 de la fixation des tubes germinatifs de *C. albicans* CAI12 sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. Une IgM ne se fixant pas à *C. albicans* a été utilisée comme témoin. Les différences significatives ($p < 0,05$) par rapport au pourcentage d'adhérence de la souche CAI12 incubées sans AcM sont indiquées par un astérisque.

B. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/CEB

La souche CAI12 a été cultivée dans du milieu RPMI pour former des tubes germinatifs et a été préincubée avec l'AcM 3D9.3 ou avec une IgM ne se fixant pas à *C. albicans* servant de témoin avant d'être incubée avec les CEB. La préincubation avec l'IgM témoin diminue significativement l'adhérence de la souche CAI12 aux CEB ([Figure 28](#)). La préincubation avec l'AcM 3D9.3 réduit également significativement l'adhérence comparée à l'anticorps IgM témoin.

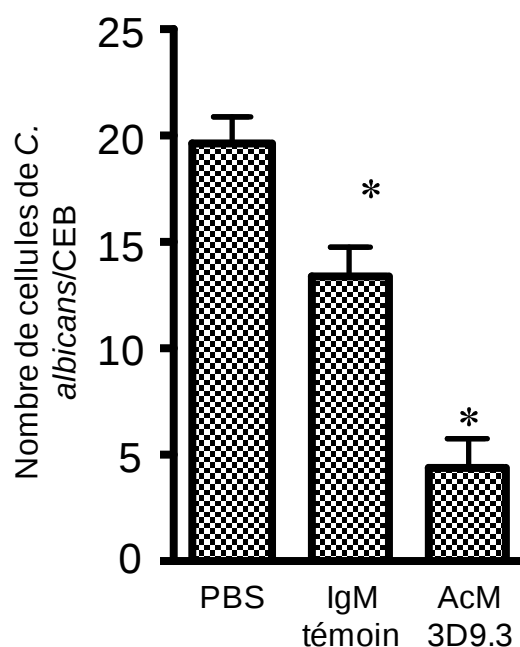


Figure 28 : Etude de l'inhibition par l'AcM 3D9.3 de la fixation des tubes germinatifs de *C. albicans* CAI12 sur les cellules épithéliales buccales. Une IgM ne se fixant pas à *C. albicans* a été utilisée comme témoin. Les différences significatives ($p < 0,05$) par rapport au pourcentage d'adhérence de la souche CAI12 incubées sans AcM sont indiquées par un astérisque.

C. Etude de l'interaction tubes germinatifs/plaquettes sanguines

1. Mise en évidence d'un composé de surface de tubes germinatifs fixant les plaquettes natives lavées

Pour caractériser les récepteurs fongiques pour les plaquettes, des extraits Zymolyase® préparés à partir de blastospores ou de tubes germinatifs biotinylés ont été incubés avec des plaquettes natives lavées. Après avoir désorbé les composés fongiques fixés sur les plaquettes, ces derniers ont été analysés en électrophorèse et électrotransfert puis

révélés par la streptavidine. Parmi les nombreux composés biotinylés présents dans l'extrait Zymolyase® de blastospores (Figure 29, piste 1), une protéine fongique de 55 kDa est révélée par la streptavidine (Figure 29, piste 2). L'extrait Zymolyase® de tubes germinatifs contient également de nombreuses molécules biotinylées (Figure 29, piste 3). La streptavidine permet de révéler dans cet extrait deux protéines fongiques à 55 kDa et à 110-220 kDa (Figure 29, piste 4) qui se sont fixées sur les plaquettes natives lavées. Les résultats obtenus avec l'extrait de tubes germinatifs ont été mis en parallèle avec ceux de l'immunodétection de l'Ag 3D9 purifié avec l'AcM 3D9.3. Dans les deux cas, une zone de marquage dans les masses moléculaires élevées (110-220 kDa) est observée avec deux zones plus intenses à 140 et 180 kDa (Figure 29, piste 4 et 5). Nous avons donc posé l'hypothèse que l'une des adhésines des tubes germinatifs de *C. albicans* pour les plaquettes pourrait être l'Ag 3D9 c'est-à-dire l'Als3p.

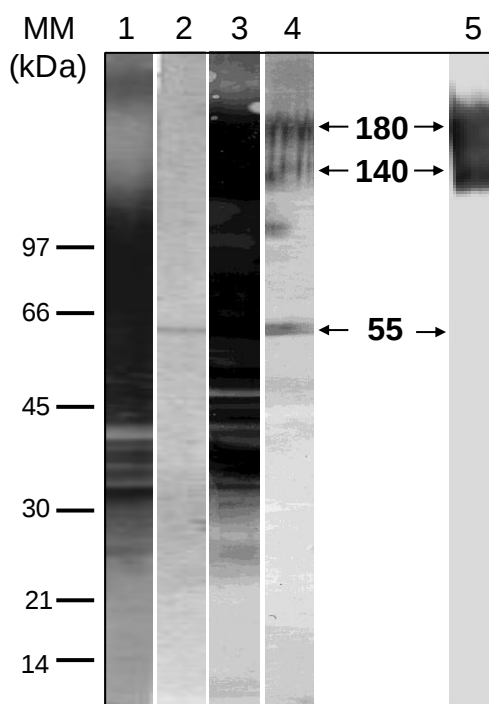


Figure 29 : Analyse des récepteurs fongiques pour les plaquettes sanguines par SDS-PAGE (gel gradient 5-15 % d'acrylamide) et transfert électrophorétique. Piste 1 : extrait Zymolyase® de blastospores biotinylées de *C. albicans* 66396; piste 2 : composés fongiques de blastospores biotinylées fixant les plaquettes sanguines; piste 3 : extrait Zymolyase® de tubes germinatifs biotinylés de *C. albicans* 66396. piste 4 : composés fongiques de tubes germinatifs biotinylés se fixant sur les plaquettes sanguines; piste 5 : Ag 3D9 purifié révélé par immunodétection avec l'AcM 3D9.3; MM, marqueurs de masse moléculaire (kDa).

2. Identification par Western-Blot du composé de surface de tubes germinatifs qui fixe les plaquettes natives lavées

Pour confirmer que l'adhésine fongique pour les plaquettes correspond à l'Ag 3D9 et donc à l'Als3p, nous avons réalisé une étude en western-blot avec les extraits de tubes germinatifs des souches de *C. albicans* 66396, CAI12, *als1Δ/als1Δ* et *als3Δ/als3Δ*. Ces extraits de tubes germinatifs ont été incubés avec des plaquettes natives lavées puis les composés fongiques fixés ont été récupérés et analysés après électrophorèse et électrotransfert suivi d'une immunodétection avec l'AcM 3D9.3.

Une immunodétection avec l'AcM 3D9.3 suivi d'une révélation grâce au chromogène DAB ont d'abord été réalisées. Aucun signal n'a été détecté quelle que soit la souche testée. L'utilisation d'un kit d'électrochemoluminescence a donc été utilisé afin d'améliorer la sensibilité de détection du signal révélé.

L'AcM 3D9.3 révèle, pour les extraits de tubes germinatifs des souches 66396, CAI12, *als1Δ/als1Δ* incubés avec des plaquettes natives lavées, une zone intense polydispersée avec une masse moléculaire apparente comprise entre 110 et 220 kDa (Figure 30). Ce profil est similaire au profil d'immunodétection obtenu avec un extrait de tubes germinatifs seul de la souche 66396 ou CAI12. Aucune réactivité de l'AcM 3D9.3 n'est observée quand l'extrait de tubes germinatifs de la souche *als3Δ/als3Δ* est incubé avec des plaquettes lavées.

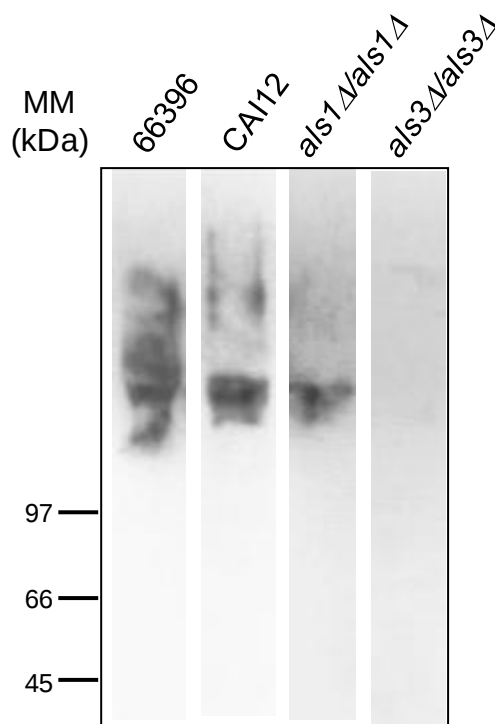


Figure 30 : Analyse par SDS-PAGE (gel gradient 5-15 % d'acrylamide) et transfert électrophorétique des composés contenus dans un extrait Zymolyase® de tubes germinatifs de différentes souches de *C. albicans* et fixant les plaquettes sanguines. La révélation a été réalisée par immunodétection avec l'AcM 3D9.3; MM, marqueurs de masse moléculaire (kDa).

3. Etude *in vitro* du rôle de la protéine Als3 dans l'interaction tubes germinatifs/plaquettes

Pour vérifier que le composé fongique de tubes germinatifs de 110-220 kDa qui se fixe sur les plaquettes natives lavées pouvait correspondre à l'Ag 3D9 et donc à l'Als3p, la capacité des tubes germinatifs à fixer les plaquettes sanguines humaines a été évaluée *in vitro* après incubation de tubes germinatifs de diverses souches de *C. albicans* telles que *C. albicans* SC5314, CAI12 parente, *als3Δ/als3Δ*, *als1Δ/als1Δ*, *ALS3SA/als3laΔ* et *ALS3LA/als3saΔ* avec des plaquettes natives lavées. Le nombre moyen de plaquettes fixées par blastospore et par tube germinatif ont été évalués. Les résultats sont regroupés dans les [Figure 31](#) et [Figure 32](#).

Pour les blastospores, aucune différence significative n'est observée quelle que soit la souche testée ([Figure 31](#)) et 1 plaquette en moyenne se fixe sur les blastospores de toutes les souches de *C. albicans*, y compris le double mutant *als3Δ/als3Δ* ([Figure 32](#)).

Pour les tubes germinatifs, il n'y a pas ou très peu de fixation des plaquettes natives lavées sur la souche mutante *als3Δ/als3Δ* ([Figure 31](#), C). Après dénombrement, 1 plaquette en

moyenne se fixe par tube germinatif de cette souche mutée pour le gène *ALS3* (Figure 32). Une forte fixation des plaquettes est observée sur la partie filamenteuse de la levure pour la souche de référence SC5314, la souche parente CAI12, la souche mutante *als1Δ/als1Δ* et les deux souches mutées pour l'un ou l'autre des allèles *ALS3* (Figure 31, A, B, D, E et F). Concernant les deux mutants hétérozygotes, la fixation des plaquettes semblent un peu plus faible comparée à la souche parente CAI12 (Figure 31, E et F). Ces résultats sont confirmés par le dénombrement des plaquettes fixées sur les tubes germinatifs. En effet, 11 à 12 plaquettes se fixent en moyenne sur un tube germinatif des souches CAI12 et *als1Δ/als1Δ*, mais une différence statistiquement significative est notée pour les souches mutées pour les allèles « court » et « long » *ALS3* (Figure 32). La souche mutée pour l'allèle « long » fixe de façon significative moins de plaquettes que la souche mutée pour l'allèle « court ».

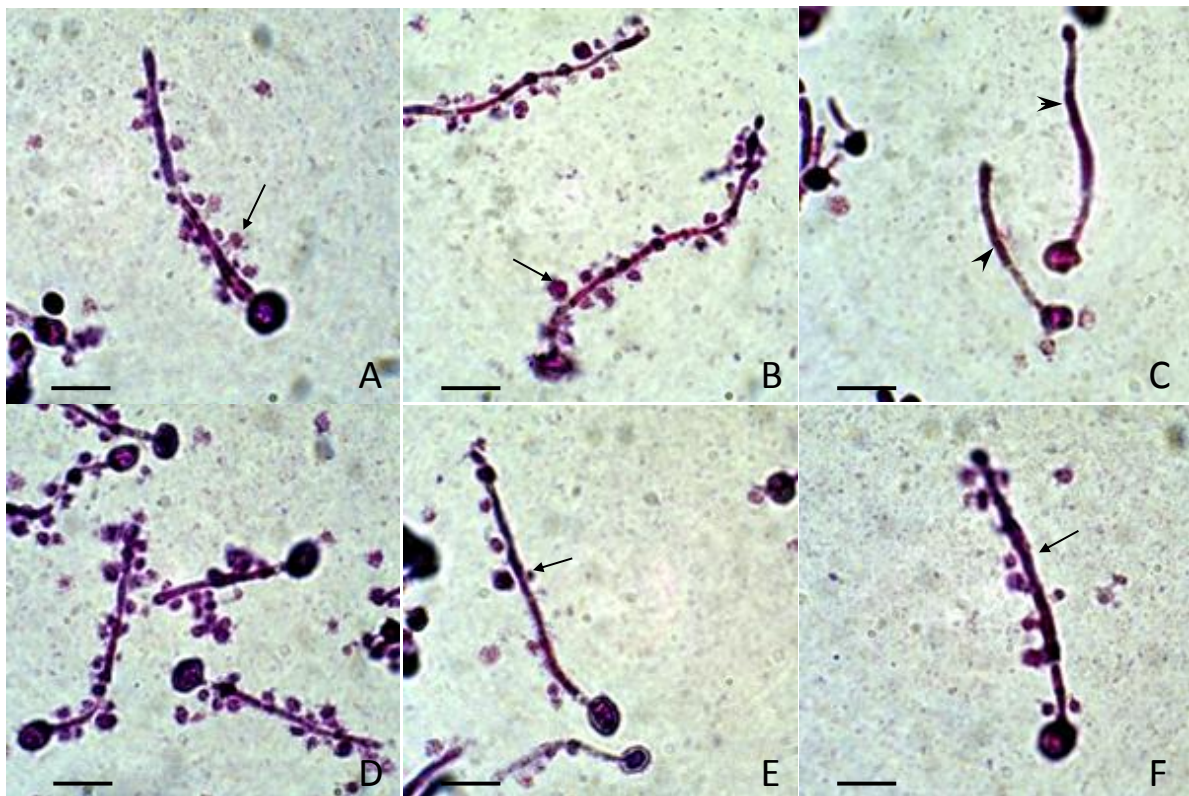


Figure 31 : Microphotographies de l'interaction des plaquettes lavées avec les tubes germinatifs de *C. albicans* SC5314 (A), CAI12 parente (B), double mutant *als3Δ/als3Δ* (C), double mutant *als1Δ/als1Δ* (D), simple mutant *ALS3SA/als3laΔ* (E) et simple mutant *ALS3LA/als3saΔ* (F). Noter la forte fixation des plaquettes sanguines majoritairement au niveau des tubes germinatifs (flèches) et l'absence de fixation des plaquettes sanguines sur la souche double mutant *als3Δ/als3Δ* (têtes de flèches). Trait = 10 μm.

