

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XI</b>
<b>DÉDICACE.....</b>	<b>XIV</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XV</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
SECTION 1 :    L'ÉCOLOGIE BUCCALE .....	2
1.1. <i>La muqueuse buccale .....</i>	3
1.1.1. Caractéristiques de la muqueuse buccale .....	3
1.1.2. Organisation de la muqueuse buccale .....	5
1.1.3. Propriétés et fonctions de la muqueuse buccale.....	7
1.2. <i>Rôle de la salive dans la protection contre les infections buccales.....</i>	8
1.3. <i>Les conditions physiologiques et pathologiques de la cavité buccale .....</i>	10
SECTION 2 :    CANDIDA ALBICANS.....	13
2.1. <i>Historique de la découverte de C. albicans.....</i>	13
2.2. <i>Écologie de C. albicans.....</i>	16
2.2.1. Distribution et habitats naturels.....	16
2.2.2. Conditions de cultures, isolement et croissance .....	17
2.2.3. Mode de vie de C. albicans et son interaction avec d'autres microorganismes .....	17
2.3. <i>Métabolisme de C. albicans.....</i>	18
2.4. <i>La génétique de C. albicans.....</i>	19
2.5. <i>La cytologie de C. albicans.....</i>	20
2.6. <i>L'enveloppe cellulaire de C. albicans .....</i>	22
2.6.1. Structure et ultrastructure de l'enveloppe.....	23
2.6.2. Composition de l'enveloppe .....	25
2.7 <i>Le biofilm, un mode de vie .....</i>	29
2.7.1. Le Biofilm .....	29
2.7.2. Structure et composition du biofilm de C. albicans .....	30
2.8. <i>Les infections à Candida = les candidoses .....</i>	32
2.8.1. C. albicans et candidose.....	32
2.8.1.1. La Candidose orale blanche .....	33
a) <i>Candidose pseudomembraneuse (la présentation classique) .....</i>	33
b) <i>Candidose hyperplasique: Mimicker of leukoplakia.....</i>	35
2.8.1.2. Candidose érythémateuse (ou atrophique).....	35
a) <i>Candidose érythémateuse aiguë : taches orales érythémateuses.....</i>	36
b) <i>Candidose érythémateuse chronique : stomatite dentaire .....</i>	37
c) <i>Glossite rhomboïde médiane : atrophie papillaire centrale .....</i>	38

d) Chéilité angulaire : Perlèche .....	39
e) Érythème gingival linéaire : bande gingivale, souvent chez le VIH .....	40
2.8.1.3. Autres variantes de la candidose orale .....	40
a) Candidose mucocutanée chronique .....	40
b) Chéilocandidose .....	41
c) Candidose multifocale chronique .....	42
2.8.2. Diagnostic .....	42
2.8.2.1. Diagnostic différentiel clinique .....	42
2.8.2.2. Tests de laboratoire .....	43
2.8.3. Traitements et contrôle des infections fongiques, et la résistance de <i>C. albicans</i> .....	44
2.9. <i>C. albicans</i> , une levure commensale qui devient pathogène .....	47
2.9.1. Les facteurs environnementaux contribuant à la pathogenèse de <i>C. albicans</i> .....	47
2.9.2. Les facteurs de virulence de <i>C. albicans</i> .....	48
2.9.2.1. L'adhésion à l'hôte .....	48
2.9.2.2. Transition morphologique et formation de l'hyphe .....	49
2.9.2.3. Enzymes hydrolytiques : La sécrétion des protéases. Exemple des Aspartyls Protéases Sécrétées (SAPs) .....	50
SECTION 3 : RÔLE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE CONTRE LES INFECTIONS À <i>C. ALBICANS</i> .....	53
3.1. Défense non spécifique de l'hôte / immunité innée .....	53
3.2. Défense spécifique de l'hôte / immunité acquise (dite adaptative) .....	54
3.3. Rôle des cellules épithéliales dans la défense de l'hôte .....	55
3.3.1. Les peptides antimicrobiens .....	57
3.3.2. Les PAMs d'origines amphibiens .....	58
3.3.3. Les dermaseptines : La dermaseptine-S1 .....	59
SECTION 4 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE .....	62
4.1. Mise en contexte .....	62
4.2. Objectifs .....	62
4.3. Hypothèses .....	62
CHAPITRE II: ARTICLE .....	63
RÉSUMÉ .....	65
ABSTRACT .....	66
CHAPITRE III : DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....	94
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	100

# Liste des tableaux insérés dans le volet introduction du mémoire

Tableau 1 : Les traitements topiques / non systémiques des candidoses orales	.....	45
Tableau 2 : Les traitements non systémiques des candidoses orales	.....	46

## **Article:**

Tableau 1 : Primer sequences used for the qRT-PCR	.....	74
---	-------	----

# Liste des figures

Figure 1 :	Structure des tissus de revêtement buccal et œsophagien humain	4
Figure 2 :	Principales caractéristiques ultra-structurales de la différenciation dans l'épithélium oral kératinisé et l'épithélium oral et œsophagien non kératinisé	6
Figure 3 :	Aperçu de l'anatomie des glandes salivaires	9
Figure 4 :	Les différentes formes de <i>C. albicans</i>	21
Figure 5 :	Images en microscopie électronique à transmission de <i>C. albicans</i>	24
Figure 6 :	Observation en microscopie électronique de coupes ultraminces de <i>C. albicans</i>	24
Figure 7 :	Observation en microscopie électronique à transmission de <i>C. albicans</i>	25
Figure 8 :	Schéma de l'architecture moléculaire de la paroi cellulaire de <i>C. albicans</i>	26
Figure 9 :	Développement du biofilm de <i>C. albicans</i> et rôle de l'adhésion	31
Figure 10 :	Candidose pseudomembraneuse aiguë	34
Figure 11 :	Candidose hyperplasique	36
Figure 12 :	Candidose érythémateuse associée à la denture	36
Figure 13 :	Candidose érythémateuse aiguë	37
Figure 14 :	Candidose érythémateuse chronique	38
Figure 15 :	Glossite rhomboïde médiane	39

Figure 16 : Chéilité angulaire	39
Figure 17 : Érythème gingival linéaire	40
Figure 18 : Candidose mucocutanée chronique	41
Figure 19 : Chéilocandidose	42
Figure 20 : Dendrogramme de la famille des gènes <i>Saps</i> . L'alignement des séquences d'ADN des 10 gènes <i>Saps</i>	52
Figure 21 : Différents modèles de mode d'action des peptides antimicrobiens	96

**Article:**

Figure 1 :	La dermaseptin-S1 reduced <i>C. albicans</i> growth	75
Figure 2 :	La Dermaseptin-S1 modulated <i>Candida</i> transition from blastospore to hyphae	76
Figure 3 :	La Dermaseptin-S1 decreased the number of <i>C. albicans</i> hyphal forms	77
Figure 4 :	Dermaseptin-S1 modulated hyphae size	78
Figure 5 :	Scanning electron micrographs of <i>C. albicans</i> treated or not with DS1	80
Figure 6 :	Dermaseptin-S1 decreased <i>C. albicans</i> biofilm formation	81
Figure 7 :	Quantitative measurement of the decreased biofilm formation following DS1 treatment	82
Figure 8 :	Dermaseptin-S1 decreased <i>HWP1</i> and <i>Sap1</i> mRNA expression by <i>C. albicans</i>	83
Figure 9 :	Dermaseptin-S1 decreased <i>Sap2</i> and <i>Sap3</i> mRNA expression by <i>C. albicans</i>	84
Figure 10 :	Dermaseptin-S1 decreased <i>Sap9</i> and <i>Sap10</i> mRNA expression by <i>C. albicans</i>	85

# Liste des abréviations

Als	Agglutinin-Like Sequence / gènes analogues à l'agglutinine
apr. J.-C.	Après Jésus Christ
$\alpha$ -Mans	$\alpha$ -1,2-oligomannosides
$\beta$ -1,2-Mans	$\beta$ -1,2-oligomannosides
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Cellule T CD4+	Lymphocytes T expriment à la surface Glycoprotéine des CD4 (cluster de différenciation 4)
Cellules lymphocytaire T (h)	Cellules lymphocytaires thymus (helper / auxiliaire)
CLRs	C-Type Lectine Receptor(s) / Récepteur(s) de Lectine de Type C
Cm	Membrane cytoplasmique
CMC	Candidose mucocutanée chronique
CNV-III	Mandibulaire du nerf trijumeau
CHROMagar	Milieu chromogène
CR3	Récepteur du complément 3
CSP	Peptide de compétence stimulante
cw	Paroi cellulaire
CWP	Cell wall proteins / protéines de la paroi de la cellule
DB1	N-Met-dermaseptine B1
DC	Cellules dendritiques
DS	Dermaseptine-S
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPS	substances polymères extracellulaires
F	Fibrillaire externe
f	Fibrillaires
Fc- $\gamma$ R	Récepteurs Fc- $\gamma$ / Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

G	Glucane
GC	Glucan-chitine
GlcNAc	N-acétylglucosamine / N-acétyl-D-glucosamine
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
GP	Glandes parotides
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSL	Glandes sublinguales
GSM	Glandes submandibulaires
Hwp1	Hyphal wall protein 1
iC3b	Type 3 complement receptor / récepteur du Complément de type 3
Ig (A, M, G)	Immunoglobuline / anticorps (isotype A, M, G)
IL	Interleukine
TLR(s)	Toll-like Receptor(s)
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
KOH	Hydroxyde de potassium
LL-37	Cathélicidines
LIP (1 à 10)	Lipases
LR(s)	Lectin Receptor(s) / récepteur(s) de Lectine
M (1 ou 2)	Mannoprotéine
MB	Membrane basale
MEC	Matrice extracellulaire
M(IP)2C	Mannosyle diinositolphosphoryl céramide
NANA	Acide N-acétylneuraminique
NLRs	Nod-Like Receptor(s) / Récepteur(s) Nod-Like
OCCA	Oxoid Chromogenic <i>Candida</i> Agar
PAM(s)	Peptide(s) antimicrobien(s)
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PL	Phospholipases
PLM	Phospholipomannanes
PM	Membrane plasmique
PMP	Phosphomannoprotéines

sIgA	IgA secrété
Pir	Proteins intarnal repetition
PPM	Phosphopeptidomannanes
Pra	pH-regulated antigen 1 protein / Protéine antigène 1 régulée par le pH
PRR	Récepteurs de reconnaissance
PSE	Polysaccharide extracellulaire
RGD	Arginine-glycineaspartic acid / acide arginine-Aspartyl
SAPs (1 à 10)	Aspartyl protéases sécrétées
SCID	Syndrome d'immunodéficience combinée
SNP	Polymorphisme nucléotidique
SPE	Substances polymères extracellulaires
SRM	Séquence répétée majeure
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor – $\alpha$ / facteur de nécrose Glycineaspartique Tumorale - $\alpha$
VIH+/sida	Virus de l'immunodéficience humaine (séropositif)

# DÉDICACE

À la mémoire de mon père  
Ahmed Belmadani (1928 - 2017)

# REMERCIEMENTS

La maîtrise représente une expérience marquante, qui laissera sûrement une trace dans ma vie. Elle m'a permis non seulement de développer mes capacités pour la recherche scientifique, mais aussi a contribué au modelage de mon caractère et ma personnalité. Dans le cadre d'une adaptation à mon nouvel environnement, un grand changement a débuté par mon installation dans cette belle province qu'est le Québec (Canada), et mon intégration dans cette nouvelle société en adoptant et respectant ses valeurs tout en préservant les miennes.

Le mérite de ce travail revient en grande partie à mon directeur de recherche, le Dr Mahmoud Rouabchia, à qui j'exprime ma profonde reconnaissance. Je le remercie, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir formée au début de ma maîtrise, pour son grand soutien et ses conseils durant les expériences et mes cours, sa disponibilité, et son appui dans le but de réaliser cette étude.

Je remercie Mme Hyun Jin Park d'avoir participé à ma formation au début de ma maîtrise et pour m'avoir aidée à se familiariser avec le matériel et les appareils du laboratoire.

Je souhaite remercier le Dr Abdelhabib Semlali pour m'avoir aidé à optimiser le protocole de l'extraction et de dosage de l'ARN, et la réalisation de la technique RT-PCR.

Ma reconnaissance va encore au Dr Mahmoud Rouabchia et aux organismes subventionnaires : en tête la faculté de médecine de l'université Laval et le Fond Émile-Beaulieu, ainsi que le CRSNG et les IRSC pour leurs soutiens financiers.

Un énorme merci à mes parents que j'aime le plus dans ma vie, mon regretté père Ahmed Belmadani et ma chère mère Ghita Oubeni Ihya, que je ne remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, mes frères et sœurs. Un grand merci aussi à ma grande famille, à chacune de mes sœurs et à chacun de mes frères pour leur appui, encouragements et soutien moral même à distance. J'ai une pensée bien spéciale pour ma regrettée sœur Samira Blemadani.

Mes remerciements aux membres du laboratoire du Dr Mahmoud Rouabchia que j'ai côtoyé durant cette période d'étude, étudiant(e)s et stagiaires, avec qui j'ai échangé certaines idées et j'ai appris tant de nouvelles choses.

Merci à tous !

# AVANT-PROPOS

Ce mémoire présente les résultats des travaux que j'ai effectués tout au long de ma maîtrise en microbiologie-immunologie. J'ai réalisé entièrement les manipulations, avec la grande aide et sous la supervision du mon directeur de recherche le Dr Mahmoud Rouabchia, et avec l'aide de certains membres du laboratoire, et collaborateurs dont Mme Hyun-Jin Park et Dr Abdelhabib Semlali.

Le mémoire est structuré en trois chapitres :

Chapitre I : Ce chapitre est une revue de la littérature scientifique pertinente à la recherche présentée dans ce document. J'ai collecté, analysé et écrit ce chapitre qui a par la suite été révisé par mon directeur de recherche.

Chapitre II : Ce chapitre est présenté sous forme d'article scientifique. Le manuscrit intitulé: "*Dermaseptin-S1 decreases C. albicans growth and biofilm formation by suppressing the HWP1 and SAPs genes.*" Par Amine Belmadani, Abdelhabib Semlali and Mahmoud Rouabchia. Ce manuscrit sera soumis en décembre 2017 au journal : *Journal of Mycology*. Ce manuscrit est le fruit de nos recherches pour le présent mémoire de maîtrise en immunologie-microbiologie. J'ai réalisé la majorité des expériences qui ont conduit à l'obtention des résultats intégrés dans ce chapitre. J'ai écrit la première version de l'article sous la supervision du Dr Mahmoud Rouabchia et du collaborateur le Dr Abdelhabib Semlali. La version finale a été validée par l'ensemble des auteurs.

Chapitre III : Il s'agit d'une discussion générale mettant en évidence nos résultats avec des conclusions de l'étude et des perspectives. J'ai rédigé ce chapitre qui a été révisé par mon directeur de recherche.

# CHAPITRE I : INTRODUCTION

## Section 1 : L'ÉCOLOGIE BUCCALE

La cavité buccale est un carrefour important d'échanges directs et d'interaction permanente avec de multiples éléments. Principalement, l'interaction de l'air, la nourriture et les boissons avec la muqueuse buccale, la salive, les dents, les matériaux de restauration dentaire, font de la bouche un milieu favorable au développement des microorganismes. Parmi les microorganismes buccaux, nous trouvons *Candida albicans* (*C. albicans*) (Thein *et al.*, 2006). La bouche contient plusieurs sites naturels d'adhésion pour différents microorganismes ; parmi ces sites nous trouvons la gencive, la langue et les dents. La bouche peu aussi contenir d'autres surfaces d'attachement, dont les matériaux de restauration utilisés lors des traitements dentaires. Ces matériaux sont de taille et de nature différentes : les couronnes dentaires (céramiques, céramo-métalliques, métalliques, ou en or.), les implants dentaires en titane ou en zircone (dioxyde de zirconium  $ZrO_2$ ), et les prothèses dentaires (les résines acryliques, les résines composites et les verres ionomères) (Thein *et al.*, 2006). Les patients ayant ces matériaux dans la bouche sont plus susceptibles de développer des infections causées par l'adhésion et la prolifération du pathogène au niveau de ces différents sites d'adhésion. (Mattos *et al.*, 2009 ; Abaci *et al.*, 2010).

À la naissance, et bien avant l'éruption des dents, la cavité buccale est stérile ou colonisée par certains microorganismes du tractus génital de la mère, ou lors de l'allaitement. Les premières bactéries colonisant la cavité buccale sont les *Actinomyces*, les *Streptococcus* (*S*), les *Veillonella*, les *Neisseria*, les *Lactobacillus* et quelques levures. À l'apparition des dents, des bactéries anaérobies commencent à apparaître aussi, comme *Porphyromonas* (*P*), *Fusobacterium* (*F*) et *Prevotella*, localisées plus au niveau du sillon gingival dentaire. *S. gordonii* et *S. mutans* s'attachent sur l'émail des dents lors du développement de ces dernières. Alors que *S. salivarius* colonise de préférence l'épithélium buccal, la salive et les gencives. Ces bactéries forment ce qu'on appelle le glycocalix (composé de plusieurs substances polymères extracellulaires (SPE) contenant majoritairement des polysaccharides, des protéines et des lipides (Flemming *et al.*, 2001), qui font

partie intégrante du biofilm bactérien (Sugano *et al.*, 2016). Les SPE sont issus de la sécrétion bactérienne, de la lyse cellulaire et de molécules antibactériennes adsorbées ce qui augmente la résistance de ce dernier (Arciola *et al.*, 2012). Ils sont impliqués dans la formation de la matrice d'agrégation microbienne, l'adhésion bactérienne aux surfaces et les propriétés de flocculation microbienne (Sheng *et al.*, 2010 ; Long *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2003). Le glycocalix contient différents facteurs facilitant l'adhésion des bactéries et la formation de la plaque dentaire (Prescott *et al.*, 2010). Généralement, il y a d'autres biomatériaux (ex. glucanes et fructanes) qui sont insolubles et avec une bonne capacité d'adhésion. Par exemple, des glucanes sont sécrétés par les *S. salivarius* et *S. mutans*, sont attachés sur le réseau de polysaccharides et contribuent à la formation de la plaque dentaire à laquelle ils se fixent. Cette plaque sera ensuite colonisée par des streptocoques surtout *S. sanguis* et des *Neisseria*. Cette colonisation fait intervenir les mécanismes d'adhésion *via* les glucanes et les fructanes formant le glycocalix (Nicolas *et al.*, 2010 ; Prescott *et al.*, 2010; Squier *et al.*, 2001 ; Quirynen *et al.*, 2004 ; Bordas *et al.*, 2008).

La présence des champignons dans la cavité buccale peut être bénéfique, car ces champignons interagissent avec les bactéries pour l'établissement et le maintien d'une écologie bucco-dentaire saine (Krom *et al.*, 2014). Cependant, ces mêmes champignons peuvent causer des maladies lorsque des facteurs locaux ou systémiques prédisposent l'individu à une infection. Par conséquent, les levures qui étaient commensales peuvent devenir pathogènes. L'un des champignons les plus étudiés et les plus communs dans la cavité buccale est *C. albicans* (Fotos *et al.*, 1992 ; Baumgartner *et al.*, 2000).

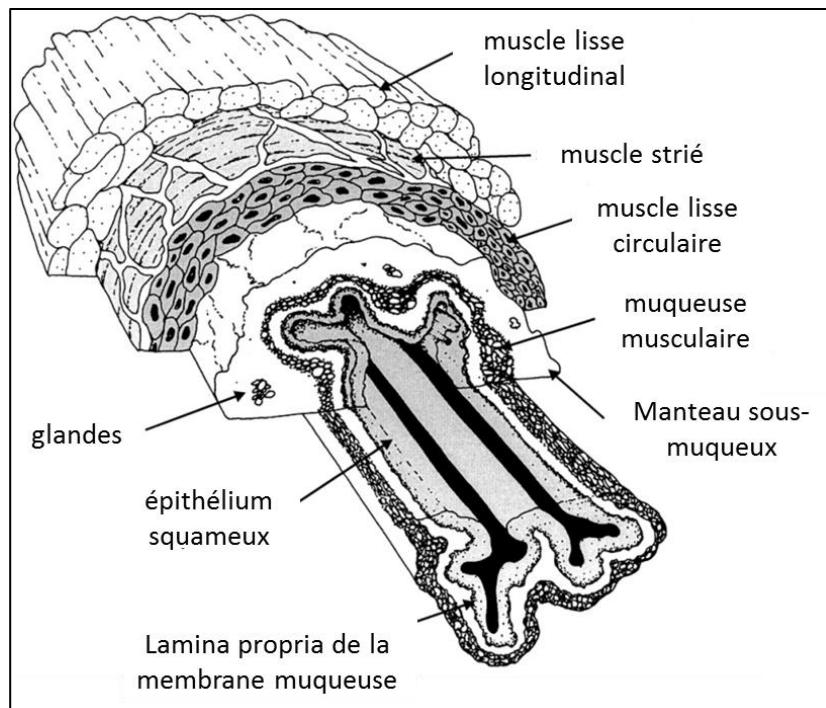
## 1.1. La muqueuse buccale

### 1.1.1. Caractéristiques de la muqueuse buccale

La muqueuse est une structure qui marque généralement les limites de toute cavité du corps en contact avec le milieu extérieur. La muqueuse forme une barrière entre le corps et l'environnement. Au niveau de la bouche, cette muqueuse

est appelée muqueuse buccale. Cette dernière est composée de deux structures distinctes : l'épithélium superficiel, et le tissu conjonctif sous-jacent appelé la *lamina propria* (Squier *et al.*, 2001 ; Lombardi *et al.*, 2009). La muqueuse buccale (comme la muqueuse de l'œsophage) est une surface muqueuse de type II [Fig. 1], recouverte d'un épithélium squameux stratifié. Elle constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes, les agents physiques et chimiques (Iwasaki *et al.*, 2007). Par son accessibilité, la muqueuse buccale est utilisée comme site d'immunisation sublinguale (Çuburu *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2009 ; Song *et al.*, 2009).

La surface tissulaire de la bouche comporte différentes muqueuses selon leurs fonctions. Nous trouvons la muqueuse masticatoire (gencives) qui représente approximativement 25% de la surface totale de la paroi buccale (Qin *et al.*, 2017). Il y a aussi la muqueuse spécialisée (dos de la langue), il constitue environ 15% et la muqueuse de la paroi, et environ 60% de la surface totale (Collins *et al.*, 1987).



**Figure 1: L'organisation des tissus de revêtement buccal et œsophagien humains (Squier *et al.*, 2001).**

### 1.1.2. Organisation de la muqueuse buccale

La muqueuse buccale est composée de deux structures bien distinctes : un épithélium, et un tissu conjonctif. Ces deux structures communiquent entre elles par la membrane basale (Muster *et al.*, 2004 ; Szpirglas, 1999).

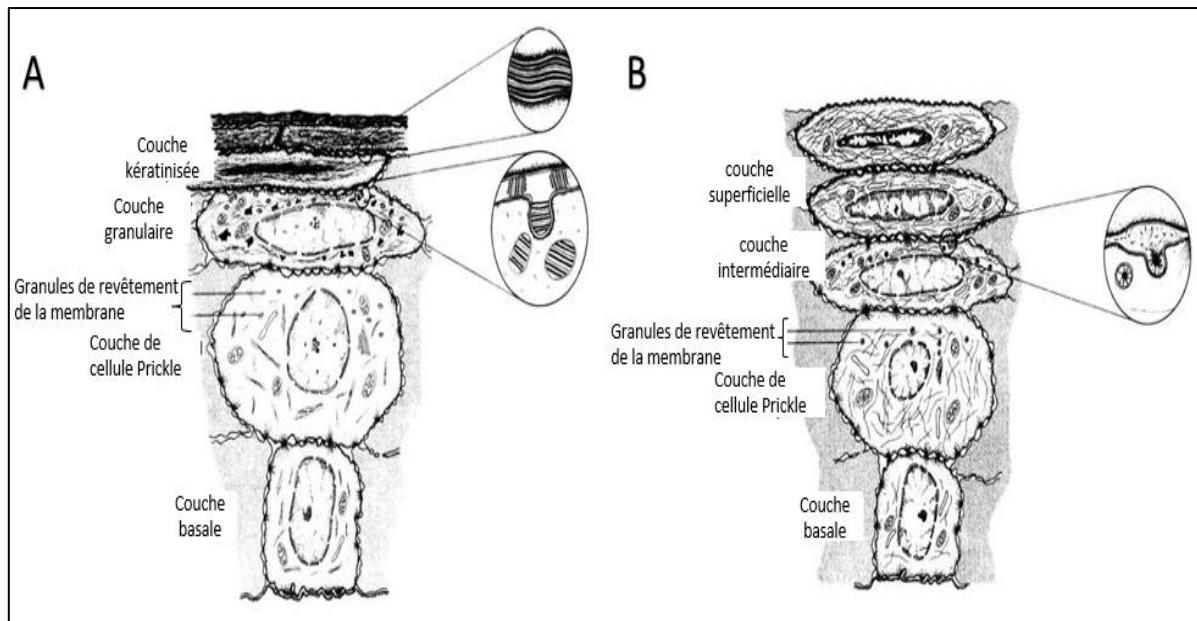
a. **L'épithélium** : Selon sa localisation, l'épithélium buccal peut être kératinisé ou non. Dans les régions soumises aux forces mécaniques associées à la mastication (qu'on trouve au niveau du palais dur et la gencive), l'épithélium est kératinisé. En revanche, les autres régions buccales dont celles du plancher de la bouche, la muqueuse qui nécessite une flexibilité pour s'adapter à la mastication, à la déglutition et faciliter la parole, est enrobée d'un épithélium non kératinisant (Squier *et al.*, 2001) [Fig. 2].

L'épithélium buccal, kératinisé ou non est constitué d'environ 4 couches cellulaires.

- La couche basale (*stratum germinativum*) est constituée de cellules de petite taille et de forme cubique. Ces cellules basales interagissent entre elles et avec la membrane basale.
- La couche épineuse (*stratum spinosum*) est formée de 15 à 20 strates (couches) de cellules polyédriques.
- La couche granuleuse (*stratum granulosum*) est composée de 5 à 8 couches de cellules aplatis, riches en granules de kératohyaline dans leur cytoplasme et des invaginations nucléaires.
- La couche cornée (*stratum corneum*) se trouvant dans l'épithélium kératinisé uniquement. Elle est formée de fines squames de kératinocytes acidophiles sans noyau (Qin *et al.*, 2017). C'est cette couche qui joue le rôle de barrière physique contre les agents des milieux environnents.

b. **La membrane basale (MB)** : C'est une structure acellulaire, de 50 à 800 nm d'épaisseur, selon sa localisation. La MB se trouve entre l'épithélium et le tissu conjonctif, elle est souvent irrégulière et constituée de projections cellulaires du tissu conjonctif (des papilles) (Squier *et al.*, 2001 ; Pawlina *et al.*, 2006). L'examen en microscopie électronique montre une MB formée de la *lamina densa*, la *lamina lucida* et de fibrilles d'ancrages. La MB joue un rôle

important dans la diffusion, entre autres, des nutriments entre l'épithélium et le tissu conjonctif. La MB joue aussi un rôle important dans la différenciation, le renouvellement et l'ancrage des cellules épithéliales au tissu conjonctif (Szpirglas, 1999).



**Figure 2: Observation par microscopie électronique des différentes couches de l'épithélium. (Squier et al., 2001) : (a) l'épithélium oral kératinisé et (b) l'épithélium oral et œsophagien non kératinisé.**

c. **Le tissu conjonctif** : Ce tissu est formé d'une matrice composée essentiellement de collagène et de peu de cellules, dont les fibroblastes. Il offre un support mécanique et nutritionnel de l'épithélium (Squier et al., 2001 ; Pawlina et al., 2006). Le tissu conjonctif est constitué d'une structure superficielle dite *lamina propria* et d'une structure profonde correspondant à la sous-muqueuse (Szpirglas, 1999).

i) La *lamina propria* : Elle est formée de deux couches, une couche réticulaire et une couche papillaire, qui sont mieux organisées dans la muqueuse masticatoire, comparativement aux autres muqueuses (Goldberg, 1993). La *lamina propria* contient des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules nerveuses et des cellules immunitaires. Les fibroblastes sont plus nombreux comparativement aux autres cellules.

ii) La sous-muqueuse est la dernière couche du chorion ; elle contient des glandes salivaires et des adipocytes. Selon l'emplacement dans la bouche, la sous-muqueuse peut être en contact avec le périoste (palais dur), l'os alvéolaire ou le tissu musculaire des joues et des lèvres (Goldberg, 1993).

#### 1.1.3. Propriétés et fonctions de la muqueuse buccale

La muqueuse buccale représente une surface humide et, malgré le fait qu'elle présente une continuité avec la peau, elle est considérablement différente parce qu'elle est plus colorée. Cette apparence est due à plusieurs facteurs, dont l'épaisseur de l'épithélium, la quantité de mélanine dans l'épithélium, le degré de kératinisation, la présence de petits vaisseaux sanguins dans le tissu conjonctif sous-jacent. Pour maintenir cette barrière importante, les tissus épithéliaux subissent un renouvellement et une réparation constants (Presland *et al.*, 2002). L'épithélium est constitué à plus de 90% de cellules épithéliales, qui se renouvellent de manière constante grâce à une division cellulaire dans les couches plus profondes (Squier *et al.*, 2001 ; Pawlina *et al.*, 2006). Dans l'épithélium, les cellules épithéliales sont appelées kératinocytes parce qu'elles produisent un ensemble de protéines structurales : les kératines. Ces kératines sont importantes pour le maintien de l'intégrité cellulaire et tissulaire. En plus des kératines, nous trouvons deux autres de structures d'adhésion cellulaire : les desmosomes et les hémidesmosomes. Ces structures permettent aux kératinocytes d'interagir les uns avec les autres et aussi avec la membrane basale (Presland *et al.*, 2002). La muqueuse buccale possède un épithélium stratifié hautement spécialisé offrant une protection contre les dommages physiques, chimiques, thermiques, etc. (Presland *et al.*, 2002).

Par sa structure multicouche et sa composition lipidique, l'épithélium buccal protège le tissu sous-jacent contre les pertes liquidiennes de l'intérieur vers l'extérieur. Il bloque aussi l'entrée d'agents potentiellement nocifs. Ces agents nocifs peuvent être des microorganismes, des toxines et enzymes d'origines microbiennes, etc. (Squier *et al.*, 2001). La fonction de protection offerte par la

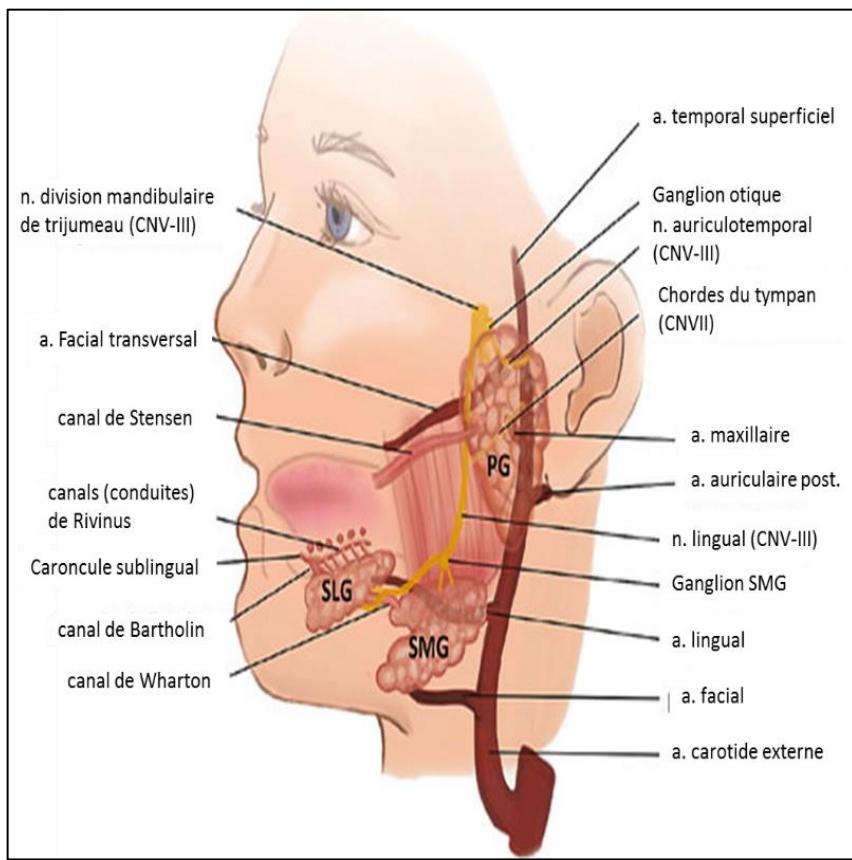
muqueuse buccale est présente généralement dans toute la cavité buccale, sauf dans les régions spécialisées comme les jonctions dento-gingivales. Les fonctions de la muqueuse buccale peuvent être perturbées par différentes conditions, dont les blessures, l'utilisation d'agents chimiques, etc. En effet, il a été démontré que la thérapie anticancéreuse affecte de manière importante l'intégrité de la muqueuse buccale. Les molécules utilisées en chimiothérapie, et la radiothérapie limitent la prolifération des cellules épithéliales ce qui cause l'amincissement de l'épithélium et son ulcération. L'effet se manifeste d'abord dans les tissus où la prolifération est rapide (comme les muqueuses buccales et gastro-intestinales). Les traitements anti-cancers affectent aussi les glandes salivaires, provoquant une réduction de la production de la salive. Le manque de salive ou la réduction de sa qualité antimicrobienne augmente le risque d'infections oropharyngées (Qin *et al.*, 2017).

