

N° d'ordre : 580

50376

1983

213-1

50376

1983

213-1

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Guy TRONCHIN

ULTRASTRUCTURE ET CYTOCHIMIE DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE DES LEVURES (*CANDIDA ALBICANS*)

Localisation des composants pariétaux - Régénération -
Interactions avec les cellules épithéliales



Présentée le 10 Juin 1983 devant la Commission d'Examen

Jury : M. DURCHON

E. VIVIER Université de Lille I

B. FOURNET

A. VERNES Université de Lille II

F. MARIAT Institut Pasteur, Paris

J. SCHREVEL Université de Poitiers

Que ce travail soit aussi le témoignage de ma reconnaissance, pour tous ceux qui par leurs conseils, aides, et encouragements, ont permis sa réalisation.

SOMMAIRE

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>GENERALITES</u>	4
I - <u>BIOLOGIE</u>	5
II - <u>MORPHOLOGIE</u>	5
III - <u>RAPPEL ULTRASTRUCTURAL</u>	6
A) Le problème de la fixation	6
B) Les organites cytoplasmiques	8
IV - <u>L'ENVELOPPE CELLULAIRE : CONSTITUANTS ET COMPOSITION</u>	
<u>CHIMIQUE</u>	10
A) Le plasmalemma	10
B) L'espace périplasmique	12
C) La paroi : Nature et Biosynthèse de ses composants	13
1 - les glucanes	13
2 - les mannanes	16
3 - la chitine	17
4 - les lipides	18
5 - les enzymes de la paroi	19
D) Le revêtement pariétal	20
E) Régénération des parois	21
V - <u>LES METHODES DE DETECTION DES GLYCOCONJUGUES</u>	23
A) Technique acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent	23
B) Les colorants cationiques	24
C) Acide phosphotungstique (PTA) à bas pH	25
D) Les lectines	26
1 - historique et définition	26
2 - propriétés et caractéristiques	27
3 - applications des lectines en biologie cellulaire - le problème de leur visualisation	29

<u>MATERIELS ET METHODES</u>	33
I - <u>SOUCHES UTILISEES</u>	34
II - <u>CONDITION DE CULTURE ET D'ENTRETIEN DES SOUCHES</u>	34
III - <u>OBTENTION DES DIVERSES FORMES CULTURALES</u>	34
A) Blastospores et pseudomycélium	34
B) Tubes germinatifs	34
IV - <u>DIGESTION ENZYMATIQUE MENAGEE DES PAROIS</u>	35
V - <u>OBTENTION DES SPHERO-PROTOPLASTES</u>	35
VI - <u>REGENERATION DES SPHERO-PROTOPLASTES</u>	35
VII - <u>TECHNIQUES MICROSCOPIQUES</u>	35
A) Microscopie de fluorescence	35
B) Microscopie électronique	36
a) utilisation des lectines	36
1) sur cellules entières ou préalable-	
coupées à congélation	36
2) sur sections ultrafines de glycol	
methacrylate	37
b) technique à l'acide périodique-thiocarbo-	
hydrazide-protéinate d'argent	38
c) technique à l'acide phosphotungstique à	
bas pH	
d) utilisation de colorants cationiques	38
e) recherche de l'activité phosphatasique	
acide	39
f) étude ultrastructurale	39
VIII - <u>ANALYSE STATISTIQUE</u>	40
IX - <u>ADHERENCE AUX CELLULES EPITHELIALES</u>	40
A) Prélèvement	40
B) Protocole d'adhérence	41
C) Observations microscopiques	41