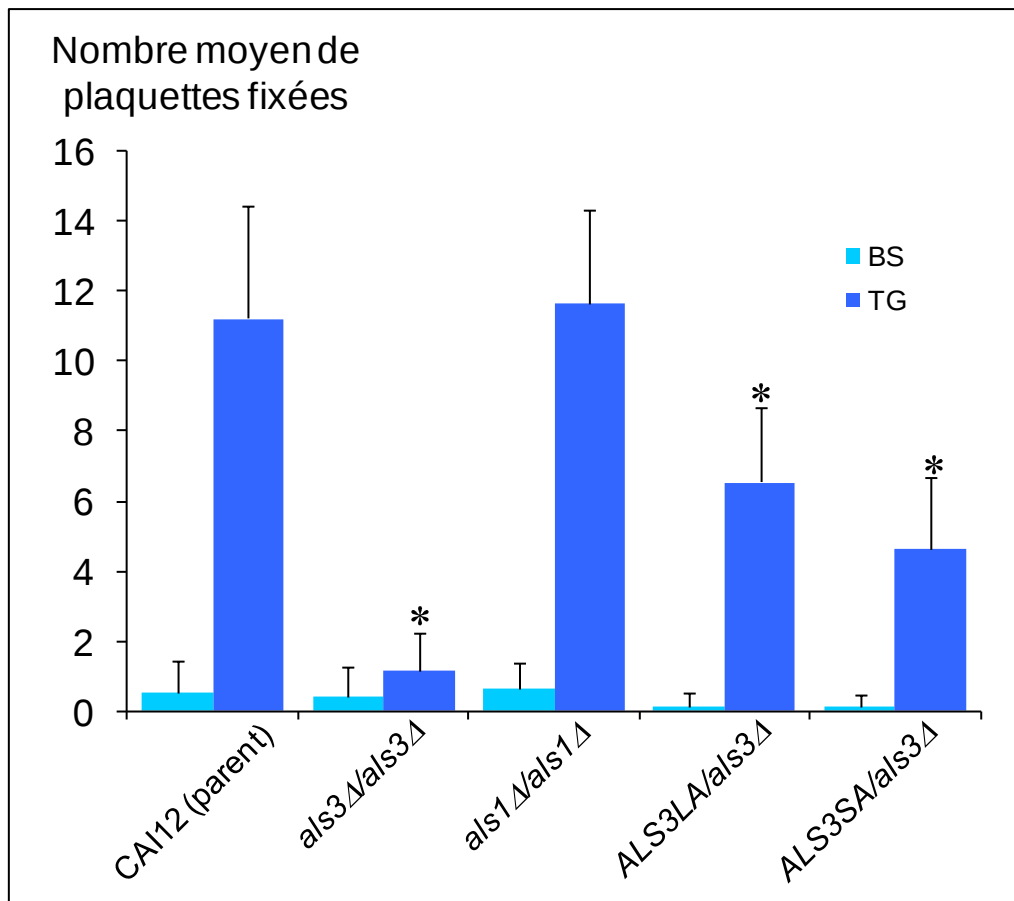


Figure 32 : Etude du nombre de plaquettes natives lavées fixées sur les blastospores et les tubes germinatifs de différentes souches de *C. albicans*. Les différences significatives ($p < 0,05$) par rapport au nombre moyen de plaquettes fixées pour la souche parente CAI12 sont indiquées par un astérisque.

A partir des observations microscopiques, une évaluation du pourcentage d'adhérence des plaquettes sur les tubes germinatifs de toutes ces souches de *C. albicans* a été réalisée. Ainsi, le pourcentage d'adhérence des plaquettes sur les tubes germinatifs de la souche *als3Δ/als3Δ* chute significativement de 90 % comparé à la souche parente CAI12 et à la souche *als1Δ/als1Δ* (Figure 33). De plus, une baisse de 60 % et 40 % d'adhérence des plaquettes est notée pour la souche mutée pour l'allèle « long » *ALS3* et la souche mutée pour l'allèle « court » *ALS3* respectivement.

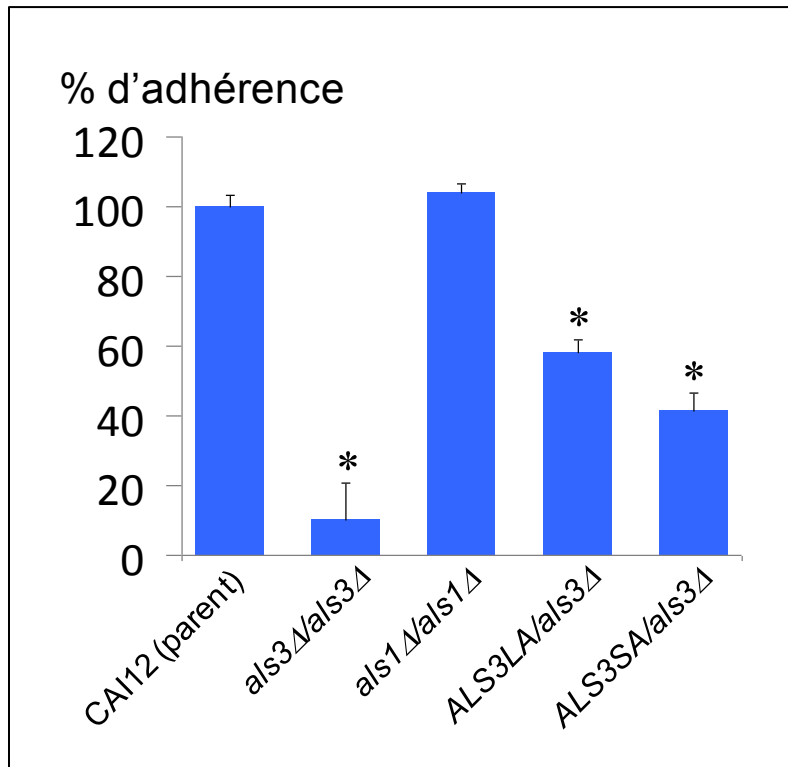


Figure 33 : Etude du pourcentage de plaquettes natives lavées fixées sur les tubes germinatifs de différentes souches de *C. albicans*. Les différences significatives ($p < 0,05$) par rapport au pourcentage d'adhérence de la souche sauvage CAI12 sont indiquées par un astérisque.

4. Inhibition de l'interaction tubes germinatifs/plaquettes lavées avec l'AcM 3D9.3

Des essais d'inhibition de l'interaction des tubes germinatifs avec les plaquettes lavées ont été réalisés en utilisant l'AcM 3D9.3 pour bloquer l'Als3p. Le pourcentage d'adhérence des plaquettes aux tubes germinatifs a été calculé après dénombrement et par comparaison à la souche CAI12 ou à la souche *als1Δ/als1Δ* incubées sans AcM (Figure 34). Quelle que soit la souche, l'AcM 3D9.3 inhibe significativement, de l'ordre de 80 %, l'interaction entre les tubes germinatifs et les plaquettes lavées.

La même étude a été réalisée avec l'AcM 5B2 comme témoin. L'AcM 5B2 a été choisi en raison de sa fixation sur les résidus mannanes de la surface des blastospores et des tubes germinatifs et de son isotype, IgM, identique à l'AcM 3D9.3. Une inhibition de l'ordre de 95 % par rapport aux témoins incubés sans AcM est observée.

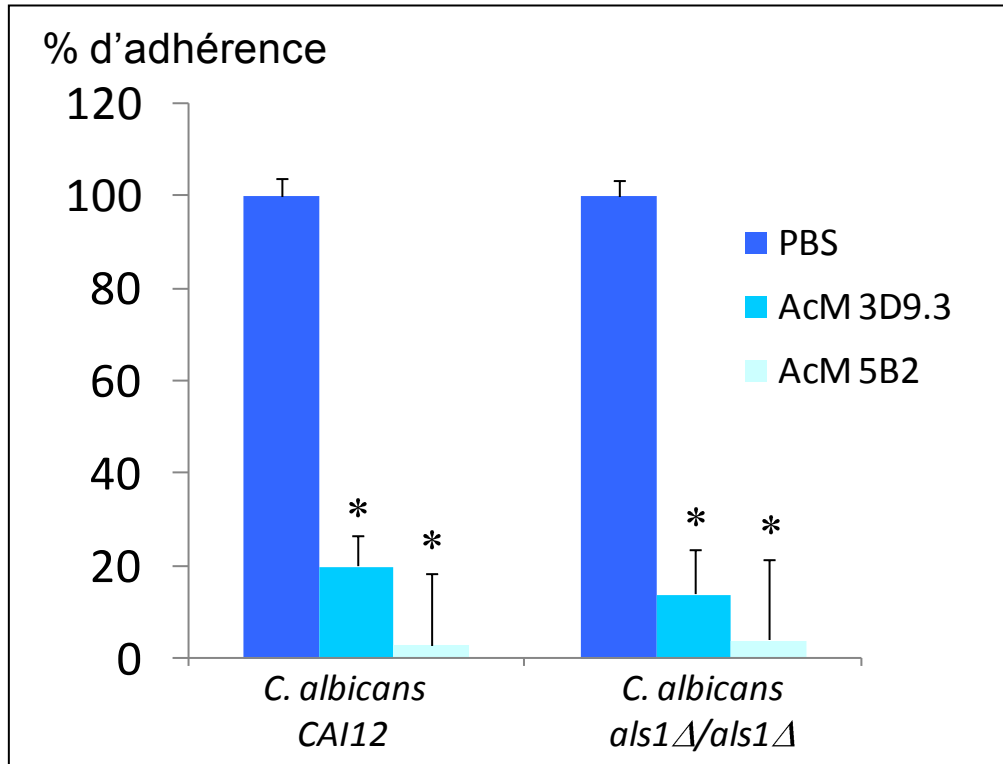


Figure 34 : Etude de l'inhibition par les AcM 3D9.3 ou 5B2 de la fixation des plaquettes lavées fixées sur les tubes germinatifs de *C. albicans* CAI12 ou *C. albicans als1*Δ/*als1*Δ. Les différences significatives ($p < 0,05$) par rapport au pourcentage d'adhérence de la souche CAI12 ou de la souche *als1*Δ/*als1*Δ incubées sans AcM sont indiquées par un astérisque.

III. DISCUSSION

Les protéines Als et plus particulièrement l'Als3p ont fait l'objet de nombreuses études concernant leur participation dans l'adhérence notamment aux cellules endothéliales, épithéliales ou encore à la fibronectine (95, 97, 99, 200, 322, 323). Le rôle dans l'adhérence de l'Als3p a également été démontré dans la formation de biofilm ou encore lors de l'endocytose par les cellules endothéliales (190, 207). L'Als3p apparaît comme être une des adhésines majeures de *C. albicans*. Le fait que cette protéine soit exprimée essentiellement à la surface des formes mycéliennes, il nous a semblé très intéressant d'étudier son rôle dans la physiopathologie des candidoses profondes.

Zhao *et al.* (322) ont montré que la délétion du gène *ALS3* chez une souche de *C. albicans* diminue significativement l'adhérence des tubes germinatifs aux CEB et aux HUVEC. Plus récemment, la même équipe a montré que cette interaction est inhibée significativement par un sérum anti-Als3p (321). Ce sérum anti-Als3p a été produit par adsorption d'un sérum polyclonal anti-Alsp avec les tubes germinatifs d'un double mutant *C. albicans als3Δ/als3Δ*. Le sérum polyclonal anti-Alsp a lui-même été obtenu par immunisation avec la partie amino-terminale purifiée de l'Als5p de *C. albicans* (97). Etant donnée la nature de l'immunogène utilisé pour obtenir le sérum anti-Alsp, les auteurs proposent que c'est la partie N-terminale de la protéine Als3p qui est en jeu dans l'interaction des HUVEC et des CEB avec les tubes germinatifs. Les essais d'inhibition que nous avons réalisés avec l'AcM 3D9.3, reconnaissant un épitope protéique porté par l'Als3p, montre que cet AcM inhibe significativement l'interaction des HUVEC et des CEB avec les tubes germinatifs. Ces résultats ne nous permettent pas de conclure que l'épitope 3D9 porté par l'Als3p correspond à l'adhésiotope participant à l'interaction entre l'Als3p et les HUVEC ou les CEB. En effet, cette inhibition pourrait être due au masquage par l'IgM 3D9.3 (900 kDa) d'un composé entrant en jeu dans l'interaction tubes germinatifs/HUVEC ou CEB. Si effectivement l'épitope 3D9 correspond à l'adhésiotope responsable de l'interaction entre les tubes germinatifs et les HUVEC ou CEB et au vue des résultats de Zhao *et al.* et de nos résultats, il est possible que l'épitope protéique reconnu par l'AcM 3D9.3 soit présent sur la partie N-terminale de la protéine Als3. Par ailleurs, Phan *et al.* (207) ont montré *in vitro* que le mycélium de *C. albicans* pouvait envahir les cellules endothéliales et épithéliales en induisant sa propre endocytose. Ils ont montré également que la partie N-terminale de la protéine Als3 présente des domaines communs aux N et E-cadhérines et mimerait les liaisons de type cadherine-cadhérine, permettant ainsi d'induire l'endocytose par fixation de cette protéine sur

les N-cadhérines des cellules endothéliales et sur les E-cadhérines des cellules épithéliales buccales. Si l'épitope 3D9 est bien un des adhésiotopes permettant la fixation des tubes germinatifs aux HUVEC et aux CEB, il pourrait être localisé dans les domaines communs aux N- et E-cadhérines.

Les plaquettes sanguines peuvent interagir, *in vivo*, avec les blastospores et les tubes germinatifs de *C. albicans* et cette interaction serait calcium dépendante (185). *In vitro*, Willcox *et al.* (308) ont montré que toutes les espèces de *Candida* pouvaient interagir avec les plaquettes contenues dans le PRP sauf *C. albicans*. Toutefois, quand les plaquettes natives sont lavées, elles se fixent préférentiellement sur les tubes germinatifs et les formes mycéliennes de *C. albicans* plutôt que sur les blastospores (157, 230, 231). Mahaza *et al.* et Nail (158, 185) ont suggéré que l'interaction des plaquettes natives avec les blastospores ferait intervenir une protéine plasmatique encore non identifiée et que l'interaction des plaquettes avec les tubes germinatifs était directe et qu'elle faisait intervenir une mannoprotéine de 45 kDa qui se fixerait sur la GPIIb-IIIa des plaquettes natives.