## 1.2. Rôle de la salive dans la protection contre les infections buccales

Il y a trois paires de glandes salivaires majeures chez l'homme, les glandes parotides (GP) qui sont les plus grandes, les glandes submandibulaires (GSM) et les glandes sublinguales (GSL), ainsi que les petites glandes secondaires dispersées sous la muqueuse de la cavité buccale (Ellis *et al.*, 2012) [fig. 3].

Les cellules constituant les glandes salivaires sécrètent différents types de salive. La GP est composée de cellules acinaires séreuses et produit une salive séreuse aqueuse. Les GSM et GSL sont des glandes composées de plusieurs types cellulaires, elles contiennent à la fois des cellules acinaires muqueuses et séreuses. La GSM possède une majorité de cellules acinaires séreuses avec moins de cellules muqueuses, tandis que la GSL est composée majoritairement de cellules acinaires muqueuses. Chez un adulte en bonne santé, les glandes salivaires principales produisent plus de 90% de la salive, le reste est produit par les glandes mineures (Holmberg *et al.*, 2014). Une personne adulte produit 1 à 2 litres de la salive par jour. Cette salive est composée de 99,5% d'eau et 0,5% de

protéines : mucus, amylase et lysozyme, ainsi que des électrolytes :  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  (Sherwood, 2015).



**Figure 3: Aperçu de l'anatomie des glandes salivaires (Holmberg et al., 2014).**  
 Les trois glandes salivaires majeures sont les GP, GSM et GSL. Les conduits de Stensen et Wharton sont les principaux canaux excréteurs de PG et SMG, respectivement. L'approvisionnement en sang est principalement fourni à la GP par l'artère transversale du visage et le GSM par l'artère du visage. L'innervation parasympathique provient des nerfs post-ganglionnaires des ganglions otiques et submandibulaires. Le ganglion otique est étroitement associé à la division mandibulaire du nerf trijumeau (CNV-III) et le ganglion sous-mandibulaire est à côté du nerf lingual. Les nerfs post-ganglionnaires sympathiques (non représentés) proviennent du ganglion cervical supérieur et innervent les glandes le long des vaisseaux sanguins.

La salive a plusieurs fonctions. Elle contribue à la lubrification de la cavité buccale pour mieux parler, déglutir, manger et déguster. La salive maintient la santé des dents en conservant l'homéostasie (l'équilibre physiologique) de la cavité buccale, tout en fournissant des fonctions de protection grâce aux enzymes (exemple : lysozymes), aux protéines (exemple : défensines) et aux immunoglobulines (exemple : IgAs) (Devoize et al., 2010). La salive facilite la

dégradation des sucres grâce aux amylases. La salive régule le pH ce qui contribue à la prévention des caries (Lee *et al.*, 2009 ; Holmberg *et al.*, 2014). Cliniquement, les personnes ayant une sécrétion salivaire faible sont plus susceptibles de développer des infections comparativement aux personnes ayant une sécrétion salivaire normale. La présence d'histatines (Ahariz *et al.*, 2010) et d'IgA dans la salive (Elguezabal *et al.*, 2004 ; Marcotte *et al.*, 1998) protège l'hôte contre les infections buccales, dont la candidose. L'histatine, les IgA inhibent l'adhésion de *Candida* aux surfaces rencontrées dans la cavité buccale.

### 1.3. Les conditions physiologiques et pathologiques de la cavité buccale

La bouche est un milieu riche en microorganismes et est propice à leur multiplication. Certains de ces microorganismes sont bénéfiques, d'autres peuvent provoquer une infection. Ces infections peuvent être dues à une prédisposition de l'hôte ou à la présence de facteurs, dont les prothèses dentaires, favorisant la surcroissance des microorganismes (Abaci *et al.*, 2010).

La cavité buccale présente un microbiote par excellence avec un parfait équilibre entre l'hôte et la flore buccale. Cet écosystème est entretenu normalement par une humidité continue due à la présence de la salive, divers nutriments et les agents antimicrobiens sécrétés par les cellules de l'hôte (Marcotte *et al.*, 1998).

Le microbiote contient entre autres des :

- 1) Firmicutes (prédominants) : genre *Streptococcus*, famille Veillonellaceae, genre *Granulicatella*
- 2) Proteobactéries: genre *Neisseria*, *Haemophilus*
- 3) Actinobactéries: genre *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*
- 4) Bacteroides: genre *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*
- 5) Fusobactéries: Genre *Fusobacterium*.

Ces espèces résident dans différentes niches dans la bouche qui sont localisées au niveau des surfaces dentaires, des joues, du palais dur, de la langue et même dans la salive (Zaura *et al.*, 2009).

Les bactéries croissent sous forme de microcolonies dans un réseau polysaccharidique d'origine bactérienne et salivaire appelée biofilm. Plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans la formation du biofilm. Parmi ces facteurs nous trouvons :

- 1) La capacité d'adhérence des microorganismes suite à la synthèse de polysaccharides extracellulaires insolubles (exemple : le glycocalix).
- 2) La composition de la salive qui joue un rôle de tampon et de contrôle de l'acidité du milieu engendrée par le métabolisme bactérien.
- 3) Certaines mucines qui sont impliquées dans les phénomènes d'agglutination et d'adsorption bactériens.
- 4) L'anaérobiose au niveau du sillon gingival dentaire.
- 5) Les plaques dentaires et gingivales.
- 6) La diète alimentaire aussi constitue un apport de substances nutritives aux bactéries et peut engendrer une modification du pH (comme dans le cas du métabolisme glucidique acidogène) et influencer l'attachement des bactéries aux polysaccharides extracellulaires exogènes.
- 7) Des molécules du système immunitaire ayant des propriétés antimicrobiennes (lysozyme, lactoferrine, IgA sécrétaires et autres, le système du complément, des cellules immunitaires, peptides antimicrobiens... etc.) (Prescott *et al.*, 2010).

La composition du biofilm est modulée par plusieurs facteurs (Zaura *et al.*, 2009), dont la teneur en oxygène, la qualité et la quantité de la salive, le fluide crévical gingival et le régime alimentaire. Ces facteurs jouent un rôle majeur dans la composition microbienne de ces niches écologiques bucco-dentaires (Zaura *et al.*, 2009; Sreenivasan *et al.*, 2011). À titre d'exemple, la salive assure la protection des tissus durs et des tissus mous. Cette protection est obtenue par le flux salivaire, le pouvoir tampon de la salive, le réservoir ionique et les propriétés antibactériennes. Cependant, lors de candidose buccale, l'effet de la salive est controversé parce que plusieurs études ont mené à des résultats contradictoires. D'un côté, la salive montre un effet de nettoyage physique et contient des molécules de la défense innée, dont le lysozyme, la lactoferrine, l'histatine, la

calprotectine et l'IgA, qui interagissent avec les espèces de *Candida* et diminue l'adhérence et la colonisation des surfaces buccales. En revanche, d'autres composants de la salive, dont les mucines, la stathérine et les protéines riches en proline facilitent l'adhésion de *C. albicans* (particulièrement sur les résines acryliques). (Pereira-Cenci *et al.*, 2008), ce qui pourrait contribuer à la formation de biofilm.

## Section 2 : CANDIDA ALBICANS

Les infections buccales à *Candida* (candidoses orales) semblent avoir été décrites dès le 2e siècle apr. J.-C. par Claudius Galien de Pergame, qui a appelé à cette époque le pathogène causal *aphthas albus*. Ce n'est qu'au milieu du 19e siècle que la nature clinique de la candidose orale a été définie et l'agent étiologique identifié. Il y a eu une grande variété de synonymes utilisés pour les membres du genre *Candida*, 166 synonymes étant reconnus pour *C. albicans* dans le monde (Samanta, 2015).

Le genre *Candida* appartient à la classe Saccharomyces (Hemiascomycetes). Il compte plus de 200 espèces. Environ 20 espèces ont été associées à une candidose chez l'homme et les animaux dont sept espèces sont d'une importance majeure. *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. glabrata* sont les plus fréquemment isolés des spécimens cliniques. Les autres espèces pathogènes sont : *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* et *C. pseudotropicalis*. Chez les chiens, *C. natalensis* (Samanta, 2015).

Il y a plusieurs types d'infections fongiques qui peuvent toucher la muqueuse buccale, l'oesophage, le tractus uro-génital et les parties humides de la peau (Odds, 1988). Les candidoses vaginales sont très fréquemment observées ; l'espèce *C. albicans* à lui seul cause 88 à 95 % de ces infections (Regulez *et al.*, 1994 ; Mendling *et al.*, 2000 ; Buchta, 2004).

### 2.1. Historique de la découverte de *C. albicans*

C'est dans l'ancienne écriture sanskrite de l'Inde (Atharva Veda, 2000-1000 av. J.-C.), que la première description d'une infection fongique a été documentée. Au dix-septième siècle, un médecin allemand (Engelbert Kaempfer) travaillant en Inde a d'abord signalé des cas cliniques de mycètes qui ont été suivis par des cas de missionnaires français à Pondichéry, en Inde (1714). Les maladies fongiques des plantes ont également été observées dans d'autres Veda vers 1200 av. J.-C. Le muguet buccal était déjà connu par Hippocrate (460-377 av. J.-C.) au IVe siècle av. J.-C.. Ce dernier, a d'abord démontré la candidose pseudomembraneuse orale

dite « *aphthae albae* » qui a ensuite été confirmée par Claudius Galien (130-200 av. J.-C.) (Ainsworth, 1986, Samanta, 2015). La première description d'un champignon pathogène revient à un jeune conférencier allemand nommé Bernard (von) Langenbeck (Knoke *et al.*, 2006). Plus tard, Berg et Wilkinson ont décrit séparément et pour la première fois la candidose orale en 1841 et la candidose vaginale en 1849 (Samanta, 2015). En 1849, Robin nommera le microorganisme d'*Oïdium albicans* (Robin, 1853). C'est l'appellation utilisée jusqu'en 1890, quand Zopf introduira le nom *Monilia albicans* pour l'agent des monilioses (Zopf, 1890). *Candida* a été décrit pour la première fois comme un genre distinct en 1923 par Berkhout (Samanta, 2015). En cette année de 1923, Christine Marie Berkhout proposa le nom « actuel » *C. albicans* dans sa thèse pour distinguer la levure retrouvée chez l'homme et les champignons du genre *Monilia* (levure végétale) qui cause la dégradation des fruits (Mackinnon *et al.* 1945). *Candida parapsilosis* a d'abord été le premier isolé par Ashford à partir des selles d'un malade diarrhéique à Porto Rico en 1928 (Samanta, 2015). Alors ce genre est regroupé avec celui des levures anascosporées caractérisées par la production de vrai mycélium (forme hyphé) ou pseudo-mycélium (pseudo-hyphé). La fin du 19e siècle et le début du 20e siècle connaîtront plusieurs observations cliniques des infections candidosiques qui peuvent atteindre différents tissus et organes (ongles, peau, vagin, œsophage, méninges, reins, cœur.etc.), mais ce n'est qu'à partir de 1950 que l'utilisation des antibiotiques à large spectre augmentera la prévalence des candidoses (Chabasse *et al.*, 2006). Ceci suggère que l'augmentation des infections causées par *C. albicans* a été remarquée lors de l'apparition des antibiotiques. Cette augmentation peut être expliquée par le fait que les antibiotiques tuent les microorganismes pathogènes ainsi que ceux qui sont nécessaires pour maintenir l'équilibre écologique. Cette perturbation favorise la croissance et propagation de *Candida* causant les candidoses.

Pendant longtemps *C. albicans* était considéré comme un microorganisme à reproduction asexuée à cause de l'observation de conidiogénèse caractérisée par une spore formée par bourgeonnement d'une simple cellule mère. Cependant, plusieurs études ont montré l'existence d'un cycle sexué "mating-type" (type sexué)

chez *Candida*, ce qui explique l'origine de la diversité génétique de ce microorganisme (Magee *et al.*, 2000 ; Hull *et al.*, 2000). Il existe plusieurs espèces de *Candida*, cette grande diversité d'espèces pourrait s'expliquer par la perte de caractère de la reproduction sexuée du genre *Candida* ancestral favorisant cette diversité (Chabasse *et al.*, 2006).

Taxonomiquement, le genre *Candida* représente plus de deux cents espèces dont une vingtaine ont été isolées chez l'Homme. Les plus connues sont *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* et *C. tropicalis* et *C. glabrata*. Cette dernière espèce représente le deuxième agent causal de la candidose humaine après *C. albicans* (Dujon *et al.*, 2004). Ces espèces partagent la majorité des caractéristiques microscopiques et macroscopiques, et colonisent différents sites du corps humain, dont la cavité buccale, le tractus gastro-intestinal et génito-vaginal (Akpan *et al.*, 2002). On peut les distinguer grâce à leurs différents critères phénotypiques (production de tube germinatif ou de chlamydospores, température de croissance, l'assimilation des hydrates de carbone, etc.) ou encore grâce à la morphologie (contour régulier, rugueux ou blanc avec une apparence crèmeuse, etc.) des colonies dans les différents milieux de culture (Khelif *et al.*, 2011).

Cliniquement, il existe au moins 15 espèces distinctes de *Candida* qui causent des maladies humaines, mais 90% des infections sont causées par *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*. Chacun de ces microorganismes possède un potentiel unique de virulence, une susceptibilité antifongique et une épidémiologie. Cependant, pris dans leur ensemble, les infections importantes causées par ces espèces de *Candida* sont généralement appelées candidoses invasives. Les infections superficielles à *Candida* (en particulier les infections au niveau de l'oropharynx, l'œsophage et le vagin) ne sont pas considérées comme des maladies classiquement invasives, mais elles sont incluses dans les mêmes directives cliniques de diagnostic et de traitement (Pappas *et al.*, 2015).

Au cours des dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour les infections à *Candida* et pour *C. albicans* en particulier, parce que ces infections sont devenues plus fréquentes et mortelles (McCullough *et al.*, 1996). Les études

expérimentales et cliniques nous ont permis de comprendre la pathogénie (virulence), l'épidémiologie, la génétique et la biochimie de *C. albicans* (McCullough et al., 1996).

## 2.2. Écologie de *C. albicans*

### 2.2.1. Distribution et habitats naturels

Généralement dans la nature, les levures se trouvent un peu partout, surtout dans les milieux liquides riches en matière organique (Gray, 1954). Le genre *Candida* fait référence à des levures ubiquitaires qui ne présentent aucune limitation dans leur répartition géographique (air, sol, fruits, céréales, produits laitiers, viandes, etc.). Certaines espèces comme *C. albicans* sont commensales présentes chez l'Homme et de nombreuses espèces animales. Par ailleurs, les espèces les plus fréquemment isolées chez l'animal semblent être différentes de celles habituellement retrouvées dans le milieu extérieur. *C. albicans* est un microorganisme normal de la flore intestinale des humains, mais peu se retrouver également dans les voies urogénitales (Chabasse et al., 2006). Dans ces habitats du corps humain, *C. albicans* est en équilibre numérique avec les flores bactériennes, réduisant la pathogénèse de la levure. Il est important de mentionner que *C. albicans* ne fait pas partie de la flore de la peau saine, il ne se développe pas sur les téguments sains, mais peut infecter un épithélium préalablement lésé (blessure ou brûlure de la peau). La présence de *C. albicans* sur les aliments relève, en principe, de conditions sanitaires déficientes (Chabasse et al., 2006).

Chez les humains et les animaux, *Candida* colonise les muqueuses après un contact avec des aliments. Lorsque la surveillance immunologique est défectueuse (immunosuppression, utilisation prolongée d'antibiotiques ou de stéroïdes, etc.) *Candida* se multiplie, change de forme et peut causer de l'inflammation. Dans ces conditions, *C. albicans* peut même envahir les parties les plus profondes des tissus pour établir des infections (ou candidose). Dans l'environnement, *Candida* peut-être isolé même de milieux à forte teneur en sel (Samanta, 2015).

## 2.2.2. Conditions de cultures, isolement et croissance

*Candida* peut être cultivé sur des milieux spéciaux tels que le milieu « *Staib Agar* » (à base de graines de Niger), le milieu « *Pal's Agar* » (à base de graines de tournesol) ou le milieu « *tobacco Agar* » (à base de tabac) (Khelif *et al.*, 2011). *Candida* peut aussi être cultivé sur des milieux bactériologiques généraux tels que l'Agar de dextrose Sabouraud (avec pénicilline, streptomycine, chloramphénicol), gélose de dextrose de pomme de terre, gélose au sang (par injection intraveineuse dans un cobaye ou lapin). *Candida* est généralement cultivé en aérobie, et à différentes températures (25 à 37°C) et à un pH acide ou alcalin (Samanta, 2015). *C. albicans* peut croître en présence d'une faible concentration (0,04%) de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique. Une culture sur milieu solide montre des colonies en forme circulaire, blanches ou opaques (une transition opaque - blanche est nécessaire), avec une consistance crémeuse (Samanta, 2015). Pour l'identification de l'espèce de *Candida*, un milieu chromogène (CHROMagar) peut être utilisé, dans lequel différentes espèces se caractérisent par différentes couleurs telles que *C. albicans* (vert / vert bleuâtre), *C. tropicalis* (bleu / violet à l'auréole) et *C. krusei* (rose / colonies truffées) (Samanta, 2015 ; Khelif *et al.*, 2011).

## 2.2.3. Mode de vie de *C. albicans* et son interaction avec d'autres microorganismes

*Candida* vit en mode saprophyte dans le milieu extérieur, mais en mode commensal ou parasite chez les humains (Chabasse *et al.*, 2006). L'espèce *C. albicans* est un organisme eucaryote ubiquitaire, présent chez environ 60% de la population (Edwards Jr *et al.*, 1997 ; Mavor *et al.*, 2005). C'est un microorganisme polymorphe qui peut adhérer à différents endroits du corps et peut croître en tant que levure, pseudohyphe, et hyphe (Szpirglas *et al.*, 1999). Dans son environnement, *C. albicans* interagit avec les constituants de son milieu. Ces interactions peuvent être interespèce et même inter-royaume. À titre d'exemple, *C. albicans* peut interagir avec *S. mutans* (Buijssen *et al.*, 2007 ; Jarosz *et al.*, 2009),

et *P. aeruginosa* (Hogan *et al.*, 2004). Lors de ces interactions, les deux bactéries (*S. mutans* et *P. aeruginosa*) semblent inhiber la formation des hyphes de *C. albicans*, par conséquent, elles contrôlent la pathogenèse de la levure.

### 2.3. Métabolisme de *C. albicans*

Le milieu de croissance de *C. albicans* peut-être simple ou défini, riche en carbone (le glucose), en azote (les sels d'ammonium) et en phosphate (Shepherd *et al.*, 1976). Le temps de division de *C. albicans* dans un milieu défini à 30°C est de 0,3 à 0,4 h (Shepherd *et al.*, 1976).

La morphologie des cellules est tributaire de la source de carbone dans le milieu de culture. Le maltose produit une morphologie mycéliale, le lactate produit une morphologie levure, alors qu'avec du fructose ou du glucose, *C. albicans* adopte une morphologie mixte, pseudo-mycéliales et mycéliales (Shepherd *et al.*, 1976). La température, le pH, la présence d'azote dans le milieu sont aussi des facteurs qui modulent la morphologie cellulaire de *C. albicans* (Odds, 1988).

La production ou non de l'uréase, et la fermentation des sucres sont deux caractéristiques biochimiques importantes qui nous aide à identifier les espèces de *Candida*. Par exemple, *C. albicans* et *C. tropicalis* sont capables d'assimiler le glucose, le maltose et le sucre, mais pas le lactose, alors que *C. pseudotropicalis* et *C. krusei* sont capables d'assimiler le glucose, le sucre et le lactose, mais pas le maltose. En revanche, *C. parapsilosis* assimile seulement le glucose. Tous ces glucides sont transformés en acide (comme l'acide tartrique) et en gaz (comme le CO<sub>2</sub>) sauf dans le cas de la consommation du sucre par *C. albicans* qui se transforme en acide seulement (Samanta, 2015).

Le genre *Candida* partage la majorité de ses caractéristiques métaboliques avec les Ascomycètes. Il est capable de fermenter le sucre, dépourvu d'activité uréase, et incapable d'assimiler l'inositol (Chabasse *et al.*, 2006). *Candida* peut métaboliser du glucose aussi bien en milieu anaérobie qu'en milieu aérobie. Un apport constant de carbone est essentiel pour de la levure favorisant l'adoption de différentes formes, blastospore, pseudo-hyphes (Akpan *et al.*, 2002).

La voie de synthèse des sphingolipides est importante et impliquée directement dans l'apparition des hyphes ; ces derniers contribuent à la formation de biofilms. L'inhibition de la voie de biosynthèse des sphingolipides [mannosyle diinositolphosphoryl céramide, M (IP) 2C] de myriocine ou auréobasidine altère la capacité de *C. albicans* à former des biofilms (Lattif *et al.*, 2011).

#### 2.4. La génétique de *C. albicans*

Selon l'espèce, *Candida* contient 6 à 9 paires de chromosomes. La nature du génome est hétérozygote (Whelan *et al.*, 1981) et est diploïdes dans la plupart des espèces dont *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*. En revanche, un génome haploïde est détecté chez *C. guilliermondii* et *C. lusitaniae* (Samanta, 2015).

*C. albicans* n'a pas de forme haploïde ou homozygote connue. Il est l'un des premiers agents pathogènes eucaryotes sélectionnés pour le séquençage du génome. Puisque *C. albicans* est l'espèce fongique la plus souvent impliquée en pathologie humaine et animale, la majorité des études sont réalisées avec *C. albicans*. Le génome de *C. albicans* est entièrement séquencé depuis 2002, est accessible sur le site du " Stanford Genome Technology Center". (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>). Le séquençage a été réalisé avec la souche SC5314, utilisée le plus souvent dans les analyses moléculaires, les analyses de virulence dans les modèles animaux et le caryotype électrophorétique diploïde classique. La séquence du génome révèle une adaptabilité de la levure à son environnement. Parmi ces adaptations notant la capacité de *C. albicans* à traverser le tube digestif, même en milieu très acide. Aussi, *C. albicans* possède un certain nombre de gènes régulateurs du pH (Jones *et al.*, 2004 ; Ainsworth, 1986).

La taille du génome de *C. albicans* est de 10,6 - 15,5 Mbp avec un nombre de gènes variant de 5 733 à 6 318. Le génome contient les éléments de la séquence répétée majeurs (SRM) où la recombinaison génétique peut avoir lieu (constitue 1 - 2% du génome). Une autre caractéristique du génome de *C. albicans* est la présence d'un seul polymorphisme nucléotidique (SNP) pour chaque 330 pb dans la souche SC5314 (Samanta, 2015). Le taux en guanine et en cytosine (G+C

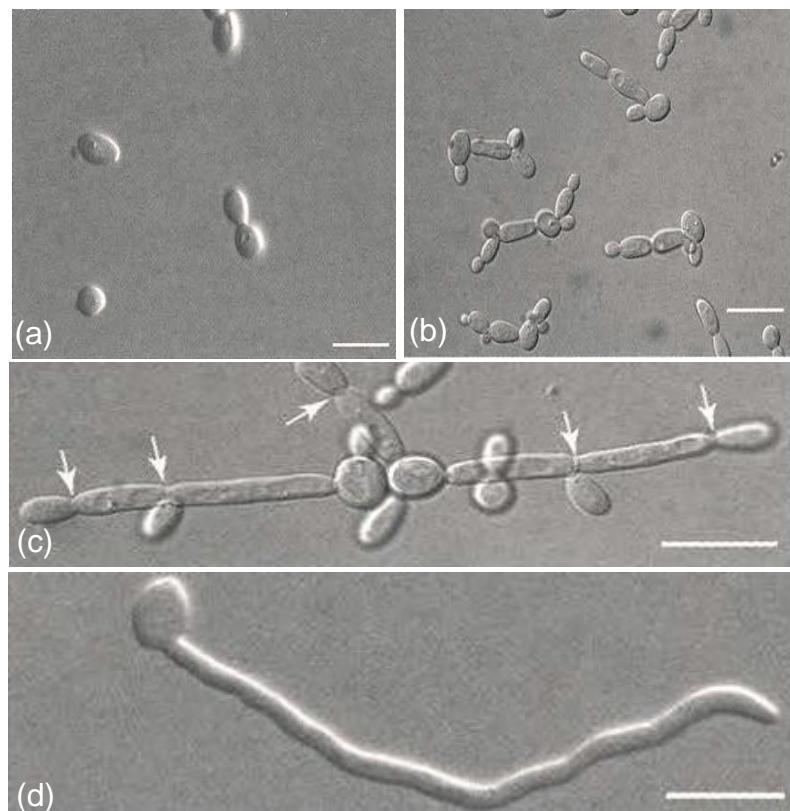
%) est de 35%. Une des particularités génétiques de cette espèce est le codon CUG qui code pour une sérine au lieu d'une leucine (Ainsworth, 1986).

La levure *C. albicans* a un mode clonal de propagation. Une analyse génétique de la population de *C. albicans*, chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) indique que les deux conséquences fondamentales de la reproduction sexuée (à savoir, la séparation et la recombinaison) sont absentes dans cette population de *C. albicans* (Pujol *et al.*, 1993). Le mode de reproduction connu pour *C. albicans* est la reproduction clonale (Pujol *et al.*, 1993). Le manque de preuves de la présence de la ségrégation et de la recombinaison chez *C. albicans* semble confirmer l'absence de reproduction sexuée. Cependant, une reproduction clonale de *C. albicans* ne signifie pas que la recombinaison est totalement absente (Pujol *et al.*, 1993). De ce fait, une étude sur le mode de reproduction montre que la recombinaison est sévèrement restreinte (Tibayrenc *et al.*, 1991).

## 2.5. La cytologie de *C. albicans*

Le genre *Candida* contient plusieurs espèces de champignons 'levuriformes' et représente collectivement un groupe très hétérogène morphologiquement (Akpan *et al.*, 2002). Une caractéristique du genre *Candida* est sa capacité à croître de manière polymorphe, soit sous la forme de levures bourgeonnantes (blastospores) ou sous forme de filaments (vraies hyphes et pseudohyphes) (Williams *et al.*, 2013). La présentation sous une forme ou une autre varie selon l'espèce de *Candida*. Les trois formes sont exprimées par *C. albicans* et *C. tropicalis*, tandis que d'autres espèces telles que *C. parapsilosis* peuvent adopter les formes de levure et de pseudohyphes. Certaines espèces telles que *C. glabrata* peuvent avoir les formes de levure et de pseudohyphes, mais principalement la forme de levure dans l'environnement et dans l'hôte. Chez *C. albicans* la forme de levure est ovale (3,5 - 6  $\mu\text{m}$  x 6 - 10  $\mu\text{m}$ ) avec bourgeonnement axial ou bipolaire [Fig. 4]. Les hyphes sont des tubes longs composés de cellules avec des côtés parallèles, une largeur uniforme et un véritable septum sans contrainte [Fig. 4]. Il y a une communication cellule-cellule au niveau de septa. Les pseudohyphes sont des chaînes de cellules

ellipsoïdes allongées avec constriction entre elles. Dans la levure et les pseudohyphes, la division nucléaire et la formation de septa se déroulent près du bourgeon, alors que dans les hyphes, les deux procédures se produisent dans le tube germinal (Samanta, 2015).



**Figure 4: Les différentes formes de *C. albicans* (Sudbery et al., 2004).** (a) montre un bourgeonnement cellulaire ; (b et c) montrent des pseudohyphes qui ont un étranglement au niveau du bourgeon. ; (d) montre une forme hyphe. Toutes les formes de pseudohyphes ressemblent superficiellement aux hyphes, mais ont des constrictions aux positions des septa ou septum (marqué par les flèches sur l'image c) et montrent une ramification régulière. Les barres d'échelle représentent 10  $\mu$ m.

La levure et les pseudohyphes peuvent croître en suivant le cycle cellulaire, par contre les cellules hyphales restent arrêtées dans la phase G1 après l'achèvement du premier cycle cellulaire jusqu'à ce qu'elles puissent accumuler suffisamment de masse cytoplasmique pour entrer dans le deuxième cycle de division. Ainsi, les formes hyphes sont moins ramifiées comparativement aux pseudohyphes. Les cellules hyphales contiennent une organelle spécialisée, connue sous le nom de “spitzenkorper”, qui aide à la croissance aux extrémités des hyphes (Samanta, 2015).

Il existe une quatrième forme moins répandue, la chlamydospores, caractéristique de *C. albicans* et de *C. dubliniensis*. Les cellules sont d'une taille plus importante (6 à 15 µm) avec une paroi épaisse, réfringente et relativement résistante à la digestion enzymatique. Les chlamydospores constituent une forme de protection de *C. albicans* lorsqu'elle se trouve dans un milieu non favorable à sa croissance (Chabasse *et al.*, 2006). Les chlamydospores restent attachés aux hyphes ou aux pseudohyphes par un suspenseur. Le noyau se divise dans le suspenseur pour donner une chlamydospore fille dans laquelle le noyau pourrait migrer (Samanta, 2015).

## 2.6. L'enveloppe cellulaire de *C. albicans*

*C. albicans* a une structure intracellulaire caractéristique des cellules eucaryotes. La cellule est entourée d'une membrane cellulaire extérieure (paroi) qui forme la membrane plasmique contenant des stérols, notamment l'ergostérol. Un cytoplasme avec un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi caractéristique des eucaryotes et un noyau avec une double membrane nucléaire, qui protège le matériel génétique (6 chromosomes) et le nucléole (Akpan *et al.*, 2002). Ce qui différencie *Candida* d'une cellule eucaryote classique est la présence d'un système vacuolo-vésiculaire chez la cellule eucaryote classique (Barelle *et al.*, 2006). Généralement, le genre *Candida* regroupe des levures non pigmentées, non encapsulées, à bourgeonnement polaire ou bipolaire et à paroi globalement bilamellaire (Ainsworth, 1986).

La paroi de *C. albicans* confère à la levure sa forme et sa stabilité mécanique et garantit le maintien de l'intégrité cellulaire en la protégeant de diverses agressions extérieures (manque de nutriments, de pH, de température, etc.). Cette paroi présente également une zone de contact privilégiée entre la cellule et son environnement, et elle est aussi impliquée dans la reconnaissance des constituants de l'hôte, et dans l'adhésion. La paroi constitue 15 à 30% du poids sec de la levure (Chabasse *et al.*, 2006).

La paroi est aussi le site privilégié pour plusieurs molécules, dont les antifongiques et le farnésol impliqués dans la régulation de la croissance de *C.*

*albicans*. Le farnésol, une molécule de détection du quorum fongique « quorum sensing en anglais » qui déforme la paroi cellulaire et change l'ultrastructure de *C. albicans* (Décanis *et al.*, 2011), la détection du quorum est un mécanisme de régulation utilisé par les microorganismes pour réguler l'expression des gènes d'une manière dépendante de la densité cellulaire au sein d'une même population (Fuqua *et al.*, 1994 ; Papenfort *et al.*, 2016). La famille des échinocandines antifongiques agit sur la voie de biosynthèse des ergostérols inhibant la synthèse de la paroi cellulaire. Les antifongiques inhibent aussi la  $\beta$ -(1,3)-glucane synthétase (Chabasse *et al.*, 2006).

#### 2.6.1. Structure et ultrastructure de l'enveloppe

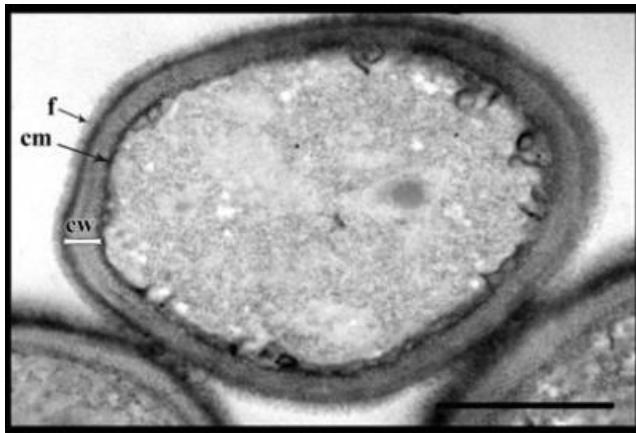
La paroi de *C. albicans* est présente à l'extérieur de la membrane cellulaire, cette dernière est composée de la couche intérieure et extérieure (Ainsworth, 1986), et d'une zone centrale entre les deux membranes (Chabasse *et al.*, 2006). La paroi est globalement bilamellaire renfermant des  $\beta$ -glucanes (Ainsworth, 1986) [Fig. 5].

##### Couche externe

La couche externe mesure 150 nm d'épaisseur (Samanta, 2015). C'est la couche la plus étudiée parce qu'elle présente le point d'interaction avec le milieu extérieur de *C. albicans* avec son environnement et aussi avec son hôte. Elle est riche en protéines et en glycoprotéines ce qui explique son apparence dense sous microscope électronique. Cette couche externe contient des fibrilles "fimbriae" qui sont des structures importantes, sous forme de projections radiales, impliquées dans l'adhésion de *C. albicans* aux cellules épithéliales (Chabasse *et al.*, 2006) [Fig. 6]. Les d'observations en microscopie électronique montrent une membrane externe composée de plusieurs couches, allant de 3 à 8 selon le milieu de culture utilisé, de la morphologie de la cellule et du stade du cycle cellulaire. La densité variable de ces couches s'explique par la diversité des constituants qui les forment (en particulier les hydrates de carbone) (Chabasse *et al.*, 2006) [Fig. 7].