<u>CHAPITRE I : LOCALISATION DE COMPOSANTS PARIETAUX</u>	43
I - <u>INTRODUCTION</u>	44
II - <u>RESULTATS</u>	46
A) Localisation des mannanes	46
a) localisation sur coupes ultrafines	46
b) localisation sur cellules entières ou préalablement coupées à congélation	47
1 - microscopie photonique	47
2 - microscopie électronique : mise en évidence d'un revêtement pariétal	47
α -par la concanavoline A	47
β -par les colorants cationiques et l'acide phosphotungstique à bas pH	49
c) effets du traitement par la pronase et le 2 - mercaptoéthanol	49
B) Localisation de la chitine	50
a) sur cellules intactes ou coupées au cryostat	50
b) sur cellules traitées par la pronase et le 2 mercaptoéthanol	51
c) sur cellules traitées par le mélange pronase 2 - mercaptoéthanol, puis par la chitinase	52
d) sur coupes ultrafines	52
III - <u>DISCUSSION</u>	52
A) Validité des techniques	52
a) détection des sites récepteurs	52
b) visualisation des sites récepteurs	53
B) Les constituants pariétaux	54
a) les mannanes	54
b) la chitine	55
c) le revêtement pariétal	56

IV - <u>CONCLUSION</u>	58
------------------------	----

<u>CHAPITRE II : MECANISMES DE SECRETION ET "DEVENIR" DES ENZYMES DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE : EXEMPLE DE LA PHOSPHATASE ACIDE</u>	61
I - <u>INTRODUCTION</u>	62
II - <u>RESULTATS</u>	63
A) Les structures cytoplasmiques	63
B) L'enveloppe cellulaire	64
III - <u>DISCUSSION</u>	65
A) Validité de la technique utilisée	66
B) Appareil de Golgi - lysosomes	67
C) Problème de l'élaboration et de l'évolution de l'enveloppe cellulaire	68
D) Phosphatase acide extracellulaire et pathogénicité	69
IV - <u>CONCLUSION</u>	70

<u>CHAPITRE III : REGENERATION DES PAROIS ET MODIFICATIONS CELLULAIRES ASSOCIEES</u>	71
I - <u>INTRODUCTION</u>	72
II - <u>RESULTATS</u>	73
A) Structure des sphéro-protoplastes fraîchement obtenus	73
B) Régénération des sphéro-protoplastes	73
a) manifestations propres à un milieu riche en glucose (20 g/l)	73
1 - glycogène et plasmalemme	73
2 - les organites cellulaires	74
α -Appareil de Golgi et réticulum endoplasmique	74
β -Les vacuoles	75
b) manifestations propres à un milieu pauvre en glucose (1 g/l)	75

c) manifestations communes aux deux milieux de régénération	75
III - <u>DISCUSSION</u>	76
A) Plasmalemmes et composants fibrillaires	77
B) Plasmalemmes et composants matriciels	78
C) Les organites cellulaires	79
a) appareil de Golgi et réticulum endoplasmique	79
b) les vacuoles	80
IV - <u>CONCLUSION</u>	81
 <u>CHAPITRE IV : L'ADHERENCE AUX CELLULES EPITHELIALES</u>	83
I - <u>INTRODUCTION</u>	84
II - <u>GENERALITES</u>	86
A) Conditions expérimentales	86
B) Facteurs influençant l'adhérence	87
a) espèces, viabilité, et formes culturelles	87
b) lectines et sucres	87
c) enzymes et cations	88
d) salive - sérum - filtrat de culture	89
e) les germes	89
III - <u>RESULTATS</u>	90
A) Modifications pariétales associées à l'incubation des blastospores avec des cellules des muqueuses buccales ou intestinales	91
B) Observation des zones de jonction blastospores - cellules hôtes	91
IV - <u>DISCUSSION</u>	92
V - <u>CONCLUSION</u>	94
 <u>CONCLUSION GENERALE</u>	95
 <u>REFERENCES</u>	99

ABBREVIATIONS

Con A	:	Concanavaline A
CB - Fer	:	Chitobiosyl ferritine
CB - HRP	:	Chitobiosyl peroxydase
GMA	:	Glycol méthacrylate
HRP	:	Péroxydase
Man - Fer	:	Mannosyl ferritine
PTA	:	Acide phosphotungstique
RR	:	Rouge de ruthénium
WGA	:	Wheat germ agglutinine