L'Ag 3D9 c'est à dire l'Als3p étant exprimé spécifiquement à la surface des formes mycéliennes de *C. albicans*, il semblait intéressant d'étudier le rôle de cette protéine dans l'interaction plaquettes/tubes germinatifs de *C. albicans*. Avant d'envisager un possible rôle de l'Als3p dans la fixation des plaquettes sanguines, les composés fongiques de surface impliqués dans l'interaction avec les plaquettes natives lavées ont été biotinylés et analysés en électrophorèse puis révélés par la streptavidine. Un composé de surface de 55 kDa présent dans l'extrait de blastospores se fixe sur les plaquettes mais paradoxalement, *in vitro*, les plaquettes se fixent peu ou pas sur les blastospores. Cette absence d'interaction entre les deux types cellulaires pourrait s'expliquer soit par une fixation non spécifique du composant soluble de 55 kDa sur les plaquettes soit par la non accessibilité de l'adhésiotope fongique lorsque la molécule est à la surface de la blastospore. Un second composé de 110-220 kDa a été identifié et jouerait un rôle dans l'interaction directe plaquettes/tubes germinatifs. Ce composé de 110-220 kDa présente deux zones de marquage plus intense à 140 et 180 kDa tout comme celles obtenues lors de la révélation de l'Ag 3D9 avec l'AcM 3D9.3 dans le chapitre 2. Cette similarité de profil électrophorétique entre ce composé fongique de 110-220 kDa et l'Ag 3D9 nous a amené à émettre l'hypothèse que ces deux molécules n'étaient qu'un seul et même composé. Cette hypothèse a été confirmée en réalisant la même expérience mais en utilisant les souches 66396 et CAI12 et en révélant le Western-Blot avec l'AcM 3D9.3. Les

profils observés pour les deux souches montrent la présence d'une zone de masse moléculaire de 110 à 220 kDa.

Pour vérifier que l'Ag 3D9/Als3p participe à l'interaction plaquettes/tubes germinatifs, des études *in vitro* ont été réalisées. Une fixation importante des plaquettes natives lavées est observée sur toute la longueur des tubes germinatifs des souches SC5314, CAI12 parente, *als1Δ/als1Δ*, *ALS3SA/als3laΔ* et *ALS3LA/als3saΔ*. Cette fixation est très faible pour les blastospores. Ces résultats sont en accord avec les résultats déjà obtenus par Robert *et al.* et Mahaza *et al.* (157, 230, 231) qui notaient une fixation plus spécifique des plaquettes sur les formes mycéliennes plutôt que sur les blastospores. Par contre, la souche mutée pour le gène *ALS3* présente une très faible fixation de plaquettes sur la partie filamenteuse de la cellule. Une baisse significative de 90 % est observée comparée à la souche parente. Cette faible fixation des plaquettes ne peut s'expliquer que par la délétion du gène *ALS3* et donc par l'absence de protéine Als3 à la surface des tubes germinatifs. L'Als3p est donc une des adhésines qui joue un rôle dans l'interaction plaquettes sanguines/tubes germinatifs. De plus, les souches de *C. albicans* mutées pour l'un ou l'autre des allèles *ALS3* présentent également une baisse significative de fixation des plaquettes. Quand l'allèle « long » est délété, le pourcentage de fixation baisse de 60 % alors qu'il baisse de 40 % quand l'allèle « court » est délété. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec une hypothèse formulée par Oh *et al.* (200) qui proposaient que plus le domaine central de l'Als3p était grand, plus la partie amino-terminale était en contact directe avec l'environnement extérieur de la cellule. Ainsi, dans notre modèle, une protéine Als3 plus « longue » permettrait à la levure de mieux exposer la partie amino-terminale de la protéine Als3 et augmenterait ainsi ses chances d'interagir avec les plaquettes sanguines. Quand le « petit » allèle est seul à être exprimé, la partie amino-terminale est moins exposée à la surface de la cellule et donc moins accessible pour les plaquettes sanguines.

Dans une étude antérieure, Mahaza *et al.* (158) avaient montré que l'interaction entre les plaquettes natives lavées et les tubes germinatifs faisait intervenir une mannoprotéine de 45 kDa que nous n'avons pas retrouvée dans notre étude. Ces résultats pourraient s'expliquer par des méthodes d'extraction différentes. En effet, Mahaza *et al.* (158) ont travaillé sur des extraits fongiques obtenus après action du DTT sur la paroi fongique alors que nous avons utilisé une β -1,3 glucanase. La méthode d'extraction avec un agent réducteur n'est peut être pas suffisante pour extraire et solubiliser la protéine Als3 de la paroi de *C. albicans*.

Pour évaluer l'hypothèse que l'épitope porté par l'Ag 3D9/Als3p et reconnu par l'AcM 3D9.3 pouvait correspondre à l'adhésiotope permettant aux plaquettes natives lavées de se fixer aux tubes germinatifs de *C. albicans*, nous avons réalisé des expériences d'inhibition avec les AcM 3D9.3 et 5B2. L'inhibition de cette interaction par l'AcM 3D9.3 est très importante mais ce résultat n'est pas suffisant pour conclure que l'épitope correspond bien à l'adhésiotope. En effet, l'inhibition avec l'AcM 3D9.3 peut être spécifique ou non. Pour vérifier cela, nous avons réalisé la même expérience en prenant comme témoin l'AcM 5B2. Cet AcM est un bon témoin puisqu'il est de même isotype que l'AcM 3D9.3 et puisque nous avons démontré auparavant qu'il ne se fixait pas à l'Als3p. Nous avons observé pour l'AcM 5B2 le même pourcentage d'inhibition que pour l'AcM 3D9. L'inhibition de la fixation des plaquettes natives lavées sur les tubes germinatifs avec l'AcM 5B2 n'est donc pas spécifique. L'inhibition par les deux AcM 3D9.3 et 5B2 peut s'expliquer par un phénomène d'encombrement stérique. En effet, les IgM sont des molécules de masse moléculaire très élevée de 900 kDa environ et en se fixant sur la paroi de *C. albicans*, que ce soit pour l'AcM 3D9.3 ou 5B2, elles pourraient masquer l'adhésiotope pour les plaquettes. L'utilisation de (Fab')₂ ou de Fab' pourrait lever ce problème d'inhibition non spécifique mais les Fab' 3D9.3 que nous avons produits perdent leur activité anticorps lors de la digestion par la papaïne. La spécificité de l'inhibition par l'AcM 3D9.3 n'a donc pas encore été confirmée. Si nous arrivons à produire des Fab' 3D9.3 fonctionnels, le témoin idéal pour ces études d'inhibition serait des Fab' d'une IgM reconnaissant un épitope protéique présent sur l'Als3p et différent de celui reconnu par l'AcM 3D9.3.

Le récepteur plaquettaire en jeu dans l'interaction directe Als3p/plaquettes sanguines natives n'a pas pu être identifié malgré de nombreuses tentatives. Les molécules de surface des plaquettes natives lavées, biotinylées ou non, ont été extraites puis incubées avec des tubes germinatifs entiers des souches de *C. albicans* CAI12 et du mutant *als3Δ/als3Δ*. Après désorption des composés plaquettaires fixés sur les éléments fongiques, une électrophorèse suivie d'un électrotransfert ont été réalisés afin de visualiser les molécules plaquettaires intervenant dans la fixation directe des plaquettes natives aux tubes germinatifs. Ces molécules ont été révélées soit par la streptavidine soit par des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques de la GP1b, de la GPIIb et de la GPIIIa. Les résultats n'ont pas pu être interprétés en raison de problèmes de fixation non spécifique des différents anticorps.

Le complexe GPIIb-IIIa est très important au cours de l'hémostase primaire. En effet, une fois que la GPIIb-IIIa est activée, elle devient récepteur pour le fibrinogène mais aussi

pour la fibronectine, le facteur de Willebrand, la vitronectine ou la laminine par l'intermédiaire de la séquence RGD. Les plaquettes activées forment ainsi des agrégats plaquettaires en se fixant sur les motifs RGD du fibrinogène, celui-ci servant d'intermédiaire entre les plaquettes (165, 210, 211). Même si le motif RGD n'intervient qu'avec des plaquettes activées, nous avons vérifié, à partir de la séquence déduite du gène *ALS3*, que cette protéine ne possédait pas ce motif.

Dans la physiopathologie des candidoses disséminées, les plaquettes pourraient avoir deux actions opposées. Lors de la rencontre dans le torrent circulatoire de *C. albicans* avec les plaquettes, ces dernières se fixent sur les éléments fongiques ce qui entraîne leur activation et la libération du facteur d'agrégation plaquettaire et des protéines microbicides plaquettaires. Si les protéines microbicides plaquettaires détruisent les cellules fongiques (316, 317), les plaquettes auraient donc un rôle protecteur pour l'hôte. Si une résistance à l'action de ces protéines microbicides plaquettaires, déjà observée chez *C. albicans*, se met en place, elle constituerait alors un facteur de pathogénicité. *C. albicans* séquestré dans les capillaires profonds pourrait poursuivre son développement et coloniser l'organe correspondant.

CHAPITRE 4 :
ETUDE *IN VIVO* DE
L'EFFET PROTECTEUR
DE L'AcM 3D9.3

I. MATERIELS ET METHODES

La souche *C. albicans* SC5314 a été cultivée sur SDA-C pendant 48 h à 37°C. Les blastospores ont été récupérées en eau distillée stérile, dénombrées et 10^4 blastospores/ml ont étéensemencées dans un erlenmeyer contenant 50 ml de bouillon YPD. Après incubation pendant 18 h à 37°C sous agitation, les blastospores ont été récupérées par centrifugation à 900 *g* pendant 5 min puis lavées 3 fois avec une solution de NaCl 0,15 M. Les blastospores ont été dénombrées et 200 µl d'une suspension de 5.10^5 cellules/ml dans une solution de NaCl 0,15 M contenant 0 ou 200 µg/ml d'AcM 3D9.3 ont été injectés à des souris par la veine latérale de la queue. En parallèle, un test de viabilité des blastospores a été réalisé en dénombrant le nombre d'unité formant colonie après ensemencement de 100 µl de la suspension de blastospores pure et diluée au 1/10 en eau physiologique sur une gélose YPD. Pour chaque condition expérimentale, un lot de 23 souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines a été utilisé. Le taux de survie a été évalué sur une période de 26 jours. Pour l'analyse statistique, le test non paramétrique du log-rank ($p < 0,05$) a été utilisé pour déterminer les différences significatives entre courbe de survie.

II. RESULTATS

L'effet protecteur de l'AcM 3D9.3 a été évalué *in vivo* chez des souris BALB/c femelles après injection d'un mélange de blastospores de la souche de référence *C. albicans* SC5314 et d'AcM 3D9.3 à 200 µg/ml ou d'une suspension de blastospores sans AcM. La [Figure 35](#) présente l'évolution du pourcentage de survivants de J0 à J26 après l'injection.

En absence d'AcM 3D9.3, le pourcentage de survivants est de 50 % à J9 et de 30 % à J14 et J26. En présence d'AcM, ce pourcentage est de 50 % à J12 et de 30 % à J20 et J26. Aucune différence significative n'est observée entre les résultats obtenus (nombre de jours de survie des souris) avec ou sans AcM (Test log-rank, $p < 0,05$).

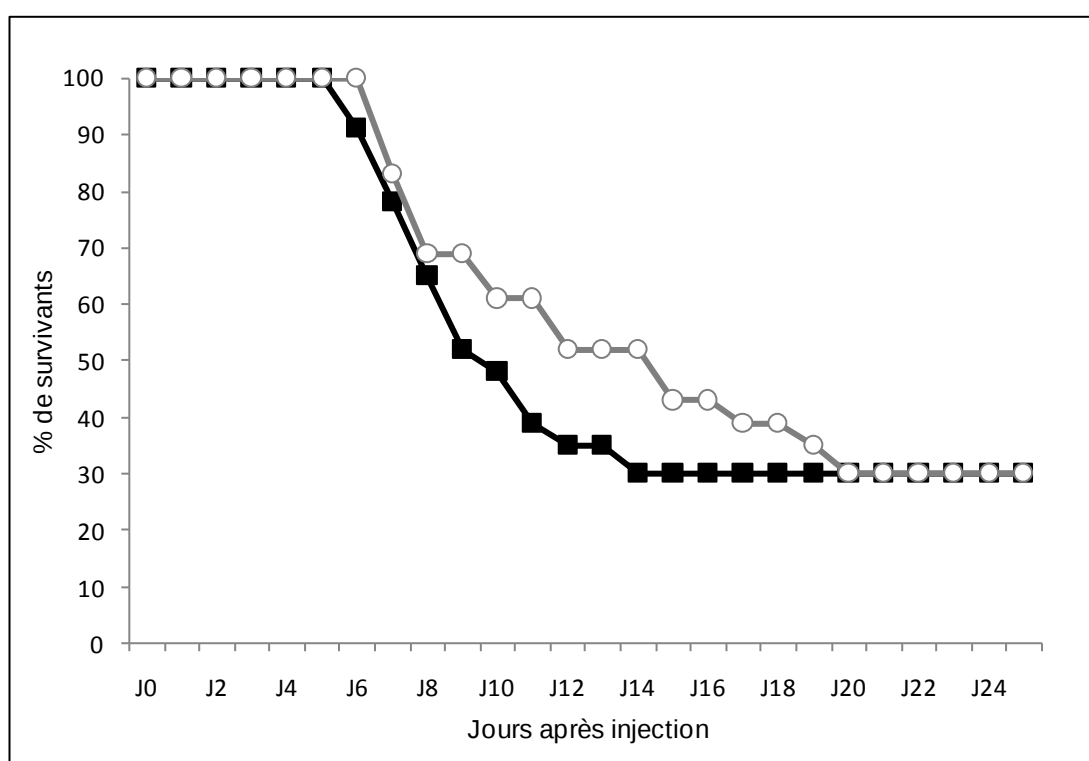


Figure 35 : Etude de l'effet protecteur *in vivo* de l'AcM 3D9.3 chez des souris BALB/c après injection conjointe à J0 de blastospores de la souche de référence *C. albicans* SC5314 sans AcM 3D9.3 (■) et avec AcM 3D9.3 à 200 µg/ml (○).