**Figure 5: Images en microscopie électronique à transmission montrant les structures de la membrane externe de *C. albicans* (da Rocha Curvelo et al., 2014). Les cellules montrent un contour régulier et un cytoplasme électrondense (A) et une paroi cellulaire avec différentes couches d'électrondensités (B). Les barres représentent 1,0  $\mu\text{m}$  (A) et 0,2  $\mu\text{m}$  (B).**



**Figure 6: Coupes ultramince de *C. albicans* observées sous microscopie électronique (Ishida et al., 2011). (f) structures fibrillaires ; (cm) membrane cytoplasmique ; et (cw) paroi cellulaire compacte.**

#### Couche interne

Appelée aussi espace périplasmique, elle est avoisinante à la membrane et encrée à cette dernière grâce à ces invaginations. Cette couche interne est particulièrement riche en mannoprotéines donnant une apparence dense lors d'observations en microscopie électronique (Chabasse et al., 2006) [fig. 6].

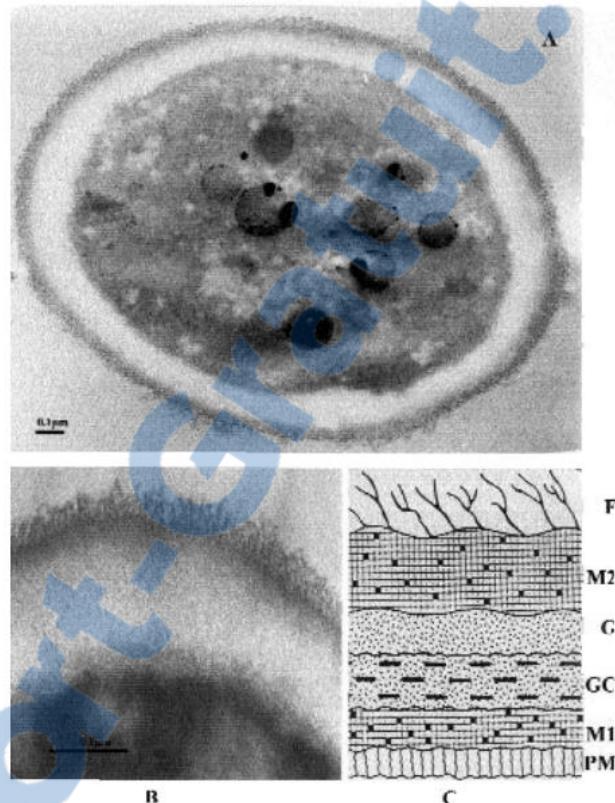
#### Zone centrale

Entre la couche interne et externe, la zone centrale est riche en  $\beta$ -(1,3)- et  $\beta$ -(1,6)-glucanes. Elle apparaît claire lors d'observations en microscope électronique (Chabasse et al., 2006) [fig. 6].

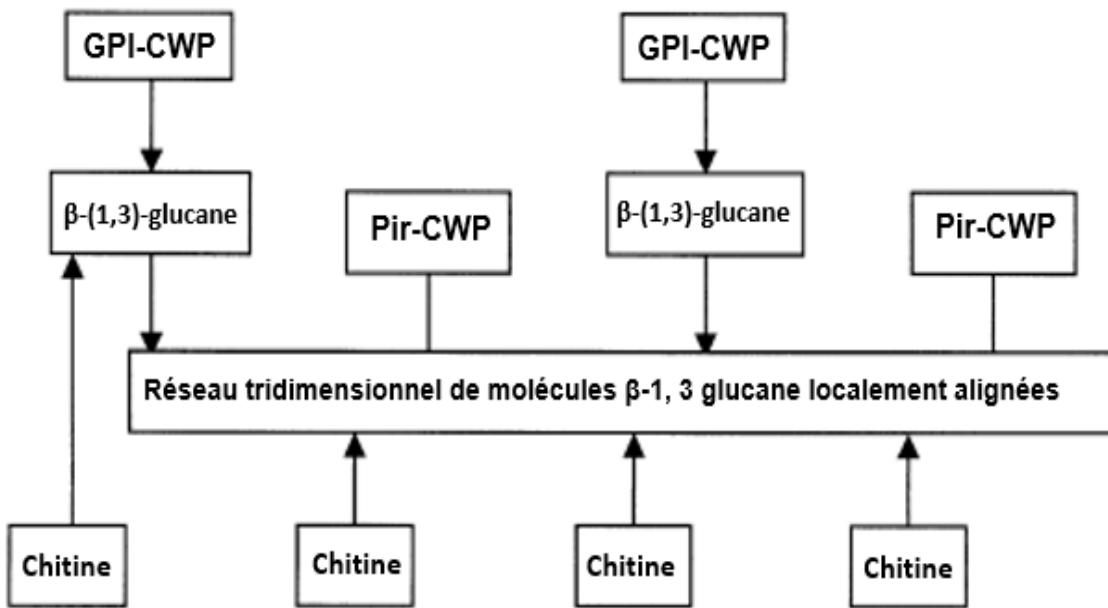
## 2.6.2. Composition de l'enveloppe

### Chitine / $\beta$ -glucanes / Mananne / acide sialique

La paroi cellulaire se compose de polymères complexes de glucose ( $\beta$ -(1,3)-glucane et  $\beta$ -(1,6)-glucane), de chaînes de N-acétylglucosamine (chitine) et de mannoprotéines murales (Shepherd, 1987). Cette composition est comparable à celle observée chez *Saccharomyces cerevisiae* (Kapteyn *et al.*, 2000) [Fig. 8].



**Figure 7: Coupes ultramince de *C. albicans* fixées au DMSO puis observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Jabra-Rizk *et al.*, 1999) :** (A) Une cellule de levure entière, montrant de longues fibrilles rayonnantes régulièrement ; (B) Section d'une cellule de levure, montrant les détails de l'ultrastructure de l'enveloppe cellulaire ; et (C) Schéma d'une paroi cellulaire typique montrant les différentes couches : membrane plasmique (PM), zone de mannoprotéine (M1), glucan-chitine (GC), glucane (G), mannoprotéine (M2) et la couche fibrillaire externe (F).



**Figure 8: Schéma de l'architecture moléculaire de la paroi cellulaire de *C. albicans* (inspiré de l'organisation moléculaire de la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* qui est un bon modèle) (Kapteyn *et al.*, 2000). Les flèches indiquent l'orientation des polysaccharides d'une extrémité non réductrice à l'extrémité réductrice. Les protéines de la paroi cellulaire (cell wall proteins ou CWP) matures dépendantes de GPI, une fois incorporée dans la paroi cellulaire, sont censées avoir perdu leur fraction lipidique et ne sont donc pas attachées à la membrane plasmique. Un nombre relativement faible de chaînes de chitine est lié aux molécules de β-1,6-glucane.**

La couche interne est un maillage de chitine liée à la paroi par des liaisons  $\beta$ -(1,3)- et  $\beta$ -(1,6)-glucane (Samanta, 2015). La chitine représente un homopolymère linéaire des unités N-acétyl-D-glucosamine (GlcNac) qui sont liées en  $\beta$ -(1,4). La chitine renforce le lien entre la membrane interne et la paroi favorisant le bourgeonnement, la septation (au niveau de septa) et la formation du tube germinatif des hyphes (Chabasse *et al.*, 2006).

La couche externe est composée de glucanes liés à la chitine. Les glucanes sont des homopolymères de glucopyranosides fortement ramifiés avec des liaisons  $\beta$ -(1,3)- ou  $\beta$ -(1,6) (Chabasse *et al.*, 2006). Il y a trois principaux types de protéines de la paroi cellulaire, qui sont attachés à la paroi cellulaire par ancrage (GPI).

- Le premier type est le glycophosphatidylinositol (GPI) qui est attaché à la paroi cellulaire (CWP) à l'aide d'une liaison covalente  $\beta$ -(1,6)-glucane par ancrage de GPI (Samanta, 2015 ; Kapteyn *et al.*, 2000).
- Protéines avec répétitions internes (Proteins internal repetition ou Pir), sont également associée à la membrane de manière covalente avec du  $\beta$ -(1,3)-glucane.
- La troisième catégorie de protéines est connue sous le nom de Pra1p (Protéine antigène 1 régulée par le pH), dépourvue de fixation covalente (Samanta, 2015).

Dans la couche externe de *C. albicans* nous trouvons aussi les mannanes qui sont des polysaccharides composés principalement de monomères de mannose. Chez *C. albicans*, ils se combinent avec des protéines donnant des composées de glyco(manno)protéines qui sont essentiellement localisées à la surface de la cellule. Ces mannanes contiennent des phospholipomannanes (PLM), des phosphomannoprotéines (PMP) et des phosphopeptidomannanes (PPM). Elles sont toujours attachées et n'existent pas sous forme libre. Les deux modes de glycosylation des mannanes sont la N-glycosylation et l'O-glycosylation (Chabasse *et al.*, 2006). Les résidus mannose représentent 40% de la paroi cellulaire de la levure *C. albicans* (Kapteyn *et al.*, 2000) qui affiche à sa surface le  $\beta$ -1,2-oligomannosides ( $\beta$ -1,2-Mans). Ces  $\beta$ -1,2-Mans jouent un rôle spécifique dans la colonisation de l'intestin par *C. albicans*. Contrairement aux  $\alpha$ -Mans omniprésents, les  $\beta$ -1,2-Mans se lient à la galectine-3, qui est une lectine endogène exprimée sur les cellules épithéliales (Dromer *et al.*, 2002).

Les acides sialiques sont des polymères d'acide N-acétylneuraminique (NANA), mis en évidence chez *C. albicans* par plusieurs approches expérimentales (comme la digestion enzymatique). Ces acides sialiques pourraient jouer un rôle dans l'échappement de *C. albicans* au système immunitaire (Chabasse *et al.*, 2006).

### Les protéines

Les protéines sont de l'ordre de 6 à 25% du poids de la paroi cellulaire. Ce sont surtout des glycoprotéines de type « mannoprotéines » et elles contribuent à

l'adhérence de la cellule sur les différents substrats et différents tissus de l'hôte. Ces protéines peuvent aussi avoir une activité enzymatique à l'intérieur de la cellule ; ou être associées à un stade morphologique précis ; ou encore localisées dans la paroi de façon transitoire et sécrétées pour modifier des substrats exogènes (Chabasse *et al.*, 2006).

#### Les lipides de la membrane plasmique

La membrane est constituée principalement de phospholipides, de stérols (estérifiés et non estérifiés) et de sphingolipides. L'ergostérol, analogue du cholestérol chez les champignons, est particulièrement étudié chez *C. albicans* avec sa voie de biosynthèse, et représente le stérol le plus abondant de la membrane plasmique (Chabasse *et al.*, 2006).

La composition lipidique de la membrane de *C. albicans* dépend de la phase de développement de cette levure (Lattif *et al.*, 2011). Les biofilms contiennent des niveaux plus élevés de phospholipides et sphingolipides que les cellules planctoniques. Le rapport de la phosphatidylcholine sur la phosphatidyléthanolamine est plus faible dans les biofilms par rapport aux cellules planctoniques. Les différences dans les profils lipidiques entre les biofilms et les cellules planctoniques de *Candida* peuvent avoir des implications importantes pour la biologie et la résistance de *C. albicans* aux molécules antifongiques (Lattif *et al.*, 2011).

Les phosphatidylinositols (PI) sont surproduits dans les biofilms, le PI est un précurseur de la biosynthèse des phosphorylcéramides de glycosylinositol (GIPCs) (Lattif *et al.*, 2011). Les GIPCs comprennent trois composantes : inositolphosphorylcéramide (IPC), mannosylinositolphosphorylcéramide (MIPC) et mannosyldiinositolphosphorylcéramide [M(IP)<sub>2</sub>C], les sphingolipides sont des constituants spécifiques de radeaux lipidiques membranaires localisés au niveau des membranes des levures (Lattif *et al.*, 2011).

## 2.7 Le biofilm, un mode de vie

### 2.7.1. Le Biofilm

Le biofilm est une communauté hétérogène de microorganismes qui s'attachent à une surface (abiotiques ou biotiques), tout encastrée dans une matrice extracellulaire (MEC), avec une structure tridimensionnelle complexe. Cliniquement, les infections aux biofilms représentent un problème lourd en raison de la résistance des microbes aux médicaments et aux défenses de l'hôte. L'Institut National de la Santé a estimé que 80% des infections humaines résultent de biofilms pathogènes "<http://grants.nih.gov/acces.bibl.ulaval.ca/grants/guide/pa-files/PA-99-084.html>". (Harriott *et al.*, 2011).

Les biofilms sont souvent de nature mixte (polymicrobienne). Ils sont composés de certains membres du microbiote endogène et de pathogènes nosocomiaux. Certains biofilms polymicrobiens renferment à la fois des pathogènes eucaryotes (par exemple *C. albicans*) et procaryotes (Shirtliff *et al.*, 2009).

Durant ces dernières décennies, les bactériologistes et plus particulièrement les mycologues ont compris que les infections sont causées par les biofilms plus que par les cellules libres. Ces biofilms se forment sur les tissus, les prothèses ou les cathéters (Costerton *et al.*, 1999 ; Hawser *et al.*, 1994). Plus tard, nous avons compris que ce mode de vie en biofilm prédomine par rapport au mode de vie planctonique chez les microorganismes ; elle est responsable de 65 % des cas d'infections (Bürgers *et al.*, 2010).

Une structure de protection mécanique, le biofilm offre aux microorganismes une certaine forme spatiale, une stabilité et une autonomie dans son microenvironnement. Un biofilm est un système sophistiqué, sa formation commence par l'adhésion des microbes à un substrat qui peut être un tissu ou un support abiotique. Après l'adhésion, les bactéries et les levures sécrètent plusieurs polymères (polysaccharides) extracellulaires formant une matrice protectrice pour les microorganismes dans le biofilm (Chandra *et al.*, 2001). Le plus souvent la formation des biofilms par *C. albicans* est associée à la propagation et la colonisation de l'hôte (Soll, 2008 ; Samanta, 2015).

### 2.7.2. Structure et composition du biofilm de *C. albicans*

*C. albicans* forme des biofilms sur différents supports (Hawser *et al.*, 1994 ; Chandra *et al.*, 2001). La facilité de la transition (changement de la forme blastospore à la forme hyphe) de *C. albicans* constitue un facteur important impliqué dans la formation du biofilm (Nobile *et al.*, 2006).

Les travaux de Baillie et son équipe (Baillie *et al.*, 1999) sur des couches minces de biofilms examinées par microscopie optique et des observations par microscopie électronique à balayage, ont montré un biofilm constitué de deux couches distinctes :

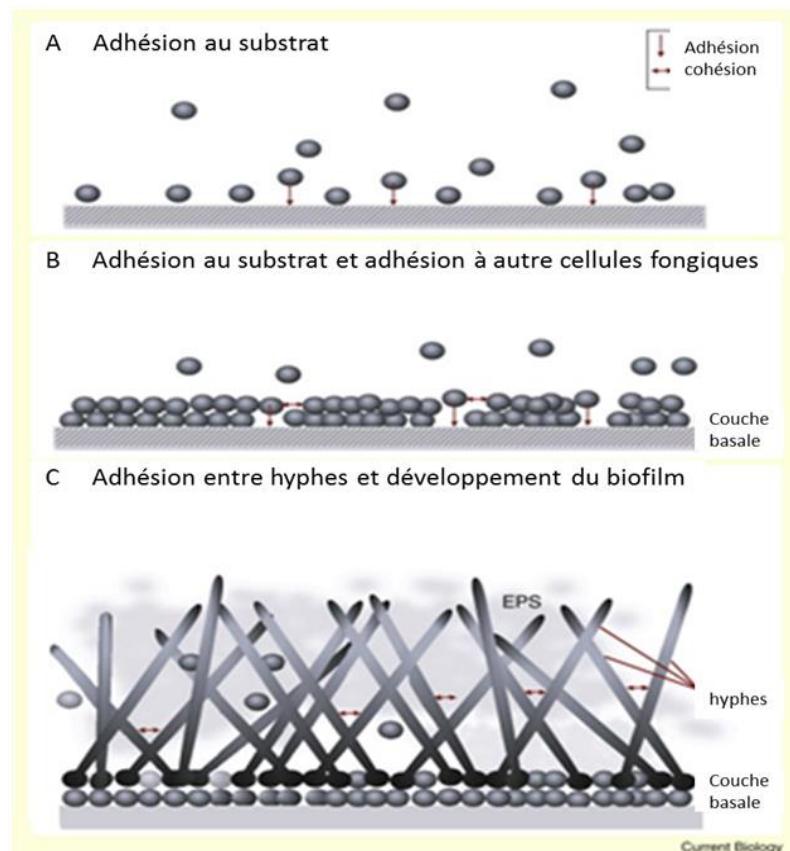
- Une couche basale mince de levure
- Une couche d'hyphe plus épaisse, mais plus espacée

Pendant la formation du biofilm de *C. albicans*, les cellules s'attachent à une structure et forment une couche basale confluente de cellules. Ces dernières se divisent et forment de longues projections tubulaires, les hyphe qui s'entrelacent dans la région supérieure du biofilm. Dès l'adhésion, les cellules commencent à synthétiser la matrice extracellulaire pour stabiliser le biofilm en développement [fig. 9]. Une fois le biofilm formé, le polysaccharide extracellulaire (PSE) entoure les cellules et les protège contre les agents antimicrobiens. Tout d'abord, le PSE peut servir à séquestrer des substances antimicrobiennes qui sont présentes dans les sécrétions orales ou dans des agents administrés, limitant ainsi l'accès de ces molécules antimicrobiennes d'atteindre *C. albicans*. La structure du biofilm bloque aussi l'accès des cellules phagocytaires à *C. albicans* dans le biofilm (Williams *et al.*, 2013).

L'adhésion est donc un élément important dans la formation du biofilm de *C. albicans*. La consolidation du biofilm se fait par la présence des formes hyphe donnant un biofilm mature [fig. 9] (Soll, 2008).

L'expression des gènes analogues à l'agglutinine (Als) qui codent pour une famille de protéines impliquées dans l'adhésion aux surfaces hôtes, est régulée de façon différentielle entre les biofilms et les cellules planctoniques. La famille de protéines de surface ALS est impliquée dans la formation de biofilm. En particulier, ALS1 et ALS3 ont des rôles essentiels, mais redondants. La protéine de surface HWP1 est

également nécessaire pour la formation de biofilm. Il y a des rôles complémentaires de HWP1 et ALS1 et ALS3 dans la formation de biofilm qui sont analogues aux rôles des agglutinines dans les réactions d'accouplement (Nobile *et al.*, 2008; Soll, 2008). Certaines bactéries sont également essentielles pour l'établissement réussi de *Candida* dans les biofilms (Pereira-Cenci *et al.*, 2008).



**Figure 9: Développement du biofilm de *C. albicans* et rôle de l'adhésion (Baillie *et al.*, 1999 ; Soll, 2008).** Dans un biofilm en développement de *C. albicans*, les cellules se lient à une surface pour former une couche basale de cellules. L'adhésion est un facteur majeur pour la liaison à la surface, et aussi pour la liaison cellule-cellule (cohésion) (A, B). Des projections tubulaires (hyphes) sont formées à partir de la couche basale contribuant à la stabilisation du biofilm. Une matrice polymère extracellulaire se forme entre les tubes (C). EPS : substances polymères extracellulaires.

Dans les biofilms oraux, l'adhésion de *C. albicans* avec d'autres bactéries buccales est considérée cruciale pour coloniser la cavité buccale (Shirtliff *et al.*, 2009). La présence de *C. albicans* augmente la production d'exopolysaccharides par *S. mutans*, de telle sorte que les biofilms co-espèces accumulent plus de biomasses et abritent plus de cellules viables de *S. mutans* (que les biofilms

monospécifiques). L'association *S. mutans* avec *C. albicans* favorise les infections à *S. mutans* au niveau de la bouche causant la carie dentaire. La coexistence microbienne augmente la virulence de biofilm (Falsetta *et al.*, 2014). En revanche, l'interaction entre *C. albicans* et *P. aeruginosa* est décrite comme étant de nature compétitive et antagoniste. Une autre interaction intrigante est celle qui se produit entre *S. aureus* et *C. albicans* qui semble initialement synergique. Ces interactions complexes entre des agents pathogènes aussi divers et importants auraient des implications cliniques importantes surtout chez les personnes immunodéprimées (Shirtliff *et al.*, 2009). La nature et la concentration des bactéries formant le biofilm avec *C. albicans* influencent la croissance et la virulence de *C. albicans* (Thein *et al.*, 2006). Selon quelques études, les radeaux lipidiques de la paroi des cellules *C. albicans* peuvent être associés à sa capacité à former des biofilms, et peuvent fournir une base pour l'élaboration d'une nouvelle stratégie pour gérer et traiter les infections associées à un biofilm (Lattif *et al.*, 2011).

## 2.8. Les infections à *Candida* = les candidoses

### 2.8.1. *C. albicans* et candidose

Les pathologies causées par *C. albicans* sont candidoses (Marcotte *et al.*, 1998 ; Pfaller *et al.*, 2007). Nous trouvons les candidoses systémiques et les candidoses superficielles. Les infections systémiques sont relativement rares, elles se développent principalement chez les personnes gravement immunodéprimées. Les candidoses superficielles sont plus fréquentes, et se développent sur différentes surfaces telle la muqueuse orale, gastro-intestinale ou vaginale (Williams *et al.*, 2013 ; Ainsworth, 1986). Il existe plusieurs types de candidoses superficielles : candidose cutanée, candidose œsophagienne, candidose génitale, candidose buccale, etc. Dans la suite de notre texte, nous nous concentrerons sur les candidoses buccales. Ces candidoses touchent de 10 à 15 % des personnes âgées et enfants en bas âge. Elle touche aussi les immunodéprimées et les porteurs de prothèses (Akpan *et al.*, 2002). L'utilisation de prothèses dentaires ou une mauvaise hygiène buccale sont les causes principales d'une irritation locale de

la cavité buccale pouvant induire une candidose (Farah *et al.*, 2000). *Candida* été isolé chez la quasi-totalité (78 à 100 %) des individus qui portent des prothèses dentaires (Olsen, 1974). Les prothèses défectueuses peuvent aussi modifier la structure des tissus bucco-dentaires sous-jacents. Ces changements pathologiques doivent être soigneusement examinés et résolus, avant le début de la nouvelle réhabilitation prothétique. La qualité de vie en matière de santé bucco-dentaire est améliorée considérablement après un traitement prothétique bien conduit (Babiuc *et al.*, 2009).

Cliniquement, les candidoses orales peuvent être classées en candidoses blanches ou en candidoses érythémateuses (Millsop *et al.*, 2016). Le groupe des candidoses orales blanches est caractérisé par des lésions blanches, et inclut la candidose pseudomembraneuse et la candidose hyperplasique. Alors que le groupe des candidoses érythémateux est caractérisé par des lésions rouges, et inclut la candidose atrophique aiguë, la candidose atrophique chronique, la glossite rhomboïde médiane, la chéilité angulaire et l'érythème gingival linéaire. De plus, il existe trois formes de candidoses buccales qui ne correspondent pas à ces catégories cliniques. Nous trouvons les candidoses mucocutanées chroniques, les chéilocandidoses et les candidoses multifocales chroniques (Millsop *et al.*, 2016).

Ces différentes présentations de candidoses orales pourraient refléter les différentes formes d'interaction entre la *C. albicans* et la surface épithéliale (Williams *et al.*, 2013). Cliniquement, les quatre formes primaires les plus distinctes de la candidose orale sont (i) la candidose érythémateuse aiguë (ii) la candidose pseudomembraneuse (iii) la candidose érythémateuse chronique et (iv) la candidose hyperplasique chronique.

#### 2.8.1.1. La Candidose orale blanche

##### a) *Candidose pseudomembraneuse (la présentation classique)*

La pseudomembraneuse est la candidose orale classique connue sous le nom de “muguet”, qui représente plus du tiers des cas de candidoses. Elle se caractérise par des pseudomembranes blanches étendues constituées de cellules épithéliales desquamées, de fibrine et d'hyphes fongiques qui sont étalés au niveau

de la surface de la muqueuse labiale et buccale, du palais dur et doux, de la langue, des tissus parodontaux et de l'oropharynx (Akpan *et al.*, 2002 ; Sharon *et al.*, 2010) [Fig. 10]. Elle se manifeste typiquement sous forme de plaques blanches crémeuses ou de taches sur les tissus oraux (Williams *et al.*, 2013). Lorsqu'elle est raclée, cette pseudomembrane laisse apparaître une muqueuse érythémateuse sous-jacente (Akpan *et al.*, 2002). Les patients sont typiquement asymptomatiques. En revanche, les patients symptomatiques peuvent décrire une sensation orale brûlante, des changements dans la perception du goût, et une tendance à un saignement facile sur les sites affectés (Sharon *et al.*, 2010).

La candidose pseudomembraneuse est plus fréquente chez les personnes atteintes d'un déséquilibre du système immunitaire. Aussi les personnes atteintes de diabète, ceux qui utilisent des inhalateurs aérosols stéroïdiens, des antibiotiques à large spectre et des psychotropes et des malades en phase terminale (Akpan *et al.*, 2002). D'autres conditions peuvent favoriser l'apparition des taches blanches dans la bouche, entre autres le lichen planus, le carcinome épidermoïde, la réaction lichénoïde et la leucoplasie (Muzyka *et al.*, 2005). Les lésions peuvent être aiguës ou chroniques causées par une surcroissance de *C. albicans* sur la muqueuse buccale (Muzyka *et al.*, 2005; (Dongari-Bagtzoglou *et al.*, 2009).



**Figure 10: Candidose pseudomembraneuse aiguë (Millsop *et al.*, 2016 ; Akpan *et al.*, 2002).**

b) *Candidose hyperplasique: Mimicker of leukoplakia*

La candidose hyperplasique (candidose hyperplasique chronique ou leucoplasie candidale) est l'une des formes les moins communes de candidose buccale. C'est la troisième variante clinique de candidose, et est généralement décrite par des taches blanches aussi bien circonscrites, légèrement élevées en relief, les plus fréquemment attachées à la muqueuse buccale et qui peuvent impliquer les commissures labiales (Sharon *et al.*, 2010; McCullough *et al.*, 2005) [Fig. 11]. La candidose hyperplasique est caractérisée par une ferme adhésion des plaques blanches sur la muqueuse buccale (Williams *et al.*, 2013). Ces tâches sont capables d'engendrer des lésions homogènes ou mouchées, de petite taille et translucides (blanches), ou encore des grandes plaques opaques (Akpan *et al.*, 2002 ; Farah *et al.*, 2000), et pouvant avoir une apparence nodulaire ou mouillée (Farah *et al.*, 2000). La candidose hyperplasique ne peut pas être facilement enlevée par raclage doux (Millsop *et al.*, 2016). La candidose hyperplasique chronique peut être augmentée par le tabagisme (Akpan *et al.*, 2002). La candidose hyperplasique a été associée à des changements malins accrus comparés à la leucoplasie non cancéreuse (McCullough *et al.*, 2005).

Histologiquement, les lésions montrent des hyphes dans un épithélium hyperplasique, généralement une invasion de *Candida* par dysplasie peut arriver quand l'épithélium est perturbé ou détérioré (Sharon *et al.*, 2010). Environ 15% des infections à *Candida* sous forme de candidoses hyperplasiques chroniques peuvent progresser en dysplasie (Samaranayake *et al.*, 1990). Pour éviter une telle dysplasie épithéliale, il est important que le patient soit suivi de près et traité efficacement et le plus tôt possible (Muzyka *et al.*, 2005). La candidose hyperplasique peut être confondue avec le lichen planus, la pemphigoïde / pemphigus, et le carcinome à cellules squameuses (Akpan *et al.*, 2002).

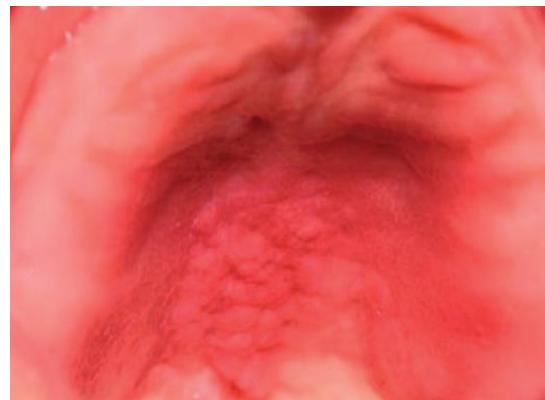
#### 2.8.1.2. *Candidose érythémateuse (ou atrophique)*

La candidose érythémateuse dite « candidose atrophique », touche les muqueuses dont la langue dorsale et le palais où elle apparaît sous forme de taches érythémateuses (Muzyka *et al.*, 2005) [Fig. 12]. La candidose érythémateuse aiguë

présente les symptômes cliniques de rougeur et douleur au niveau de la muqueuse buccale. La langue est souvent plus touchée (Williams *et al.*, 2013). C'est une infection qui est liée à l'utilisation d'antibiotiques à large spectre ou encore de corticostéroïdes. Cliniquement, il y a une réaction inflammatoire importante due à une infiltration massive de neutrophiles (Farah *et al.*, 2000). On distingue plusieurs formes de candidose érythémateuse.



**Figure 11: Candidose hyperplasique (Farah *et al.*, 2000 ; Muzyka *et al.*, 2005).**



**Figure 12: Candidose érythémateuse causée par une prothèse dentaire, souvent appelée stomatite prothétique. (McCullough *et al.*, 2005).**

*a) Candidose érythémateuse aiguë : taches orales érythémateuses*

La candidose érythémateuse aiguë se caractérise par des taches érythémateuses, le plus souvent au niveau du palais [Fig. 13]. Les taches peuvent apparaître partout sur la muqueuse buccale et la partie dorsale de la langue, qui

peuvent provoquer une papille linguale. Cliniquement, il y a une sensation de douleur dans la lèvre et la langue, et de brûlure dans la bouche (Akpan *et al.*, 2002). Cette candidose est causée par une utilisation accrue d'antibiotique à large spectre, le VIH+, le diabète, l'utilisation de corticostéroïdes, la carence en fer et en vitamine B12 (Millsop *et al.*, 2016). Toutes ces conditions affectent le système immunitaire, ce qui favorise la pathogénicité de *C. albicans*.



**Figure 13: Candidose érythémateuse aiguë (Sharon *et al.*, 2010).**

*b) Candidose érythémateuse chronique : stomatite dentaire*

La candidose érythémateuse chronique [fig. 14] se présente fréquemment chez les patients porteurs de prothèses dentaires. Elle se manifeste sous forme d'un érythème situé dans les parties des prothèses dentaires mal ajustées ou mal nettoyées (Williams *et al.*, 2013). Dans ces régions, il y a une forte croissance de *Candida*. Les lésions sont érythémateuses et/ou œdémateuses, dues à la constriction de la muqueuse en contact avec les prothèses dentaires (Farah *et al.*, 2010). Cette forme de candidose est souvent asymptomatique, mais les patients peuvent ressentir une brûlure, une douleur dans la bouche et un picotement sous la prothèse (Millsop *et al.*, 2016).

En fonction de la gravité des lésions, la candidose érythémateuse chronique peut être classée en trois types cliniques connus : le type I, qui se limite aux signes locaux de la maladie (avec inflammation simple locale ou hyperhémie ponctuelle

précise). Le type II caractérisé par un érythème localisé et généralisé sur la muqueuse en contact avec la prothèse dentaire. Le type III est caractérisé par un érythème localisé au niveau du palais dur central ou la crête alvéolaire, qui cause une hyperplasie granuleuse ou papillaire de la muqueuse buccale en contact avec les prothèses dentaires (Samaranayake *et al.*, 2009).



**Figure 14: Candidose érythémateuse chronique (Millsop *et al.*, 2016).**

c) *Glossite rhomboïde médiane : atrophie papillaire centrale*

La glossite rhomboïde médiane peut être décrite dans les papilles circumvallées comme une tache symétrique, érythémateuse, sous une forme rhomboïde située au centre dorsal antérieur de la langue (Akpan *et al.*, 2002 ; Farah *et al.*, 2010) [Fig. 15]. Les lésions représentent une atrophie des papilles filiformes. Cette candidose est typiquement asymptomatique chez les patients. Elle est provoquée par l'inhalation des corticostéroïdes et exacerbée par la cigarette (Sharon *et al.*, 2010). L'évaluation statistique montre que ce type de candidose buccale est rare (moins de 1% dans la population), et il touche 3 fois plus les hommes que des femmes (Redman, 1970).

La chéilité angulaire, appelée aussi la stomatite angulaire ou la perlèche, montre des taches érythémateuses avec des fissures (Farah *et al.*, 2010). Elle est

généralement symptomatique et bilatérale avec des commissures labiales des deux côtés de la bouche (Reichart *et al.*, 2000) [Fig. 16]. Le patient a des douleurs à cause de l'inflammation et des fissures (Akpan *et al.*, 2002). La chéilite angulaire peut être causée principalement par *S. aureus* et *C. albicans* (Wilkieson *et al.*, 1991). Cette forme de candidose est le plus souvent présente chez les personnes porteuses de prothèses dentaires, et celle qui ont l'habitude de mordre les bouts de leurs lèvres (Appleton, 2000) ;Akpan *et al.*, 2002).