INTRODUCTION

Candida albicans est à l'origine d'innombrables travaux, tant sur le plan appliqué (ODDS, 1979, a recensé entre 200 et 300 publications scientifiques annuelles sur le seul thème des candidoses) que fondamental. Si cette littérature abondante peut aisément se concevoir dans le 1er domaine où *Candida albicans* pose d'indéniables problèmes de santé (Epidémiologie, thérapeutique, diagnostic), elle s'explique plus difficilement dans le second cas. Il ne s'agit là en effet à priori que d'un prototype d'organisme cellulaire eucaryote tout à fait banal, que rien ne semble destiner à exciter la curiosité de l'observateur : absence de mouvements spectaculaires, et de structures différenciées impliquées dans l'adhérence, la pénétration, ou la lyse tissulaire ; uniformité des stades cellulaires ; absence de réelle pathogénicité rendant quasi-impossible l'infestation expérimentale, etc... En réalité, c'est bien la présence d'une épaisse paroi isolant la cellule fongique du milieu extérieur qui continue d'intriguer tous ceux qui sont confrontés au monde des levures.

Dans l'histoire des levures, la paroi a longtemps été considérée à tort comme une carapace inerte et rigide (le terme wall ou cell wall des anglo-saxons est à ce titre significatif) sans autre fonction que de protéger une cellule fragile avec laquelle elle ne possède aucune relation fonctionnelle. Pour cette raison, nombre d'auteurs ont abordé séparément l'étude de chacune des 2 composantes de la cellule fongique, certains considérant la présence d'une paroi comme une entrave à l'accessibilité du cytoplasme, d'autres faisant abstraction des structures cellulaires pourtant nécessaires au maintien de son organisation. Or à la lumière de travaux récents, il apparaît que la paroi :

- * exerce un contrôle sur la cellule fongique : son absence déclenche un signal de régénération, tandis que sa présence est indispensable à l'initiation des phénomènes de cytokinèse.

- * est le siège d'un équilibre entre processus de lyse et de synthèse qui lorsqu'il est perturbé entraîne des altérations morphologiques et métaboliques de la cellule.

- * enfin de son intégrité, et de sa capacité à filtrer certaines molécules (vis à vis d'antifongiques ou des réactions

immunitaires de l'hôte par exemple) dépend le comportement du germe, lyse, simple survie, ou adhérence aux cellules permettant la colonisation des tissus.

Ces 3 exemples montrent bien la nécessité, dans quelque domaine que ce soit, de considérer la paroi comme partie intégrante de la cellule qu'elle entoure, et ce sera notre préoccupation majeure tout au long de ce travail, tant dans l'adaptation des techniques que dans l'interprétation des résultats.

Nous envisagerons tout d'abord, dans la partie "généralités", quelques aspects de la biologie, de la morphologie, mais aussi de l'ultrastructure de la cellule fongique qu'est *Candida albicans*. Puis nous aborderons l'état actuel de nos connaissances sur l'enveloppe cellulaire ainsi que sur les techniques cytochimiques permettant d'en détecter plus spécifiquement les composants.

Les résultats ont été regroupés en 4 chapitres. Le premier fait l'objet de la localisation des glycoconjugués pariétaux. Dans le second, nous abordons le devenir de l'enveloppe cellulaire à travers l'évolution d'enzyme de l'espace périplasmique telles que la phosphatase acide. Le troisième chapitre concerne l'étude des mécanismes de réparation et de régénération des parois.

Ces acquisitions nouvelles sur l'enveloppe cellulaire des levures ont été mises à profit pour aborder l'étude des phénomènes d'adhérence aux cellules hôtes. Les résultats obtenus sont présentés dans le quatrième chapitre.