III. DISCUSSION

La famille des Als regroupe des protéines qui présentent des propriétés d'adhérence pour divers constituants des cellules de l'hôte, notamment les cellules épithéliales et endothéliales. Ces Als participent activement au développement de la pathogénicité dans la physiopathologie des candidoses. Ibrahim *et al.* (108) ont cherché un candidat potentiel parmi les adhésines de *Candida* pour développer un vaccin anti-*Candida*. Ils ont retenu la protéine Als1, protéine de surface qui permet à *C. albicans* de se fixer sur différentes cellules humaines. La partie N-terminale de la protéine recombinante Als1, qui présente des propriétés d'adhérence, a été choisie comme immunogène. Ce vaccin est un candidat prometteur pour prévenir les candidoses disséminées. En effet, il est efficace chez des souris infectées par *C. albicans* et aussi contre quelques espèces non *C. albicans* (107). Ces mêmes auteurs ont réalisé le même protocole de vaccination mais avec la partie N-terminale de l'Als3p. Ils ont obtenu les mêmes effets protecteurs dans le modèle de candidose disséminée chez la souris. De plus, ce vaccin est efficace contre les candidoses buccales et vaginales (259). Les données concernant ces vaccins semblent étayer l'hypothèse que l'AcM 3D9.3 pourrait avoir un rôle protecteur dans les candidoses disséminées puisque cet AcM est dirigé contre un épitope protéique présent sur la protéine Als3. L'Als3p, molécule exprimée essentiellement durant la phase mycélienne, semble être une molécule importante pour potentialiser l'adhérence de la levure.

Nous avons voulu vérifier si la pathogénicité de *C. albicans* pouvait être atténuée *in vivo* par l'AcM 3D9.3. Dans un modèle de souris après injection de blastospores de *C. albicans*, aucun effet significatif n'a été observé entre le lot de souris témoin et le lot ayant reçu l'AcM 3D9.3. Les résultats négatifs obtenus pour l'effet protecteur de l'AcM 3D9.3 pourrait s'expliquer par une dégradation trop rapide des AcM dans le sang des souris ou par une multiplication sous forme blastospores de la levure dans différents organes qui échappent à l'action de l'AcM 3D9.3 reconnaissant un Ag des parties filamenteuses des tubes germinatifs.

CONCLUSION

Nous avons montré dans ce travail que les « petite » et « grande » protéines Als3 codées par les deux allèles *ALS3* portent un épitope, reconnu par l'AcM 3D9.3, qui est spécifique de la seule espèce *C. albicans* et des stades morphologiques tubes germinatifs et mycélium de cette espèce. L'Als3p est une adhésine de surface exprimée essentiellement à la surface des tubes germinatifs et du mycélium de *C. albicans*. Cette protéine fait partie de la famille des Als dont la plupart des membres ont des propriétés d'adhérence sur divers constituants de l'hôte. Il serait intéressant d'évaluer la capacité d'adhérence sur ces différents constituants des souches de *C. albicans* exprimant des allèles *ALS3* plus ou moins longs.

Nous avons également montré que l'AcM 3D9.3 inhibe l'interaction des tubes germinatifs avec les cellules épithéliales buccales et les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. Etant donné les résultats d'inhibition de fixation de tubes germinatifs aux CEB et HUVEC avec l'AcM 3D9.3, le rôle protecteur de cet AcM reste intéressant à étudier malgré les résultats négatifs que nous avons obtenus.

Nous avons également clairement établi que l'Als3p joue un rôle important dans l'interaction de *C. albicans* avec les plaquettes et pourrait être une des adhésines impliquées dans cette interaction. Toutefois, nous n'avons pas pu montrer que l'épitope reconnu par l'AcM 3D9.3 correspondait à l'adhésiotope. La prochaine étape consistera à identifier le récepteur plaquettaire qui participe à cette interaction directe en se liant à l'Als3p car les études préliminaires que nous avons réalisées n'ont pas donné de résultats interprétables. Cependant, nous pensons que le complexe GPIIb-IIIa serait un bon candidat pour être ce récepteur plaquettaire.

In vivo, les plaquettes natives se fixent autant sur les blastospores que sur les tubes germinatifs. L'interaction des plaquettes natives circulantes avec les blastospores pourrait faire intervenir un constituant plasmatique. L'identification de ce constituant est importante et pourrait permettre de mieux expliquer les différences observées *in vivo* et *in vitro* entre les interactions des plaquettes natives avec *C. albicans* et de mieux comprendre certains mécanismes physiopathologiques des candidoses invasives.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Annaix, V., J. P. Bouchara, G. Tronchin, J. M. Senet, and R. Robert.** 1990. Structures involved in the binding of human fibrinogen to *Candida albicans* germ tubes. *FEMS Microbiol Immunol* **2**:147-53.
2. **Argimon, S., J. A. Wishart, R. Leng, S. Macaskill, A. Mavor, T. Alexandris, S. Nicholls, A. W. Knight, B. Enjalbert, R. Walmsley, F. C. Odds, N. A. Gow, and A. J. Brown.** 2007. Developmental regulation of an adhesin gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6**:682-92.
3. **Bailey, D. A., P. J. Feldmann, M. Bovey, N. A. Gow, and A. J. Brown.** 1996. The *Candida albicans* *HYR1* gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J Bacteriol* **178**:5353-60.
4. **Banerjee, S. N., T. G. Emori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, T. Horan, J. R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson, and W. J. Martone.** 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* **91**:86S-89S.
5. **Banno, Y., T. Yamada, and Y. Nozawa.** 1985. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* **23**:47-54.
6. **Barrett-Bee, K., Y. Hayes, R. G. Wilson, and J. F. Ryley.** 1985. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* **131**:1217-21.
7. **Bartnicki-Garcia, S.** 2006. Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res* **6**:957-65.
8. **Beausejour, A., D. Grenier, J. P. Goulet, and N. Deslauriers.** 1998. Proteolytic activation of the interleukin-1beta precursor by *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**:676-81.
9. **Beck-Sague, C., and W. R. Jarvis.** 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* **167**:1247-51.
10. **Bennett, R. J., M. A. Uhl, M. G. Miller, and A. D. Johnson.** 2003. Identification and characterization of a *Candida albicans* mating pheromone. *Mol Cell Biol* **23**:8189-201.
11. **Blasi, E., L. Pitzurra, M. Puliti, A. R. Chimienti, R. Mazzolla, R. Barluzzi, and F. Bistoni.** 1995. Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. *Infect Immun* **63**:1806-9.
12. **Bouali, A., R. Robert, G. Tronchin, and J. M. Senet.** 1986. Binding of human fibrinogen to *Candida albicans* *in vitro*: a preliminary study. *J Med Vet Mycol* **24**:345-8.
13. **Bouali, A., R. Robert, G. Tronchin, and J. M. Senet.** 1987. Characterization of binding of human fibrinogen to the surface of germ-tubes and mycelium of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**:545-51.
14. **Bouchara, J. P., G. Tronchin, V. Annaix, R. Robert, and J. M. Senet.** 1990. Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect Immun* **58**:48-54.
15. **Braun, B. R., W. S. Head, M. X. Wang, and A. D. Johnson.** 2000. Identification and characterization of *TUP1*-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics* **156**:31-44.

16. **Braun, B. R., and A. D. Johnson.** 1997. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* **277**:105-9.
17. **Braun, B. R., and A. D. Johnson.** 2000. *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**:57-67.
18. **Braun, B. R., D. Kadosh, and A. D. Johnson.** 2001. NRG1, a repressor of filamentous growth in *Candida albicans*, is down-regulated during filament induction. *Embo J* **20**:4753-61.
19. **Brena, S., M. J. Omaetxebarria, N. Elguezabal, J. Cabezas, M. D. Moragues, and J. Ponton.** 2007. The fungicidal monoclonal antibody C7 binds to *Candida albicans* Als3. *Infect Immun.* **75** (7):3680-2.
20. **Calderone, R., and J. Sturtevant.** 1994. Macrophage interactions with *Candida*. *Immunol Ser* **60**:505-15.
21. **Calderone, R. A.** 1993. Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. *Arch Med Res* **24**:275-9.
22. **Calderone, R. A., R. L. Cihlar, D. D. Lee, K. Hoberg, and W. M. Scheld.** 1985. Yeast adhesion in the pathogenesis of endocarditis due to *Candida albicans*: studies with adherence-negative mutants. *J Infect Dis* **152**:710-5.
23. **Calderone, R. A., and W. A. Fonzi.** 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**:327-35.
24. **Calderone, R. A., L. Linehan, E. Wadsworth, and A. L. Sandberg.** 1988. Identification of C3d receptors on *Candida albicans*. *Infect Immun* **56**:252-8.
25. **Cameron, B. J., and L. J. Douglas.** 1996. Blood group glycolipids as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *Infect Immun* **64**:891-6.
26. **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.
27. **Casanova, M., M. L. Gil, L. Cardenoso, J. P. Martinez, and R. Sentandreu.** 1989. Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun* **57**:262-71.
28. **Casanova, M., J. L. Lopez-Ribot, C. Monteagudo, A. Llombart-Bosch, R. Sentandreu, and J. P. Martinez.** 1992. Identification of a 58-kilodalton cell surface fibrinogen-binding mannoprotein from *Candida albicans*. *Infect Immun* **60**:4221-9.
29. **Cassone, A., N. Simonetti, and V. Strippoli.** 1973. Ultrastructural changes in the wall during germ-tube formation from blastospores of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **77**:417-26.
30. **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.
31. **Chaffin, W. L., J. Skudlarek, and K. J. Morrow.** 1988. Variable expression of a surface determinant during proliferation of *Candida albicans*. *Infect Immun* **56**:302-9.
32. **Chaffin, W. L., and D. M. Stocco.** 1983. Cell wall proteins of *Candida albicans*. *Can J Microbiol* **29**:1438-44.

33. **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.
34. **Chen, M. H., Z. M. Shen, S. Bobin, P. C. Kahn, and P. N. Lipke.** 1995. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. Evidence for a yeast cell wall protein with multiple immunoglobulin-like domains with atypical disulfides. *J Biol Chem* **270**:26168-77.
35. **Cheng, G., K. Wozniak, M. A. Wallig, P. L. Fidel, Jr., S. R. Trupin, and L. L. Hoyer.** 2005. Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infect Immun* **73**:1656-63.
36. **Critchley, I. A., and L. J. Douglas.** 1987. Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**:637-43.
37. **Cutler, J. E., D. L. Brawner, K. C. Hazen, and M. A. Jutila.** 1990. Characteristics of *Candida albicans* adherence to mouse tissues. *Infect Immun* **58**:1902-8.
38. **Daniels, K. J., S. R. Lockhart, J. F. Staab, P. Sundstrom, and D. R. Soll.** 2003. The adhesin Hwp1 and the first daughter cell localize to the a/a portion of the conjugation bridge during *Candida albicans* mating. *Mol Biol Cell* **14**:4920-30.
39. **De Backer, M. D., T. Ilyina, X. J. Ma, S. Vandoninck, W. H. Luyten, and H. Vanden Bossche.** 2001. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1660-70.
40. **De Bernardis, F., A. Molinari, M. Boccanera, A. Stringaro, R. Robert, J. M. Senet, G. Arancia, and A. Cassone.** 1994. Modulation of cell surface-associated mannoprotein antigen expression in experimental candidal vaginitis. *Infect Immun* **62**:509-19.
41. **De Groot, P. W., K. J. Hellingwerf, and F. M. Klis.** 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**:781-96.
42. **De Nobel, H., P. N. Lipke, and J. Kurjan.** 1996. Identification of a ligand-binding site in an immunoglobulin fold domain of the *Saccharomyces cerevisiae* adhesion protein alpha-agglutinin. *Mol Biol Cell* **7**:143-53.
43. **Dean, N.** 1999. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim Biophys Acta* **1426**:309-22.
44. **Djeu, J. Y., J. H. Liu, S. Wei, H. Rui, C. A. Pearson, W. J. Leonard, and D. K. Blanchard.** 1993. Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2. *J Immunol* **150**:960-70.
45. **Djeu, J. Y., K. Matsushima, J. J. Oppenheim, K. Shiotsuki, and D. K. Blanchard.** 1990. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. *J Immunol* **144**:2205-10.
46. **Domer, J. E., J. W. Murphy, G. S. Deepe, Jr., and M. Franco.** 1992. Immunomodulation in the mycoses. *J Med Vet Mycol* **30 Suppl 1**:157-66.
47. **Dubois, M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith.** 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**:167.

48. **Edwards, J. E., Jr., C. L. Mayer, S. G. Filler, E. Wadsworth, and R. A. Calderone.** 1992. Cell extracts of *Candida albicans* block adherence of the organisms to endothelial cells. *Infect Immun* **60**:3087-91.
49. **Ernst, J. F., and S. K. Prill.** 2001. O-glycosylation. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:67-74.
50. **Espersen, F., I. Clemmensen, and V. Barkholt.** 1985. Isolation of *Staphylococcus aureus* clumping factor. *Infect Immun* **49**:700-8.
51. **Filler, S. G., B. O. Ibe, A. S. Ibrahim, M. A. Ghannoum, J. U. Raj, and J. E. Edwards, Jr.** 1994. Mechanisms by which *Candida albicans* induces endothelial cell prostaglandin synthesis. *Infect Immun* **62**:1064-9.
52. **Filler, S. G., B. O. Ibe, P. M. Lockett, J. U. Raj, and J. E. Edwards, Jr.** 1991. *Candida albicans* stimulates endothelial cell eicosanoid production. *J Infect Dis* **164**:928-35.
53. **Filler, S. G., J. N. Swerdloff, C. Hobbs, and P. M. Lockett.** 1995. Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**:976-83.
54. **Firon, A., G. Lesage, and H. Bussey.** 2004. Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. *Curr Opin Microbiol* **7**:617-23.
55. **Fitzpatrick, D. A., M. E. Logue, J. E. Stajich, and G. Butler.** 2006. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* **6**:99.
56. **Fonzi, W. A., and M. Y. Irwin.** 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**:717-28.
57. **Fortier, B., V. Hopwood, and D. Poulain.** 1988. Electric and chemical fusions for the production of monoclonal antibodies reacting with the *in-vivo* growth phase of *Candida albicans*. *J Med Microbiol* **27**:239-45.
58. **Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F. C. Odds, and B. Hube.** 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**:397-415.
59. **Fradin, C., D. Poulain, and T. Jouault.** 2000. beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* **68**:4391-8.
60. **Franklyn, K. M., J. R. Warmington, A. K. Ott, and R. B. Ashman.** 1990. An immunodominant antigen of *Candida albicans* shows homology to the enzyme enolase. *Immunol Cell Biol* **68 (Pt 3)**:173-8.
61. **Frojmovic, M. M., and J. G. Milton.** 1982. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev* **62**:185-261.
62. **Fu, Y., G. Rieg, W. A. Fonzi, P. H. Belanger, J. E. Edwards, Jr., and S. G. Filler.** 1998. Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* **66**:1783-6.
63. **Garey, K. W., M. Rege, M. P. Pai, D. E. Mingo, K. J. Suda, R. S. Turpin, and D. T. Bearden.** 2006. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis* **43**:25-31.