**Figure 15: Glossite rhomboïde médiane (McCullough *et al.*, 2005)**

*d) Chéilite angulaire : Perlèche*

Une chéilite angulaire peut atteindre des personnes ayant un déficit en acide folique, de fer, de riboflavine, de thiamine et de vitamine B12 (Rose, 1971).



**Figure 16: Chéilite angulaire (Farah *et al.*, 2010)**

e) *Érythème gingival linéaire : bande gingivale, souvent chez le VIH*

L'érythème gingival linéaire est caractérisé par une bande érythémateuse discrète sur la marge gingivale d'une ou plusieurs dents (Odden *et al.*, 1994) [Fig. 17]. L'érythème gingival linéaire est une entité clinique sans critères de diagnostic définitif, fortement associé aux personnes atteintes de VIH (plus 50 % chez les adultes et 38 % chez les enfants). Cette forme de candidose peut être provoquée par *C. albicans* mais aussi à *C. dubliniensis* (Velegraki *et al.*, 1999 ; Samaranayake *et al.*, 2009).



**Figure 17: Érythème gingival linéaire (Velegraki *et al.*, 1999).**

#### 2.8.1.3. Autres variantes de la candidose orale

a) *Candidose mucocutanée chronique*

La candidose mucocutanée chronique (CMC) est un ensemble de syndromes rares, parfois associés à des défauts immunitaires connus (Ellepola *et al.*, 2000). Elle représente un groupe de troubles hétérogènes en montrant des lésions superficielles de cause candidale, qui persistent au niveau oral, de la peau ou des ongles, avec une mauvaise réponse aux agents antifongiques (Odds, 1988). Plus de 90 % des personnes atteintes de CMC ont des candidoses orales qui ont des caractéristiques histopathologiques similaires aux candidoses chroniques. Chez ces patients, la langue peut augmenter de taille, avoir des fissures et peut avoir aussi des nodules hyperplasiques aux côtés latéraux (Farah *et al.*, 2000) [Fig. 18]. L'infection peut atteindre le pharynx, le larynx ou l'œsophage (Farah *et al.*,

2000). Ces lésions orales peuvent inclure aussi la candidose hyperplasique, le muguet et/ou la chéilité angulaire et la chéilité pseudomembraneuse. En plus de la possibilité de présence de plaques érythémateuses hyperkératosiques au niveau du cuir chevelu ou scalp (Millsop *et al.*, 2016).

La CMC est liée à une variété de maladies d'immunodéficiences, comme le syndrome d'immunodéficience combinée sévère (SCID), le syndrome de Nezelof (alypoplasie thymique), le syndrome de DiGeorge (aplasie thymique congénitale), le syndrome de l'hyperimmunoglobuline, la carence en myloperoxydase et les troubles endocriniens, en particulier la maladie d'Addison et l'hypoparathyroïdie (Farah *et al.*, 2000). Les anomalies endocriniennes associées constituent un ensemble de syndromes rares : la polyendocrinopathie auto-immune-candidose-dystrophie ectodermique est le syndrome de candidose endocrine. Ces anomalies endocriniennes associées à la CMC incluent la maladie d'Addison, l'hypoparathyroïdie, l'hypothyroïdie, et diabète (Millsop *et al.*, 2016). Habituellement, les symptômes commencent au début de la vie du patient et sont souvent résistants au traitement antifongique (Ellepola *et al.*, 2000).



**Figure 18: Candidose mucocutanée chronique (Farah *et al.*, 2000).**

*b) Chéilocandidose*

La chéilocandidose représente une lésion ulcéreuse située sur la lèvre, généralement sur le bord inférieur du vermillon (Sharon *et al.*, 2010) [Fig. 19].

c) *Candidose multifocale chronique*

La candidose multifocale chronique montre des plaques érythémateuses dans deux sites ou plus au niveau de la bouche (Sharon *et al.*, 2010). Le plus souvent observée chez des fumeurs masculins plus âgés. Cette candidose est caractérisée par des lésions présentes pendant plus de 4 semaines, en l'absence de facteurs de risque identifiables (Samaranayake *et al.*, 2009 ; Ellepola *et al.*, 2000). Généralement, la candidose multifocale chronique peut être traitée par les antifongiques usuels. Il est aussi recommandé d'arrêter le tabagisme pour éviter les récidives (Ellepola *et al.*, 2000).



Figure 19: Chéilocandidose (Millsop *et al.*, 2016).

## 2.8.2. Diagnostic

### 2.8.2.1. Diagnostic différentiel clinique

Il est nécessaire de distinguer les lésions causées par une infection à *Candida* des autres lésions dues à des brûlures chimiques, des lésions traumatiques, de la syphilis et d'autres lésions kératotiques blanches. Également, il faut distinguer la candidose érythémateuse des autres lésions rouges intraorales, telles que l'érythème polymorphe, le lupus érythémateux, les lésions traumatiques thermiques, l'anémie pernicieuse, le lichen planus érosif et des réactions lichénoïdes, les réactions médicamenteuses, et la dysplasie épithéliale (Farah *et al.*, 2000).

#### 2.8.2.2. Tests de laboratoire

Le diagnostic des candidoses orales doit se faire avec un examen approfondi, basé sur l'observation des signes et des symptômes cliniques en tenant compte de l'historique médical du patient. Pour confirmer le diagnostic, il est recommandé de faire un (ou plusieurs) test de laboratoire à partir d'échantillonnage de la muqueuse buccale pour confirmer la présence de *Candida* et identifier le type de la levure en cause. Les échantillons peuvent être obtenus des sujets par un frottis, le rinçage oral concentré, collecte de la salive entière, une culture d'empreinte (utilisant de l'Agar de dextrose Sabouraud) ou une biopsie orale. Le choix entre ces techniques d'échantillonnage dépend principalement de la nature de la lésion à étudier (Williams *et al.*, 2000).

La candidose pseudomembraneuse est l'une des formes les plus communes qui représentent environ un tiers des candidoses oropharyngées, et dont le diagnostic est généralement simple (Akpan *et al.*, 2002). Le diagnostic différentiel de la candidose hyperplasique chronique est similaire à celui de la candidose pseudomembraneuse aiguë (Sharon *et al.*, 2010). La présence de la forme hyphe dans la candidose pseudomembraneuse, peut être révélée par une coloration périodique par l'acide-Schiff appliquée sur une biopsie de la lésion ou un frottis cytologique de la pseudomembrane, qui confirme le diagnostic rapidement et avec précision (Farah *et al.*, 2000). Dans les biopsies, le tissu fixé peut-être colorer avec de l'hématoxyline-éosine pour montrer les éléments fongiques (Sharon *et al.*, 2010). Le diagnostic peut être confirmé par une coloration de Gram (positive), au bleu de méthylène, 10% d'hydroxyde de potassium (KOH) ou par la méthanamine-argent nitrate? Grocott (Akpan *et al.*, 2002 ; Sharon *et al.*, 2010). Pour vérifier la présence d'une infection fongique, une culture sur un milieu spécifique est recommandée (Farah *et al.*, 2000). Parmi les milieux de culture, nous trouvons le dextrose de Sabouraud, qui peut être combiné avec un second milieu différentiel comme l'Agar de Pagano-Levin ou l'Agar chromogène commerciale (Williams *et al.*, 2000).

Une culture dans le milieu dextrose de Sabouraud (incubée à 37°C pendant 24h ou 48h) peut montrer des colonies convexes et crèmeuses caractéristiques de *Candida*, mais sans la précision de l'espèce (Williams *et al.*, 2000). Cette

différenciation spécifique nécessite des techniques immunohistochimiques (Farah *et al.*, 2000). L'identification de la souche est surtout importante chez les personnes atteintes de déficit immunitaire ou dans le cas de souches résistantes pour déterminer un traitement efficace.

### 2.8.3. Traitements et contrôle des infections fongiques, et la résistance de *C. albicans*

Une bonne hygiène bucodentaire qui inclut un brossage des dents et de la langue (2x / jour), l'utilisation de la soie dentaire (1x / jour) et un nettoyage dentaire chez le dentiste (2x / an), peut prévenir de la candidose. Pour les porteurs de prothèses, une désinfection quotidienne des prothèses est nécessaire. Cette désinfection des prothèses consiste en un traitement à base d'agents antiseptiques suivi d'un rinçage et d'un séchage de la prothèse. Aussi, il faut enlever la prothèse de la bouche la nuit pendant six heures, au moins, car un bon flux salivaire est important pour le nettoyage de la bouche. En cas de xérostomie (réduction de la salivation) il faut boire fréquemment de l'eau et stimuler la production de salive en utilisant des pastilles (microplaquettes) de glace ou des pastilles sans sucre (Sharon *et al.*, 2010).

Dans le cas de personnes atteintes de candidose buccale, la gestion d'un traitement peut commencer par l'élimination des facteurs causals. Car même après le traitement, sans l'élimination de ces facteurs de risque, il y aura toujours possibilité de récidives. Quand le diagnostic affiche une candidose, un traitement empirique peut être effectué. Plusieurs traitements sont déjà définis pour la candidose buccale et la chéilité angulaire (Ellepola *et al.*, 2000 ; Sharon *et al.*, 2010) [Tableau1]. Ces traitements sont le plus souvent efficaces, cependant, chez certaines personnes ayant une candidose récidivante, le traitement peut comprendre une (chimio-)prophylaxie. Un traitement prophylactique est une thérapie antifongique continue pour réduire la croissance et l'infection candidale orale (Akpan *et al.*, 2002). Il n'y a pas de traitement prophylactique standard. La thérapie dépend de la fréquence des récurrences, de l'espèce de *Candida* isolée, de

facteurs prédisposants et du type de traitement immunsupresseur ou antibiotique suivi par le sujet (Sharon *et al.*, 2010).

Divers agents de traitement de la candidose oropharyngée sont disponibles. Ces traitements sont classés en deux catégories :

- Les agents topiques qui sont utilisés dans les cas non compliqués et avant les antimicrobiens systémiques, ces agents topiques peuvent être des crèmes, des poudres, des solutions de rinçage buccaux, ou des comprimés vaginaux.
- Les agents systémiques sont utilisés lorsque les agents topiques ne sont pas efficaces ou non tolérés par le patient.

Les traitements des candidoses orales disponibles actuellement sont résumés dans les tableaux : 1 et 2.

**Tableau 1: Les traitements topiques des Candidoses orales (Millsop *et al.*, 2016).**

Agent	Véhicule ou forme	Dose et fréquence	Effets secondaires et caractéristiques spéciaux
Violet de gentiane	• Solution	• 1,5 ml de solution à 0,5% deux fois par jour	• Irritation de la peau • Ulcères buccaux • Coloration pourpre des vêtements et de la peau
Nystatine	• Crème • Pommade • Suspension • Pastille • Tablette (vaginale)	• Crème et pommade : Appliquer trois à quatre fois par jour • Suspension : 100 U quatre fois par jour • Pastille : 100 000 U maximum 5 fois par jour pendant 7-14 jours • Tablette : 100 000 U trois fois par jour	• Nausées et vomissements • Irritation de la peau
Amphotéricine B	• Crème • Pommade • Lotion • Suspension	• Crème, pommade, lotion (tonique) : trois à quatre fois par jour pour un maximum de 14 jours • Suspension : 100 mg / mL	• N'est pas absorbé par l'intestin

Miconazole	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crème</li> <li>• Pommade</li> <li>• Gel</li> <li>• Laque (gomme)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2% Crème et pommade : deux fois par jour pendant 2-3 semaines</li> <li>• 2% de gel : trois à quatre fois par jour pendant 2-3 semaines</li> <li>• Laque (gomme) : 1 g appliqué une fois par semaine aux prothèses dentaires pendant 3 semaines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Irritation de la peau</li> <li>• Sensation de brûlure</li> <li>• Macération</li> </ul>
Kétoconazole	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crème</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2% de crème deux à trois fois par jour pendant 14 à 28 jours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Irritation de la peau</li> <li>• Mal de tête</li> </ul>
Clotrimazole	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crème</li> <li>• Solution</li> <li>• Pastille</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1% de crème deux fois par jour à trois fois par jour pendant 3-4 semaines</li> <li>• 1% de solution trois à quatre fois par jour pendant 2-3 semaines</li> <li>• 10 mg sous forme de pastille cinq fois par jour pendant 2 semaines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Irritation de la peau</li> <li>• Nausées et vomissements</li> </ul>

**Tableau 2: Les traitements non systémiques des Candidoses orales (Millsop et al., 2016).**

Agent	Véhicule ou forme	Dose et fréquence	Effets secondaires et caractéristiques spéciaux
Kétoconazole	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tablette</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 mg par jour ou deux fois par jour pendant 2 semaines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La FDA ne conseille pas l'utilisation de kétoconazole oral</li> <li>• Nausées et vomissements</li> <li>• Hépatotoxicité</li> <li>• Catégorie de risque de grossesse : C</li> <li>• Interactions avec d'autres médicaments</li> <li>• Effets négatifs potentiels sur la fertilité masculine</li> <li>• Chute de cheveux</li> <li>• Insuffisance surrénalienne</li> </ul>
Fluconazole	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capsule</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dose de chargement initial de 250 mg ; 50-200 mg quotidièrement, pendant 7 à 14 jours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Catégorie de risque de grossesse : C</li> <li>• Trouble gastro-intestinal</li> <li>• Hépatotoxicité</li> <li>• Interactions avec d'autres médicaments</li> </ul>
Fluconazole	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capsule</li> <li>• Solution orale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 à 200 mg par jour pendant 14 jours</li> <li>• Pour les cas récurrents sévères, la dose de 200 mg de charge par voie respiratoire est répétée trois fois par jour pendant 3 jours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pris avec des aliments ou des boissons acides</li> <li>• Catégorie de risque de grossesse : C</li> <li>• Desfonctionnement hépatique</li> <li>• Trouble gastro-intestinal</li> <li>• Vertiges et maux de tête</li> </ul>

Posaconazole	Suspension	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suspension</li> <li>• 100 mg deux fois par jour le jour 1, puis 100 mg par jour pendant 13 jours</li> <li>• Pour les cas réfractaires : 400 mg deux fois par jour pendant 3 jours, puis 400 mg par jour à deux fois par jour pendant 25 à 28 jours</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Catégorie de risque de grossesse C</li> <li>• Troubles gastro-intestinaux</li> <li>• Neutropénie</li> </ul>
--------------	------------	--	--

## 2.9. *C. albicans*, une levure commensale qui devient pathogène

Comme mentionnée précédemment, la levure dimorphique *C. albicans* est un organisme eucaryote ubiquitaire qui se développe en tant que saprophytes de la muqueuse chez l'homme. La comparaison (par une analyse génotypique de locus microsatellite polymorphes) de souches *C. albicans* isolées d'individus en bonne santé et de patients avec candidoses ne montre pas de différence phénotypique ni génotypique. Ceci suggère que toutes les souches de *C. albicans* sont commensales avec une capacité de se transformer en agents pathogènes (Dalle *et al.*, 2003).

### 2.9.1. Les facteurs environnementaux contribuant à la pathogenèse de

#### *C. albicans*

De nombreux facteurs contribuent à l'augmentation des infections fongiques ou candidales. Parmi ces facteurs nous trouvons une immunodépression due à une rupture de la barrière cutanée ou des muqueuses, des défauts dans le nombre et la fonction des neutrophiles, réduction de l'immunité à médiation cellulaire, un dysfonctionnement métabolique, et l'âge (Segal *et al.*, 2006). La transplantation, la chimiothérapie et l'augmentation de l'utilisation d'antibiotiques à large spectre augmentent aussi le risque d'infection par les champignons opportunistes (Nouér *et al.*, 2005 ; Pfaller *et al.*, 2004). Les expositions environnementales à une variété d'agents pathogènes endémiques peuvent augmenter le risque de maladies mycosiques (Chu *et al.*, 2006).

L'état commensal de *C. albicans* est souvent associé au fonctionnement du système immunitaire inné. La perturbation du système immunitaire favorise la prolifération et les changements morphologiques de *C. albicans*, cette forme hyphe facilite l'invasion des tissus (Scully *et al.*, 1994).

L'immunité innée des tissus est exercée par les cellules épithéliales/kératinocytes. La réaction de la surface épithéliale face à la colonisation de *Candida* est extrêmement importante. De nombreuses variables peuvent affecter la nature de réponse des muqueuses (Williams *et al.*, 2013). Parmi ces facteurs nous trouvons la structure et l'intégrité du tissu ; mais aussi l'interaction du tissu avec *C. albicans* (Williams *et al.*, 2013).

### 2.9.2. Les facteurs de virulence de *C. albicans*

Les facteurs de virulence correspondent aux attributs nécessaires pour la croissance, la survie et l'interaction avec l'hôte. Ces facteurs confèrent la pathogénicité au microorganisme et engendrent la perturbation de l'homéostasie qui se manifeste sous forme de symptôme de la maladie (Brunke *et al.*, 2016). Les facteurs de virulence exprimés par *C. albicans* dépendent du type de l'infection provoquée (locale ou systémique), la nature de la réponse de l'hôte, le site et le stade de l'infection (Cutler, 1991). Le changement de forme est un des facteurs les plus importants pour la virulence de *C. albicans*. Cette forme augmente l'adhésion et l'invasion des tissus sous-jacents (Zhang *et al.*, 2017; Mitchell, 1998 ; Vila *et al.*, 2017; Tronchin *et al.*, 2008). L'invasion de *C. albicans* est facilitée par des enzymes priténolitiques, dont les protéinases aspartyl sécrétées (SAPs) (Schaller *et al.*, 2005). Les trois principaux attributs de virulences de *Candida* sont donc l'adhésion aux tissus de l'hôte, l'adaptation morphologique à la suite des réponses environnementales et la sécrétion des hydrolases (Haynes, 2001).

#### 2.9.2.1. L'adhésion à l'hôte

L'adhésion initiale de *Candida* aux surfaces épithéliales humaines est un processus complexe et multifactoriel. Les surfaces cellulaires de *Candida* et des cellules épithéliales sont généralement chargées négativement. Plusieurs facteurs

non spécifiques contribuent à l'interaction qui aboutit à une adhésion réussie. Quand les forces répulsives sont surmontées, l'adhésion est ensuite médiée par des molécules spécifiques, les adhésines, localisées à la surface de la cellule fongique et qui interagissent avec leurs ligands spécifiques localisés à la surface de la cellule hôte (comme les cadhérines ou les intégrines) (Li *et al.*, 2003).

Les adhésines de *Candida* sont des protéines impliquées directement dans l'attachement sur les tissus de l'hôte. Grâce à ces adhésines, le microorganisme commensal comme *C. albicans* qui est principalement dans le mucus à une distance des cellules épithéliales peut se lier directement aux cellules hôtes et peut devenir infectieux (Brunke *et al.*, 2016). Cette propriété d'adhésion donne à *C. albicans* sa grande capacité à former des biofilms sur les surfaces (Martinez, 1998). Parmi les adhésines, nous trouvons la protéine Int1p. Cette protéine de type intégrine (integrin-like) contient un motif RGD (une protéine RGD qui lie iC3b) est impliquée dans la virulence de *C. albicans* parce qu'elle est nécessaire à la croissance des hyphes et à l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte (Gale *et al.*, 1998). La virulence de *C. albicans* est renforcée par la présence de glycoprotéines de surface avec des séquences de types agglutinines (agglutinin-like sequence ou ALS). Ces glycoprotéines de surface favorisent l'adhésion de *C. albicans* à la surface des cellules de l'hôte (Hoyer, 2001).

#### 2.9.2.2. Transition morphologique et formation de l'hyphe

La possibilité de basculer entre morphologies levure, pseudohyphe et hyphe est souvent considérée nécessaire pour la virulence, bien que la preuve formelle reste à démontrer. Les hyphes et les pseudohyphes sont envahissants (Sudbery *et al.*, 2004). Lors de ces variations morphologiques, il y a une expression de gènes spécifiques pendant et après cette transition morphologique. Ceci peut expliquer la coévolution de la morphologie et de la virulence dans les espèces de *Candida*, (Thompson *et al.*, 2011). Les fréquences de ramification des hyphes sont dépendantes du milieu nutritif (Barelle *et al.*, 2003). La suppression de plusieurs régulateurs transcriptionnels (Tup1p, Cph1p, Efg1p et Rbf1p) et les protéines qui transmettent le signal à ces régulateurs (Hst7p, Cla4p et Cpp1p) dans *C. albicans*

entraînent des modifications morphologiques (Braun *et al.*, 1997). Plusieurs facteurs de transcription pourraient également réguler l'expression de gènes non impliqués dans la morphogenèse. Par exemple, sept gènes régulés négativement par Tup1p ont été identifiés, et tous codants pour des protéines sécrétées ou de surface cellulaire, dont cinq sont impliqués dans la transition levure-hyphes (RBT1, RBT4, RBT5, HWP1 et WAP1) (Braun *et al.*, 2000).

Deux gènes, *PHR1* et *PHR2* présents chez *C. albicans* sont sensibles au pH, ces gènes jouent un rôle important dans les candidoses superficielles et systémiques. L'expression de *PHR1* et *PHR2* est régulée par la voie de transduction du signal de pH Rim101p (De Bernardis *et al.*, 1998).

La densité cellulaire de *Candida* dans le milieu est un des facteurs qui favorisent le changement de forme (Calderone *et al.*, 2011). Par conséquent, réduire le changement de forme de *C. albicans* pourrait réduire sa pathogenèse. Une étude a montré qu'une molécule peptide de compétence stimulante (CSP) produite par *S. mutans* inhibe le changement morphologique de *C. albicans* et diminue sa virulence (Jarosz *et al.*, 2009). Dans le même sens, une étude de notre équipe de recherche a montré que le farnésol, qui est une molécule de détection du quorum (Quorum-Sensing), réduit la pathogenèse par une régulation négative de la morphogenèse (formation des hyphes), et l'inhibition de l'expression de plusieurs gènes de virulence Saps (Décanis *et al.*, 2011).

#### 2.9.2.3. Enzymes hydrolytiques : La sécrétion des protéases.

##### Exemple des Aspartyls Protéases Sécrétées (SAPs)

Lors de sa phase infectieuse, *C. albicans* peut produire certaines enzymes hydrolytiques pouvant jouer un rôle central dans la pathogénicité de cette levure et qui peuvent endommager les structures de la cellule hôte (Finlay *et al.*, 1989).

Les trois enzymes hydrolytiques extracellulaires les plus importantes produites par *C. albicans* sont les aspartyl protéases sécrétées (SAPs), les enzymes de la phospholipase B et les lipases (Biswas *et al.*, 2007, Kantarcioğlu *et al.*, 2002).

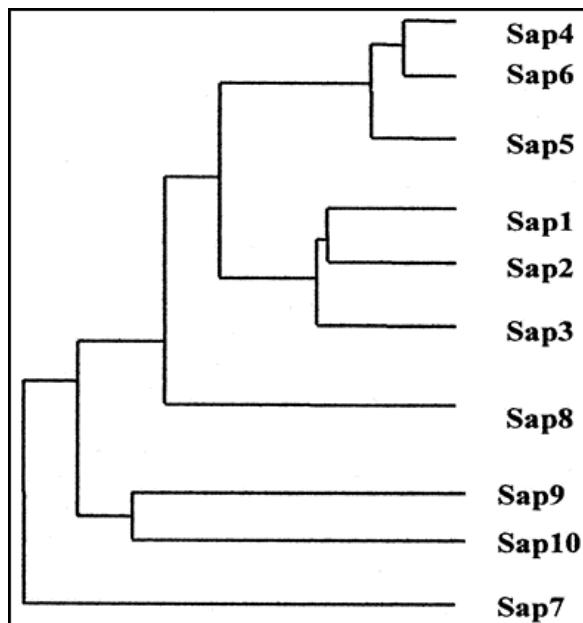
- La famille des lipases est contrôlée par 10 gènes (LIP1 à 10) (Hube *et al.*, 2001). La famille des phospholipases est sous le contrôle de 7 gènes (PLA,

PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3 et PLD1) (Samaranayake *et al.*, 2006). Les lipases et les phospholipases sont des enzymes hydrolytiques extracellulaires qui peuvent être impliqués dans l'adhésion, l'apport ou acquisition des éléments nutritifs et l'invasion de l'épithélium de l'hôte (Gácser *et al.*, 2007 ; Stehr *et al.*, 2004). Leur expression constitutive a été démontrée dans les biofilms de *C. albicans* (Nailis *et al.*, 2010).

- La famille SAPs est la plus étudiée. Les protéines SAPs contribuent à différents processus de virulence de *C. albicans*. Elles favorisent l'adhésion, la formation des hyphes et le gommage tissulaire (l'invasion des cellules épithéliales), ainsi que l'évasion du système immunitaire (Calderone *et al.*, 2011 ; Naglik *et al.*, 2003 ; Schaller *et al.*, 2005). La famille des SAPs est constituée de 10 différentes protéines de taille allant de 35 à 50 kDa. (Naglik *et al.*, 2003). Ces protéines SAPs sont sous le contrôle de 10 gènes différents (Naglik *et al.*, 2014), [Figure 20].

Les enzymes SAPs semblent capables de dégrader plusieurs substrats physiologiquement importants tels que l'albumine, l'immunoglobuline et les protéines de la peau (Cassone *et al.*, 1987). La contribution des *Saps* dans la pathogénicité de *C. albicans* a été démontrée par l'utilisation des mutants déficients en SAP et les inhibiteurs de protéinase. SAP1 et SAP3 sont impliqués dans la transition phénotypique de *C. albicans* (Hube *et al.*, 2001 ; White *et al.*, 1995). SAP2 est impliqué dans la croissance (Naglik *et al.*, 2003). SAP 4 - 6 sont impliqués dans la formation des hyphes (White *et al.*, 1993), l'invasion de l'épithélium (Staib *et al.*, 2000), et l'apoptose des cellules épithéliales (Wu *et al.*, 2013). Ils sont aussi exprimés par *C. albicans* lors de l'invasion des hyphes d'un épithélium oral humain reconstitué (Malic *et al.*, 2007), et de l'infection par voie orale (Naglik *et al.*, 1999). SAPs 4 - 6 peuvent cibler des protéines hôtes similaires. L'expression du gène SAPs 1 - 6 semble être liée à l'adhésion, aux dommages tissulaires, et aux variations de la réponse immunitaire (Naglik *et al.*, 2003 ; Schaller *et al.*, 2001). Les SAP 1 - 6 ainsi que SAP 9 et 10 semblent jouer un rôle dans le mécanisme d'adhésion aux cellules hôtes (Albrecht *et al.*, 2006). SAPs 2 et 6 sont également des inducteurs puissants de l'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 par des monocytes

(Pietrella *et al.*, 2013). SAP 5 est impliqué dans la rupture de l'E-cadhérine, une protéine associée aux jonctions des cellules épithéliales qui sert à maintenir une barrière fonctionnelle. Ce qui peut représenter un mécanisme par lequel *C. albicans* envahit la muqueuse buccale (Villar *et al.*, 2007).



**Figure 20: Dendrogramme de la famille des gènes Saps. L'alignement des séquences d'ADN des 10 gènes Saps (Naglik *et al.*, 2014).**

Le présent dendrogramme montre les liens et la classification hiérarchique dans la famille des iso-enzymes SAPs de *C. albicans* par homologie séquentielle. Il y a trois groupes gènes Saps principaux distincts. Le premier est *Sap1* à *Sap3* (avec une similarité de près de 67%), le deuxième est *Sap4* à *Sap6* (similarité de 89%), tandis que *Sap7* (similarité de seulement 20 à 27% avec les autres Saps). Et le troisième est *Sap9* et *Sap10* (ont une séquence consensus C-terminal typique pour les protéines GPI). Des familles de SAP semblables existent dans *C. dubliniensis* et *C. tropicalis*.

## Section 3 : RÔLE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE CONTRE LES INFECTIONS À *C. ALBICANS*

Le système immunitaire protège la cavité buccale et ses composantes (dents, gencives, muqueuse et prothèse dentaire si elle existe) contre toutes les infections incluant celles provoquées par *Candida*. L'immunité innée et l'immunité acquise jouent un rôle significatif dans la défense de l'hôte contre *C. albicans*. L'immunité innée, médiée par les macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires est importante dans la défense contre la candidose systémique. En effet, les patients neutropéniques et les patients transplantés traités par des immunosuppresseurs ont une incidence élevée de candidose disséminée (Fidel, 2002). L'immunité humorale est une autre composante du système immunitaire qui nous protège, entre autres, contre les infections à *Candida*. Lors de l'activation de l'immunité humorale, les anticorps anti-*Candida* sont facilement et rapidement produits. Les patients atteints d'infections à *Candida* montrent une production d'anticorps anti-protéines de surface de *Candida* (Torosantucci *et al.*, 2017).

### 3.1. Défense non spécifique de l'hôte / immunité innée

Chez les individus sains et immunologiquement actifs, les tissus épithéliaux (la peau et la muqueuse) forment une barrière (physique et chimique) efficace du système immunitaire inné, qui protège contre des milliers d'espèces pathogènes ou qui peuvent le devenir.

Lors du contact de *C. albicans* avec les cellules épithéliales, un mécanisme de reconnaissance permet aux cellules de l'hôte de savoir s'il s'agit d'une situation d'infection ou de commensalisme. Le rôle des cellules épithéliales dans l'immunité innée sera abordé plus tard.

La reconnaissance et l'activation de la réponse de l'hôte sont réalisées grâce à des récepteurs de reconnaissance dite **Pattern Recognition Receptor** (PRR). Dans cette famille de récepteurs, ce sont les récepteurs Toll-like (TLR) et les récepteurs de lectine (LR) sur leurs membranes cellulaires, qui reconnaissent les

motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns = PAMP). Les PAMP sont des signatures chimiques ou microbiennes conservées (Kumar *et al.*, 2011).

Les TLR forment une classe majeure de récepteurs de reconnaissance de motifs PAMP. Leur activation induit des signaux responsables de l'expression de gènes importants pour une défense efficace de l'hôte. L'activation de ces TLR induit la production de plusieurs cytokines par les cellules épithéliales ; ces cytokines agissent sur l'agent pathogène.

Les cellules du système (macrophages, neutrophiles, etc.) immunitaire inné reconnaissent différentes composantes de la membrane externe de *C. albicans*. Parmi ces composantes nous trouvons, la chitine et le  $\beta$ -(1,3)-glucane (Netea *et al.*, 2008). Les  $\beta$ -(1,3)-glucanes interagissent avec le récepteur dectine-1 des cellules phagocytaires et avec les TLR pour contrôler la croissance et le changement de forme de *C. albicans* (Gantner *et al.*, 2005). Les cellules dendritiques impliquées dans le traitement et la présentation des antigènes, expriment aussi des PRR pour la reconnaissance des antigènes de *C. albicans*. Les neutrophiles expriment moins les TLR, mais plus fortement les récepteurs phagocytaires comme le récepteur du complément 3 (CR3) et les récepteurs Fc- $\gamma$  (Fc- $\gamma$ R). L'expression des PRR sur les lymphocytes T est beaucoup plus restreinte. Il y a une expression différentielle des PRR entre les différents types de cellules, ce qui détermine le type de réponse initiée par la reconnaissance une *C. albicans* (Netea *et al.*, 2010).

Le système de défense inné est primordial dans la protection de l'hôte contre les infections à *Candida*. Cependant, si cette défense innée n'est pas efficace, l'implication de l'immunité adaptative est nécessaire.

### 3.2. Défense spécifique de l'hôte / immunité acquise (dite adaptative)

Le rôle du système immunitaire inné ne se limite pas qu'à la reconnaissance antigénique ; il amorce et module les réponses immunitaires spécifiques impliquant les lymphocytes T et B qui interagissent avec les cellules présentatrices d'antigènes

(Hoebe *et al.*, 2004). L'activation de la réponse immunitaire spécifique mène à l'activation des lymphocytes B qui produisent différents types d'immunoglobulines (Ig) dites aussi, anticorps. Ces anticorps peuvent être des IgA, IgM et IgG.

Les personnes atteintes de candidose ont un niveau normal ou élevé d'anticorps IgM et IgG anti-*Candida* (Fidel, 2002).

Des anticorps anti-mannanes et anti-glucanes de la paroi cellulaire de *C. albicans* ont été observés dans les sérums. Leur rôle de protection est, cependant, incertain, car les niveaux élevés de ces anticorps sont observés dans un mauvais pronostic d'infections (Poulain *et al.*, 2004). Ces anticorps anti-*Candida* peuvent être retrouvés dans la salive. Coogan et son équipe (1994) ont montré une augmentation des anticorps salivaires chez des personnes VIH+ comparativement à des personnes normales. Ils ont suggéré que le taux d'anticorps reflète une réponse à l'effet antigénique et infectieux de *Candida* chez ces patients plutôt qu'une réaction de protection normale. La présence d'anticorps anti-*Candida* dans la salive semble empêcher l'adhésion de *Candida* à la muqueuse (Coogan *et al.*, 1994).

### 3.3. Rôle des cellules épithéliales dans la défense de l'hôte

Dans cette section, nous résumons les différents mécanismes impliqués dans les réponses des cellules épithéliales vis-à-vis de *Candida*.