GENERALITES

I - BIOLOGIE

Candida albicans (ROBIN) BERKOUT 1853, est un microorganisme eucaryote appartenant au monde des levures, c'est à dire un champignon se présentant sous une forme unicellulaire pendant une grande partie de son cycle, et qui se reproduit le plus souvent par bourgeonnement. Le terme levure, trop souvent assimilé aux seules levures de bière ou du boulanger, recouvre un groupe de champignons hétérogène, plus de 500 espèces, dont une centaine environ pour le seul genre *Candida* qui se caractérise par son aptitude à former du pseudomycélium. Parmi celles-ci, *Candida albicans* peut être identifié par sa capacité à produire, dans des conditions bien précises, des éléments morphologiques spécifiques, les chlamydospores et les tubes germinatifs.

La plupart des individus sains hébergent ce germe sous sa forme levure comme saprophyte des muqueuses digestives ou vaginales. Contrairement à de nombreux autres commensaux, son caractère opportuniste lui permet d'adopter dans certaines conditions favorisantes (diabète, grossesse, antibiothérapie, immunodépression, etc...) un comportement pathogène à l'origine de nombreuses préoccupations d'ordre médical (traitement, diagnostic...). L'envahissement tissulaire qui s'en suit s'opère préférentiellement sous forme filamenteuse. Il devient alors responsable de lésions (ou candidoses), des muqueuses buccales (muguet), de la peau (intertrigo), des phanères (onyxis et périonyxis), ou plus profondes (digestives, urinaires, pulmonaires, ou septicémiques).

II - MORPHOLOGIE

Candida albicans se présente sous quatre aspects : levure, pseudomycélium, mycélium, chlamydospore (PHAFF *et al.*, 1978 ; ODDS, 1979)

* La levure

C'est une cellule globuleuse ou légèrement ovoïde (3,5 - 6 μ m X 6 - 10 μ m) encore appelée blastospore, qui se multiplie par bourgeonnement. La séparation de la cellule mère et du bourgeon s'opère par un système de dislocation, ou septum, qui laisse une cicatrice de

naissance sur la cellule fille et de bourgeonnement sur la cellule parentale. C'est cette forme, la plus facilement obtenue en culture sur le milieu usuel de Sabouraud, et la mieux connue sur le plan de l'ultrastructure, qui servira de base à notre étude des parois.

* Le pseudomycélium

C'est une structure filamenteuse formée par bourgeonnement terminal de blastospores allongées qui demeurent attachées les unes aux autres, et séparées par un étranglement caractéristique. On le rencontre souvent dans les cultures âgées.

* Le mycélium

Il est constitué de longs filaments séparés en articles par des cloisons, principalement rencontrés lors d'envahissements tissulaires. L'étude de sa paroi est le plus souvent assimilée à celle des tubes germinatifs, ou encore formes de blastèse, obtenus *in vitro* sur sérum ou en milieu synthétique liquide. Dans ces conditions en effet, les blastospores initient rapidement un tube mycélien d'ailleurs considéré comme spécifique de *Candida albicans*, et utilisé pour en assurer la diagnose.

* La chlamydospore

C'est une grosse cellule à contenu granuleux et à paroi épaisse, qui apparaît à l'extrémité des articles pseudomycéliens, dans des milieux de culture particuliers tels que l'eau de riz glucosée. Sa production est également utilisée dans le diagnostic courant comme test d'identification de *Candida albicans*.