64. **Garner, R. E., A. M. Childress, L. G. Human, and J. E. Domer.** 1990. Characterization of *Candida albicans* mannan-induced, mannan-specific delayed hypersensitivity suppressor cells. *Infect Immun* **58**:2613-20.
65. **Gaur, N. K., and S. A. Klotz.** 1997. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **65**:5289-94.
66. **Gaur, N. K., S. A. Klotz, and R. L. Henderson.** 1999. Overexpression of the *Candida albicans* *ALA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to those of *Candida albicans*. *Infect Immun* **67**:6040-7.
67. **Ghannoum, M. A., K. Abu el-Teen, and S. S. Radwan.** 1987. Blocking adherence of *Candida albicans* to buccal epithelial cells by yeast glycolipids, yeast wall lipids and lipids from epithelial cells. *Mykosen* **30**:371-8.
68. **Glee, P. M., P. Sundstrom, and K. C. Hazen.** 1995. Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* *in vivo*. *Infect Immun* **63**:1373-9.
69. **Gow, N. A., A. J. Brown, and F. C. Odds.** 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* **5**:366-71.
70. **Gow, N. A., T. H. Perera, J. Sherwood-Higham, G. W. Gooday, D. W. Gregory, and D. Marshall.** 1994. Investigation of touch-sensitive responses by hyphae of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Scanning Microsc* **8**:705-10.
71. **Green, C. B., X. Zhao, K. M. Yeater, and L. L. Hoyer.** 2005. Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of *ALS* gene expression in budding and filamenting cells. *Microbiology* **151**:1051-60.
72. **Gudlaugsson, O., S. Gillespie, K. Lee, J. Vande Berg, J. Hu, S. Messer, L. Herwaldt, M. Pfaller, and D. Diekema.** 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* **37**:1172-7.
73. **Han, Y., N. van Rooijen, and J. E. Cutler.** 1993. Binding of *Candida albicans* yeast cells to mouse popliteal lymph node tissue is mediated by macrophages. *Infect Immun* **61**:3244-9.
74. **Harry, J. B., J. L. Song, C. N. Lyons, and T. C. White.** 2002. Transcription initiation of genes associated with azole resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* **40**:73-81.
75. **Hattori, M., K. Yoshiura, M. Negi, and H. Ogawa.** 1984. Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans*. *Sabouraudia* **22**:175-83.
76. **Hauser, K., and W. Tanner.** 1989. Purification of the inducible alpha-agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae* and molecular cloning of the gene. *FEBS Lett* **255**:290-4.
77. **Hawser, S. P., and L. J. Douglas.** 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect Immun* **62**:915-21.
78. **Hazen, B. W., and K. C. Hazen.** 1988. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. *Infect Immun* **56**:2521-5.
79. **Hazen, K. C.** 1989. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infect Immun* **57**:1894-900.

80. **Hazen, K. C., D. L. Brawner, M. H. Riesselman, M. A. Jutila, and J. E. Cutler.** 1991. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect Immun* **59**:907-12.
81. **Hazen, K. C., and P. M. Glee.** 1994. Hydrophobic cell wall protein glycosylation by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Can J Microbiol* **40**:266-72.
82. **Hazen, K. C., and B. W. Hazen.** 1992. Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Immun* **60**:1499-508.
83. **Hazen, K. C., and B. W. Hazen.** 1993. Surface hydrophobic and hydrophilic protein alterations in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **107**:83-7.
84. **Hazen, K. C., and B. W. Hazen.** 1987. Temperature-modulated physiological characteristics of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* **31**:497-508.
85. **Hazen, K. C., J. G. Lay, B. W. Hazen, R. C. Fu, and S. Murthy.** 1990. Partial biochemical characterization of cell surface hydrophobicity and hydrophilicity of *Candida albicans*. *Infect Immun* **58**:3469-76.
86. **Heitman, J.** 2006. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr Biol* **16**:R711-25.
87. **Hoffman, M. P., and C. G. Haidaris.** 1993. Analysis of *Candida albicans* adhesion to salivary mucin. *Infect Immun* **61**:1940-9.
88. **Holder, I. A., and P. Nathan.** 1973. Effect in mice of injection of viable *Candida albicans* and a cell-free sonic extract on circulating platelets. *Infect Immun* **7**:468-72.
89. **Hoover, C. I., M. J. Jantapour, G. Newport, N. Agabian, and S. J. Fisher.** 1998. Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (*PLB1*) gene. *FEMS Microbiol Lett* **167**:163-9.
90. **Hopwood, V., D. Poulain, B. Fortier, G. Evans, and A. Vernes.** 1986. A monoclonal antibody to a cell wall component of *Candida albicans*. *Infect Immun* **54**:222-7.
91. **Horisberger, M., and M. F. Clerc.** 1988. Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*. *Eur J Cell Biol* **46**:444-52.
92. **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.
93. **Hostetter, M. K., J. S. Lorenz, L. Preus, and K. E. Kendrick.** 1990. The iC3b receptor on *Candida albicans*: subcellular localization and modulation of receptor expression by glucose. *J Infect Dis* **161**:761-8.
94. **Hoyer, L. L.** 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**:176-80.
95. **Hoyer, L. L., J. Clevenger, J. E. Hecht, E. J. Ehrhart, and F. M. Poulet.** 1999. Detection of Als proteins on the cell wall of *Candida albicans* in murine tissues. *Infect Immun* **67**:4251-5.
96. **Hoyer, L. L., R. Fundyga, J. E. Hecht, J. C. Kapteyn, F. M. Klis, and J. Arnold.** 2001. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics* **157**:1555-67.

97. **Hoyer, L. L., and J. E. Hecht.** 2001. The *ALS5* gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. *Yeast* **18**:49-60.
98. **Hoyer, L. L., and J. E. Hecht.** 2000. The *ALS6* and *ALS7* genes of *Candida albicans*. *Yeast* **16**:847-55.
99. **Hoyer, L. L., T. L. Payne, M. Bell, A. M. Myers, and S. Scherer.** 1998. *Candida albicans ALS3* and insights into the nature of the *ALS* gene family. *Curr Genet* **33**:451-9.
100. **Hoyer, L. L., T. L. Payne, and J. E. Hecht.** 1998. Identification of *Candida albicans ALS2* and *ALS4* and localization of Als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol* **180**:5334-43.
101. **Hoyer, L. L., S. Scherer, A. R. Shatzman, and G. P. Livi.** 1995. *Candida albicans ALS1*: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol* **15**:39-54.
102. **Hube, B., D. Hess, C. A. Baker, M. Schaller, W. Schafer, and J. W. Dolan.** 2001. The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology* **147**:879-89.
103. **Hube, B., D. Sanglard, F. C. Odds, D. Hess, M. Monod, W. Schafer, A. J. Brown, and N. A. Gow.** 1997. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun* **65**:3529-38.
104. **Hull, C. M., and A. D. Johnson.** 1999. Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**:1271-5.
105. **Hull, C. M., R. M. Raisner, and A. D. Johnson.** 2000. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**:307-10.
106. **Ibrahim, A. S., S. G. Filler, M. A. Ghannoum, and J. E. Edwards, Jr.** 1993. Interferon-gamma protects endothelial cells from damage by *Candida albicans*. *J Infect Dis* **167**:1467-70.
107. **Ibrahim, A. S., B. J. Spellberg, V. Avanesian, Y. Fu, and J. E. Edwards, Jr.** 2006. The anti-*Candida* vaccine based on the recombinant N-terminal domain of Als1p is broadly active against disseminated candidiasis. *Infect Immun* **74**:3039-41.
108. **Ibrahim, A. S., B. J. Spellberg, V. Avenissian, Y. Fu, S. G. Filler, and J. E. Edwards, Jr.** 2005. Vaccination with recombinant N-terminal domain of Als1p improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. *Infect Immun* **73**:999-1005.
109. **Jakab, E., M. Paulsson, F. Ascencio, and A. Ljungh.** 1993. Expression of vitronectin and fibronectin binding by *Candida albicans* yeast cells. *Apmis* **101**:187-93.

110. James, T. Y., F. Kauff, C. L. Schoch, P. B. Matheny, V. Hofstetter, C. J. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, H. T. Lumbsch, A. Rauhut, V. Reeb, A. E. Arnold, A. Amtoft, J. E. Stajich, K. Hosaka, G. H. Sung, D. Johnson, B. O'Rourke, M. Crockett, M. Binder, J. M. Curtis, J. C. Slot, Z. Wang, A. W. Wilson, A. Schussler, J. E. Longcore, K. O'Donnell, S. Mozley-Standridge, D. Porter, P. M. Letcher, M. J. Powell, J. W. Taylor, M. M. White, G. W. Griffith, D. R. Davies, R. A. Humber, J. B. Morton, J. Sugiyama, A. Y. Rossman, J. D. Rogers, D. H. Pfister, D. Hewitt, K. Hansen, S. Hambleton, R. A. Shoemaker, J. Kohlmeyer, B. Volkmann-Kohlmeyer, R. A. Spotts, M. Serdani, P. W. Crous, K. W. Hughes, K. Matsuura, E. Langer, G. Langer, W. A. Untereiner, R. Lucking, B. Budel, D. M. Geiser, A. Aptroot, P. Diederich, I. Schmitt, M. Schultz, R. Yahr, D. S. Hibbett, F. Lutzoni, D. J. McLaughlin, J. W. Spatafora, and R. Vilgalys. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**:818-22.
111. Jayatilake, J. A., Y. H. Samaranayake, and L. P. Samaranayake. 2005. An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* **34**:240-6.
112. Johnson, A. 2003. The biology of mating in *Candida albicans*. *Nat Rev Microbiol* **1**:106-16.
113. Jones, S., G. White, and P. R. Hunter. 1994. Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections. *J Clin Microbiol* **32**:2869-70.
114. Jouault, T., A. Bernigaud, G. Lepage, P. A. Trinel, and D. Poulain. 1994. The *Candida albicans* phospholipomannan induces *in vitro* production of tumour necrosis factor-alpha from human and murine macrophages. *Immunology* **83**:268-73.
115. Jouault, T., G. Lepage, A. Bernigaud, P. A. Trinel, C. Fradin, J. M. Wieruszeski, G. Strecker, and D. Poulain. 1995. Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun* **63**:2378-81.
116. Kalo, A., E. Segal, E. Sahar, and D. Dayan. 1988. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosal surfaces: involvement of fibronectin in adherence. *J Infect Dis* **157**:1253-6.
117. Kaminishi, H., M. Tanaka, T. Cho, H. Maeda, and Y. Hagihara. 1990. Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* **58**:2139-43.
118. Kanbe, T., and J. E. Cutler. 1994. Evidence for adhesin activity in the acid-stable moiety of the phosphomannoprotein cell wall complex of *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**:1662-8.
119. Kanbe, T., Y. Han, B. Redgrave, M. H. Riesselman, and J. E. Cutler. 1993. Evidence that mannans of *Candida albicans* are responsible for adherence of yeast forms to spleen and lymph node tissue. *Infect Immun* **61**:2578-84.
120. Kappe, R., S. M. Levitz, A. Cassone, and R. G. Washburn. 1992. Mechanisms of host defence against fungal infection. *J Med Vet Mycol* **30 Suppl 1**:167-77.

121. **Kapteyn, J. C., L. L. Hoyer, J. E. Hecht, W. H. Muller, A. Andel, A. J. Verkleij, M. Makarow, H. Van Den Ende, and F. M. Klis.** 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**:601-11.
122. **Karthauss, M., and O. A. Cornely.** 2007. Treatment options in candidaemia. *Mycoses* **50**:44-49.
123. **Kelly, S. L., D. C. Lamb, J. Loeffler, H. Einsele, and D. E. Kelly.** 1999. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem Biophys Res Commun* **262**:174-9.
124. **Kirkpatrick, C. H.** 1994. Chronic mucocutaneous candidiasis. *J Am Acad Dermatol* **31**:S14-7.
125. **Kitz, D. J., P. D. Stahl, and J. R. Little.** 1992. The effect of a mannose binding protein on macrophage interactions with *Candida albicans*. *Cell Mol Biol* **38**:407-12.
126. **Klis, F. M., P. de Groot, and K. Hellingwerf.** 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:1-8.
127. **Klis, F. M., P. Mol, K. Hellingwerf, and S. Brul.** 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**:239-56.
128. **Klotz, S. A.** 1990. Adherence of *Candida albicans* to components of the subendothelial extracellular matrix. *FEMS Microbiol Lett* **56**:249-54.
129. **Klotz, S. A.** 1994. Adherence of *Candida albicans* to endothelial cells is inhibited by prostaglandin I₂. *Infect Immun* **62**:1497-500.
130. **Klotz, S. A., N. K. Gaur, D. F. Lake, V. Chan, J. Rauceo, and P. N. Lipke.** 2004. Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infect Immun* **72**:2029-34.
131. **Klotz, S. A., J. L. Harrison, and R. P. Misra.** 1989. Aggregated platelets enhance adherence of *Candida* yeasts to endothelium. *J Infect Dis* **160**:669-77.
132. **Klotz, S. A., R. C. Hein, R. L. Smith, and J. B. Rouse.** 1994. The fibronectin adhesin of *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**:4679-81.
133. **Klotz, S. A., and R. L. Smith.** 1991. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J Infect Dis* **163**:604-10.
134. **Klotz, S. A., R. L. Smith, and B. W. Stewart.** 1992. Effect of an arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide on hematogenous candidal infections in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:132-6.
135. **Krishnamurthy, S., V. Gupta, R. Prasad, and S. L. Panwar.** 1998. Expression of CDR1, a multidrug resistance gene of *Candida albicans*: transcriptional activation by heat shock, drugs and human steroid hormones. *FEMS Microbiol Lett* **160**:191-7.
136. **Kumamoto, C. A., and M. D. Vences.** 2005. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* **7**:1546-54.
137. **La Valle, R., C. Bromuro, L. Ranucci, H. M. Muller, A. Crisanti, and A. Cassone.** 1995. Molecular cloning and expression of a 70-kilodalton heat shock protein of *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**:4039-45.

138. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
139. **Lamb, D. C., D. E. Kelly, T. C. White, and S. L. Kelly.** 2000. The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes drug resistance through reduced affinity. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:63-7.
140. **Lane, S., C. Birse, S. Zhou, R. Matson, and H. Liu.** 2001. DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **276**:48988-96.
141. **Lehrer, N., E. Segal, H. Lis, and Y. Gov.** 1988. Effect of *Candida albicans* cell wall components on the adhesion of the fungus to human and murine vaginal mucosa. *Mycopathologia* **102**:115-21.
142. **Li, R. K., and J. E. Cutler.** 1993. Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **268**:18293-9.
143. **Limper, A. H., and J. E. Standing.** 1994. Vitronectin interacts with *Candida albicans* and augments organism attachment to the NR8383 macrophage cell line. *Immunol Lett* **42**:139-44.
144. **Lipke, P. N., and J. Kurjan.** 1992. Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev* **56**:180-94.
145. **Lipke, P. N., D. Wojciechowicz, and J. Kurjan.** 1989. AG alpha 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol Cell Biol* **9**:3155-65.
146. **Liu, H., J. Kohler, and G. R. Fink.** 1994. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**:1723-6.
147. **Lodder, J.** 1970. The yeasts : a taxonomy study, Norths Holland publishing company ed, London.
148. **Lopez-Ribot, J. L., M. Casanova, J. P. Martinez, and R. Sentandreu.** 1991. Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. *Infect Immun* **59**:2324-32.
149. **Lopez-Ribot, J. L., R. K. McAtee, L. N. Lee, W. R. Kirkpatrick, T. C. White, D. Sanglard, and T. F. Patterson.** 1998. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2932-7.
150. **Lopez-Ribot, J. L., D. Navarro, P. Sepulveda, J. M. Nogueira, M. Casanova, and J. P. Martinez.** 1994. A comparative study on cell wall antigens and cell surface hydrophobicity in clinical isolates of *Candida albicans*. *Mycopathologia* **127**:1-13.
151. **Lott, T. J., B. P. Holloway, D. A. Logan, R. Fundyga, and J. Arnold.** 1999. Towards understanding the evolution of the human commensal yeast *Candida albicans*. *Microbiology* **145 (Pt 5)**:1137-43.
152. **Lotz, H., K. Sohn, H. Brunner, F. A. Muhlschlegel, and S. Rupp.** 2004. *RBR1*, a novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by *RIM101* and activated by *NRG1*. *Eukaryot Cell* **3**:776-84.

153. **Lu, C. F., R. C. Montijn, J. L. Brown, F. Klis, J. Kurjan, H. Bussey, and P. N. Lipke.** 1995. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **128**:333-40.
154. **Maartens, G., and M. J. Wood.** 1991. The clinical presentation and diagnosis of invasive fungal infections. *J Antimicrob Chemother* **28 Suppl A**:13-22.
155. **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.
156. **Magee, B. B., and P. T. Magee.** 2000. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science* **289**:310-3.
157. **Mahaza, C., R. Robert, M. Miegerville, G. Tronchin, and J. M. Senet.** 1991. *Candida albicans*-platelet interaction : Evidence for *in vivo* and *in vitro*, cell to cell attachment., p. 131-135. In T. E. e. al. (ed.), *Candida* and Candidamycosis. Plenum Press, New York.
158. **Mahaza, C., R. Robert, and J. M. Senet.** 1991. *Candida albicans*-platelet interaction : molecules involved in the adherence., p. 137-141. In T. E. e. al. (ed.), *Candida* and Candidamycosis. Plenum press, New York.
159. **Maisch, P. A., and R. A. Calderone.** 1980. Adherence of *Candida albicans* to a fibrin-platelet matrix formed *in vitro*. *Infect Immun* **27**:650-6.
160. **Maisch, P. A., and R. A. Calderone.** 1981. Role of surface mannan in the adherence of *Candida albicans* to fibrin-platelet clots formed *in vitro*. *Infect Immun* **32**:92-7.
161. **Manning, M., and T. G. Mitchell.** 1980. Morphogenesis of *Candida albicans* and cytoplasmic proteins associated with differences in morphology, strain, or temperature. *J Bacteriol* **144**:258-73.
162. **Marcilla, A., M. V. Elorza, S. Mormeneo, H. Rico, and R. Sentandreu.** 1991. *Candida albicans* mycelial wall structure: supramolecular complexes released by zymolyase, chitinase and beta-mercaptoethanol. *Arch Microbiol* **155**:312-9.
163. **Marcilla, A., C. Monteagudo, S. Mormeneo, and R. Sentandreu.** 1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. *Microbiology* **145 (Pt 3)**:695-701.
164. **Marguerie, G. A., T. S. Edgington, and E. F. Plow.** 1980. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor as part of a multistep reaction in ADP-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* **255**:154-61.
165. **Marguerie, G. A., M. H. Ginsberg, and E. F. Plow.** 1985. Fibrinogen and platelet function. *Adv Exp Med Biol* **192**:41-54.
166. **Marot-Leblond, A., B. Beucher, S. David, S. Nail-Billaud, and R. Robert.** 2006. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. *J Clin Microbiol* **44**:138-42.
167. **Marot-Leblond, A., L. Grimaud, S. Nail, S. Bouterige, V. Apaire-Marchais, D. J. Sullivan, and R. Robert.** 2000. New monoclonal antibody specific for *Candida albicans* germ tube. *J Clin Microbiol* **38**:61-7.

168. **Marot-Leblond, A., R. Robert, J. Aubry, P. Ezcurra, and J. M. Senet.** 1993. Identification and immunochemical characterization of a germ tube specific antigen of *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **7**:175-86.
169. **Marot-Leblond, A., R. Robert, O. Loiseau, V. Apaire-Marchais, and J. M. Senet.** 2000. Hydrophobic and hydrophilic cell surface (glyco)proteinic components of *Candida albicans*. *J. mycol. méd.* **10**:115-142.
170. **Marot-Leblond, A., R. Robert, J. M. Senet, and T. Palmer.** 1995. Purification of a *Candida albicans* germ tube specific antigen. *FEMS Immunol Med Microbiol* **12**:127-36.
171. **Martin, M. V.** 1999. The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of *Candida albicans* infections: a review. *J Antimicrob Chemother* **44**:429-37.
172. **Martinez, J. P., J. L. Lopez-Ribot, and W. L. Chaffin.** 1994. Heterogeneous surface distribution of the fibrinogen-binding protein on *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**:709-12.
173. **Matthews, R., and J. Burnie.** 1992. The role of Hsp90 in fungal infection. *Immunol Today* **13**:345-8.
174. **McNamara, M. P., J. H. Wiessner, C. Collins-Lech, B. L. Hahn, and P. G. Sohnle.** 1988. Neutrophil death as a defence mechanism against *Candida albicans* infections. *Lancet* **2**:1163-5.
175. **Merson-Davies, L. A., V. Hopwood, R. Robert, A. Marot-Leblond, J. M. Senet, and F. C. Odds.** 1991. Reaction of *Candida albicans* cells of different morphology index with monoclonal antibodies specific for the hyphal form. *J Med Microbiol* **35**:321-4.
176. **Mille, C., G. Janbon, F. Delplace, S. Ibata-Ombetta, C. Gaillardin, G. Strecker, T. Jouault, P. A. Trinel, and D. Poulain.** 2004. Inactivation of *CaMIT1* inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem* **279**:47952-60.
177. **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.
178. **Miyakawa, Y., T. Kuribayashi, K. Kagaya, M. Suzuki, T. Nakase, and Y. Fukazawa.** 1992. Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* **60**:2493-9.
179. **Moragues, M. D., M. J. Omaetxebarria, N. Elguezabal, M. J. Sevilla, S. Conti, L. Polonelli, and J. Ponton.** 2003. A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall mannoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities. *Infect Immun* **71**:5273-9.
180. **Moran, G., C. Stokes, S. Thewes, B. Hube, D. C. Coleman, and D. Sullivan.** 2004. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. *Microbiology* **150**:3363-82.
181. **Morrell, M., V. J. Fraser, and M. H. Kollef.** 2005. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3640-5.

182. **Morschhauser, J.** 2002. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1587**:240-8.
183. **Murad, A. M., C. d'Enfert, C. Gaillardin, H. Tournu, F. Tekaia, D. Talibi, D. Marechal, V. Marchais, J. Cottin, and A. J. Brown.** 2001. Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* **42**:981-93.
184. **Murad, A. M., P. Leng, M. Straffon, J. Wishart, S. Macaskill, D. MacCallum, N. Schnell, D. Talibi, D. Marechal, F. Tekaia, C. d'Enfert, C. Gaillardin, F. C. Odds, and A. J. Brown.** 2001. *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *Embo J* **20**:4742-52.
185. **Nail, S.** 2002. L'interaction plaquettes sanguines-levures *in vivo* et ses conséquences. Université d'Angers, Angers.
186. **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.
187. **Navarathna, D. H., J. M. Hornby, N. Krishnan, A. Parkhurst, G. E. Duhamel, and K. W. Nickerson.** 2007. Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a *DPP3* knockout mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**:1609-18.
188. **Niewiarowski, S., E. Kornecki, A. Z. Budzynski, T. A. Morinelli, and G. P. Tuszyński.** 1983. Fibrinogen interaction with platelet receptors. *Ann N Y Acad Sci* **408**:536-55.
189. **Nikawa, H., L. P. Samaranayake, J. Tenovuo, K. M. Pang, and T. Hamada.** 1993. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol* **38**:1057-63.
190. **Nobile, C. J., D. R. Andes, J. E. Nett, F. J. Smith, F. Yue, Q. T. Phan, J. E. Edwards, S. G. Filler, and A. P. Mitchell.** 2006. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *Candida albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS Pathog* **2**:e63.
191. **Nobile, C. J., and A. P. Mitchell.** 2005. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *Candida albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol* **15**:1150-5.
192. **Nobile, C. J., J. E. Nett, D. R. Andes, and A. P. Mitchell.** 2006. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* **5**:1604-10.
193. **Noverr, M. C., S. M. Phare, G. B. Toews, M. J. Coffey, and G. B. Huffnagle.** 2001. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun* **69**:2957-63.
194. **O'Connor, L., S. Lahiff, F. Casey, M. Glennon, M. Cormican, and M. Maher.** 2005. Quantification of *ALS1* gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler. *Mol Cell Probes* **19**:153-62.
195. **Odds, F. C.** 1979. *Candida* and Candidosis, Leicester University Press ed, London.
196. **Odds, F. C.** 1985. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* **12**:45-93.

197. **Odds, F. C., A. B. Abbott, R. L. Stiller, H. J. Scholer, A. Polak, and D. A. Stevens.** 1983. Analysis of *Candida albicans* phenotypes from different geographical and anatomical sources. *J Clin Microbiol* **18**:849-57.
198. **Odds, F. C., and L. A. Merson-Davies.** 1989. Colony variations in *Candida* species. *Mycoses* **32**:275-82.
199. **Oh, K. B., H. Miyazawa, T. Naito, and H. Matsuoka.** 2001. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4664-8.
200. **Oh, S. H., G. Cheng, J. A. Nuessen, R. Jajko, K. M. Yeater, X. Zhao, C. Pujol, D. R. Soll, and L. L. Hoyer.** 2005. Functional specificity of *Candida albicans* Als3p proteins and clade specificity of *ALS3* alleles discriminated by the number of copies of the tandem repeat sequence in the central domain. *Microbiology* **151**:673-81.
201. **Omaetxebarria, M. J., M. D. Moragues, N. Elguezabal, A. Rodriguez-Alejandre, S. Brena, J. Schneider, L. Polonelli, and J. Ponton.** 2005. Antifungal and antitumor activities of a monoclonal antibody directed against a stress mannoprotein of *Candida albicans*. *Curr Mol Med* **5**:393-401.
202. **Pappas, P. G., J. H. Rex, J. D. Sobel, S. G. Filler, W. E. Dismukes, T. J. Walsh, and J. E. Edwards.** 2004. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* **38**:161-89.
203. **Pazos, C., M. D. Moragues, G. Quindos, J. Ponton, and A. del Palacio.** 2006. Diagnostic potential of (1,3)-beta-D-glucan and anti-*Candida albicans* germ tube antibodies for the diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. *Rev Iberoam Micol* **23**:209-15.
204. **Peerschke, E. I.** 1985. The platelet fibrinogen receptor. *Semin Hematol* **22**:241-59.
205. **Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell.** 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**:3551-67.
206. **Pfaller, M. A.** 1996. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* **22 Suppl 2**:S89-94.
207. **Phan, Q. T., C. L. Myers, Y. Fu, D. C. Sheppard, M. R. Yeaman, W. H. Welch, A. S. Ibrahim, J. E. Edwards, and S. G. Filler.** 2007. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* **5**:e64.
208. **Pitarch, A., M. Sanchez, C. Nombela, and C. Gil.** 2003. Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **787**:101-28.
209. **Pitarch, A., M. Sanchez, C. Nombela, and C. Gil.** 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics* **1**:967-82.
210. **Plow, E. F., M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G. Marguerie, and M. H. Ginsberg.** 1987. Arginyl-glycyl-aspartic acid sequences and fibrinogen binding to platelets. *Blood* **70**:110-5.
211. **Plow, E. F., M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G. A. Marguerie, and M. H. Ginsberg.** 1985. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:8057-61.

212. **Ponton, J., A. Marot-Leblond, P. A. Ezkurra, B. Barturen, R. Robert, and J. M. Senet.** 1993. Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. *Infect Immun* **61**:4842-7.
213. **Poulain, D., C. Faille, J. C. Michalsky, and D. Camus.** 1990. Anticorps monoclonaux anti-*Candida albicans* : de la biologie cellulaire aux marqueurs de comportement pathogène. *Med. Scien.*:526-533.
214. **Poulain, D., G. Tronchin, J. F. Dubremetz, and J. Biguet.** 1978. Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: study of its constitutive layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides. *Ann Microbiol (Paris)* **129**:141-53.
215. **Poulain, D., A. Vernes, and J. Fruit.** 1980. Variation de la structure antigénique pariétale de *Candida albicans*. Mise en évidence au niveau des blastospores d'un antigène P dépendant de leur origine. *Sabouraudia* **18**:61-68.
216. **Prasad, R., P. De Wergifosse, A. Goffeau, and E. Balzi.** 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* **27**:320-9.
217. **Prasad, R., and K. Kapoor.** 2005. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int Rev Cytol* **242**:215-48.
218. **Prill, S. K., B. Klinkert, C. Timpel, C. A. Gale, K. Schroppel, and J. F. Ernst.** 2005. PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* **55**:546-60.
219. **Pugh, D., and R. A. Cawson.** 1977. The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia* **15**:29-35.
220. **Qi, Q. G., T. Hu, C. H. Fu, and X. D. Zhou.** 2005. Comparison of *ALS* gene mRNA between sessile and planktonic *Candida albicans* of oral cavities. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **23**:233-6.
221. **Qian, Q., M. A. Jutila, N. Van Rooijen, and J. E. Cutler.** 1994. Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* **152**:5000-8.
222. **Rauceo, J. M., R. De Armond, H. Otoo, P. C. Kahn, S. A. Klotz, N. K. Gaur, and P. N. Lipke.** 2006. Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the *Candida albicans* adhesin Als5p. *Eukaryot Cell* **5**:1664-73.
223. **Rauceo, J. M., N. K. Gaur, K. G. Lee, J. E. Edwards, S. A. Klotz, and P. N. Lipke.** 2004. Global cell surface conformational shift mediated by a *Candida albicans* adhesin. *Infect Immun* **72**:4948-55.
224. **Reiss, E., V. M. Hearn, D. Poulain, and M. G. Shepherd.** 1992. Structure and function of the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* **30 Suppl 1**:143-56.
225. **Rex, J. H., J. E. Bennett, A. M. Sugar, P. G. Pappas, J. Serody, J. E. Edwards, and R. G. Washburn.** 1995. Intravascular catheter exchange and duration of candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Clin Infect Dis* **21**:994-6.