Les cellules épithéliales des muqueuses constituent la première ligne de défense face à différentes infections, dont *C. albicans*. Ces cellules épithéliales sont un acteur clé de l'immunité innée. Elles expriment des PRRs leur permettant de reconnaître *C. albicans* et de produire des peptides antimicrobiens (PAMs) contre *C. albicans*. Une cellule épithéliale exprime à sa surface membranaire les trois catégories des PRP soit les récepteurs toll-like (TLRs), récepteurs de lectine de type C (CLRs) et récepteurs nod-like (NLRs). Seulement certains TLRs et CLRs sur les cellules épithéliales reconnaissent les PRRs de *Candida* (Netea *et al.*, 2008).

La famille des TLR est constituée de 13 TLRs, identifiés chez l'humain et la souris. Les cellules épithéliales des muqueuses (orale, vaginale, cutanée,

intestinale, etc.) humaines expriment les TLR1, 2, 4, 5 et 6 (Saegusa *et al.*, 2004 ; Pivarcsi *et al.*, 2005 ; Naglik *et al.*, 2011). Les TLR2 et TLR5 sont surexprimés par les cellules épithéliales orales et sont principalement impliqués dans la réparation, la croissance et la survie de ces cellules (Shaykhiev *et al.*, 2008). En plus des TLRs, d'autres protéines comme la E-cadhéchine présente à la surface des cellules épithéliales orales peuvent promouvoir l'adhésion et l'endocytose de *Candida*. La E-cadhéchine lie les invasines Als3 et Ssa1 de *C. albicans* (Phan *et al.*, 2007 ; Sun *et al.*, 2010). Le récepteur de facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)), peut aussi reconnaître les Als3 et Ssa1 de *Candida* (Zhu *et al.*, 2012).

La reconnaissance de la surface cellulaire de *Candida* initie une réaction de signalisation cellulaire en cascade, ce qui conduit à l'activation de plusieurs gènes dans les cellules épithéliales. Suite à cette activation, différents médiateurs (cytokines, des peptides antimicrobiens) sont sécrétés (Schaller *et al.*, 2002 ; Steele *et al.*, 2002 ; Bahri *et al.*, 2010). Parmi ces médiateurs nous trouvons l'IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, le facteur de nécrose tumorale.

L'épithélium joue donc un rôle actif dans le maintien de l'équilibre immunologique. Grâce à ses médiateurs lipidiques (PGI1, PGE2, PAF, LysoPC) et cytokines anti-inflammatoires (IL10 et TGF- $\beta$ ), l'épithélium offre une défense chimique contre les microorganismes pathogènes (Ahluwalia *et al.*, 2017 ; DeFranco *et al.*, 2009). Cependant, *C. albicans* peut échapper à la surveillance des cellules épithéliales. En effet, *C. albicans* est capable de bloquer les réponses inflammatoires de l'hôte en inhibant la production d'IL-12p70 (une importante cytokine impliquée dans l'activation des cellules Th1 lors de l'inflammation). L'inhibition de la production de l'IL-12p70 favorise la tolérance immunitaire envers *C. albicans*. Cela peut être l'un des mécanismes avec lesquels *C. albicans* peut rester en mode de vie commensale sans nuire aux hôtes (Zheng *et al.*, 2013).

Les cellules épithéliales stimulées par *Candida* peuvent également produire (*in vitro*) divers peptides antimicrobiens, comme les  $\beta$ -défensines et la cathélicidines LL-37 (Li *et al.*, 2011 ; Schneider *et al.*, 2005). Ces peptides antimicrobiens inhibent

la croissance et le changement de forme de *C. albicans* (López-García *et al.*, 2005 ; Vylkova *et al.*, 2007).

### 3.3.1. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des polypeptides de petite taille (de 10 à 50 acides aminés) classés dans différents groupes en fonction de leurs compositions en acides aminés, la taille, et de la conformation (Nakatsuji *et al.*, 2012).

Les PAMs sont produits de façon constitutive ou inducible ; ce sont des composantes essentielles de l'immunité innée. Ils sont sécrétés entre autres par les neutrophiles et par les cellules épithéliales. Ils agissent sur plusieurs types d'agents infectieux (parasite, microbe, champignon ou virus) (Agerberth *et al.*, 2000 ; Bals *et al.*, 1998). En plus de leurs effets antimicrobiens, les PAMs ont un rôle immunomodulateur lors d'inflammations chroniques (Xia *et al.*, 2017). Les PAMs ont une application potentielle dans le contrôle des agents pathogènes fongiques, en agissant sur les différentes formes (forme levure ou filamenteuse) et modes de vie (sous forme planctonique ou de biofilm) (van der Does *et al.*, 2012 ; Théberge *et al.*, 2013). Ces effets antimicrobiens et anti-inflammatoires des PAMs font d'eux de potentiels antibiotiques de la prochaine génération. En plus de leur effets antimicrobiens à large spectre, les PAMs ont une toxicité cellulaire faible ou inexistante pour l'hôte (Fjell *et al.*, 2012 ; Haney *et al.*, 2017; Conlon *et al.*, 2011; Batoni *et al.*, 2011 ; Triana-Vidal *et al.*, 2017). Quelques PAMs ont même des effets bénéfiques pour la cicatrisation (Park *et al.*, 2017). Le nombre des PAMs ne cesse d'augmenter (Leiter *et al.*, 2017 ; Gonçalves *et al.*, 2017 ; Rank *et al.*, 2017). Au cours des dernières décennies, plus de 2700 PAMs naturels et synthétiques ont été identifiés. Les PAMs peuvent être produits par des cellules humaines, animales, bactéries, plantes et amphibiens.

Parmi les PAMs d'origine humaine nous trouvons entre autres les histatines, les cathélicidines/LL-37, les défensines, et les lactoferricins (Zhu, 2008 ; van der Does *et al.*, 2012 ; Teraguchi *et al.*, 2004 ; Kong *et al.*, 2016 ; Liao, 2017). Les PAMs produits par les bactéries sont regroupés sous le nom de bactériocines. En

plus de leurs effets sur les microorganismes pathogènes, les PAMs semblent moduler l'immunité innée et adaptative (Haney *et al.*, 2017 ; Batoni *et al.*, 2011). L'intérêt croissant pour les PAMs est basé sur le fait qu'ils peuvent fournir une protection contre une large gamme d'agents pathogènes (Takakura *et al.*, 2003 ; Haney *et al.*, 2017). À la lumière de ces données prometteuses, l'utilisation des PAMs (naturels ou synthétiques) est une perspective importante et nécessaire pour lutter contre les infections microbiennes qui présentent une résistance au traitement traditionnel, comme les candidoses orales causées par *C. albicans* (Ernst *et al.*, 2017 ; Kong *et al.*, 2016).

Dans ce contexte, les PAMs d'origines amphibiens ont attiré l'attention des chercheurs en tant que produits prometteurs pour le développement de traitements antifongiques.

### 3.3.2. Les PAMs d'origines amphibiens

Les sécrétions de la peau et de tissus amphibiens contiennent plusieurs peptides biologiquement actifs à fort potentiel antibactérien et antifongique. Environ, une centaine de peptides ont été isolés de différentes espèces. Certains présentent un effet antifongique important sans être toxiques pour les cellules de mammifères (Mangoni, 2006). D'autres sont cependant toxiques pour des cellules de mammifères, ce qui mène au développement de peptides analogues (synthétiques) non toxiques tout en conservant une forte activité biologique (Conlon *et al.*, 2011). Les peptides antimicrobiens de la peau de grenouille s'attaquent à la membrane plasmique bactérienne provoquant la mort de la cellule par nécrose (Park *et al.*, 1996). Ce mode d'action a été démontré avec la maganine 2 isolée de la peau de la grenouille africaine *Xenopus laevis*). La maganine 2 est un peptide hybride qui incorpore des résidus de magainine 2 (MA) et des résidus de protéine ribosomale L1 d'*Helicobacter pylori* (Lee *et al.*, 2002). Un autre peptide, le temporins extrait de la grenouille européenne *Rana temporaria* perméabilise la membrane cellulaire de plusieurs espèces fongiques dont *C. albicans* (Park *et al.*, 1998). La buforine 2 (du crapaud *Bufo Gargarizans* asiatique) semble perméabiliser la membrane plasmique, puis pénétrer dans la cellule pour se lier à l'ARN et l'ADN, ce qui bloque

toute fonction cellulaire menant à la mort de la cellule (Park *et al.*, 1998). D'autres peptides sécrétés par les cellules cutanées d'amphibiens dont les dermaseptins sont dotés d'activités antimicrobiennes.

### 3.3.3. Les dermaseptines : La dermaseptine-S1

Les dermaseptines constituent une super famille de PAMs isolés des sécrétions cutanées des grenouilles du genre *Phyllomedusa* (Brand *et al.*, 2002 ; Mor *et al.*, 1991). Cette famille est constituée de 34 dermaseptines ; ce sont des molécules cationiques, composées de 24 à 34 acides aminés. Ces peptides sont thermostables, hydrosolubles. Dans la grande majorité des cas, ils forment une structure hélicoïdale dans les milieux non polaires. Le spectre de dichroïsme circulaire montre une conformation hélice  $\alpha$  chez 80 % des dermaseptines, et leurs séquences ont été déterminées par la méthode d'Edman: ALWKVMLKKLGTMALHAGKAALGAAADTISQGTQ (Shalev *et al.*, 2002 ; Mor *et al.*, 1991). Ils sont amphipathiques ou amphiphiles et capables d'agir à des concentrations micromolaires (Batista *et al.*, 1999 ; Brand *et al.*, 2002). Chaque peptide a un large spectre d'action, pouvant avoir un effet sur les virus, les protozoaires, les mycobactéries, les champignons et les bactéries (Belaïd *et al.*, 2002 ; Mor *et al.*, 1994-a ; Batista *et al.*, 1999). Ces peptides peuvent agir selon deux mécanismes d'action différents. Le premier est le « barrel-stave » où les peptides se fixent sur les composantes acides (les phospholipides) de la membrane bactérienne pour perturber l'équilibre osmotique des cellules et favoriser la rupture de la membrane après l'avoir perméabilisée créant des pores (ou canaux) transmembranaires. Le deuxième est un mécanisme alternatif appelé le « tapis ». C'est un mécanisme de destruction plus général, où les peptides lytiques chargés positivement se lient à la surface de la membrane cible chargée négativement et la recouvrent complètement. Les peptides imprègnent et désintègrent la membrane en perturbant la bicoche lipidique de la bactérie (Shai, 2002).

Grâce à leurs effets sur les microorganismes, les dermaseptines offrent une possibilité clinique pour contrer les résistances microbiennes aux antibiotiques et antifongiques utilisés. Les dermaseptine-S sont caractérisés par une grande teneur

en lysine (3 à 6 unités) avec un tryptophane très conservé dans la position 3 à partir de l'extrémité N-terminale (Mor *et al.*, 1991 ; Mor *et al.*, 1994-b). Treize dermaseptines ont été isolés et identifiés (DS1 à 13) (Nicolas *et al.*, 2009) jusqu'à présent. Les DS1 à DS5 sont des peptides antifongiques contre une large gamme de champignons avec une ressemblance d'environ 40%. Les différentes dermaseptines agissent souvent en synergie puisqu'une combinaison de certains dermaseptines augmente l'effet antimicrobien (100 fois dans certains cas) comparativement aux effets obtenus avec chaque DS seule (Mor *et al.*, 1994-b). Des dérivés de dermaseptines sont souvent synthétisés à partir des dermaseptines natifs, en diminuant la longueur de celle-ci par l'élimination de certains acides aminés, puis ils sont purifiés et leurs activités antimicrobiennes sont évaluées. La réduction de la longueur de la chaîne donne des dérivés peptidiques avec parfois des résultats surprenants, comme dans le cas du dérivé MsrA2 de la DB1 (N-Met-dermaseptine B1) utilisé pour protéger les pommes de terre contre une grande gamme d'infections fongiques (Mor *et al.*, 1994-b ; Osusky *et al.*, 2005).

Avec son activité antimicrobienne, la DS1 a été la source de plusieurs analogues. Ces analogues ont montré un effet antimicrobien, dépendant de la dose utilisée (Savoia *et al.*, 2008). Les études des caractéristiques structure-activité de la DS1 ont montré que la séquence minimale ayant une activité biologique est de (1-15)-NH<sub>2</sub>. De plus, l'activité antibactérienne de la DS1 nécessite la présence d'un acide aminé avec un noyau aromatique sur la chaîne latérale prouvant l'importance du Trp<sup>3</sup>. L'ajout d'une Lys supplémentaire du côté N-terminal peut améliorer l'activité contre certains microbes, comme *E. coli* et *S. aureus* (Savoia *et al.*, 2008). Certains dérivés de la DS1 montrent une activité sélective contre certains microorganismes indiquant une utilisation potentielle comme nouveaux antimicrobiens sélectifs (Savoia *et al.*, 2008 ; Savoia *et al.*, 2010). Cependant, les effets de la DS1 sur la croissance, la transformation de *C. albicans* ainsi que la formation de biofilm demeurent inconnus. Aussi, l'effet de la DS1 sur l'expression de certains gènes impliqués dans la pathogénèse de *C. albicans* n'a pas été élucidé. En nous appuyant sur la littérature disponible, la DS1 pourrait être une

solution pour le contrôle de la pathogénicité de *C. albicans*, réduisant ainsi les candidoses locales et systémiques.

## Section 4 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

### 4.1. Mise en contexte

Les infections à *Candida* (candidose) sont la conséquence d'une prolifération importante de la levure *Candida*, et de son changement de forme. Ces caractéristiques peuvent provoquer une candidose superficielle ou profonde, le traitement usuel des candidoses font appel à plusieurs dérivés azolés et les polyènes. Ces molécules sont le plus souvent très efficaces ; cependant, de plus en plus, de cas de résistance contre ces molécules sont documentées. Le recours à de nouvelles molécules antimicrobiennes comme les PAMs pourrait contrer ces résistances et sauver des vies. Parmi ces PAMs, les dermaseptines dont la DS1 pourrait être une solution prometteuse pour le traitement des condidoses.

### 4.2. Objectifs

Étudier les effets de la DS1 sur la pathogénicité de *C. albicans*. Nos objectifs spécifiques sont :

- Évaluer l'effet de la DS1 sur la croissance et la transformation de *C. albicans*.
- Évaluer l'effet de la DS1 sur la formation de biofilm à *C. albicans*.
- Évaluer l'effet de la DS1 sur l'expression de certains gènes de virulence *Saps* (1, 2, 3, 9 et 10) et *HWP1*.

### 4.3. Hypothèses

La littérature scientifique rapporte des effets antibactériens très intéressants de la DS1. Ces observations nous laissent croire que la DS1 pourrait agir aussi sur *C. albicans* en réduisant sa croissance et son changement de forme. En réduisant la croissance et le changement de forme de *C. albicans*, la DS1 pourrait diminuer la capacité de la levure à former des biofilms. Cet effet pourrait passer par une modulation de l'expression certains gènes de *C. albicans*.

## CHAPITRE II: ARTICLE

***Dermaseptin-S1 decreases C. albicans growth and biofilm formation  
by suppressing the HWP1 and SAPs genes***

*Amine Belmadani<sup>1</sup>, Abdelhabib Semlali<sup>2</sup> and Mahmoud Rouabchia<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Oral Ecology Research Group, Faculty of Dentistry, Université Laval, 2420, rue de la Terrasse, Quebec G1V 0A6, QC, Canada. <sup>2</sup>Genome Research Chair, Department of Biochemistry, College of Science King Saud University, Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia.

**Running title:** Dermaseptin-S1 as an antifungal peptide

**Correspondence:** Dr. Mahmoud Rouabchia, Oral Ecology Research Group, Faculty of Dentistry, Laval University, 2420, rue de la Terrasse, Quebec G1V 0A6, QC, Canada.

[mahmoud.rouabchia@fmd.ulaval.ca](mailto:mahmoud.rouabchia@fmd.ulaval.ca)

## RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'effet du peptide antimicrobien synthétique la dermaseptin-S1 (DS1) (ALWKTMLKKLGTMALHAGKAALGAAADTISQGTQ) sur la croissance de *C. albicans*, sur sa transition de la forme blastospore à la forme hyphe, et sur la formation de biofilm. Nous avons également analysé l'expression de différents gènes (*HWP1* et *Saps*) impliqués dans la virulence de *C. albicans*. Les résultats montrent qu'en plus de la diminution de la croissance de *C. albicans*, le peptide DS1 a inhibé la transition de blastospore à hyphe de la levure. Ces effets sont comparables à ceux obtenus avec l'amphotéricine B utilisé en clinique. *C. albicans* traité avec la DS1 ou avec l'amphotéricine B montre une surface de paroi cellulaire déformée, suggérant que l'effet de la DS1 est similaire à celui de l'amphotéricine B. Ces observations ont été confirmées par nos résultats avec des biofilms montrant que le peptide DS1 et l'amphotéricine B inhibent significativement la formation de biofilm après 2 et 4 jours. L'effet de la DS1 sur la croissance, la transition et la formation de biofilms de *C. albicans* peut être dû à une modulation génique, puisque l'expression des gènes *HWP1*, *Sap1*, *Sap2*, *Sap3*, *Sap9* et *Sap10* impliqués dans la pathogénèse de *C. albicans* est réduite lorsque *C. albicans* a été traité avec la DS1. Ces données confirment l'efficacité de la DS1 contre *C. albicans*, et la possibilité d'utiliser ce peptide comme traitement antifongique.

## ABSTRACT

We investigated the effect of synthetic antimicrobial peptide dermaseptin-S1 (DS1) (ALWKTMLKKLGTMALHAGKAALGAAADTISQGTQ) on the growth of *C. albicans*, its transition from blastospore to hyphae, and its biofilm formation. We also analyzed the expression of different genes (*HWP1* and *Saps*) involved in *C. albicans* virulence. Results show that in addition to decreasing *C. albicans* growth, peptide DS1 inhibited its transition from blastospore to hyphal form. These effects are comparable to those obtained with amphotericin B. *C. albicans* cells treated with either DS1 or amphotericin B displayed a distorted cell wall surface, suggesting that the effect of DS1 was similar to that of amphotericin B on *C. albicans* cell membrane structure. These observations were confirmed by our results with biofilms showing that both DS1 peptide and amphotericin B significantly inhibited biofilm formation after 2 and 4 days. The effect of DS1 on *C. albicans* growth, transition, and biofilm formation may occur through gene modulation, as the expression of *HWP1*, *Sap1*, *Sap2*, *Sap3*, *Sap9* and *Sap10* genes involved in *C. albicans* pathogenesis were all downregulated when *C. albicans* was treated with DS1. These data provide new insight into the efficacy of DS1 against *C. albicans* and its potential for use as an antifungal therapy.

**Keywords:** Dermaseptin, *C. albicans*, growth, transition, biofilm, genes, *HWP1*, *Saps*

## Highlights

- Peptide dermaseptin S1 (DS1) decreased *C. albicans* growth and transition.
- Peptide DS1 reduced biofilm formation.
- Peptide DS1 decreased the mRNA levels of the *HWP1* and *Saps* genes.
- Peptide DS1 shows potential as an antifungal therapy.

## Introduction

*Candida albicans* (*C. albicans*), a common opportunistic fungal pathogen in humans, asymptotically colonizes the skin and mucosal surfaces of most healthy individuals (Arendrup *et al.*, 2017). However, alterations in host immunity, physiology, and/or microbiota can lead to the inability to control *C. albicans* colonization on mucosal surfaces and the development of candidiasis at various sites in the human body (Salvatori *et al.*, 2016). Indeed, vulvovaginal candidiasis is a common affliction that affects a large number of women (Sangaré *et al.*, 2017). Patients with AIDS are prone to oral and oesophageal candidiasis (Konaté *et al.*, 2017). Patients suffering from burns and newborn (especially premature) babies are also subject to *C. albicans* skin infections (Devrim *et al.*, 2017). Furthermore, *C. albicans* is responsible for a bloodstream infection known as candidemia in vulnerable groups of patients, including those in intensive care units (Sasso *et al.*, 2017).

*C. albicans* is capable of switching between yeast, pseudohyphae, and hyphae growth forms, and is found in both yeast and filamentous form in the host (Rouabchia *et al.*, 2012). The morphological plasticity of *C. albicans* is critical in the yeast's pathogenesis. The hyphal form plays a key role in the infection process by promoting tissue invasion (Rouabchia *et al.*, 2012). Hyphal morphogenesis is controlled by various genes. Hyphae-specific genes *HWPI*, *ALS3*, and *RBT5* encode cell wall proteins that are important in the adhesion to host cells and the acquisition of iron from the host (Nailis *et al.*, 2010).

Another important virulence attribute of *C. albicans* is its extracellular proteolytic activity due to secreted aspartic proteinases (SAPs). *C. albicans* is known to produce these secreted proteinases which contribute to the yeast's adhesion to as well as the invasion and destruction of host tissue (Bochenska *et al.*, 2016). The *SAP* family includes at least ten members (*Saps1–10*) containing a signal peptide; these are secreted, except for *Sap9* and *Sap10* which remain bound to the cell wall. *Sap* genes are expressed at various stages of the infection process (Santos *et al.*, 2013) and are characterized by broad-spectrum proteolytic activity and virulence properties (Santos *et al.*, 2013). *Saps1–3* are active at acidic pH, whereas *Saps4–6* are more active at neutral to slightly alkaline pH and are associated with hyphal growth (Aoki *et al.*, 2011). *Saps* directly attack and degrade host proteins such as E-cadherin, histatins, complement, and antibodies involved in the immune defense (Aoki *et al.*,

2011). *Saps* were shown to be the predominant proteinase genes expressed in both *Candida* carriers and patients with vulvovaginal candidiasis (VVC) and recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC) (Naglik *et al.*, 2008).

The treatment of *C. albicans* infections currently involves the use of antifungal agents divided into four distinct classes: azoles, polyenes, pyrimidine analogues, and caspofungin/candins (Moudgal *et al.*, 2010). Different pathways are involved in the antifungal effects on *C. albicans*; these pathways are capable of targeting **ergosterol and ergosterol biosynthesis**. Ergosterol is a key component of fungal cell membranes and is similar to human cholesterol. It also plays an important role in fungal cell growth. Polyene drugs, such as amphotericin B, have been reported to bind to ergosterol and cause a lethal leak of cell components by forming channels on the fungal cell membranes (Hirano *et al.*, 2011). Azoles are another class of antifungals targeting ergosterol biosynthesis. Fluconazole targets lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase, a core enzyme involved in ergosterol biosynthesis (Lupetti *et al.*, 2002). While currently available antifungal drugs are efficient in controlling *Candida* infections, several studies have reported *Candida* resistance to these antifungal molecules (Katiyar *et al.*, 2006). Resistance to nearly all major antifungal agents has been reported in clinical isolates of *Candida* spp. (Katiyar *et al.*, 2006), which represents a major public health concern because the arsenal of antifungal agents is limited. Such limitations may be solved by using antimicrobial peptides such as dermaseptins.

Dermaseptins, a large family of antimicrobial amphipathic peptides (AMP) effective against bacteria, yeasts, fungi, protozoa, and viruses, are part of host defense mechanisms against pathogens (Mor *et al.*, 1991). Similar to human skin, amphibian skin exhibits a well-developed chemical defense system by secreting antimicrobial peptides with a wide range of pharmacological activities (Brand *et al.*, 2013). These peptides are synthesized and stored in the granular glands and are released when required, usually in response to a stressor, such as a predatory attack or an infection (Amiche *et al.*, 2008). To date, a large number of amphibian skin antimicrobial peptides have been identified, including pexiganan (Giovannini *et al.*, 1987), bombinins (Gibson *et al.*, 1991), brevinins (Simmaco *et al.*, 1994), and dermaseptins (Mor *et al.*, 1991). Dermaseptin (DS) peptides have been isolated from the secretions of phylomedusine frog skin. DS1, a 34 amino acid residue peptide from

*Phyllomedusa sauvagii* (Mor *et al.*, 1994), was reported to inhibit both filamentous fungi and bacterial growth (Hernandez *et al.*, 1992). More than 50 different dermaseptin peptides have been identified (Amiche *et al.*, 2008) with cationic (Lys-rich) properties and the ability to fold into amphipathic  $\alpha$ -helical structures in hydrophobic media (Strahilevitz *et al.*, 1994). Savoia *et al.* (2008) reported that *C. albicans* was susceptible to dermaseptin-S1 (DS1) analogues. Although there have been extensive studies on the broad-spectrum antimicrobial activities of most dermaseptin peptides, the direct effect of dermaseptin S1 on *C. albicans* remains unclear and thus limited. Interestingly, DS1 was reported to display lytic action on some microorganisms with no adverse effect on human cells (Savoia *et al.*, 2008).

In the present study, we investigated the effect of DS1 on *C. albicans* growth and transition as well as on cell structure and biofilm formation. We also analyzed the effect of DS1 on the expression of certain key genes (*HWP1*, *Sap1*, *Sap2*, *Sap3*, *Sap9*, and *Sap10*) involved in *C. albicans* virulence.

## Materials and Methods

### *C. albicans*

*C. albicans* strain ATCC-SC5314 was cultured for 24 h on Sabouraud dextrose agar plates (Becton Dickinson, Oakville, ON, Canada) at 30°C. For the *C. albicans* suspensions, one colony was used to inoculate 10 ml of Sabouraud liquid medium supplemented with 0.1% glucose at pH 5.6. The cultures were grown for 18 h in a shaking water bath at 30°C. The yeast cells were then collected, washed with phosphate-buffered saline (PBS), counted with a hemocytometer, and adjusted to  $10^7$ /ml prior to use.

### Antimicrobial peptides

DS1 peptide was purchased from Synpeptide Co., Ltd (Shanghai, China). The peptide was stored in lyophilized format at -80°C until use. A DS1 solution was prepared, filtered (0.22  $\mu$ m pore size), and used for the experiments. Amphotericin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in distilled water to obtain a 250  $\mu$ g/ml concentration which was also filtered (0.22  $\mu$ m pore size) prior to use.

### **Effect of DS1 on *C. albicans* proliferation**

Proliferation was investigated by placing  $10^4$  *C. albicans* in 1 mL of Sabouraud dextrose broth in a round-bottom 12-well plate. The *C. albicans* cultures were supplemented or not with DS1 at concentrations of 10, 50, or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The negative controls were obtained by seeding *C. albicans* in medium without DS1, while the positive controls were *C. albicans* cultures supplemented with amphotericin B at concentrations of 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The cultures were grown for 24 h at 30°C in a shaking water bath; subsequently, the blastoconidia were collected, washed with PBS, and counted by means of a trypan blue dye exclusion assay. To do so, 3 aliquots of each culture were diluted V/V with a 1% trypan blue solution, then incubated for 5 min in ice, after which time cells were counted using a hemocytometer. Results are reported as the means  $\pm$  SD of six different experiments.

### **Effect of DS1 on *C. albicans* transition from blastospore to hyphal form**

To determine the effect of DS1 on the yeast-to-hyphae transition, *C. albicans* ( $10^5$  cells) was suspended in 500 ml of Sabouraud dextrose broth supplemented with 0.1% glucose and 10% fetal bovine serum (FBS). DS1 was then added (or not) to the culture at various concentrations (10, 50, or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The negative controls were *C. albicans* cultures without antimicrobial peptide, while the positive controls represented *C. albicans* cultures supplemented with amphotericin B (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The previously reported hyphae-inducing conditions (Théberge *et al.*, 2013), consisting of culture medium supplementation with 10% fetal calf serum and subsequent incubation at 37°C, were also used in our experiments. Following incubation for 3 or 6 h, the cultures were observed microscopically and photographed to record *C. albicans* morphology ( $n = 5$ ). To calculate the percentage of yeast cells that underwent the morphological transition, 3 aliquots from each culture ( $n = 5$ ) were used to determine the number of yeast cells and hyphae, using a hemocytometer and an optical microscope. The percentage of cells that underwent morphological transition was determined using the following formula: (number of hyphae divided by the number of yeast cells and hyphae)  $\times$  100. Furthermore, the length of the hyphal forms in each condition was measured using NIH-ImageJ software.

### **Effect of DS1 on *C. albicans* shape using Scanning Electron Microscopy (SEM)**

*C. albicans* ( $10^6$  cells) was cultured in Sabouraud liquid medium in the presence of DS1 at 10, 50, or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . *C. albicans* cultured without DS1 or in the presence of 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of amphotericin B (Amph-B) constituted the negative and positive controls, respectively. Following a 24-h culture, *C. albicans* pellets were prepared and used for SEM analyses. *C. albicans* cells were fixed in 3% (v/v) glutaraldehyde in PBS (pH 7.4) and dehydrated thereafter in increasing concentrations of ethanol (10%, v/v, increments to 100%). A drop was placed onto a round glass cover slip for critical-point drying (CPD 030; Balzers, Liechtenstein, Germany). The sample was then mounted onto an aluminum slab using silver paint (Agar Scientific, Stansted, UK). Sputter coating was performed (S150B, Edwards, London, UK) and the image was viewed using the SEM model Jeol JSM 6360 LV (Soquelec, Montréal, QC, Canada). The experiment was repeated four times.

### **Effect of DS1 on *C. albicans* biofilm formation**

*C. albicans* biofilms were obtained by culturing the yeast on a porous collagen scaffold which facilitated the yeast's penetration through the pores and its adhesion to the scaffold through collagen affinity. This also promoted biofilm formation and handling with no cell loss, thus contributing to maintaining the biofilm's structure. For this purpose, 5 mm  $\times$  5 mm samples of porous scaffold (Collatape, Zimmer Dental Inc., Carlsbad, CA, USA) were placed into a 24-well plate. The scaffolds were then rinsed twice with culture medium, seeded with *C. albicans* ( $10^5$  cells), and incubated for 30 min at 37°C without shaking to allow for adherence. Fresh Sabouraud medium was added to each well in the presence or absence of various concentrations of DS1 (10, 50, or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Two controls were included in this study segment: the negative control was *C. albicans* seeded without DS1, while the positive control was *C. albicans* seeded with Amph-B (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The *C. albicans*-seeded scaffolds were then incubated for 2 or 4 days at 37°C. The medium, DS1, and Amph-B were refreshed every 24 h. Following each culture period, *C. albicans* growth and biofilm formation was assessed by MTT assay and SEM.

### **MTT assay**

*C. albicans* growth and biofilms were assessed by means of the (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) MTT assay. MTT measures cell growth as a function of mitochondrial activity. Briefly, an MTT stock solution (5 mg/ml) was prepared in PBS and added to each collagen scaffold seeded for 2 and 4 days with *C. albicans*, at a final concentration of 10% (v/v). The *C. albicans* scaffolds were then incubated with the MTT solution at 37°C for 4 h, after which time the scaffold was washed 3 times to remove any non-integrated MTT solution. Each scaffold was then incubated for 15 min in the presence of 500 µl of 0.04 N HCl in isopropanol under shaking. Absorbance (optical density, OD) was subsequently measured at 550 nm using an xMark microplate spectrophotometer (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Results are reported as the means ± SD of six separate experiments.

### **Scanning electron microscopy (SEM) analysis**

Biofilms were fixed in ethylene glycol for 60 min and rinsed once thereafter with sterile PBS. Dehydration was performed in a series of 5-min treatments with ethanol solutions of increasing concentration (50, 70, 90, and twice at 100%). The dehydrated biofilms were kept overnight in a vacuum oven at 25°C, after which time they were sputter-coated with gold, examined, and imaged (n = 4) under a JEOL 6360 LV SEM (Soquelec, Montréal, QC, Canada) operating at a 30 kV accelerating voltage.

### **Effect of DS1 on *C. albicans* gene activation/repression**

*C. albicans* was subcultured for 18 h in Sabouraud liquid medium supplemented with 0.1% glucose, pH 5.6, in a shaking water bath at 30°C. The yeast cells were then collected, washed with PBS, and counted with a hemocytometer, after which time they were co-cultured with either DS1 (10, 50, or 100 µg/ml) or Amph-B (5 µg/ml) or with none of these molecules (controls) in Sabouraud liquid medium supplemented with 0.1% glucose, pH 5.6. The cultures were maintained at 30°C for 18 h.

### Quantitative real-time RT-PCR

The RNA (500 ng of each sample) was reverse transcribed into cDNA by means of the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). The conditions for the preparation of the cDNA templates for PCR analysis were 5 min at 25°C, 1 h at 42°C, and 5 min at 85°C. Quantitative PCR (qPCR) was also carried out. The quantity of mRNA transcripts was measured using the Bio-Rad CFX96 real-time PCR detection system. Reactions were performed using a PCR supermix, also from Bio-Rad (iQ SYBR Green supermix). Primers (Table 1) were added to the reaction mix to a final concentration of 250 nM. Five microliters of each cDNA sample were added to a 20 µl PCR mixture containing 12.5 µl of the iQ SYBR Green supermix, 0.5 µl of specific primers *ACT1*, *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP9*, *SAP10*, and *HWP1* (Midland Certified Reagent Company, Inc., Midland, TX, USA), and 7 µl of RNase/DNase-free water (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Each reaction was performed in a Bio-Rad MyCycler Thermal Cycler. For the qPCR, the CT was automatically determined using the accompanying Bio-Rad CFX Manager. The thermocycling conditions for the *ACT1* and the *SAPs* were established as 5 min at 95°C, followed by 30 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C, with each reaction performed in triplicate. For *HWP1*, the conditions were 3 min at 95°C, followed by 45 cycles of 10 s at 95°C, 30 s at 54°C, and 40 s at 72°C, with each reaction performed in triplicate. The specificity of each primer pair was determined by the presence of a single melting temperature peak. *ACT1* produced uniform expression levels varying by less than 0.5 CTs between sample conditions and thus became the reference gene for this study. The results were analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak) relative expression method (n = 5).