III - RAPPEL ULTRASTRUCTURAL

A) Le problème de la fixation

L'état actuel de nos connaissances sur l'ultrastructure des levures en général, et sur *Candida albicans* en particulier, ne peut être abordé sans faire référence aux multiples procédés de fixation utilisés

pour en révéler efficacement les diverses structures cellulaires. Il est frappant de constater, encore plus que pour tout autre type de cellule, combien la fixation peut affecter l'aspect morphologique des levures, phénomène auquel l'épaisse paroi qui enveloppe la masse cytoplasmique n'est certes pas étrangère. Il n'est donc pas surprenant que de nombreux auteurs (PREUSSER, 1978 ; DREWE, 1981 ; PERSI et BURNHAM, 1981 ; BAHARAEEN et VISHNIAC, 1982) aient trouvé là matière à mener des études comparatives ; Et s'il est vrai qu'une bonne fixation doit être d'une efficacité générale et non sélective, il faut bien avouer que de ce point de vue la plupart des tentatives ont échoué, et qu'elles ont rarement contribué à montrer les levures sous un aspect très favorable.

Pour tenter de mettre au point une fixation universelle permettant de préserver efficacement cytoplasme et paroi, l'approche s'est faite dans deux directions :

- La première a consisté à tester de nouveaux fixateurs, tampons ou résines, ou à modifier leurs conditions d'utilisation. Dès 1965, devant le manque d'informations fournies par la fixation conventionnelle glutaraldéhyde - OsO_4 , MONTES *et al.* introduisent le permanganate de potassium (KMnO_4), et le permanganate de lithium (LiMnO_4). Grâce à un excellent contraste des structures membranaires, ces techniques ont rapidement permis d'établir l'architecture de base de la forme levure. Toutefois, la perte considérable de matériel cellulaire (ribosomes, lipides) a amené les expérimentateurs à associer ces fixateurs au glutaraldéhyde (OSUMI *et al.*, 1974 ; KOT *et al.*, 1975 ; ARAI *et al.*, 1977 ; GOW *et al.*, 1977).

Parallèlement, MONTES *et al.* (1968), puis SCHWAB *et al.*, (1970), DJACZENKO et CASSONE, (1971), CASSONE *et al.* (1981), BAHARAEEN et VISHNIAC (1982), développèrent des fixations à base d'acroléine, de diméthylsulfoxyde (DMSO) ou de TRIS - (1-aziridiny) phosphine oxide (TAPO). Ces techniques, bien qu'aux résultats inconstants, ont fourni des renseignements utiles en complément des techniques précédentes ; il en est de même pour les fixations "multiples", glutaraldéhyde - OsO_4 - acide tannique - OsO_4 - KMnO_4 , (PERSI et BURNHAM, 1981), ou glutaraldéhyde - acroléine - paraformaldéhyde - KMnO_4 , (BAHARAEEN et VISHNIAC, 1982) ;

et pour les fixations de longue durée (18 à 24 heures, JOSHI *et al.*, 1975). Enfin, l'utilisation d'acide tannique comme mordant (PERSI et BURNHAM, 1981) de l'ERL 4206, résine époxy de basse viscosité particulièrement adaptée aux parois végétales (SPURR, 1969 ; SHANNON et ROTHMAN, 1971) ou encore du dichromate de potassium comme substance tampon dans une fixation OsO_4 , (PREUSSER 1978), sont d'autres exemples d'acquisitions ayant permis d'accroître l'efficacité des techniques précédemment développées.

- Une deuxième série de tentatives a consisté à favoriser la pénétration des fixateurs. A cet effet ce sont surtout des digestions enzymatiques partielles permettant d'augmenter la perméabilité des parois qui ont été réalisées (OSUMI *et al.*, 1974 ; PARTRIDGE, 1974 ; STOETZNER et KEMMER, 1975). Outre la difficulté d'apprécier correctement les altérations cytoplasmiques provoquées par l'attaque enzymatique, ces méthodes sont mal adaptées à l'étude des parois *in situ*.