226. **Rex, J. H., J. E. Bennett, A. M. Sugar, P. G. Pappas, C. M. van der Horst, J. E. Edwards, R. G. Washburn, W. M. Scheld, A. W. Karchmer, A. P. Dine, and et al.** 1994. A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. Candidemia Study Group and the National Institute. *N Engl J Med* **331**:1325-30.
227. **Rindum, J. L., A. Stenderup, and P. Holmstrup.** 1994. Identification of *Candida albicans* types related to healthy and pathological oral mucosa. *J Oral Pathol Med* **23**:406-12.
228. **Robert, R., O. Faure, A. Carloti, B. Lebeau, C. Bernard, A. Marot-Leblond, R. Grillot, and J. M. Senet.** 1998. A monoclonal antibody specific to surface antigen on *Candida krusei*. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**:121-4.
229. **Robert, R., C. Mahaza, A. Marot-Leblond, G. Tronchin, and J. M. Senet.** 1991. Binding of mouse fibrinogen to *Candida albicans* *in vivo*. *FEMS Microbiol Lett* **62**:301-3.
230. **Robert, R., C. Mahaza, M. Miegerville, J. Ponton, A. Marot-Leblond, and J. M. Senet.** 1996. Binding of resting platelets to *Candida albicans* germ tubes. *Infect Immun* **64**:3752-7.
231. **Robert, R., J. M. Senet, C. Mahaza, V. Annaix, M. Miegerville, J. P. Bouchara, G. Tronchin, and A. Marot-Leblond.** 1992. Molecular basis of the interactions between *Candida albicans*, fibrinogen and platelets. *J Mycol Med* **2**.
232. **Rogers, P. D., and K. S. Barker.** 2002. Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3412-7.
233. **Romani, L., and D. H. Howard.** 1995. Mechanisms of resistance to fungal infections. *Curr Opin Immunol* **7**:517-23.
234. **Ruchel, R.** 1981. Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **659**:99-113.
235. **Ruiz-Herrera, J., M. V. Elorza, E. Valentin, and R. Sentandreu.** 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**:14-29.
236. **Sandovsky-Losica, H., N. Chauhan, R. Calderone, and E. Segal.** 2006. Gene transcription studies of *Candida albicans* following infection of HEp2 epithelial cells. *Med Mycol* **44**:329-34.
237. **Sanglard, D.** 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* **5**:379-85.
238. **Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod, and J. Bille.** 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143 (Pt 2)**:405-16.
239. **Sanglard, D., K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod, and J. Bille.** 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:2378-86.

240. **Santoni, G., A. Gismondi, J. H. Liu, A. Punturieri, A. Santoni, L. Frati, M. Piccoli, and J. Y. Djeu.** 1994. *Candida albicans* expresses a fibronectin receptor antigenically related to alpha 5 beta 1 integrin. *Microbiology* **140** (Pt 11):2971-9.
241. **Santos, M. A., C. Cheesman, V. Costa, P. Moradas-Ferreira, and M. F. Tuite.** 1999. Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in *Candida spp.* *Mol Microbiol* **31**:937-47.
242. **Schaller, M., M. Bein, H. C. Korting, S. Baur, G. Hamm, M. Monod, S. Beinhauer, and B. Hube.** 2003. The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* **71**:3227-34.
243. **Schaller, M., B. Hube, M. W. Ollert, W. Schafer, M. Borg-von Zepelin, E. Thoma-Greber, and H. C. Korting.** 1999. *In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol* **112**:383-6.
244. **Schaller, M., C. Schackert, H. C. Korting, E. Januschke, and B. Hube.** 2000. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol* **114**:712-7.
245. **Schaller, M., W. Schafer, H. C. Korting, and B. Hube.** 1998. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* **29**:605-15.
246. **Segretain, G., E. Drouhet, and F. Mariat.** 1987. Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale 5ème édition., Maloine ed, Paris.
247. **Sevilla, M. J., B. Robledo, A. Rementeria, M. D. Moragues, and J. Ponton.** 2006. A fungicidal monoclonal antibody protects against murine invasive candidiasis. *Infect Immun* **74**:3042-5.
248. **Sharkey, L. L., M. D. McNemar, S. M. Saporito-Irwin, P. S. Sypherd, and W. A. Fonzi.** 1999. *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J Bacteriol* **181**:5273-9.
249. **Shattil, S. J., A. Budzynski, and M. C. Scrutton.** 1989. Epinephrine induces platelet fibrinogen receptor expression, fibrinogen binding, and aggregation in whole blood in the absence of other excitatory agonists. *Blood* **73**:150-8.
250. **Sheppard, D. C., M. R. Yeaman, W. H. Welch, Q. T. Phan, Y. Fu, A. S. Ibrahim, S. G. Filler, M. Zhang, A. J. Waring, and J. E. Edwards, Jr.** 2004. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **279**:30480-9.
251. **Skerl, K. G., R. A. Calderone, E. Segal, T. Sreevalsan, and W. M. Scheld.** 1984. *In vitro* binding of *Candida albicans* yeast cells to human fibronectin. *Can J Microbiol* **30**:221-7.
252. **Skerl, K. G., R. A. Calderone, and T. Sreevalsan.** 1981. Platelet interactions with *Candida albicans*. *Infect Immun* **34**:938-43.
253. **Slabas, A. R., B. Ndimba, W. J. Simon, and S. Chivasa.** 2004. Proteomic analysis of the *Arabidopsis* cell wall reveals unexpected proteins with new cellular locations. *Biochem Soc Trans* **32**:524-8.

254. **Slutsky, B., J. Buffo, and D. R. Soll.** 1985. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* **230**:666-9.
255. **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.
256. **Smail, E. H., and J. M. Jones.** 1984. Demonstration and solubilization of antigens expressed primarily on the surfaces of *Candida albicans* germ tubes. *Infect Immun* **45**:74-81.
257. **Sohn, K., C. Urban, H. Brunner, and S. Rupp.** 2003. *EFG1* is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Mol Microbiol* **47**:89-102.
258. **Soll, D. R.** 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* **5**:183-203.
259. **Spellberg, B. J., A. S. Ibrahim, V. Avanesian, Y. Fu, C. Myers, Q. T. Phan, S. G. Filler, M. R. Yeaman, and J. E. Edwards, Jr.** 2006. Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. *J Infect Dis* **194**:256-60.
260. **Spotl, L., J. Most, and M. P. Dierich.** 1994. Ca ions stabilize the binding of complement factor iC3b to the pseudohyphal form of *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**:1125-7.
261. **Staab, J. F., Y. S. Bahn, C. H. Tai, P. F. Cook, and P. Sundstrom.** 2004. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J Biol Chem* **279**:40737-47.
262. **Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom.** 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* **283**:1535-8.
263. **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.
264. **Staab, J. F., and P. Sundstrom.** 1998. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene *HWP1* of *Candida albicans*. *Yeast* **14**:681-6.
265. **Staebell, M., and D. R. Soll.** 1985. Temporal and spatial differences in cell wall expansion during bud and mycelium formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **131**:1467-80.
266. **Staib, F.** 1965. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* **4**:187-93.
267. **Staib, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, G. Kohler, S. Michel, H. Hof, J. Hacker, and J. Morschhauser.** 1999. Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol Microbiol* **32**:533-46.
268. **Stein, D. K., S. E. Malawista, G. Van Blaricom, D. Wysong, and R. D. Diamond.** 1995. Cytoplasts generate oxidants but require added neutrophil granule constituents for fungicidal activity against *Candida albicans* hyphae. *J Infect Dis* **172**:511-20.

269. **Stevenhagen, A., and R. van Furth.** 1993. Interferon-gamma activates the oxidative killing of *Candida albicans* by human granulocytes. *Clin Exp Immunol* **91**:170-5.
270. **Stoldt, V. R., A. Sonneborn, C. E. Leuker, and J. F. Ernst.** 1997. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J* **16**:1982-91.
271. **Sullivan, D., and D. Coleman.** 1997. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. *Curr Top Med Mycol* **8**:15-25.
272. **Sundstrom, P.** 2002. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**:461-9.
273. **Sundstrom, P., E. Balish, and C. M. Allen.** 2002. Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis* **185**:521-30.
274. **Sundstrom, P., J. E. Cutler, and J. F. Staab.** 2002. Reevaluation of the role of *HWP1* in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker *URA3* targeted to the *ENO1* locus. *Infect Immun* **70**:3281-3.
275. **Sundstrom, P. M., and G. E. Kenny.** 1984. Characterization of antigens specific to the surface of germ tubes of *Candida albicans* by immunofluorescence. *Infect Immun* **43**:850-5.
276. **Sundstrom, P. M., M. R. Tam, E. J. Nichols, and G. E. Kenny.** 1988. Antigenic differences in the surface mannoproteins of *Candida albicans* as revealed by monoclonal antibodies. *Infect Immun* **56**:601-6.
277. **Surarit, R., P. K. Gopal, and M. G. Shepherd.** 1988. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **134**:1723-30.
278. **Suzuki, M., and Y. Fukazawa.** 1982. Immunochemical characterization of *Candida albicans* cell wall antigens: specific determinant of *Candida albicans* serotype A mannan. *Microbiol Immunol* **26**:387-402.
279. **Swerdloff, J. N., S. G. Filler, and J. E. Edwards, Jr.** 1993. Severe candidal infections in neutropenic patients. *Clin Infect Dis* **17 Suppl 2**:S457-67.
280. **Swoboda, R. K., G. Bertram, S. Budge, G. W. Gooday, N. A. Gow, and A. J. Brown.** 1995. Structure and regulation of the *HSP90* gene from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**:4506-14.
281. **Taylor, J. W., D. M. Geiser, A. Burt, and V. Koufopanou.** 1999. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin Microbiol Rev* **12**:126-46.
282. **Timpel, C., S. Strahl-Bolsinger, K. Ziegelbauer, and J. F. Ernst.** 1998. Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**:20837-46.
283. **Tosh, F. D., and L. J. Douglas.** 1992. Characterization of a fucoside-binding adhesin of *Candida albicans*. *Infect Immun* **60**:4734-9.
284. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.

285. **Trinel, P. A., C. Faille, P. M. Jacquinet, J. C. Cailliez, and D. Poulain.** 1992. Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies. *Infect Immun* **60**:3845-51.
286. **Trinel, P. A., T. Jouault, J. E. Cutler, and D. Poulain.** 2002. Beta-1,2-mannosylation of *Candida albicans* mannoproteins and glycolipids differs with growth temperature and serotype. *Infect Immun* **70**:5274-8.
287. **Tronchin, G., J. P. Bouchara, and R. Robert.** 1989. Dynamic changes of the cell wall surface of *Candida albicans* associated with germination and adherence. *Eur J Cell Biol* **50**:285-90.
288. **Tronchin, G., J. P. Bouchara, R. Robert, and J. M. Senet.** 1988. Adherence of *Candida albicans* germ tubes to plastic: ultrastructural and molecular studies of fibrillar adhesins. *Infect Immun* **56**:1987-93.
289. **Tronchin, G., D. Poulain, J. Herbaut, and J. Biguet.** 1981. Cytochemical and ultrastructural studies of *Candida albicans*. II. Evidence for a cell wall coat using concanavalin A. *J Ultrastruct Res* **75**:50-9.
290. **Tronchin, G., R. Robert, A. Bouali, and J. M. Senet.** 1987. Immunocytochemical localization of *in vitro* binding of human fibrinogen to *Candida albicans* germ tube and mycelium. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**:177-87.
291. **Tsang, P. C., L. P. Samaranayake, H. P. Philipsen, M. McCullough, P. A. Reichart, A. Schmidt-Westhausen, C. Scully, and S. R. Porter.** 1995. Biotypes of oral *Candida albicans* isolates in human immunodeficiency virus-infected patients from diverse geographic locations. *J Oral Pathol Med* **24**:32-6.
292. **Tsuboi, R., H. Komatsuzaki, and H. Ogawa.** 1996. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun* **64**:2936-40.
293. **Tsuchimori, N., L. L. Sharkey, W. A. Fonzi, S. W. French, J. E. Edwards, Jr., and S. G. Filler.** 2000. Reduced virulence of *HWP1*-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect Immun* **68**:1997-2002.
294. **Tsushima, H., H. Mine, Y. Kawakami, F. Hyodoh, and A. Ueki.** 1994. *Candida albicans* aspartic proteinase cleaves and inactivates human epidermal cysteine proteinase inhibitor, cystatin A. *Microbiology* **140** (Pt 1):167-71.
295. **Umazume, M., E. Ueta, and T. Osaki.** 1995. Reduced inhibition of *Candida albicans* adhesion by saliva from patients receiving oral cancer therapy. *J Clin Microbiol* **33**:432-9.
296. **Urban, C., K. Sohn, F. Lottspeich, H. Brunner, and S. Rupp.** 2003. Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett* **544**:228-35.
297. **Urban, C., X. Xiong, K. Sohn, K. Schroppel, H. Brunner, and S. Rupp.** 2005. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **57**:1318-41.
298. **Vudhichamnong, K., D. M. Walker, and H. C. Ryley.** 1982. The effect of secretory immunoglobulin A on the *in-vitro* adherence of the yeast *Candida albicans* to human oral epithelial cells. *Arch Oral Biol* **27**:617-21.