**Table 1: Primer sequences used for the qRT-PCR**

Gene	Primer sequence (5' à 3')	Amp size (bp)
<b>ACT-1</b>	Forward : GACAATTCTCTTCAGCACTAGTAGTGA Reverse : GCTGGTAGAGACTTGACCAACCA	87
<b>HWP1</b>	Forward : GCTCAACTTATTGCTATCGCTTATTACA Reverse : GACCGTCTACCTGTGGGACAGT	67
<b>SAP1</b>	Forward : TTTCATCGCTCTGCTATTGCTT Reverse : TGACATCAAAGTCTAAAGTGACAAAACC	86
<b>SAP2</b>	Forward : TCCTGATGTTAATGTTGATTGTCAAG Reverse : TGGATCATATGTCCCCTTTGTT	82
<b>SAP3</b>	Forward : GGACCAGTAACATTTTATGAGTTTGAT Reverse : TGCTACTCCAACAACCAACTTCAACAAT	87
<b>SAP9</b>	Forward : ATTTACTCCACAGTTATCACTGAAGGT Reverse : CCACAAGAACCAACCCCTCAGTT	86
<b>SAP10</b>	Forward : CCCGGTATCCAATAGAATCGAA Reverse : TCAGTGAATGTGACGAATTGAAGA	78

### Statistical analysis

Each experiment was performed at least four times, with experimental values expressed as means  $\pm$  SD. The statistical significance of the differences between the control (absence of DS1) and test (presence of DS1 or Amph-B) values was determined by means of a one-way ANOVA. Posteriori comparisons were performed using Tukey's method. Normality and variance assumptions were verified using the Shapiro-Wilk test and the Brown and Forsythe test, respectively. All of the assumptions were fulfilled. P values were declared significant at  $\leq 0.05$ . The data were analyzed using the SAS version 8.2 statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## Results

### DS1 reduced *C. albicans* growth

As shown in Fig. 1, DS1 significantly ( $p < 0.01$ ) reduced the growth of *C. albicans* over the 24-h contact period. Indeed, the number of *C. albicans* decreased from  $96 \times 10^6$  in the control to  $14 \times 10^6$  in the *C. albicans* culture treated with  $100 \mu\text{g/ml}$  of DS1. In the presence of Amph-B, the number of *C. albicans* was  $2.5 \times 10^6$ . It is interesting to note that the density of *C. albicans* significantly ( $p < 0.01$ ) decreased following comparison of the 10 and 50  $\mu\text{g/ml}$  concentrations and the 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  concentrations of DS1.

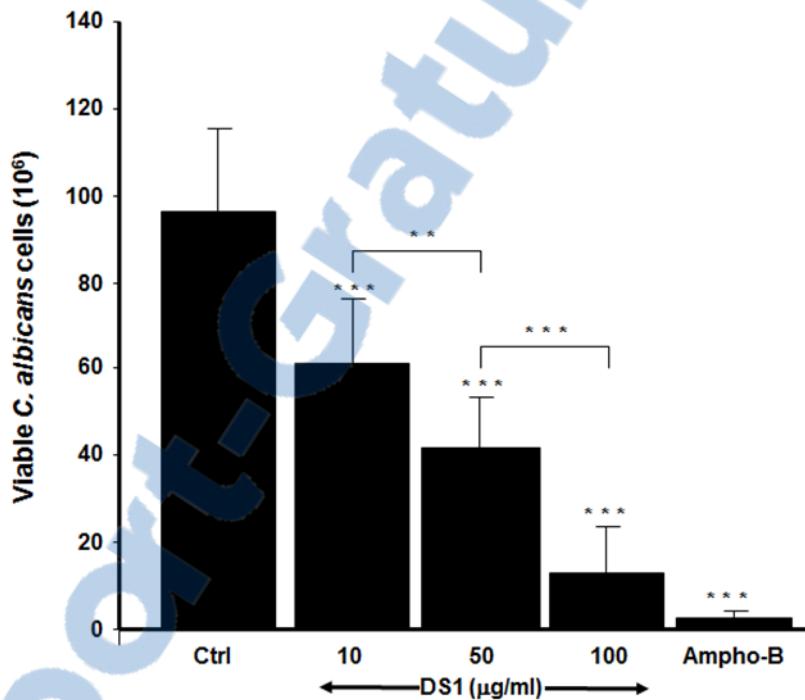
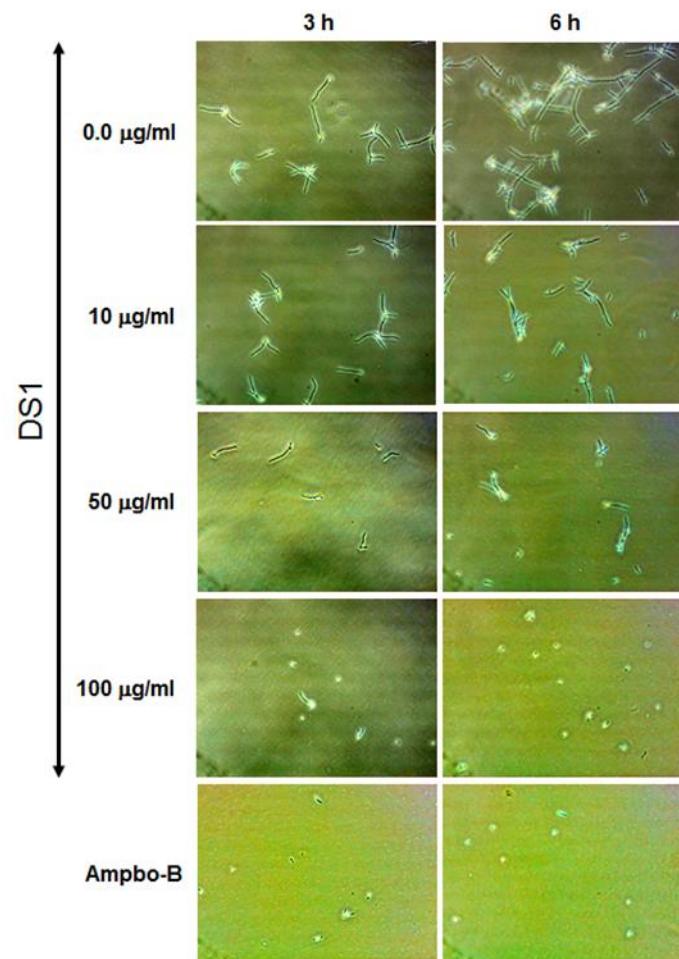


Fig. 1: **Dermaseptin-S1 reduced *C. albicans* growth.** Yeast cells were seeded with or without DS1 at various concentrations. The cultures were maintained for 24 h at 30°C. The live cells were counted by the trypan blue exclusion ( $n = 6$ ). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  when comparing the présence/absence of DS1 in the *C. albicans* cultures.

### DS1 reduced the transition of *C. albicans* from blastospore to hyphal form

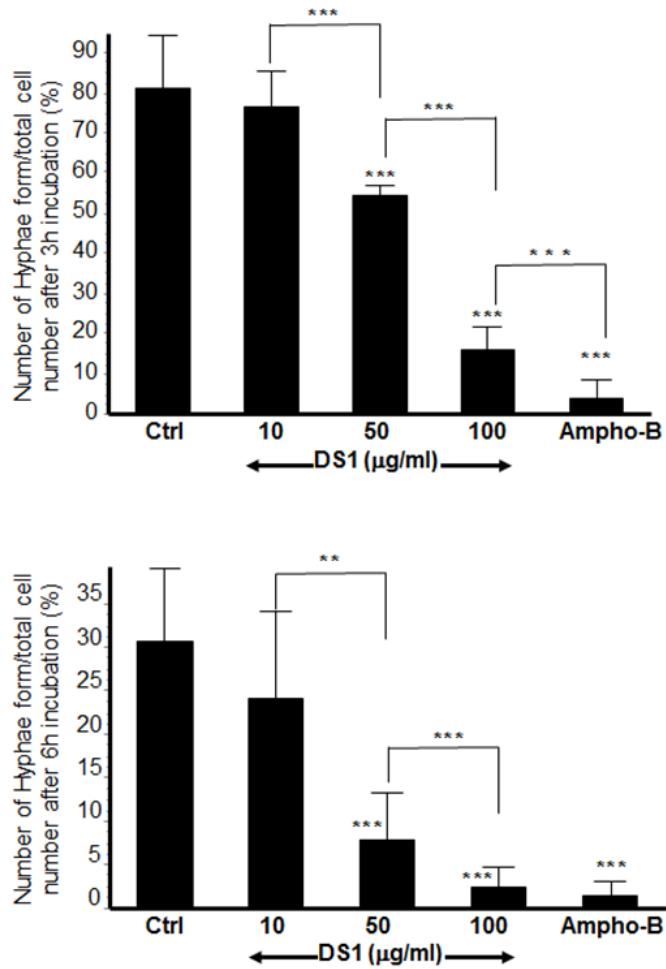
*C. albicans* cultures were supplemented with 10% FCS in the presence of DS1 (0, 10, 50, or 100  $\mu\text{g/ml}$ ), then incubated for 3 and 6 h. As shown in Fig. 2A, the density of elongated cells was high in the control (no DS1). This cell density decreased in the culture treated with 10,

50, or 100  $\mu\text{g/ml}$  of DS1. Indeed, with 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  of DS1, no more hyphal forms were visible. This was comparable to the culture treated with Amph-B. To confirm these observations, we investigated the *C. albicans* transition at 6 h post-treatment. Fig. 2A shows an elevated hyphae cell density in the control. This density decreased when the



**Fig. 2: Dermaseptin-S1 modulated *Candida* transition from blastospore to hyphae.** *C. albicans* was cultured in Sabouraud medium supplemented with 10% fetal bovine serum and DS1 at various concentrations for 3 and 6 h at 37°C. Following each culture period, the cultures were observed under an inverted microscope and photographed. Photos are representative ( $n = 5$ ).

culture was supplemented with DS1 at 10, 50, or 100  $\mu\text{g/ml}$ . Quantitative analyses showed a significant ( $p < 0.01$ ) decrease in the number of hyphal forms with every DS1 concentration after 3 h of treatment (Fig. 3). However, at this time point, Amph-B displayed a greater effect than DS1 did, even at 100  $\mu\text{g/ml}$ .



**Fig. 3: Dermaseptin-S1 decreased the number of *C. albicans* hyphal forms.** The numbers of yeast and hyphal forms were counted following 3 and 6 h of incubation with or without DS1 in hyphae growth conditions. The percentage of hyphae was obtained by dividing the number of hyphae by the total number of cells (blastospores and hyphae) in each culture. The means  $\pm$  SD relative values are shown. The levels of significance were obtained by comparing the percentages of yeast-to-hyphae transition in the presence/absence of DS1. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ( $n = 5$ ).

The evaluation at 6 h post-treatment also revealed a significant ( $p < 0.01$ ) decrease in the number of hyphae. Interestingly, the effect of DS1 at 100  $\mu\text{g/ml}$  was almost the same as the effect of Amph-B. Hyphae size also differed in the presence of DS1.

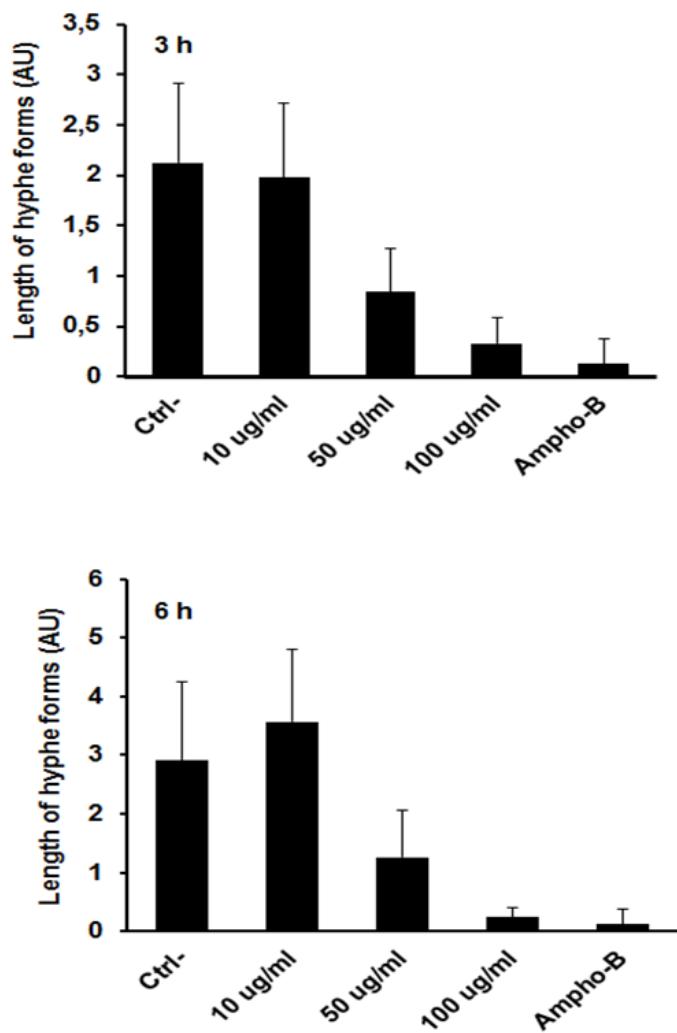


Fig. 4: **Dermaseptin-S1 modulated hyphal size.** The numbers of yeast and hyphal forms were counted following 3 and 6 h of incubation with or without DS1 in hyphal growth conditions. Hyphal tube length was measured with NIH-ImageJ software ( $n = 5$ ) and presented. Significance was obtained by comparing the DS1-treated and non-treated cultures. \*\*\* $p < 0.001$ .

As shown in Fig. 4, longer hyphal tubes were found at both 3 and 6 h in the control groups. However, in the *C. albicans* cultures treated with DS1 and Amph-B, the length of the hyphae was shown to be significantly ( $p < 0.01$ ) reduced. This reduction was greater at higher concentrations of DS1 (50 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Overall, the data demonstrate that DS1 decreased the transition of *C. albicans* from blastospore to hyphal form.

#### **DS1 treatment modified the external cell morphology of *C. albicans***

The aerobic growth of *C. albicans* cells showed typical yeast cells displaying the characteristic bud scars in the control (no DS1 treatment) (Fig. 5, Ctrl). A very limited development of pseudohyphae (chains of elongated unseparated blastospores) was observed in all of the culture conditions (presence or absence of DS1 or Amph-B). Following the addition of DS1, the external morphology of the cells did not appear to be as smooth as that of the untreated cells, which indicates a possible loss of cytosolic volume. Indeed, DS1 basically distorted the cell wall surface at high concentrations (50 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fig. 5). This cell shape was comparable to that observed in the *C. albicans* culture treated with Amph-B.

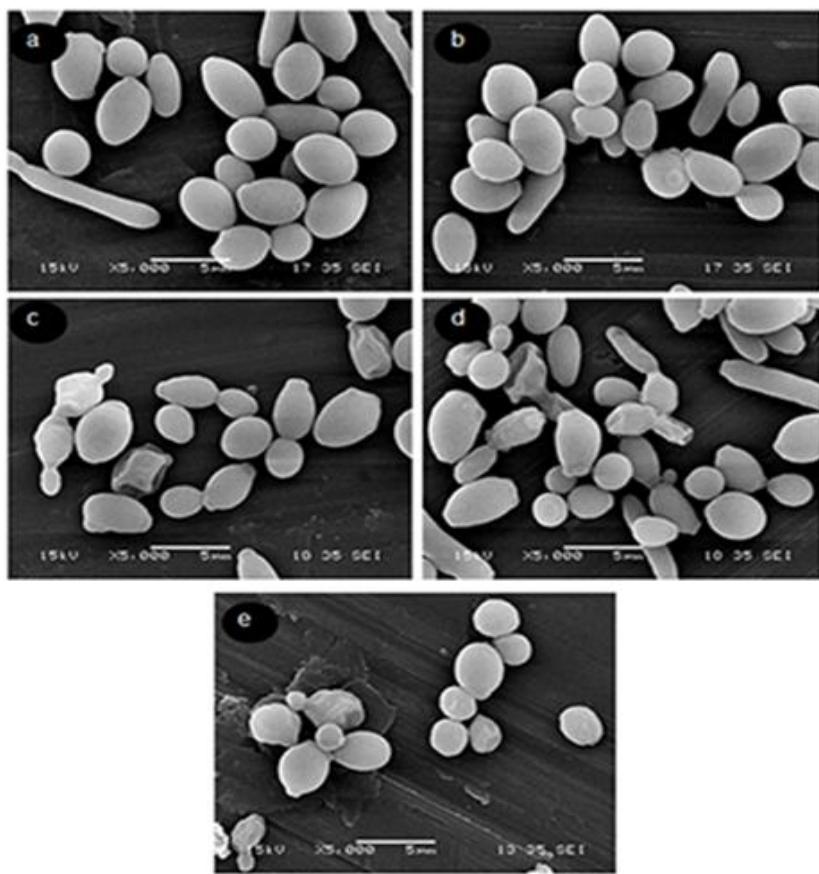
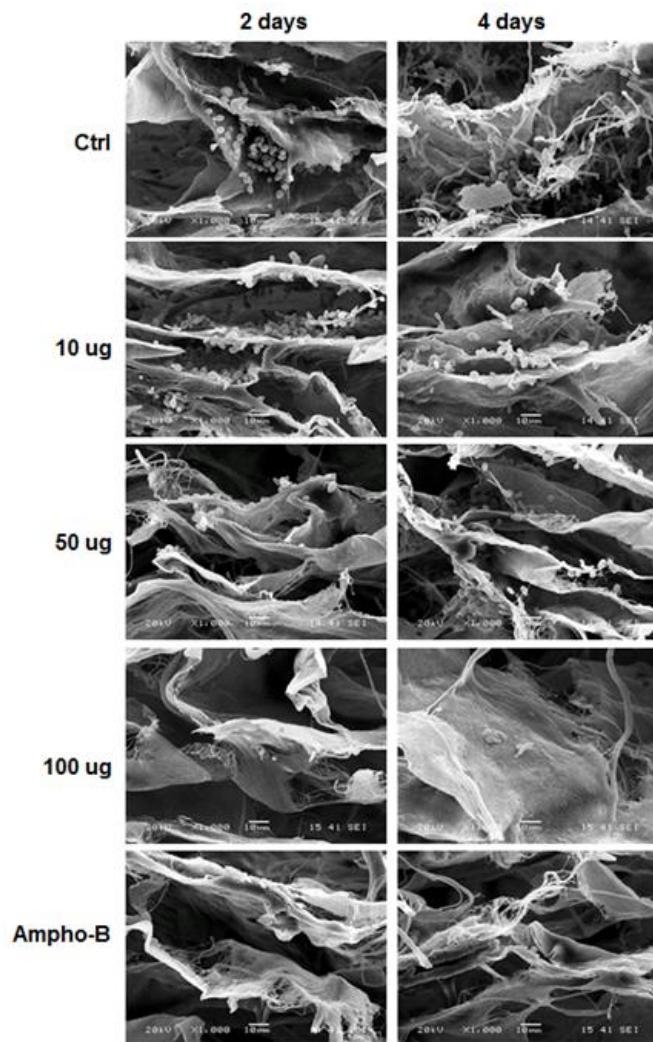


Fig. 5: **Scanning electron micrographs of *C. albicans* treated or not with DS1.** Cells were cultured in Sabouraud medium in the presence of DS1. Untreated *C. albicans* cultures (a) and amphotericin B ( $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ )-treated *C. albicans* cultures (e) were used as controls. Following incubation, *C. albicans* was prepared as described in the M&M section and observed under a scanning electron microscope. *C. albicans* was incubated with various concentrations of DS1 at  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  (b),  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  (c), and  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  (d) overnight at  $37^\circ\text{C}$ . Bar =  $5 \mu\text{m}$ . Photos are representative ( $n = 4$ ).

#### DS1 decreased *C. albicans* biofilm formation

Because DS1 contributed to decreasing *C. albicans* growth and transition, we investigated the potential of DS1 to inhibit *C. albicans* biofilm formation. Using SEM analyses, we showed that DS1 was capable of reducing *C. albicans* adhesion to (Fig. 6, arrows) and growth in the porous, 3D collagen scaffold. The efficacy of DS1 was indeed ascertained by the low cell density of *C. albicans* observed within the scaffold. The anti-biofilm activity of DS1 was observed at 2 and 4 days. Quantitative measurement of biofilm formation by the

MTT assay revealed a significant ( $p \leq 0.01$ ) decrease in the number of cells (Fig. 7). Indeed, at 2 days post-treatment, the absorbance referring to *C. albicans* viable cells decreased from  $0.33 \pm 0.04$  in the control to  $0.009 \pm 0.04$  in the *C. albicans* culture treated with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of DS1. The effect of DS1 at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was comparable to that obtained with Amph-B ( $0.006 \pm 0.001$ ). At 4 days post-treatment, the effect of DS1 in inhibiting biofilm formation was confirmed (Fig. 7B).



**Fig. 6: Dermaseptin-S1 decreased *C. albicans* biofilm formation.** *C. albicans* was cultured in Sabouraud medium with or without DS1 at various concentrations for 2 and 4 days in a porous 3D collagen scaffold. Cultures in the presence of amphotericin B (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were used as the positive controls. Biofilm analyses were performed using SEM. Note the limited density of *C. albicans* in the DS1-treated samples compared to the absence of DS1 treatment; (n = 4).

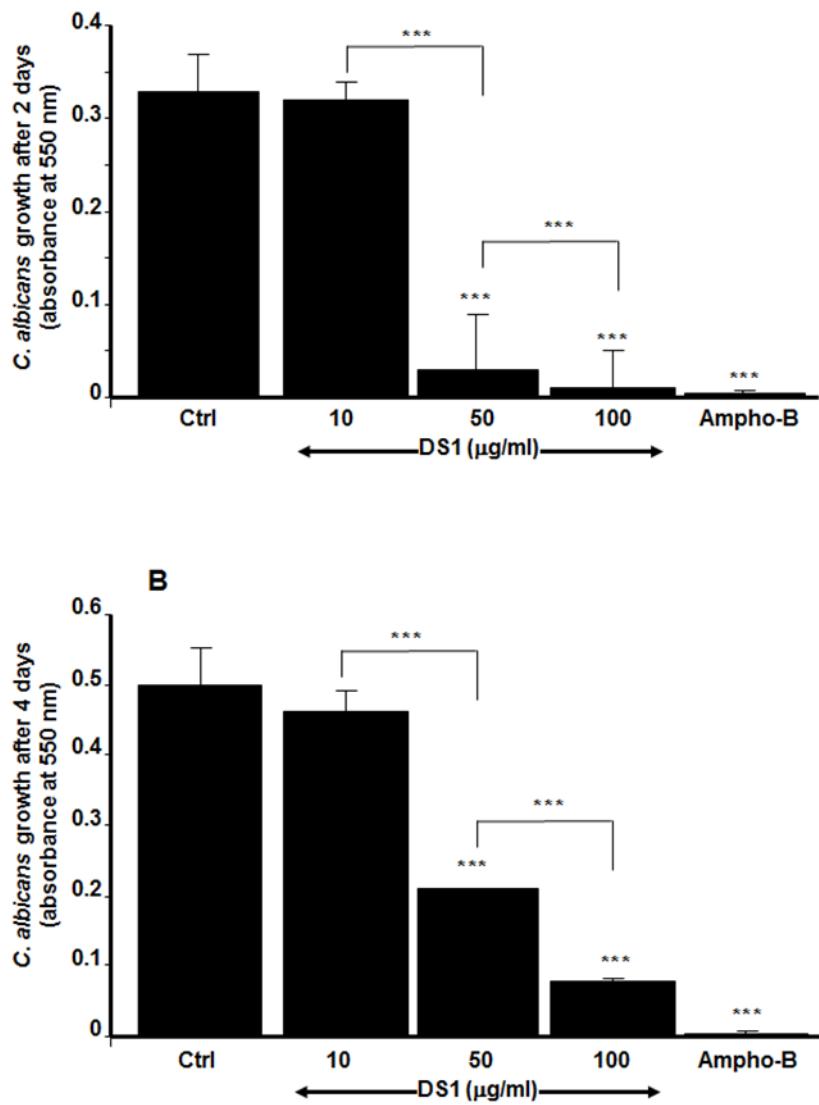


Fig. 7: **Quantitative measurement of the decreased biofilm formation following DS1 treatment.** *C. albicans* was cultured on a 3D porous scaffold in the presence of DS1 for 2 and 4 days. Following each culture period, biofilm formation was analyzed using the MTT assay. (A) 2 days; (B) 4 days. Results are means  $\pm$  SD; ( $n = 6$ ).

#### DS1 modulated the expression of various *C. albicans* genes

Based on the data showing that DS1 reduced *C. albicans* proliferation, transition, and biofilm formation, we sought to determine the level of involvement of this peptide on the

regulation of certain genes. Fig. 8 shows that the *HWPI* gene was significantly downregulated following exposure of *C. albicans* to DS1 for 18 h. The effect of DS1 on *HWPI* gene expression was significantly ( $p \leq 0.01$ ) high, particularly with 50 and 100  $\mu$ g/ml. We also analyzed *Sap1* gene expression following *C. albicans* exposure to DS1 and found (Fig. 8) a significant ( $p < 0.001$ ) decrease of *Sap1* gene expression, which was obtained with high concentrations (50 and 100  $\mu$ g/ml) of DS1 peptide. Similarly, *Sap2*, *Sap3* (Fig. 9), *Sap9*, and *Sap10* (Fig 10) expression was significantly ( $p \leq 0.01$ ) decreased. The greatest effects were obtained with *Sap2* and *Sap3*, compared to *Sap9* and *Sap10*.

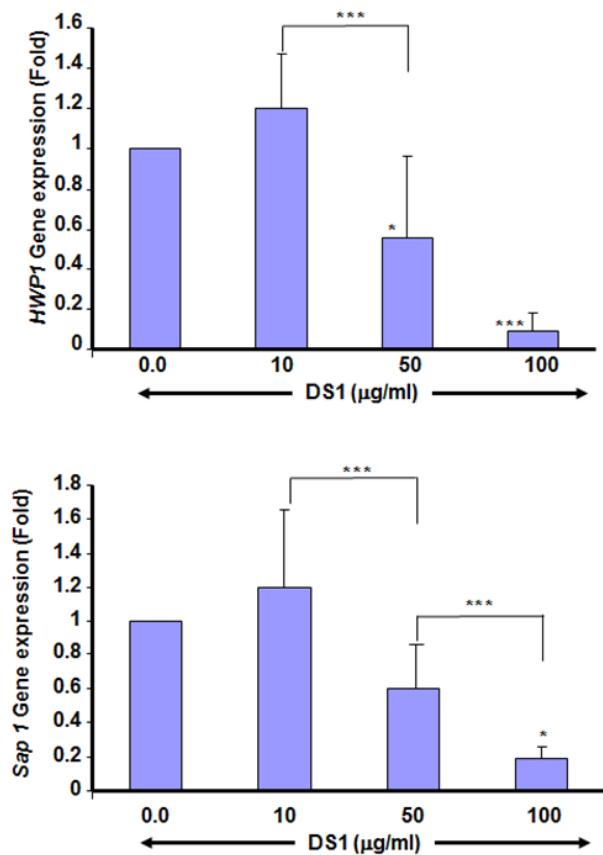


Fig. 8: **Dermaseptin-S1 decreased *HWP1* and *Sap1* mRNA expression by *C. albicans*.** Yeast cells were grown with or without DS1 for 24 h. *HWP1* and *Sap1* gene expression was analyzed by qRT-PCR. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n = 5); \*p < 0.05; \*\*\*p < 0.001.

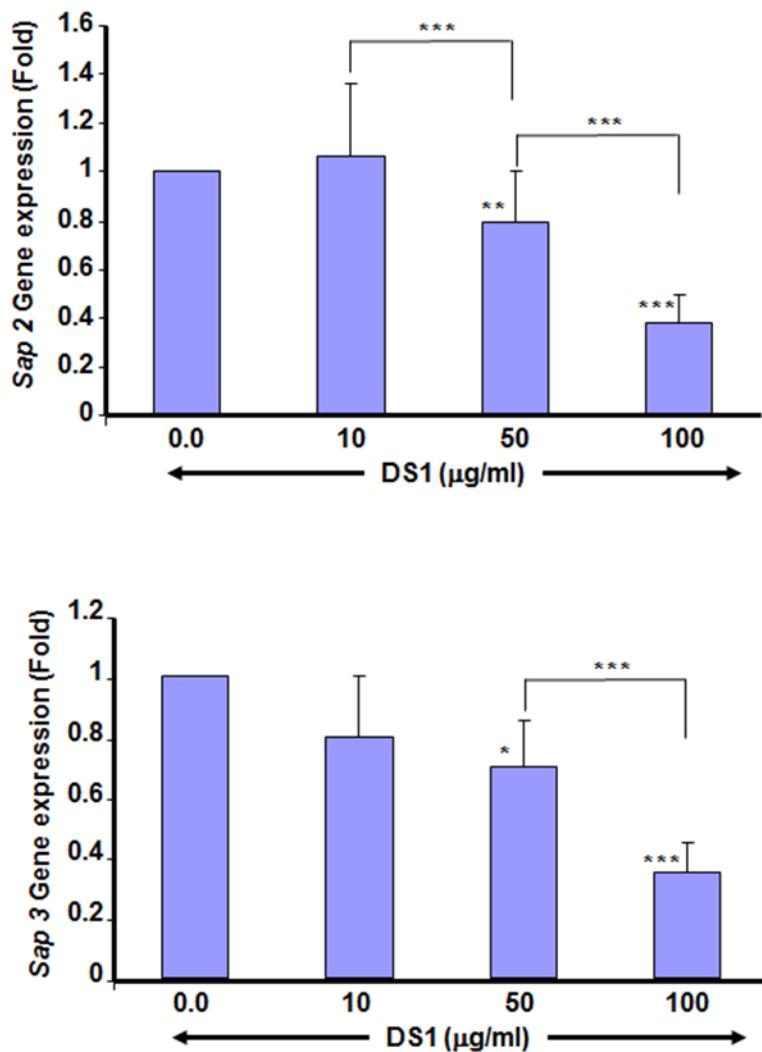


Fig. 9: **Dermaseptin-S1 decreased *Sap2* and *Sap3* mRNA expression by *C. albicans*.** Yeast cells were grown with or without DS1 for 24 h. *Sap2* and *Sap3* gene expression was analyzed by qRT-PCR. Data are expressed as means  $\pm$  SD ( $n = 5$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

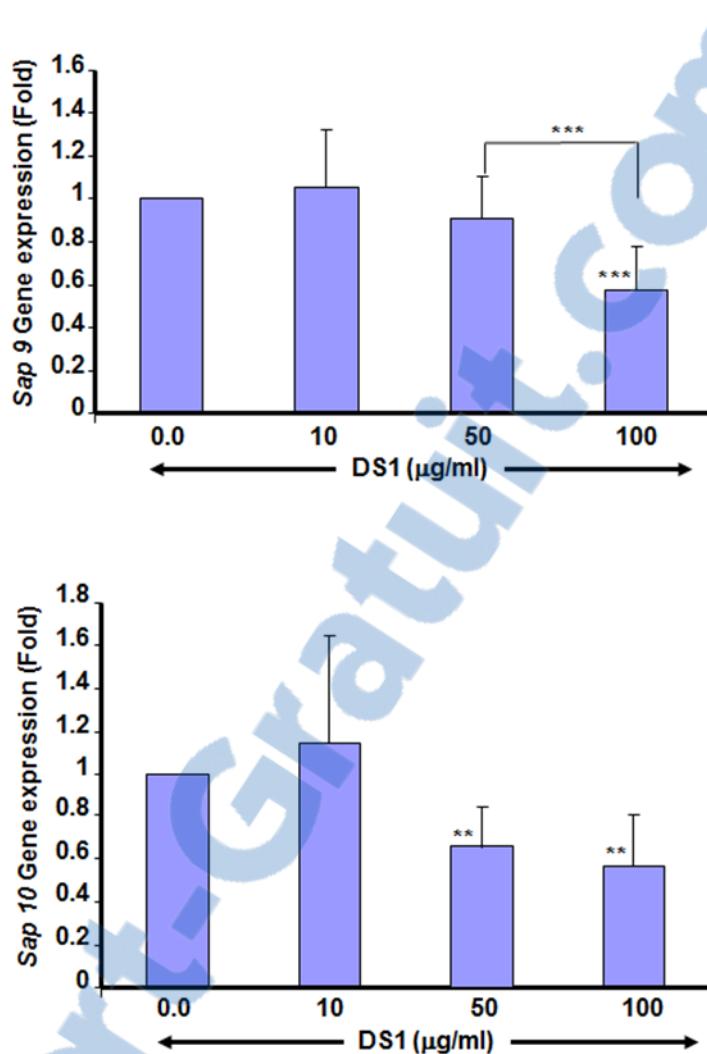


Fig. 10: **Dermaseptin-S1 decreased *Sap9* and *Sap10* mRNA expression by *C. albicans*.** Yeast cells were grown with or without DS1 for 24 h. *Sap9* and *Sap10* gene expression was analyzed by qRT-PCR. Data are expressed as means  $\pm$  SD ( $n = 5$ ); \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## Discussion

We demonstrated that DS1 at mid (50 µg/ml) and high (100 µg/ml) concentrations effectively inhibited *C. albicans* growth. Although the growth inhibition obtained with DS1 was less than that obtained with Amph-B, the observed effects of DS1 were nonetheless significant ( $p < 0.01$ ), leading to an over 80% decrease in the number of cells. The growth inhibition effects of DS1 are in agreement with those of bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* (Okkers *et al.*, 1999). Furthermore, our results support other findings (Harris *et al.*, 2009) reporting the effectiveness of dermaseptin-S3 to inhibit *C. albicans* binding and growth. In another supporting study, analogues of DS1 were found to decrease the growth of different microorganisms, including bacteria and fungi (Savoia *et al.*, 2008). Our findings strongly suggest that DS1 is also effective against fungal growth and may be suitable for use to control *C. albicans* infections. Further studies on the possible synergistic effect of Amph-B and DS1 against *C. albicans* growth are therefore justified.