Les meilleurs résultats nous sont fournis à ce jour par la technique de BORGERS et DE NOLLIN (1974) qui consiste à fixer des cellules préalablement coupées au cryostat. Dans ces conditions la préservation des structures cellulaires et pariétales est correctement assurée ; de plus, ce type de préparation convient remarquablement aux études cytochimiques (DE NOLLIN *et al.*, 1975). Associé à la technique d'inclusion de SPURR (1969) il sera à la base de la plupart de nos travaux sur *Candida albicans*. Ajoutons enfin, que la double coloration des coupes ultrafines acétate d'uranyle-citrate de plomb, nécessaire à une bonne définition de l'architecture pariétale, contraste uniformément le cytoplasme et rend les organites cellulaires difficilement identifiables. La technique de THIERY (1967), qui fournit en plus d'une coloration sélective de certains polysides, de nombreux détails d'ordre morphologique, lui est bien souvent supérieure.

B) Les organites cytoplasmiques

Malgré les variations morphologiques inhérentes au type de fixation utilisé, l'examen ultrastructural des blastospores de *Candida albicans* révèle la présence des organites cellulaires typiques

de cellules eucaryotes. Leur description a fait l'objet de nombreux ouvrages et articles (AGAR et DOUGLAS, 1957 ; TSUKAHARA et SATO, 1964 ; MONTES *et al.*, 1965 ; MATILE *et al.*, 1969 ; BORGER et DE NOLLIN, 1974 ; PATRIDGE et DREW, 1974). Nous en rappellerons brièvement ici les principaux aspects.

Un système de double membrane, occasionnellement connecté à l'enveloppe nucléaire et étroitement associé au plasmalemme, constitue le réticulum endoplasmique, le plus souvent agranulaire (MOOR et MUHLETHALER, 1963). Il est à l'origine de vésicules contenant des disulfides réductases (MOOR, 1967) et des glucanases (CORTAT *et al.*, 1972) dont le déversement au niveau de l'espace périplasmique serait susceptible d'augmenter la plasticité de la paroi, et donc d'initier le bourgeonnement.

L'existence de l'appareil de Golgi est très controversée. Son identification difficile à partir de simples critères morphologiques (HAVELKOVA et MENSİK, 1966 ; KOPECKA, 1972) a néanmoins pu être établie à partir de réactions cytochimiques chez des protoplastes en régénération (VAN RIJN *et al.*, 1975). Il s'agit d'une structure rudimentaire constituée de trois à quatre saccules entourés de plusieurs petites vésicules. De nombreux auteurs le considèrent comme une formation éphémère produite par une prolifération du réticulum endoplasmique, et "consommée" au cours de la synthèse pariétale.

Assimilées aux lysosomes des cellules animales (MATILE et WIEMKEN, 1967) les vacuoles, grâce à leur important stock enzymatique, constituent le principal compartiment digestif des levures (WIEMKEN *et al.*, 1979). Elles seraient à l'origine du turnover protéique observé au cours de la différenciation cellulaire. Un cycle alternant fragmentation et fusion des vacuoles, et des modifications concernant la distribution des particules intramembranaires des tonoplastes (=membranes vacuolaires) ont également été décrits, au cours du processus de bourgeonnement (MOELLER et THOMSON, 1979 a et b).

Les globules lipidiques (=sphérosomes) apparaissent le plus souvent logés dans une dépression ménagée par le noyau. Leur phagocytose

par la vacuole, au niveau d'invaginations du tonoplaste dépourvues en particules intramembranaires, est un processus constant (MOELLER et THOMSON, 1979 a).

Le noyau, limité par un système de double membrane percée de pores, présente une forme irrégulière et un nucléole excentré peu visible. Outre ces différents organites, le cytoplasme est très riche en ribosomes et contient des mitochondries bien développées à crêtes parallèles. La principale réserve polysaccharidique est constituée par des particules de glycogène de 32 nm de diamètre (particules β), le plus souvent disposées en rosette de 40 à 150 nm de diamètre (particules α) (YAMAGUCHI *et al.*, 1974 ; RAJASINGHAM et CAWSON, 1980). Enfin des corps denses révélant une activité catalasique (OSUMI *et al.*, 1974) ont accessoirement été décrits. L'ensemble de ces données ultrastructurales est illustré par les micrographies 1 à 5, et schématisé sur la figure A.