299. **Wadsworth, E., S. C. Prasad, and R. Calderone.** 1993. Analysis of mannoproteins from blastoconidia and hyphae of *Candida albicans* with a common epitope recognized by anti-complement receptor type 2 antibodies. *Infect Immun* **61**:4675-81.
300. **Wang, M., H. Friedman, and J. Y. Djeu.** 1989. Enhancement of human monocyte function against *Candida albicans* by the colony-stimulating factors (CSF): IL-3, granulocyte-macrophage-CSF, and macrophage-CSF. *J Immunol* **143**:671-7.
301. **Watanabe, K., K. Kagaya, T. Yamada, and Y. Fukazawa.** 1991. Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant gamma interferon. *Infect Immun* **59**:521-8.
302. **Werner, H.** 1966. Studies on the lipase activity in yeasts and yeast-like fungi. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* **200**:113-24.
303. **White, T. C.** 1997. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1482-7.
304. **White, T. C., K. A. Marr, and R. A. Bowden.** 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **11**:382-402.
305. **White, T. C., S. H. Miyasaki, and N. Agabian.** 1993. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **175**:6126-33.
306. **Whiteway, M., and U. Oberholzer.** 2004. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* **7**:350-7.
307. **Wickes, B., J. Staudinger, B. B. Magee, K. J. Kwon-Chung, P. T. Magee, and S. Scherer.** 1991. Physical and genetic mapping of *Candida albicans*: several genes previously assigned to chromosome 1 map to chromosome R, the rDNA-containing linkage group. *Infect Immun* **59**:2480-4.
308. **Willcox, M. D., B. C. Webb, A. Thakur, and D. W. Harty.** 1998. Interactions between *Candida* species and platelets. *J Med Microbiol* **47**:103-10.
309. **Wingard, J. R.** 1995. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* **20**:115-25.
310. **Wingard, J. R., W. G. Merz, M. G. Rinaldi, T. R. Johnson, J. E. Karp, and R. Saral.** 1991. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* **325**:1274-7.
311. **Wingard, J. R., W. G. Merz, and R. Saral.** 1979. *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* **91**:539-43.
312. **Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond.** 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**:309-17.
313. **Wojciechowicz, D., C. F. Lu, J. Kurjan, and P. N. Lipke.** 1993. Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein alpha-agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Mol Cell Biol* **13**:2554-63.
314. **Yang, Y. L., and H. J. Lo.** 2001. Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect* **34**:79-86.

315. **Yeaman, M. R., A. S. Ibrahim, J. E. Edwards, Jr., A. S. Bayer, and M. A. Ghannoum.** 1993. Thrombin-induced rabbit platelet microbicidal protein is fungicidal *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:546-53.
316. **Yeaman, M. R., S. S. Soldan, M. A. Ghannoum, J. E. Edwards, Jr., S. G. Filler, and A. S. Bayer.** 1996. Resistance to platelet microbicidal protein results in increased severity of experimental *Candida albicans* endocarditis. *Infect Immun* **64**:1379-84.
317. **Yeaman, M. R., Y. Q. Tang, A. J. Shen, A. S. Bayer, and M. E. Selsted.** 1997. Purification and *in vitro* activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect Immun* **65**:1023-31.
318. **Yu, L., K. K. Lee, H. B. Sheth, P. Lane-Bell, G. Srivastava, O. Hindsgaul, W. Paranchych, R. S. Hodges, and R. T. Irvin.** 1994. *Fimbria*-mediated adherence of *Candida albicans* to glycosphingolipid receptors on human buccal epithelial cells. *Infect Immun* **62**:2843-8.
319. **Zhang, N., A. L. Harrex, B. R. Holland, L. E. Fenton, R. D. Cannon, and J. Schmid.** 2003. Sixty alleles of the *ALS7* open reading frame in *Candida albicans*: *ALS7* is a hypermutable contingency locus. *Genome Res* **13**:2005-17.
320. **Zhao, R., K. J. Daniels, S. R. Lockhart, K. M. Yeater, L. L. Hoyer, and D. R. Soll.** 2005. Unique aspects of gene expression during *Candida albicans* mating and possible G(1) dependency. *Eukaryot Cell* **4**:1175-90.
321. **Zhao, X., K. J. Daniels, S. H. Oh, C. B. Green, K. M. Yeater, D. R. Soll, and L. L. Hoyer.** 2006. *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology* **152**:2287-99.
322. **Zhao, X., S. H. Oh, G. Cheng, C. B. Green, J. A. Nuessen, K. Yeater, R. P. Leng, A. J. Brown, and L. L. Hoyer.** 2004. *ALS3* and *ALS8* represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* **150**:2415-28.
323. **Zhao, X., S. H. Oh, and L. L. Hoyer.** 2007. Deletion of *ALS5*, *ALS6* or *ALS7* increases adhesion of *Candida albicans* to human vascular endothelial and buccal epithelial cells. *Med Mycol* **45**:429-34.
324. **Zhao, X., S. H. Oh, and L. L. Hoyer.** 2007. Unequal contribution of *ALS9* alleles to adhesion between *Candida albicans* and human vascular endothelial cells. *Microbiology* **153**:2342-50.
325. **Zhao, X., S. H. Oh, R. Jajko, D. J. Diekema, M. A. Pfaller, C. Pujol, D. R. Soll, and L. L. Hoyer.** 2007. Analysis of *ALS5* and *ALS6* allelic variability in a geographically diverse collection of *Candida albicans* isolates. *Fungal Genet Biol.*
326. **Zhao, X., S. H. Oh, K. M. Yeater, and L. L. Hoyer.** 2005. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology* **151**:1619-30.
327. **Zhao, X., C. Pujol, D. R. Soll, and L. L. Hoyer.** 2003. Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* *ALS5*, *ALS1* and *ALS9*. *Microbiology* **149**:2947-60.

ANNEXE

(Préparation des solutions)

TAMPON PHOSPHATE SALIN (PBS) 0,15 M pH 7,2:

Phosphate monosodique	0,33 g
Phosphate disodique (12 H ₂ O)	2,66 g
Chlorure de sodium	8,18 g
H ₂ O distillée	qsp 1 l

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLY-ACRYLAMIDE :**Tampon Tris-SDS pH 8,8**

Tris	9,09 g
SDS	0,2 g
Ajuster à pH 8,8 avec HCl 1 N	
H ₂ O distillée	qsp 100 ml

Tampon Tris-SDS pH 6,8

Tris	3,03 g
SDS	0,2 g
Ajuster à pH 6,8 avec HCl 1 N	
H ₂ O distillée	qsp 100 ml

Tampon électrophorèse

Tris	15,15 g
Glycine	72 g
SDS	5 g
H ₂ O distillée	qsp 5 l
Vérifier le pH à 8,3	

Solution à 4% de poly-acrylamide (gel d'empilement)

Solution de poly-acrylamide 37,5:1	1,33 ml
Tampon Tris-SDS pH 6,8	5 ml
H ₂ O distillée	3,67 ml
Ammonium Persulfate (APS) 10%	100 µl
TEMED	10 µl

Solution à 5% de poly-acrylamide (gel en gradient 5-15%)

Solution de poly-acrylamide 37,5:1	2,6 ml
Tampon Tris-SDS pH 8,8	7,78 ml
H ₂ O distillée	5,2 ml
APS 10%	38,9 µl
TEMED	3,89 µl

Solution à 15% de poly-acrylamide (gel en gradient 5-15%)

Solution de poly-acrylamide 37,5:1	7,78 ml
Tampon Tris-SDS pH 8,8	7,78 ml
H ₂ O distillée	0 ml
APS 10%	38,9 µl
TEMED	3,89 µl

Solution de fixation pour gel

Isopropanol	250 ml
Acide acétique	100 ml
H ₂ O distillée	qsp 1000 ml

Solution de colorant au bleu de Coomassie

Coomassie R-250	0,5 g
Méthanol	800 ml
Acide acétique glacial (99%)	140 ml
H ₂ O distillée	qsp 2 l

Solution de décoloration pour gel

Méthanol	400 ml
Acide acétique glacial (99%)	70 ml
H ₂ O distillée	qsp 1 l

Tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (pour tampon échantillon 6X)

Tris	6,06 g
Ajuster à pH 6,8 avec HCl 1 N	
H ₂ O distillée	qsp 100 ml

Tampon échantillon 6X

Tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	7 ml
SDS	1 g
Glycérol	3 ml
Bleu de Bromophénol	1,2 mg

COLORATION DES GELS AU NITRATE D'ARGENT**Méthanol - acide acétique - Formaldéhyde (50 % -12 % - 0,0185 %)**

Méthanol	50 ml
Acide acétique	12 ml
Formaldéhyde (37 %)	50 µl
H ₂ O ultrapure	qsp 100 ml

Ethanol 50 %

Ethanol	50 ml
H ₂ O milliQ	50 ml

Thiosulfate de sodium 0,2 g/l

Thiosulfate	20 mg
H ₂ O milliQ	100 ml

Nitrate d'argent - Formaldéhyde (0,2 % - 0,028 %)

Nitrate d'argent	0,2 g
Formaldéhyde (37 %)	75 µl
H ₂ O milliQ	100 ml

Carbonate de sodium -Thiosulfate de sodium - Formaldéhyde (6 % - 0,004 % - 0,0185 %)

Carbonate de sodium	6 g
Thiosulfate de sodium	200 µl de la solution à 0,2 g/l
Formaldéhyde (37 %)	50 µl
H ₂ O milliQ	qsp 100 ml

Méthanol - acide acétique (50 % - 12 %)

Méthanol	50 ml
Acide acétique	12 ml
H ₂ O milliQ	qsp 100 ml

Méthanol 50 %

Méthanol	50 ml
H ₂ O milliQ	50 ml

Protocole :

Fixer le gel 18 h dans la solution de Méthanol-acide acétique-Formaldéhyde puis incuber le gel 3 fois 20 minutes dans la solution d'éthanol à 50 %. Incuber ensuite le gel dans la solution de Thiosulfate de sodium (0,2 g/l) pendant 1 minute. Rincer le gel 3 fois 20 secondes dans de l'eau ultrapure et l'incuber dans la solution de Nitrate d'argent-Formaldéhyde pendant 20 minutes. Rincer à nouveau le gel 2 fois 20 secondes dans de l'eau ultrapure et révéler par la solution de Carbonate de sodium-Thiosulfate de sodium-Formaldéhyde. Arrêter la révélation en incubant le gel dans la solution de Méthanol-Acide acétique. Le gel est ensuite conservé dans la solution de Méthanol à 50 % à l'obscurité.

ELECTRO-TRANSFERT :**Tampon d'électro-transfert**

Tris	3 g
Glycine	14,4 g
SDS	1 g
Méthanol	200 ml
H ₂ O distillée	qsp 1 l

Solution de coloration à l'amido-Schwarz

Amido-schwarz	0,5 g
Méthanol	225 ml
Acide acétique	50 ml
H ₂ O distillée	225 ml

ELISA :**Tampon d'adsorption Carbonate-Bicarbonate pH 9,6-0,05 M**

Carbonate de sodium anhydre (0,2 M)	80 ml
Bicarbonate de sodium (0,2 M)	170 ml
H ₂ O distillée	qsp 1 l

REVELATION DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE :**-ELISA :****Tampon citrate-phosphate 0,15 M pH 5***Solution d'acide citrique :*

Acide citrique	21 g
H ₂ O distillée	qsp 1000 g

Tampon phosphate :

Phosphate disodique (12 H ₂ O)	53,7 g
H ₂ O distillée	qsp 1 l

Tampon citrate-phosphate 0,15 M pH 5

Solution d'acide citrique	49 ml
Tampon phosphate	51 ml

Solution de révélation

Orthophénylène diamine	30 mg
Tampon citrate-phosphate	40 ml
H ₂ O ₂ (110 volumes)	20 µl
Ajuster à pH 5	

Immuno-empreinte (Western Blot) :**Tampon Tris 0,1 M pH 7,6**

Tris	1,22 g
Ajuster le pH à 7,6 avec HCl 0,1 N	
H ₂ O distillée	qsp 100 ml

Solution de révélation

3,3'diamino benzidy tétra hydrochloride 5 mg

Tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 10 ml

Vérifier le pH 7,6

H₂O₂ (110 volumes) 10µl

TITRE : Spécificité antigénique de l'Als3p de *C. albicans* et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte

RESUME

Candida albicans est une levure polymorphique commensale de la cavité buccale et du tractus digestif qui peut entraîner des infections sévères particulièrement chez les patients immunodéprimés. A l'état pathogène, les formes blastospores sont généralement observées en association avec des éléments filamenteux. L'anticorps monoclonal 3D9.3 (AcM 3D9.3) réagit avec la surface des tubes germinatifs de *C. albicans* et reconnaît un épitope protéique porté par l'antigène 3D9 (Ag 3D9). Nous avons montré que l'épitope 3D9 est présent uniquement sur les éléments mycéliens de la seule espèce *C. albicans*. L'Ag 3D9 a été purifié et présente, en Western-Blot, deux zones de marquage plus intense à 140 et 180 kDa. L'analyse par spectrométrie de masse a permis de montrer que la protéine Als3 était présente dans ces deux zones. L'absence de réactivité de l'AcM 3D9.3 sur une souche mutée pour le gène *ALS3* et la réactivité d'un sérum anti-Als3p sur l'Ag 3D9 purifié démontre que l'Ag 3D9 correspond à la protéine Als3. De plus, nous avons montré que l'épitope 3D9 était présent dans les protéines Als3p codées par les deux allèles *ALS3*. Des études d'interactions entre l'Als3p et les constituants de l'hôte ont été réalisées. L'AcM 3D9.3 inhibe l'interaction des tubes germinatifs avec les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et les cellules épithéliales buccales. De plus, l'étude d'une souche mutée pour le gène *ALS3* montre que l'Als3p est une des adhésines participant à l'interaction directe entre les tubes germinatifs et les plaquettes sanguines natives lavées. Il reste désormais à identifier le récepteur plaquettaire responsable de la fixation des plaquettes natives sur l'Als3p.

MOTS-CLES : Anticorps Monoclonal 3D9.3, Antigène 3D9, Als3p, *Candida albicans*, Cellules Epithéliales, Cellules Endothéliales, Plaquettes Sanguines

TITLE : Antigenic specificity of *Candida albicans* Als3p and implication of this protein in interaction with host components.

ABSTRACT

Candida albicans is a commensal polymorphic yeast of the oral cavity and digestive tract which can cause severe infections, especially in immunocompromised patients. During pathogenic process, blastoconidia are generally observed in association with hyphae. Monoclonal antibody 3D9.3 (MAb 3D9.3) reacts with surface of *Candida albicans* germ tubes and recognizes a proteinic epitope carried by 3D9 antigen (3D9 Ag). We demonstrated that 3D9 epitope was localized on mycelium of the only *C. albicans* species. 3D9 Ag was purified and presents, by western blot, two intense bands at 140 and 180 kDa. Analysis by mass spectrometry allowed us to prove that Als3 protein was present in these two bands. Negative result of MAb 3D9.3 reactivity against an *als3Δ/als3Δ* mutant strain and anti-Als3p serum reactivity against purified 3D9 antigen demonstrate that 3D9 Ag corresponds to Als3p. Moreover, we demonstrated that 3D9 epitope was present in Als3 proteins encoded by the two *ALS3* alleles. Interaction assays was performed between Als3p and host components. MAb 3D9.3 inhibits interaction of germ tubes and human umbilical vein endothelial cells and buccal epithelial cells. Finally, analysis of strain deleted for *ALS3* gene shows that Als3p was one of adhesins involved in direct interaction between germ tubes and washed resting blood platelets. Platelet receptor involved in binding of resting platelets to Als3p remains to be identified.

KEY-WORDS : Monoclonal Antibody 3D9.3, 3D9 Antigen, Als3p, *Candida albicans*, Epithelial Cells, Endothelial Cells, Blood Platelets.