*Candida* virulence is not limited to cellular overgrowth but is also mediated by its capacity to change the morphotype from yeast to hyphae. In an experimental protocol that induced the formation of hyphae through the presence of serum in the culture medium, we showed for the first time that DS1 significantly downregulated the transition of *Candida* from yeast to hyphal form. A similar study on esculentin-1b, an N-terminal 1-18 fragment of frog skin, reported an inhibition of *C. albicans* transition (Luca *et al.*, 2014). The effect of DS1 on *C. albicans* transition is consistent with the effects reported in other studies with different antimicrobial peptides which were shown to effectively block the morphological shift of *Candida* from yeast to hyphae (Akerey *et al.*, 2009; Théberge *et al.*, 2013). Thus DS1 may possibly contribute to the control of *C. albicans* infection by reducing cell growth and the yeast-hyphae transition.

The effect of DS1 on *C. albicans* growth can occur through either cytolysis or cell membrane disruption, resulting in cell death similar to what was demonstrated with histatin-5 (Vylkova *et al.*, 2007). Indeed, histatin-5 was shown to induce the selective leakage of intracellular ions and ATP from yeast cells. This is caused by the translocation of histatin-5 into the intracellular compartment and accumulates to a critical concentration (Jang *et al.*,

2010). Further studies are thus warranted to shed light on the fungicidal mechanism of DS1 peptide.

Because we showed that DS1 distorted the cell wall surface, as did Amph-B, this peptide may modulate *Candida* growth by compromising both the cell wall and/or membrane and cytoplasm integrity (Akerey *et al.*, 2009). Similar alterations were observed following treatment of *C. albicans* cells with ciclopirox (Niederth *et al.*, 2003), Amph-B, and nisin Z (Akerey *et al.*, 2009). The effect of DS1 on *C. albicans* ultrastructure may be linked to *Candida* interacting with its environment which involves pH, temperature, and most certainly the host.

*C. albicans* growth and transition from blastospore to hyphal form are important features for biofilm formation and *C. albicans* virulence because a strain that is genetically manipulated to grow exclusively in the yeast form is greatly hindered in generating biofilms. In addition, a variety of *C. albicans* mutants known to be unable to form hyphae have also been found to show biofilm defects (Banerjee *et al.*, 2013). Because DS1 reduced *C. albicans* growth and inhibited its transition from yeast to hyphae, this suggests that this peptide may also be effective in inhibiting its biofilm formation. Our findings indicate that DS1 was indeed capable of reducing biofilm formation similar to the activity of Amph-B, a well-known antifungal molecule. Also of interest is that a significant inhibition of *C. albicans* biofilm formation was obtained with a concentration of as low as 50 µg/ml of DS1 peptide. These useful data support those of other studies showing the positive action of synthetic peptide to control and prevent microbial biofilm formation (da Silva *et al.*, 2013). Thus, with its significant impact in reducing *C. albicans* biofilm formation, DS1 shows definite promise for several novel applications in the clinical setting. Further investigations will elucidate this potential.

Compromising *C. albicans* cell wall and morphological changes from blastospore to hyphae could take place through the involvement of various genes (Desai *et al.*, 2015). Once it reaches the cell, DS1 can potentially act on the cytoplasmic membrane as well as on intracellular targets (Beckloff *et al.*, 2007). The action of DS1 against *C. albicans* may also operate through the modulated expression of certain *C. albicans* genes that control growth (Bauerova *et al.*, 2012), transition (Cleary *et al.*, 2012), and biofilm formation (Nobile *et al.*,

2012). We therefore examined the effect of DS1 on the *HWP1* gene. *HWP1* is a downstream component of the cAMP-dependent PKA pathway and is positively regulated by EFG1 (Sharkey *et al.*, 1999). In the present study, the transcript level of *HWP1* decreased when treated with DS1 at 50 and 100 µg/ml. These data suggest that DS1 did indeed impact the activity of the cAMP–EFG1 pathway and led to an alteration of *C. albicans* growth and morphogenesis. Further research is therefore required to investigate the invasion/virulence of DS1-treated *C. albicans*.

It is well known that *Candida* pathogenesis can be established by virtue of proteolytic enzymes under the control of *Sap* genes (Staniszewska *et al.*, 2016). Because DS1 downregulated *C. albicans* growth and transition, this may have occurred through a modulation of the *Sap* genes. Our findings confirm that DS1 is capable of decreasing *Sap1*, *Sap2*, *Sap3*, *Sap9*, and *Sap10* mRNA expression in *C. albicans*, which may lead to reducing *C. albicans* virulence (Staniszewska *et al.*, 2016). Our study thus establishes, for the first time, a clear link between an antimicrobial peptide (DS1), *C. albicans* growth, hyphal morphogenesis, and gene expression. However, the precise interactions between DS1 and gene expression during *C. albicans* pathogenesis remain to be elucidated. Future studies must also focus on the role of DS1 in controlling *Candida* virulence/pathogenesis in conjunction with host defenses.

## Conclusion

This study is the first to demonstrate that dermoseptin-S1 downregulates *C. albicans* growth and transition, resulting in decreased biofilm formation. Also of interest is that these effects may occur through the modulation of certain *C. albicans* genes, such as *HWP1* and SAPs. Overall results clearly highlight the potential of DS1 as an antifungal molecule.

## Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by

## References

- Akerey B, Le-Lay C, Fliss I, Subirade M, Rouabchia M, 2009. In vitro efficacy of nisin Z against *Candida albicans* adhesion and transition following contact with normal human gingival cells. *J Appl Microbiol* **107**(4):1298-307
- Amiche M., Ladram A., Nicolas P2008. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily phyllomedusinae. *Peptides* **29**: 2074–2082.
- Aoki W, Kitahara N, Miura N, Morisaka H, Yamamoto Y, Kuroda K, Ueda M, 2011. Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. *J Biochem* **150**(4): 431-8.
- Arendrup MC, Patterson TF, 2017. Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis* **216**(suppl-3): S445-S451.
- Banerjee M, Uppuluri P, Zhao XR, Carlisle PL, Vipulanandan G, Villar CC, López-Ribot JL, Kadosh D, 2013. Expression of UME6, a key regulator of *Candida albicans* hyphal development, enhances biofilm formation via Hgc1- and Sun41-dependent mechanisms. *Eukaryot Cell* **12**: 224–232.
- Bauerova V, Pichova I, Hruskova-Heidingsfeldova O, 2012. Nitrogen source and growth stage of *Candida albicans* influence expression level of vacuolar aspartic protease Apr1p and carboxypeptidase Cpy1p. *Can J Microbiol* **58**: 678–681
- Beckloff N, Laube D, Castro T, Furgang D, Park S, Perlin D, Clements D, Tang H, Scott RW, Tew GN, Diamond G, 2007. Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:4125–4132.
- Bochenska O, Rapala-Kozik M, Wolak N, Aoki W, Ueda M, Kozik A, 2016. The action of ten secreted aspartic proteases of pathogenic yeast *Candida albicans* on major human salivary antimicrobial peptide, histatin 5. *Acta Biochim Pol* **63**(3): 403-10.
- Brand GD, Santos RC, Arake LM, Silva VG, Veras LM, Costa V, Costa CH, Kuckelhaus SS, Alexandre JG, Feio MJ, Leite JR. 2013. The skin secretion of the amphibian *Phyllomedusa nordestina*: a source of antimicrobial and antiprotozoal peptides. *Molecules* **18**(6): 7058-70.

- Cleary IA, Lazzell AL, Monteagudo C, Thomas DP, Saville SP, 2012. BRG1 and NRG1 form a novel feedback circuit regulating *Candida albicans* hypha formation and virulence. *Mol Microbiol* **85**: 557–573.
- da Silva BR, de Freitas VA, Carneiro VA, Arruda FV, Lorenzon EN, de Aguiar AS, Cilli EM, Cavada BS, Teixeira EH, 2013. Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci. *Peptides* **42C**: 78–83.
- Desai JV, Mitchell AP, 2015. *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. *Microbiol Spectr*. **3**(3): 1-12
- Devrim İ, Kara A, Düzgöl M, Karkiner A, Bayram N, Temir G, Şencan A, Sorguç Y, Gülfidan G, Hoşgör M, 2017. Burn-associated bloodstream infections in pediatric burn patients: Time distribution of etiologic agents. *Burns* **43**(1):144-148.
- Gibson BW, Tang D, Mandrell R, Kelly M, Spindel E, 1991. Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the asian toad, bombina orientalis. *J Biol Chem* **266**: 23103–23111.
- Giovannini MG, Poulter L, Gibson BW, Williams DH, 1987. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *xenopus laevis* prohormones. *Biochem J* **243**: 113–120.
- Harris M, Mora-Montes HM, Gow NA, Coote PJ, 2009. Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. *Microbiology* **155**(Pt 4): 1058-70.
- Hernandez C, Mor A, Dagger F, Nicolas P, Hernandez A, Benedetti E, Dunia I, 1992. Functional and structural damage in *leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin. *Eur J Cell Biol* **59**: 414-424
- Hirano M, Takeuchi Y, Matsumori N, Murata M, Ide T, 2011. Channels formed by amphotericin B covalent dimers exhibit rectification. *J Membrane Biol* **240**: 159-64
- Jang WS, Bajwa JS, Sun JN, Edgerton M, 2010. Salivary histatin 5 internalization by translocation, but not endocytosis, is required for fungicidal activity in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **77**: 354–370.
- Katiyar S, Pfaller M, Edlind T, 2006. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2892–2894.

- Konaté A, Barro-Kiki PCM, Kassi KF, Angora KE, Vanga-Bosson H, Djohan V, Bédia-Tanoh AV, Miézan AJS, Yavo W, Menan EI, 2017. Oropharyngeal candidiasis prevalence among HIV-infected patients at the teaching hospital of Treichville (Abidjan, Côte d'Ivoire). *J Mycol Med* pii: S1156-5233.
- Luca V, Olivi M, Di Grazia A, Palleschi C, Uccelletti D, Mangoni ML, 2014. Anti-*Candida* activity of 1-18 fragment of the frog skin peptide esculentin-1b: in vitro and in vivo studies in a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Cell Mol Life Sci* **71**(13): 2535-46.
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S, 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* **8**: 76-81
- Mor A, Hani K, Nicolas P, 1994. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J Biol Chem* **269**: 31635-31641.
- Mor A, Van Huong N, Delfour A, Migliore-Samour D, Nicolas P, 1991. Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry* **30**: 8824-8830.
- Moudgal V, Sobel J, 2010. Antifungals to treat *Candida albicans*. *Expert Opin Pharmacother* **11**: 2037-2048.
- Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsichlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B, 2008. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* **154**(Pt 11): 3266-80.
- Nailis H, Kucharikova S, Ricicova M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, Coenye T, (2010). Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol* **10**: 114-125.
- Niederwirth M, Kunze D, Seibold M, Schaller M, Korting HC, Hube B, 2003. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1807-17.

- Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, Tuch BB, Andes DR, Johnson AD, 2012. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell* **148**: 126–138.
- Okkers DJ, Dicks LM, Silvester M, Joubert JJ, Odendaal HJ, 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J Appl Microbiol* **87**: 726–734.
- Rouabchia M, Semlali A, Audoy J, Chmielewski W, 2012. Antagonistic effect of *Candida albicans* and IFN $\gamma$  on E-cadherin expression and production by human primary gingival epithelial cells. *Cell Immunol* **280**(1): 61-7.
- Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M, 2016. Innate immunity and saliva in *Candida albicans*-mediated oral diseases. *J Dent Res* **95**(4): 365-71.
- Sangaré I, Sirima C, Bamba S, Zida A, Cissé M, Bazié WW, Sanou S, Dao B, Menan H, Guiguemdé RT, 2017. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in pregnancy at three health centers in Burkina Faso. *J Mycol Med* **pii**: S1156-5233.
- Santos AL, Braga-Silva LA, 2013. Aspartic protease inhibitors: effective drugs against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mini Rev Med Chem* **13**(1): 155-62.
- Sasso M, Roger C, Sasso M, Poujol H, Barbar S, Lefrant JY, Lachaud L, 2017. Changes in the distribution of colonising and infecting *Candida* spp. isolates, antifungal drug consumption and susceptibility in a French intensive care unit: A 10-year study. *Mycoses* doi: 10.1111/myc.12661
- Savoia D, Guerrini R, Marzola E, Salvadori S, 2008. Synthesis and antimicrobial activity of dermaseptin S1 analogues. *Bioorg Med Chem* **16**(17): 8205-9.
- Sharkey LL, McNemar MD, Saporito-Irwin SM, Sypherd PS, Fonzi WA, 1999. HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1. *J Bacteriol* **181**: 5273–5279.
- Simmaco M, Mignogna G, Barra D, Bossa F, 1994. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J Biol Chem* **269**: 11956–11961
- Staniszewska M, Małgorzata B, Zbigniew O, 2016. Contribution of aspartic proteases in *Candida* virulence. Protease inhibitors against *Candida* infections. *Curr Protein Pept Sci* **18**(10): 1050-1062.

- Strahilevitz J, Mor A, Nicolas P, Shai Y, 1994. Spectrum of antimicrobial activity and assembly of dermaseptin-b and its precursor form in phospholipid membranes. *Biochemistry* **33**: 10951–10960
- Théberge S, Semlali A, Alamri A, Leung KP, Rouabha M, 2013. *C. albicans* growth, transition, biofilm formation, and gene expression modulation by antimicrobial decapeptide KSL-W. *BMC Microbiol* **13**: 246.
- Vylkova S, Jang WS, Li W, Nayyar N, Edgerton M, 2007. Histatin 5 initiates osmotic stress response in *Candida albicans* via activation of the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Eukaryot Cell* **6**: 1876–1888.

## CHAPITRE III : DISCUSSION ET CONCLUSIONS

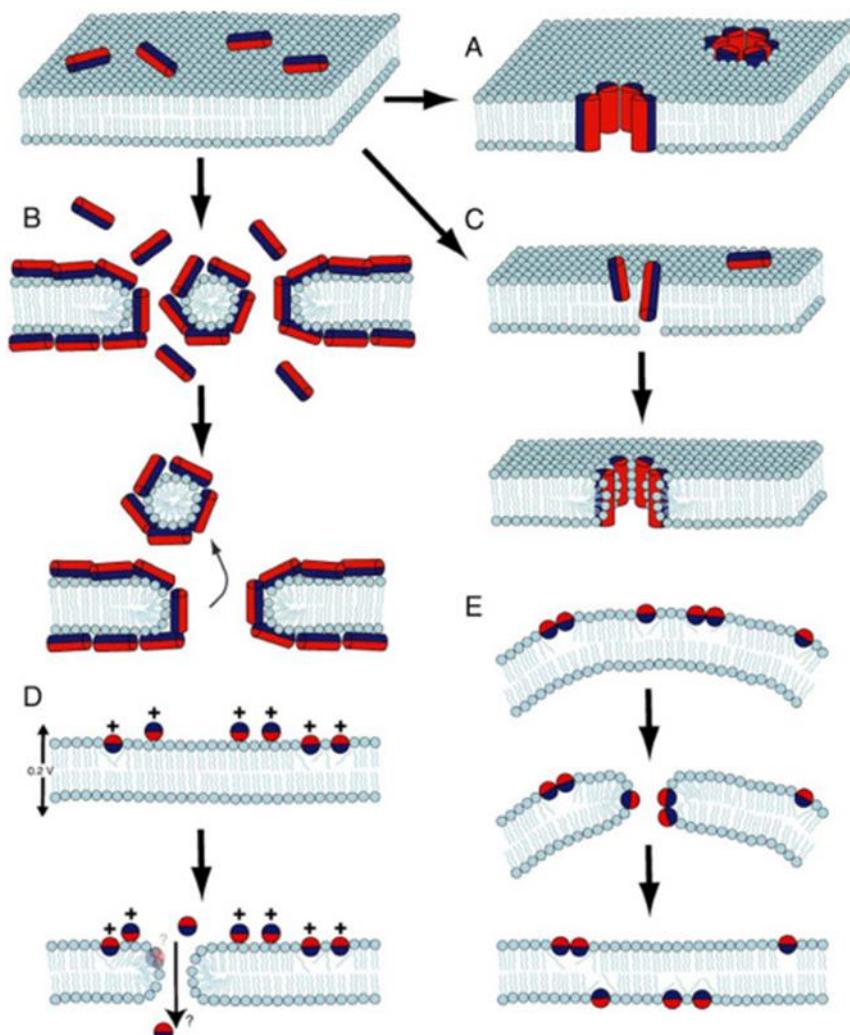
Les levures opportunistes *Candida* vivent en symbiose de manière saprophyte chez 60% des personnes saines. *Candida* est identifié dans plusieurs sites du corps humain, dont la cavité buccale, le tube digestif et les voies aériennes supérieures jusqu'aux intestins, et dans les voies génito-urinaires. C'est un microorganisme dimorphe et le polymorphisme de *C. albicans* joue un rôle important dans l'invasion et l'évasion des cellules de l'hôte. La forme hyphe constitue une forme de virulence de *Candida* contribuant à la formation de biofilm. Chez des personnes ayant un faible système immunitaire (personnes âgées ; personnes malades qui sont sous immunosupresseurs comme antibiotiques pour une longue durée ; personnes HIV+ ; personnes subissant une intervention chirurgicale, une chimiothérapie, etc.), entre autres, *Candida* est responsable des candidoses. L'utilisation d'antifongiques réduit la pathogénèse de *C. albicans* et améliore la santé et le bien-être du patient.

Le but de ce travail est d'évaluer l'effet de la DS1 sur la croissance de *C. albicans*, sur son changement morphologique et sur sa capacité à former un biofilm. Nous avons aussi évalué l'impact de la DS1 sur l'expression de certains gènes dont les Saps 1, 2, 3, 9 et 10 et le *Hwp1* impliqués dans différents processus de virulence de *C. albicans*. L'effet sur l'ultrastructure de la membrane des cellules *C. albicans* est évalué aussi.

Les résultats ont montré que la DS1 inhibe la croissance de *C. albicans*. L'effet inhibiteur est plus important avec la concentration la plus forte de la DS1. Ces résultats vont dans le même sens et confirment celle déjà rapportée sur l'effet inhibiteur antifongique de la DS1 sur *C. albicans* et d'autres microorganismes (Mor et al., 1994-b ; Savoia et al., 2008 ; Savoia et al., 2010). L'effet inhibiteur du DS1 sur la croissance de *C. albicans* peut passer par une modification de la structure membranaire de *Candida*. En effet, les cellules traitées avec la DS1 montrent une déformation et une altération de la structure membranaire ainsi qu'une diminution de la taille des cellules traitées par la DS1. La DS1 semble se fixer sur les phospholipides anioniques (chargés négativement) et s'intercalent dans la bicouche lipidique de *C. albicans*, grâce à sa structure hélice  $\alpha$  hélicoïdale amphipatique cationique. Cette fixation permet de créer des pores dans la membrane cellulaire,

ce qui perturbe son équilibre osmotique et cause la lyse membranaire complète (Mor *et al.*, 1994-c ; Shai, 2002). Différents modes d'action des PAMs ont été décrites selon le type d'interaction peptide-membrane bactérienne (Li *et al.*, 2012 ; Travkova *et al.*, 2017) [Fig. 21].

Des études approfondies ont précisé le mode d'action des dermaseptines sur la bicouche lipidique anionique représentée dans la formation de « barrel-stave » [Fig. 21] où les peptides pénètrent la bicouche lipidique pour former des pores bordés de peptides, expliquant les invaginations et les déformations observées au niveau de la membrane (Huang *et al.*, 2010).



**Figure 21: Les modes d'action des peptides antimicrobiens (Chan *et al.*, 2006)**

Barrel-stave (A), tapis (B), pores toroïdaux (C), électroporation moléculaire (D), radeau de forage (E). La partie rouge du peptide représente une surface hydrophile, tandis que le bleu est hydrophobe.

La morphologie filamenteuse offre des avantages de survie, de colonisation, d'invasion et d'évasion du système immunitaire (Justice *et al.*, 2006 ; Chauhan *et al.*, 2006 ; Abrahams *et al.*, 2006). La filamentation a été impliquée dans la survie bactérienne lors de l'exposition à des stress environnementaux. En plus de la résistance aux stress biologiques, la filamentation peut également contribuer à la résistance d'un agent pathogène aux molécules antimicrobiennes. Les organismes filamenteux sont couramment observés dans les échantillons cliniques prélevés chez des patients traités aux antifongiques (Chen *et al.*, 2005 ; Miller *et al.*, 2004 ; Beaber *et al.*, 2004). Dans ce cas, l'inhibition de la croissance cellulaire n'est peut-être pas assez pour combattre un pathogène avec une plasticité morphologique comme *C. albicans*. La transition de la forme blastospore à la forme hyphe est un facteur de virulence important de *C. albicans*. La DS1 prévient cette transformation morphologique. En effet, nos résultats ont montré que la DS1 réduit significativement la transformation de *C. albicans*, une inhibition importante à forte concentration. Ces résultats montrent pour la première fois la capacité de la DS1 à inhiber la formation des formes hyphes de *C. albicans*. Nos travaux sont en accord avec d'autres travaux montrant une inhibition de la transformation morphologique de *C. albicans* par le peptide antimicrobien KSL-W (Théberge *et al.*, 2013) ou la molécule farnesol (Décanis *et al.*, 2011) dans le but de contrôler la pathogénicité de cette levure.

Une des causes de la résistance des pathogènes est leur croissance sous forme de biofilms qui sont tolérants ou résistants à la plupart des classes d'agents antifongiques. Par conséquent, de nouveaux agents anti-biofilm sont nécessaires pour réduire l'incidence des infections associées au biofilm. De nos jours, les PAMs sont considérés comme des alternatives ou des compléments précieux aux agents antifongiques classiques pour combattre les infections fongiques. Nos résultats démontrent, pour la première fois, que la DS1 réduit de façon significative la formation de biofilm à *C. albicans*. Ces résultats confirment la capacité de la DS1 à prévenir la formation du biofilm *C. albicans*. La DS1 peut être considérée comme un candidat potentiel au traitement des infections à *Candida* (Morici *et al.*, 2016).

L'effet inhibiteur de la DS1 sur la croissance, la transformation et la formation de biofilm peut se faire via la réduction de l'expression de certains gènes de virulence *C. albicans*. En effet, la DS1 diminue l'expression des gènes *Saps* (1, 2, 3, 9 et 10) et de *Hwp1*. Ces résultats montrent pour la première fois une modulation de ces gènes de virulence de *C. albicans* par la DS1 et vont dans le même sens que ceux obtenus par Théberge *et al.*, (2013) avec un autre peptide antimicrobien, le KSL-W. Nos résultats confirment d'autres études qui ont montré que la modulation par régulation négative de plusieurs gènes de *Candida* est critique pour la croissance, la transformation levure-hyphe, la formation de biofilm, l'invasion tissulaire et les dommages cellulaires (James *et al.*, 2016).

L'efficacité de la DS1 sur l'inhibition de la transformation de *C. albicans* était obtenue quand la DS1 a été rajoutée en début de culture, et dans des conditions favorisant la transformation (10% du sérum de veau fœtal et incubation à 37°C) de *C. albicans*. Il est intéressant de noter que même à de faibles concentrations, la DS1 réduit les formes hyphes de *C. albicans*. L'inhibition du changement de forme de *C. albicans* pourrait réduire la formation de biofilms.

Dans cette étude nous avons démontré que la DS1 inhibe la formation de biofilm de *C. albicans* lorsque cette molécule antimicrobienne est présente dans le milieu dès le début de la culture. Cependant, il reste à étudier l'effet de la DS1 sur la perturbation d'un biofilm déjà formé (biofilm mature), tel que démontré par d'autres PAMs dont le KSL-W (Théberge *et al.*, 2013). La réalisation de cette étude sera intéressante pour voir si la DS1 a un effet sur la formation et sur la dégradation d'un biofilm. Nous avons démontré une diminution de l'expression de ces gènes lorsque *C. albicans* est incubé en présence de la DS1. Cependant, les voies de signalisations impliquées dans cette inhibition restent à découvrir.

En conclusion, nous avons démontré, pour la première fois que la DS1 est capable de contrôler la pathogénicité de *Candida* en réduisant sa croissance, sa transformation, la formation de biofilm ainsi que l'expression de certains gènes de virulences de *C. albicans*. L'ensemble de nos travaux suggère que la DS1 pourrait être utilisée comme un agent antifongique pour traiter les infections fongiques,

notamment les candidoses. Cependant, plusieurs études restent à faire avant une application clinique de la DS1. Ces études pourraient inclure :

- Une évaluation de l'innocuité de la DS1 sur les cellules gingivales humaines
- Une évaluation de l'effet de la DS1 sur la bactérie *S. mutans* qui est la cause des caries au niveau des dents et qui forme souvent des biofilms mixtes avec *C. albicans*.
- Une étude de l'effet de la DS1 sur le biofilm mixte de *C. albicans* et *S. mutans*
- Une évaluation de la possibilité d'inclure la DS1 dans les matériaux de restauration dentaire pour réduire la formation de dans la cavité buccale. Ce modèle s'inspirerait de ce qui existe déjà en clinique avec l'utilisation d'un matériau de restauration dentaire contenant du fluor pour prévenir la formation de biofilm.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abaci, O., Haliki-Uztan, A., Ozturk, B., Toksavul, S., Ulusoy, M., & Boyacioglu, H. (2010). Determining *Candida spp.* incidence in denture wearers. *Mycopathologia*, 169(5), 365-372.
- Abrahams, G. L., & Hensel, M. (2006). Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cellular microbiology*, 8(5), 728-737.
- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jörnvall, H., Wigzell, H., & Gudmundsson, G. H. (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and  $\alpha$ -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 96(9), 3086-3093.
- Ahariz, M., Loeb, I., & Courtois, P. (2010). *Candidoses orales et prothèses dentaires*. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale*, 111(2), 74-78.
- Ahluwalia, B., Magnusson, M. K., & Öhman, L. (2017). Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 52(11), 1185-1193.
- Ainsworth, G. C. (1986). History of medical and veterinary mycology.
- Akpan, A., & Morgan, R. (2002). Oral candidiasis. *Postgraduate medical journal*, 78(922), 455-459.
- Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J. R., Schaller, M., de Groot, P., MacCallum, D., Odds, F. C., Schäfer, W., Klis, F., Monod, M., & Hube, B. (2006). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 688-694.
- Appleton, S. S. (2000). Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics, and treatment. *Journal of the California Dental Association*, 28(12), 942-948.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., & Costerton, J. W. (2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 33(26), 5967-5982.
- Babiuc, I., Pauna, M., Malita, M. A., Ariton, S. G., Damian, M., Ungureanu, V., & Petrini, A. N. C. A. (2009). Correct complete denture rehabilitation, a chance for recovering abused tissues. *Rom J Morphol Embryol*, 50(4), 707-12.

- Bachtiar, E. W., Dewiyani, S., Akbar, S. M. S., & Bachtiar, B. M. (2016). Inhibition of *Candida albicans* biofilm development by unencapsulated *Enterococcus faecalis* cps2. *Journal of Dental Sciences*, 11(3), 323-330.
- Bahri, R., Saidane-Mosbahi, D., & Rouabchia, M. (2010). *Candida famata* modulates toll-like receptor,  $\beta$ -defensin, and proinflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, 222(1), 209-218.
- Baillie, G. S., & DOUGLAS, L. J. (1999). Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of medical microbiology*, 48(7), 671-679.
- Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., & Wilson, J. M. (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9541-9546.
- Barbosa Pelegrini, P., del Sarto, R. P., Silva, O. N., Franco, O. L., & Grossi-de-Sa, M. F. (2011). Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. *Biochemistry Research International*, 2011.
- Barelle, C. J., Bohula, E. A., Kron, S. J., Wessels, D., Soll, D. R., Schäfer, A., ... & Gow, N. A. (2003). Asynchronous cell cycle and asymmetric vacuolar inheritance in true hyphae of *Candida albicans*. *Eukaryotic cell*, 2(3), 398-410.
- Barelle, C. J., Richard, M. L., Gaillardin, C., Gow, N. A., & Brown, A. J. (2006). *Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryotic Cell*, 5(2), 359-367.
- Batista, C. V. F., da Silva, L. R., Sebben, A., Scaloni, A., Ferrara, L., Paiva, G. R., ... & Bloch, C. (1999). Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides*, 20(6), 679-686.
- Batoni, G., Maisetta, G., Lisa Brancatisano, F., Esin, S., & Campa, M. (2011). Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Current medicinal chemistry*, 18(2), 256-279.
- Baumgartner, J. C., Watts, C. M., & Xia, T. (2000). Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *Journal of endodontics*, 26(12), 695-698.
- Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427(6969), 72-74.
- Belaid, A., Aouni, M., Khelifa, R., Trabelsi, A., Jemmali, M., & Hani, K. (2002). In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *Journal of medical virology*, 66(2), 229-234.

- Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., & Tomita, M. (1993). Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Medical microbiology and immunology*, 182(2), 97-105.
- Bordas, A., McNab, R., Staples, A. M., Bowman, J., Kanapka, J., & Bosma, M. P. (2008). Impact of different tongue cleaning methods on the bacterial load of the tongue dorsum. *Archives of oral biology*, 53, S13-S18.
- Brand, G. D., Leite, J. R. S., Silva, L. P., Albuquerque, S., Prates, M. V., Azevedo, R. B., ... & Bloch, C. (2002). Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta* anti-*trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49332-49340.
- Braun, B. R., Head, W. S., Wang, M. X., & Johnson, A. D. (2000). Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. *Genetics*, 156(1), 31-44.
- Braun, B. R., & Johnson, A. D. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science*, 277(5322), 105-109.
- Biswas, S., Van Dijck, P., & Datta, A. (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 348-376.
- Brunke, S., Mogavero, S., Kasper, L., & Hube, B. (2016). Virulence factors in fungal pathogens of man. *Current opinion in microbiology*, 32, 89-95.
- Buchta, V., & Spacek, J. (2004). Microbiological findings in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis in the Hradec Kralove Faculty Hospital 1995-2002. *Ceska gynekologie*, 69(1), 7-14.
- Buijssen, K. J., Harmsen, H. J., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., & van der Laan, B. F. (2007). Lactobacilli: important in biofilm formation on voice prostheses. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 137(3), 505-507.
- Bürgers, R., Hahnel, S., Reichert, T. E., Rosentritt, M., Behr, M., Gerlach, T., ... & Gosau, M. (2010). Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta biomaterialia*, 6(6), 2307-2313.
- Calderone, R. A., & Clancy, C. J. (Eds.). (2011). *Candida* and candidiasis. American Society for Microbiology Press.
- Cassone, A., Bernardis, F. D., Mondello, F., Ceddia, T., & Agatensi, L. (1987). Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *Journal of Infectious Diseases*, 156(5), 777-783.

- Chabasse, D., & Robert, R. (2006). *Candida* pathogènes. Éd. Tec & Doc.
- Chan, D. I., Prenner, E. J., & Vogel, H. J. (2006). Tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1184-1202.
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*, 183(18), 5385-5394.
- Chauhan, A., Madiraju, M. V., Fol, M., Lofton, H., Maloney, E., Reynolds, R., & Rajagopalan, M. (2006). Mycobacterium tuberculosis cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *Journal of bacteriology*, 188(5), 1856-1865.
- Chen, K., Sun, G. W., Chua, K. L., & Gan, Y. H. (2005). Modified virulence of antibiotic-induced *Burkholderia pseudomallei* filaments. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(3), 1002-1009.
- Chu, W. S., Magee, B. B., & Magee, P. T. (1993). Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *Journal of bacteriology*, 175(20), 6637-6651.
- Collins, L. M. C., & Dawes, C. (1987). The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *Journal of dental research*, 66(8), 1300-1302.
- Gonçalves, S., Silva, P. M., Felício, M. R., de Medeiros, L. N., Kurtenbach, E., & Santos, N. C. (2017). Psd1 effects on *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7.
- Conlon, J. M., & Sonnevend, A. (2011). Clinical applications of amphibian antimicrobial peptides. *J Med Sci*, 4(2), 62-72.
- Coogan, M. M., Sweet, S. P., & Challacombe, S. J. (1994). Immunoglobulin A (IgA), IgA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Infection and immunity*, 62(3), 892-896.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Çuburu, N., Kweon, M. N., Song, J. H., Hervouet, C., Luci, C., Sun, J. B., Hofman, P., Holmgren, J., Anjuère, F., & Czerniksky, C. (2007). Sublingual immunization

induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine*, 25(51), 8598-8610.

Cutler, J. E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annual Reviews in Microbiology*, 45(1), 187-218.

da Rocha Curvelo, J. A., Barreto, A. L. S., Portela, M. B., Alviano, D. S., Holandino, C., Souto-Padrón, T., & de Araújo Soares, R. M. (2014). Effect of the secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI) on *Candida albicans* biological processes: A therapeutic alternative?. *Archives of oral biology*, 59(9), 928-937.

Dalle, F., Dumont, L., Franco, N., Mesmacque, D., Caillot, D., Bonnin, P., Moiroux, C., Vagner, O., Cuisenier, B., Lizard, S., & Bonnin, A. (2003). Genotyping of *Candida albicans* oral strains from healthy individuals by polymorphic microsatellite locus analysis. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 2203-2205.

De Bernardis, F., Mühlischlegel, F. A., Cassone, A., & Fonzi, W. A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 66(7), 3317-3325.

DeFranco, A. L., Robertson, M., & Locksley, R. M. (2009). *Immunité: la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. De Boeck Supérieur.

De Lucca, A. J., & Walsh, T. J. (1999). Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(1), 1-11.

de Repentigny, L., Lewandowski, D., & Jolicoeur, P. (2004). Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 729-759.

Devoize, L., & Dallel, R. (2010). Salivation [en ligne]. *EMC (Elsevier Masson SAS) Médecine buccale*, 28-150.

Décanis, N., Tazi, N., Correia, A., Vilanova, M., & Rouabchia, M. (2011). Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers *Candida albicans* morphological changes by downregulating the expression of different secreted aspartyl proteinase genes. *The open microbiology journal*, 5, 119.

Dongari-Bagtzoglou, A., Kashleva, H., Dwivedi, P., Diaz, P., & Vasilakos, J. (2009). Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One*, 4(11), e7967.

Dromer, F., Chevalier, R., Sendid, B., Improvisi, L., Jouault, T., Robert, R., Mallet, J. M., & Poulain, D. (2002). Synthetic analogues of  $\beta$ -1, 2 oligomannosides prevent

intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(12), 3869-3876.

Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., & Durrens, P. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995), 35.

Edwards Jr, J. E., Bodey, G. P., Bowden, R. A., Büchner, T., de Pauw, B. E., Filler, S. G., ... & Kohno, S. (1997). International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe *Candida* infections.

Elguezabal, N., Maza, J. L., & Ponton, J. (2004). Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies. *Oral diseases*, 10(2), 81-86.

Ellepola, A. N. B., & Samaranayake, L. P. (2000). Oral candidal infections and antimycotics. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(2), 172-198.

Ellis, H. (2012). Anatomy of the salivary glands. *Surgery (Oxford)*, 30(11), 569-572.

Ernst, J. F., & Swidergall, M. (2017). AMPlified Defense: Antimicrobial Peptides During *Candida albicans* Infection. In *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology* (pp. 185-203). Springer International Publishing.

Essig, A., Hofmann, D., Münch, D., Gayathri, S., Künzler, M., Kallio, P. T., Sahl, H-G., Wider, G., Schneider, T., & Aebi, M. (2014). Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(50), 34953-34964.

Falsetta, M. L., Klein, M. I., Colonne, P. M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Pai, C. H., Gonzalez-Begne, M., Watson, G., Krysan, D. J., Bowen, W., & Koo, H. (2014). Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infection and immunity*, 82(5), 1968-1981.

Farah, C. S., Ashman, R. B., & Challacombe, S. J. (2000). Oral candidosis. *Clinics in dermatology*, 18(5), 553-562.

Farah, C. S., Lynch, N., & McCullough, M. J. (2010). Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Australian dental journal*, 55(s1), 48-54.

Fidel, P. L. (2002). Immunity to *Candida*. *Oral diseases*, 8(s2), 69-75.

Fidel, P. L., & Sobel, J. D. (1994). The role of cell-mediated immunity in candidiasis. *Trends in microbiology*, 2(6), 202-206.

- Finlay, B. B., & Falkow, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiological reviews*, 53(2), 210-230.
- Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature reviews. Drug discovery*, 11(1), 37.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water science and technology*, 43(6), 1-8.
- Fotos, P. G., & Hellstein, J. W. (1992). *Candida* and candidosis. Epidemiology, diagnosis and therapeutic management. *Dental Clinics of North America*, 36(4), 857-878.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology*, 176(2), 269.
- Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J., & Hostetter, M. K. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science*, 279(5355), 1355-1358.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., & Underhill, D. M. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *The EMBO journal*, 24(6), 1277-1286.
- Goldberg, M., & Ayanoglou, C. (1993). *Tissus non minéralisés et milieu buccal: histologie et biologie*. Elsevier Masson.
- Goodson, J. M. (2003). Gingival crevice fluid flow. *Periodontology 2000*, 31(1), 43-54.
- Gácser, A., Trofa, D., Schäfer, W., & Nosanchuk, J. D. (2007). Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *The Journal of clinical investigation*, 117(10), 3049.
- Gray, E. A. (1954). *Microbiologie*. Dunod. Paris: France. p. 92
- Ha, J. F., Italiano, C. M., Heath, C. H., Shih, S., Rea, S., & Wood, F. M. (2011). Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. *Burns*, 37(2), 181-195.
- Haney, E. F., Mansour, S. C., & Hancock, R. E. (2017). Antimicrobial peptides: an introduction. *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols*, 3-22.

- Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2011). Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends in microbiology*, 19(11), 557-563.
- Hawser, S. P., & Douglas, L. J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection and immunity*, 62(3), 915-921.
- Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species. *Trends in microbiology*, 9(12), 591-596.
- Hoebe, K., Janssen, E., & Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology*, 5(10), 971-974.
- Hogan, D. A., Vik, Å., & Kolter, R. (2004). A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular microbiology*, 54(5), 1212-1223.
- Holmberg, K. V., & Hoffman, M. P. (2014). Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. In *Saliva: Secretion and Functions* (Vol. 24, pp. 1-13). Karger Publishers.
- Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., & Nickerson, K. W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 2982-2992.
- Hoyer, L. L. (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 9(4), 176-180.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., & Schäfer, W. (2000)
- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & cell*, 1(2), 143-152.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., & Schäfer, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of microbiology*, 174(5), 362-374.
- Hull, C. M., Raisner, R. M., & Johnson, A. D. (2000). Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*, 289(5477), 307-310.
- Ishida, K., Rodrigues, J. C. F., Cammerer, S., Urbina, J. A., Gilbert, I., de Souza, W., & Rozental, S. (2011). Synthetic arylquinuclidine derivatives exhibit antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilopsis*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 10(1), 3.
- Iwasaki, A. (2007). Mucosal dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 381-418.

Jabra-Rizk, M. A., Falkler, W. A., Merz, W. G., Kelley, J. I., Baqui, A. A., & Meiller, T. F. (1999). *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* display surface variations consistent with observed intergeneric coaggregation. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16(4), 187-193.

James, K. M., MacDonald, K. W., Chanyi, R. M., Cadieux, P. A., & Burton, J. P. (2016). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and modulation of gene expression by probiotic cells and supernatant. *Journal of medical microbiology*, 65(4), 328-336.

Jarosz, L. M., Deng, D. M., van der Mei, H. C., Crielaard, W., & Krom, B. P. (2009). Streptococcus mutans competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryotic cell*, 8(11), 1658-1664.

Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., Magee, P. T., Davis, R. W., & Scherer, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), 7329-7334.

Justice, S. S., Hunstad, D. A., Seed, P. C., & Hultgren, S. J. (2006). Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19884-19889.

Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Müller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Molecular microbiology*, 35(3), 601-611.

Kantarcioğlu, A. S., & Yücel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, 45(5-6), 160-165.

Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34(5), 637-650.

Khelif, M., Sellami, A., Sellami, H., Makni, F., & Ayadi, A. (2011). *Candida dubliniensis*: Identification methods and epidemiologic implication. *Pathobiologie*, 59(3), 166-172.

Knoke, M., & Bernhardt, H. (2006). The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses*, 49(4), 283-287.

Kong, E. F., Tsui, C., Boyce, H., Ibrahim, A., Hoag, S. W., Karlsson, A. J., Meiller, T. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Development and in vivo evaluation of a novel

- histatin-5 bioadhesive hydrogel formulation against oral candidiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(2), 881-889.
- Krom, B. P., Kidwai, S., & Ten Cate, J. M. (2014). *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *Journal of dental research*, 93(5), 445-451.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16-34.
- Lattif, A. A., Mukherjee, P. K., Chandra, J., Roth, M. R., Welti, R., Rouabhia, M., & Ghannoum, M. A. (2011). Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation. *Microbiology*, 157(11), 3232-3242.
- Lee, D. G., Park, Y., Kim, P. I., Jeong, H. G., Woo, E. R., & Hahm, K. S. (2002). Influence on the plasma membrane of *Candida albicans* by HP (2-9)-magainin 2 (1-12) hybrid peptide. *Biochemical and biophysical research communications*, 297(4), 885-889.
- Lee, Y. H., & Wong, D. T. (2009). Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *American journal of dentistry*, 22(4), 241.
- Lehrer, R. I., & Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current opinion in immunology*, 11(1), 23-27.
- Leiter, É., Gáll, T., Csénoch, L., & Pócsi, I. (2017). Biofungicide utilizations of antifungal proteins of filamentous ascomycetes: current and foreseeable future developments. *BioControl*, 1-14.
- Lewis, R. E. (2009). Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin*, 25(7), 1732-1740.
- Li, L., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2009). Epithelial GM-CSF induction by *Candida glabrata*. *Journal of dental research*, 88(8), 746-751.
- Li, M., Chen, Q., Tang, R., Shen, Y., & Da Liu, W. (2011). The expression of  $\beta$ -defensin-2, 3 and LL-37 induced by *Candida albicans* phospholipomannan in human keratinocytes. *Journal of dermatological science*, 61(1), 72-75.
- Li, X., Yan, Z., & Xu, J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(2), 353-362.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207-215.

- Liao, H., Liu, S., Wang, H., Su, H., & Liu, Z. (2017). Efficacy of Histatin5 in a murine model of vulvovaginal candidiasis caused by *Candida albicans*. *Pathogens and Disease*.
- Littman, M. L., & Miwatani, T. (1963). Effect of water soluble vitamins and their analogues on the growth of *Candida albicans*. I. Biotin, pyridoxamine, pyridoxine and fluorinated pyrimidines. *Mycopathologia*, 21(2), 81-108.
- Liu, Y., & Fang, H. H. (2003). Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge.
- Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90(5), 939-949.
- Lombardi, T., Samson, J., & Kuffer, R. (2009). *La muqueuse buccale: de la clinique au traitement*. Ed. Med'Com.
- Long, G., Zhu, P., Shen, Y., & Tong, M. (2009). Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on deposition kinetics of bacteria. *Environmental science & technology*, 43(7), 2308-2314.
- López-García, B., Lee, P. H., Yamasaki, K., & Gallo, R. L. (2005). Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(1), 108-115.
- Mackinnon, J. E., & Artagaveytia-Allende, R. C. (1945). The so-called genus *Candida* Berkout, 1923. *Journal of bacteriology*, 49(4), 317.
- Malic, S., Hill, K. E., Ralphs, J. R., Hayes, A., Thomas, D. W., Potts, A. J., & Williams, D. W. (2007). Characterization of *Candida albicans* infection of an in vitro oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. *Molecular Oral Microbiology*, 22(3), 188-194.
- Marcotte, H., & Lavoie, M. C. (1998). Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(1), 71-109.
- Magee, B. B., & Magee, P. T. (2000). Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL $\alpha$  and MTL $\alpha$  strains. *Science*, 289(5477), 310-313.
- Mangoni, M. L. (2006). Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cellular and molecular life sciences*, 63(9), 1060-1069.
- Martinez, R. (1998). Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation in vitro. *Mycopathologia*, 144(3), 125-129.

- Mattos, B. S. C., Sousa, A. A. D., de Magalhães, M. H. C., André, M., & Brito e Dias, R. (2009). *Candida albicans* in patients with oronasal communication and obturator prostheses. *Brazilian dental journal*, 20(4), 336-340.
- Mavor, A. L., Thewes, S., & Hube, B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current drug targets*, 6(8), 863-874.
- McCullough, M. J., Ross, B. C., & Reade, P. C. (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 25(2), 136-144.
- McCullough, M. J., & Savage, N. W. (2005). Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry. *Australian dental journal*, 50(s2).
- Mendling, W., Pinto De Andrade, M., Gutschmidt, J., Gantenberg, R., Presber, W., & Schönian, G. (2000). Strain specificity of yeasts isolated from different locations of women suffering from vaginal candidosis, and their partners Vergleich der Stammspezifität von Hefepilzen verschiedener Lokalisation bei Frauen mit VaginalCandidosen. *Mycoses*, 43(11-12), 387-392.
- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., & Cohen, S. N. (2004). SOS response induction by  $\beta$ -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305(5690), 1629-1631.
- Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in dermatology*, 34(4), 487-494.
- Mitchell, A. P. (1998). Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*, 1(6), 687-692.
- Mor, A., Amiche, M., & Nicolas, P. (1994a). Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry*, 33(21), 6642-6650.
- Mor, A., Hani, K., & Nicolas, P. (1994b). The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31635-31641.
- Mor, A., & Nicolas, P. (1994c). The NH<sub>2</sub>-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3), 1934-1939.
- Mor, A., Van Huong, N., Delfour, A., Migliore-Samour, D., & Nicolas, P. (1991). Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry*, 30(36), 8824-8830.

- Morici, P., Fais, R., Rizzato, C., Tavanti, A., & Lupetti, A. (2016). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by the synthetic lactoferricin derived peptide hlf1-11. *PLoS one*, 11(11), e0167470.
- Muster, D., Ben Slama, L., Biour, M., Bollack, M. R., Brocvielle, H., de Chavigny, D., Doddoli, R., Muret, P., Szpirglas, H., Bertrand, J-C., & Wilk, A. (2004). Thérapeutique médicale buccodentaire: moyens et méthodes.
- Muzyka, B. C. (2005). Oral fungal infections. *Dental Clinics*, 49(1), 49-65.
- Naglik, J. R. (2014). *Candida* immunity. *New Journal of Science*, 2014.
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(3), 400-428.
- Naglik, J. R., & Moyes, D. (2011). Epithelial cell innate response to *Candida albicans*. *Advances in dental research*, 23(1), 50-55.
- Naglik, J. R., Newport, G., White, T. C., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, J. S., Greenspan, D., Sweet, S. P., Challacombe, S. J., & Agabian, N. (1999). In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infection and immunity*, 67(5), 2482-2490.
- Nailis, H., Kucharíková, S., Říčicová, M., Van Dijck, P., Deforce, D., Nelis, H., & Coenye, T. (2010). Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. *BMC microbiology*, 10(1), 114.
- Nair, R. G., Anil, S., & Samaranayake, L. P. (2001). The effect of oral bacteria on *Candida albicans* germ-tube formation. *Apmis*, 109(2), 147-154.
- Nakatsuji, T., & Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3), 887-895.
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature reviews. Microbiology*, 6(1), 67.
- Netea, M. G., Gow, N. A., Munro, C. A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R., Bertram, G., Hughes, H. B., Jansen, T., Jacobs, L., Buurman, E. T., Gijzen, K., Williams, D. L., Torensma, R., McKinnon, A., MacCallum, D. M., Odds, F. C., Van der Meer, J. W. M., Brown, A. J. P., & Kullberg, B. J. (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of

- mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1642.
- Netea, M. G., & Maródi, L. (2010). Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends in immunology*, 31(9), 346-353.
- Netea, M. G., van der Graaf, C., Van der Meer, J. W., & Kullberg, B. J. (2004). Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *Journal of leukocyte biology*, 75(5), 749-755.
- Nicolas, G. G., & Lavoie, M. C. (2010). Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(1), 1-20.
- Nicolas, P., & El Amri, C. (2009). The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1537-1550.
- Nobile, C. J., Schneider, H. A., Nett, J. E., Sheppard, D. C., Filler, S. G., Andes, D. R., & Mitchell, A. P. (2008). Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Current Biology*, 18(14), 1017-1024.
- Nouér, S. A., Nucci, M., de-Oliveira, M. P., Pellegrino, F. L. P. C., & Moreira, B. M. (2005). Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-β-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(9), 3663-3667.
- Noverr, M. C., & Huffnagle, G. B. (2004a). Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?. *Trends in microbiology*, 12(12), 562-568.
- Noverr, M. C., & Huffnagle, G. B. (2004b). Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infection and immunity*, 72(11), 6206-6210.
- Odden, K., Schenck, K., Koppang, H., & Hurlen, B. (1994). Candidal infection of the gingiva in HIV-infected persons. *Journal of oral pathology & medicine*, 23(4), 178-183.
- Odds, F. C. (1988). *Candida and candidosis: a review and bibliography*. Bailliere Tindall.
- Olsen, I. (1974). Denture stomatitis occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontologica Scandinavica*, 32(5), 329-333.

- Osusky, M., Osuska, L., Kay, W., & Misra, S. (2005). Genetic modification of potato against microbial diseases: in vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theoretical and applied genetics*, 111(4), 711-722.
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576.
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., & Sobel, J. D. (2015). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), e1-e50.
- Park, C. B., Kim, H. S., & Kim, S. C. (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 244(1), 253-257.
- Park, C. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1996). A Novel Antimicrobial Peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 218(1), 408-413.
- Park, H. J., Salem, M., Semlali, A., Leung, K. P., & Rouabhia, M. (2017). Antimicrobial peptide KSL-W promotes gingival fibroblast healing properties in vitro. *Peptides*, 93, 33-43.
- Pawlina, W., Ross, M. H., & Kaye, G. I. (2006). Histology: a text and atlas.
- Pereira-Cenci, T., Del Bel Cury, A. A., Crielaard, W., & Ten Cate, J. M. (2008). Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of applied oral science*, 16(2), 86-94.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of clinical microbiology*, 42(10), 4419-4431.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 133-163.
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Ibrahim, A. S., Edwards Jr., J. E., & Filler, S. G. (2007). Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS biology*, 5(3), e64.
- Pietrella, D., Pandey, N., Gabrielli, E., Pericolini, E., Perito, S., Kasper, L., Bistoni, F., Cassone, A., Hube, B., & Vecchiarelli, A. (2013). Secreted aspartic proteases

of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. *European journal of immunology*, 43(3), 679-692.

Pivarcsi, A., Nagy, I., Koreck, A., Kis, K., Kenderessy-Szabo, A., Szell, M., Dobozy, Attila, & Kemeny, L. (2005). Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human  $\beta$ -defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes and Infection*, 7(9), 1117-1127.

Poulain, D., & Jouault, T. (2004). *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Current opinion in microbiology*, 7(4), 342-349.

Prescott, L. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2010). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.

Presland, R. B., & Jurevic, R. J. (2002). Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *Journal of dental education*, 66(4), 564-574.

Pujol, C., Reynes, J., Renaud, F., Raymond, M., Tibayrenc, M., Ayala, F. J., Mallié, M., & Bastide, J. M. (1993). The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(20), 9456-9459.

Qin, R., Steel, A., & Fazel, N. (2017). Oral mucosa biology and salivary biomarkers. *Clinics in Dermatology*, 35(5), 477-483.

Quirynen, M., Avontroodt, P., Soers, C., Zhao, H., Pauwels, M., & Van Steenberghe, D. (2004). Impact of tongue cleansers on microbial load and taste. *Journal of clinical periodontology*, 31(7), 506-510.

Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & López-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5459-5463.

Rank, L. A., Walsh, N. M., Liu, R., Lim, F. Y., Bok, J. W., Huang, M., Keller, N. P., Gellman, S. H. & Hull, C. M. (2017). A cationic polymer that shows high antifungal activity against diverse human pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC-00204.

Redman, R. S. (1970). Prevalence of geographic tongue, fissured tongue, median rhomboid glossitis, and hairy tongue among 3,611 Minnesota schoolchildren. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 30(3), 390-395.

Regulez, P., Fernandez, J. G., Moragues, M. D., Schneider, J., Quindos, G., & Ponton, J. (1994). Detection of Anti-*Candida albicans* IgE Antibodies in Vaginal

Washes from Patients with Acute Vulvovaginal Candidiasis. *Gynecologic and obstetric investigation*, 37(2), 110-114.

Reichart, P. A., Samaranayake, L. P., & Philipsen, H. P. (2000). Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. *Oral diseases*, 6(2), 85-91.

Reynes, J., Pujol, C., Moreau, C., Mallié, M., Renaud, F., Janbon, F., & Bastide, J. M. (1996). Simultaneous carriage of *Candida albicans* strains from HIV-infected patients with oral candidiasis: multilocus enzyme electrophoresis analysis. *FEMS microbiology letters*, 137(2-3), 269-273.

Robin, C. (1853). *Histoire naturelle des végétaux parasites qui croissent sur l'homme et sur les animaux vivants* (Vol. 1). Baillière.

Rose, J. (1971). Folic-acid deficiency as a cause of angular cheilosis. *The Lancet*, 298(7722), 453-454.

Rossoni, R. D., Fuchs, B. B., de Barros, P. P., dos Santos Velloso, M., Jorge, A. O. C., Junqueira, J. C., & Mylonakis, E. (2017). Lactobacillus paracasei modulates the immune system of Galleria mellonella and protects against *Candida albicans* infection. *PLoS one*, 12(3), e0173332.

Saegusa, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S., & Hosoi, T. (2004). *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* induce interleukin-8 production from intestinal epithelial-like Caco-2 cells in the presence of butyric acid. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 41(3), 227-235.

Salvatori, O., Puri, S., Tati, S., & Edgerton, M. (2016). Innate immunity and saliva in *Candida albicans*-mediated oral diseases. *Journal of dental research*, 95(4), 365-371.

Samaranayake, L. P., Keung Leung, W., & Jin, L. (2009). Oral mucosal fungal infections. *Periodontology 2000*, 49(1), 39-59.

Samaranayake, L. P., & MacFarlane, T. W. (1990). *Oral candidosis*. Wright Publishing Company.

Samaranayake, Y. H., Dassanayake, R. S., Cheung, B. P. K., Jayatilake, J. A. M. S., Yeung, K. W. S., Yau, J. Y. Y., & Samaranayake, L. P. (2006). Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *Apmis*, 114(12), 857-866.

Samanta, I. (2015). *Veterinary mycology*. Springer.

- Savoia, D., Donalisio, M., Civra, A., Salvadori, S., & Guerrini, R. (2010). In vitro activity of dermaseptin S1 derivatives against genital pathogens. *Apmis*, 118(9), 674-680.
- Savoia, D., Guerrini, R., Marzola, E., & Salvadori, S. (2008). Synthesis and antimicrobial activity of dermaseptin S1 analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(17), 8205-8209.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., & Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48(6), 365-377.
- Schaller, M., Januschke, E., Schackert, C., Woerle, B., & Korting, H. C. (2001). Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis in vivo. *Journal of medical microbiology*, 50(8), 743-747.
- Schaller, M., Sander, C. A., Korting, H. C., Mailhammer, R., Grassl, G., & Hube, B. (2002). Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(4), 652-657.
- Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., & Korting, H. C. (2005). Human defensins. *Journal of molecular medicine*, 83(8), 587-595.
- Scully, C., & Porter, S. R. (1994). Oral mucosal disease: a decade of new entities, aetiologies and associations. *International dental journal*, 44(1), 33-43.
- Segal, B. H., Kwon-Chung, J., Walsh, T. J., Klein, B. S., Battiwalla, M., Almyroudis, N. G., Holland, S. M., & Romani, L. (2006). Immunotherapy for fungal infections. *Clinical infectious diseases*, 42(4), 507-515.
- Seiler, F., Bals, R., & Beisswenger, C. (2016). Function of Antimicrobial Peptides in Lung Innate Immunity. In *Antimicrobial Peptides* (pp. 33-52). Springer International Publishing.
- Selvaratnam, L., Cruchley, A. T., Navsaria, H., Wertz, P. W., Hagi-Pavli, E. P., Leigh, I. M., Squier, C. A. & Williams, D. M. (2001). Permeability barrier properties of oral keratinocyte cultures: a model of intact human oral mucosa. *Oral diseases*, 7(4), 252-258.
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 66(4), 236-248.
- Shaley, D. E., Mor, A., & Kustanovich, I. (2002). Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptin S3. *Biochemistry*, 41(23), 7312-7317.

- Sharon, V., & Fazel, N. (2010). Oral candidiasis and angular cheilitis. *Dermatologic therapy*, 23(3), 230-242.
- Shaykhiev, R., Behr, J., & Bals, R. (2008). Microbial patterns signaling via Toll-like receptors 2 and 5 contribute to epithelial repair, growth and survival. *PLoS one*, 3(1), e1393.
- Sheng, G. P., Yu, H. Q., & Li, X. Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnology advances*, 28(6), 882-894.
- Shepherd, M. G. (1987). Cell envelope of *Candida albicans*. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 15(1), 7-25.
- Shepherd, M. G., & Sullivan, P. A. (1976). The production and growth characteristics of yeast and mycelial forms of *Candida albicans* in continuous culture. *Microbiology*, 93(2), 361-370.
- Shirtliff, M. E., Peters, B. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2009). Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS microbiology letters*, 299(1), 1-8.
- Sherwood, L. (2015). *Physiologie humaine*. De Boeck Supérieur.
- Silva-Bogossian, C. M., Colombo, A. P. V., Tanaka, M., Rayo, C., Xiao, Y., & Siqueira, W. L. (2013). Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluid in different periodontal conditions. *PLoS One*, 8(10), e75898.
- Sobel, J. D., & Akins, R. A. (2017). The role of resistance in *Candida* infections: Epidemiology and treatment. In *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 1075-1097). Springer International Publishing.
- Soll, D. R. (2008). *Candida* biofilms: is adhesion sexy?. *Current Biology*, 18(16), R717-R720.
- Song, J. H., Kim, J. I., Kwon, H. J., Shim, D. H., Parajuli, N., Cuburu, N., Czerkinsky, C., & Kweon, M. N. (2009). CCR7-CCL19/CCL21-regulated dendritic cells are responsible for effectiveness of sublingual vaccination. *The Journal of Immunology*, 182(11), 6851-6860.
- Sreenivasan, P. K., Haraszthy, V. I., & Zambon, J. J. (2011). The effect of a microbead dentifrice on microbial load in oral microenvironments. *International journal of dental hygiene*, 9(2), 136-142.
- Squier, C. A., & Kremer, M. J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *JNCI Monographs*, 2001(29), 7-15.

- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., & Morschhäuser, J. (2000). Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 6102-6107.
- Steele, C., & Fidel, P. L. (2002). Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 70(2), 577-583.
- Stehr, F., Felk, A., Gácser, A., Kretschmar, M., Mähnß, B., Neuber, K., Hube, B., & Schäfer, W. (2004). Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS yeast research*, 4(4-5), 401-408.
- Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 12(7), 317-324.
- Sugano, M., Morisaki, H., Negishi, Y., Endo-Takahashi, Y., Kuwata, H., Miyazaki, T., & Yamamoto, M. (2016). Potential effect of cationic liposomes on interactions with oral bacterial cells and biofilms. *Journal of liposome research*, 26(2), 156-162.
- Sun, J. N., Solis, N. V., Phan, Q. T., Bajwa, J. S., Kashleva, H., Thompson, A., Liu, Y., Dongari-Bagtzoglou, A., Edgerton, M., & Filler, S. G. (2010). Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS pathogens*, 6(11), e1001181.
- Szpirglas, H., & Slama, L. B. (1999). *Pathologie de la muqueuse buccale*. Elsevier Masson.
- Takakura, N., Wakabayashi, H., Ishibashi, H., Teraguchi, S., Tamura, Y., Yamaguchi, H., & Abe, S. (2003). Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(8), 2619-2623.
- Teraguchi, S., Wakabayashi, H., Kuwata, H., Yamauchi, K., & Tamura, Y. (2004). Protection against infections by oral lactoferrin: evaluation in animal models. *Biometals*, 17(3), 231-234.
- Théberge, S., Semlali, A., Alamri, A., Leung, K. P., & Rouabha, M. (2013). *C. albicans* growth, transition, biofilm formation, and gene expression modulation by antimicrobial decapeptide KSL-W. *BMC microbiology*, 13(1), 246.
- Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H., & Samaranayake, L. P. (2006). Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Archives of oral biology*, 51(8), 672-680.
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L., & Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic cell*, 10(9), 1173-1182.

- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brenière, S. F., Dardé, M. L., & Ayala, F. J. (1991). Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), 5129-5133.
- Torosantucci, A., Tumbarello, M., Bromuro, C., Chiani, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Cauda, R., & Cassone, A. (2017). Antibodies against a  $\beta$ -glucan-protein complex of *Candida albicans* and its potential as indicator of protective immunity in candidemic patients. *Scientific Reports*, 7.
- Travkova, O. G., Moehwald, H., & Brezesinski, G. (2017). The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*.
- Triana-Vidal, L. E., Castro, M. S., Pires Júnior, O. R., Álvares, A. C. M., de Freitas, S. M., Fontes, W., Vargas, J. A. G., Zúñiga-Baos, J. A., Batista, I. de F. C., Grellier, P., & Charneau, S. (2017). Dendropsophin 1, a novel antimicrobial peptide from the skin secretion of the endemic Colombian frog *Dendropsophus columbianus*. *Natural Product Research*, 1-7.
- Tronchin, G., Pihet, M., Lopes-Bezerra, L. M., & Bouchara, J. P. (2008). Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Sabouraudia*, 46(8), 749-772.
- van der Does, A. M., Bergman, P., Agerberth, B., & Lindbom, L. (2012). Induction of the human cathelicidin LL-37 as a novel treatment against bacterial infections. *Journal of leukocyte biology*, 92(4), 735-742.
- Velegaki, A., Nicolatou, O., Theodoridou, M., Mostrou, G., & Legakis, N. J. (1999). Paediatric AIDS-related linear gingival erythema: a form of erythematous candidiasis?. *Journal of oral pathology & medicine*, 28(4), 178-182.
- Vila, T., Romo, J. A., Pierce, C. G., McHardy, S. F., Saville, S. P., & Lopez-Ribot, J. L. (2017). Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. *Virulence*, 8(2), 150-158.
- Villar, C. C., Kashleva, H., Nobile, C. J., Mitchell, A. P., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2007). Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infection and immunity*, 75(5), 2126-2135.
- Vylkova, S., Nayyar, N., Li, W., & Edgerton, M. (2007). Human  $\beta$ -defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(1), 154-161.

- Wagner, R. D., Pierson, C., Warner, T., Dohnalek, M., Farmer, J., Roberts, L., Hilty, M., & Balish, E. (1997). Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infection and immunity*, 65(10), 4165-4172.
- Whelan, W. L., & Magee, P. T. (1981). Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 145(2), 896-903.
- White, T. C., & Agabian, N. (1995). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *Journal of bacteriology*, 177(18), 5215-5221.
- White, T. C., Miyasaki, S. H., & Agabian, N. (1993). Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 175(19), 6126-6133.
- Wilkieson, C., Samaranayake, L. P., MacFarlane, T. W., Lamey, P. J., & MacKenzie, D. (1991). Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *Journal of oral pathology & medicine*, 20(1), 13-16.
- Williams, D. W., Jordan, R. P. C., Wei, X., Alves, C. T., Wise, M. P., Wilson, M. J., & Lewis, M. A. O. (2013). Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J. Oral. Microbiol*, 5(10), 340-358.
- Williams, D. W., & Lewis, M. A. O. (2000). Oral Microbiology: Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral diseases*, 6(1), 3-11.
- Wu, H., Downs, D., Ghosh, K., Ghosh, A. K., Staib, P., Monod, M., & Tang, J. (2013). *Candida albicans* secreted aspartic proteases 4-6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan horse mechanism. *The FASEB Journal*, 27(6), 2132-2144.
- Xia, X., Cheng, L., Zhang, S., Wang, L., & Hu, J. (2017). The role of natural antimicrobial peptides during infection and chronic inflammation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1-22.
- Zaura, E., Keijser, B. J., Huse, S. M., & Crielaard, W. (2009). Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC microbiology*, 9(1), 259.
- Zhang, T., Hashizume, T., Kurita-Ochiai, T., & Yamamoto, M. (2009). Sublingual vaccination with outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and Flt3 ligand elicits protective immunity in the oral cavity. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(3), 937-941.
- Zhang, X., Zhao, S., Sun, L., Li, W., Wei, Q., Ashman, R. B., & Hu, Y. (2017). Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase. *American journal of translational research*, 9(1), 50.

- Zheng, X. F., Hong, Y. X., Feng, G. J., Zhang, G. F., Rogers, H., Lewis, M. A., Williams, D. W., Xia, Z-F., Song, B., & Wei, X. Q. (2013). Lipopolysaccharide-induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production is blocked by *Candida albicans* mediated up-regulation of EBI3 expression. *PLoS One*, 8(5), e63967.
- Zhu, S. (2008). Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS $\alpha$  $\beta$  defensins. *Molecular immunology*, 45(3), 828-838.
- Zhu, W., Phan, Q. T., Boontheung, P., Solis, N. V., Loo, J. A., & Filler, S. G. (2012). EGFR and HER2 receptor kinase signaling mediate epithelial cell invasion by *Candida albicans* during oropharyngeal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), 14194-14199.
- Zopf, W. (1890). *Die Pilze* (Vol. 4). E. Trewendt.