IV - L'ENVELOPPE CELLULAIRE : CONSTITUANTS ET COMPOSITION CHIMIQUE

Elle est constituée du plasmalemme, de l'espace périplasmique, de la paroi, et du revêtement pariétal (fig. A).

A) Le plasmalemme

Il présente une structure classique de type "unit membrane" de 8 nm d'épaisseur (HIRANO *et al.*, 1969 ; MATILE *et al.*, 1969) et l'existence d'une couche dense adhérente au feuillet externe (glycocalyx ou cell coat) de nature polysaccharidique (PARTRIDGE et DREWE, 1974 ; POULAIN *et al.*, 1978), lui confère une organisation typique de cellule animale (BERKALOFF *et al.*, 1977) ou végétale (ROLAND et VIAN, 1971). Il s'en distingue cependant sur le plan biochimique par un contenu en phospholipides anormalement bas, comparativement aux cellules eucaryotes (16 % des lipides totaux au lieu de 60 % pour les érythrocytes humains). Il donne fréquemment naissance à des invaginations intracytoplasmiques susceptibles de migrer dans le plan de la membrane (NECAS *et al.*, 1981), et à des enroulements plus complexes ou lomasomes (DE NOLLIN et BORGERS, 1975). La disposition des particules intramembranaires observées en cryodécapage y est caractéristique. La face exocytoplasmique présente des arrangements

hexagonaux de particules d'un diamètre de 15 nm, composées de mannanes et de protéines dans un rapport 5 : 2. La face protocytoplasmique comporte peu de particules, à l'exception des invaginations membranaires (MOOR et MUHLETHALER, 1963 ; NECAS et SVOBODA, 1976 ; PREUSSER et ROSTEK, 1979 ; PESTI *et al.*, 1981). BAUMGARTNER *et al.* (1980) y ont identifié 17 fractions antigéniques, dont la présence a été confirmée en cryodécapage par une technique indirecte d'anticorps marqués à la ferritine.

En régulant le flux moléculaire entrant et sortant, le plasmalemma joue un rôle majeur dans les communications entre la cellule et son environnement. Ce transport transmembranaire peut s'effectuer par simple diffusion, et concerne alors principalement le transport de l'eau, des alcools, des acides organiques et de la plupart des drogues. Le plus souvent il s'agit cependant d'un transport actif qui s'effectue par l'intermédiaire d'un système de perméases. Ce dernier implique la présence de protéines transporteuses spécifiques, dont LOGAN *et al.* (1979) ont pu établir les principales caractéristiques chez *Candida albicans*. Sont ainsi véhiculés des monosaccharides (3 protéines membranaires impliquées dans le transport du galactose, du glucose et du mannose ont été isolées et purifiées, ARNOLD, 1981), des disaccharides, des acides aminés, des peptides, des anions et des cations.

De plus, le plasmalemma possède certaines activités de synthèse spécifiques. Citons pour les principales une activité chitine synthétase, catalysant l'incorporation de N-acetylglucosamine en polymères de chitine à partir d'UDP-N- acetylglucosamine ; d'une glucane synthétase et d'une glycosyl transferase, catalysant le transfert du glucose respectivement en polymères de β -(1 $\rightarrow$ 3) et α -(1 $\rightarrow$ 4) glucanes à partir d'UDP-glucose. Enfin des ATP ases, des phospholipases et 20 % de l'activité mannosyl transferase (SANTOS *et al.*, 1978) ont également été identifiées à ce niveau.

De nombreux travaux ont tenté d'élucider le rôle du plasmalemma des levures dans la biosynthèse des glycoprotéines, plus spécialement dans celle des glycoenzymes de l'espace périplasmique (WELTEN-VERSTEGEN, 1981). Différentes interprétations sont présentées

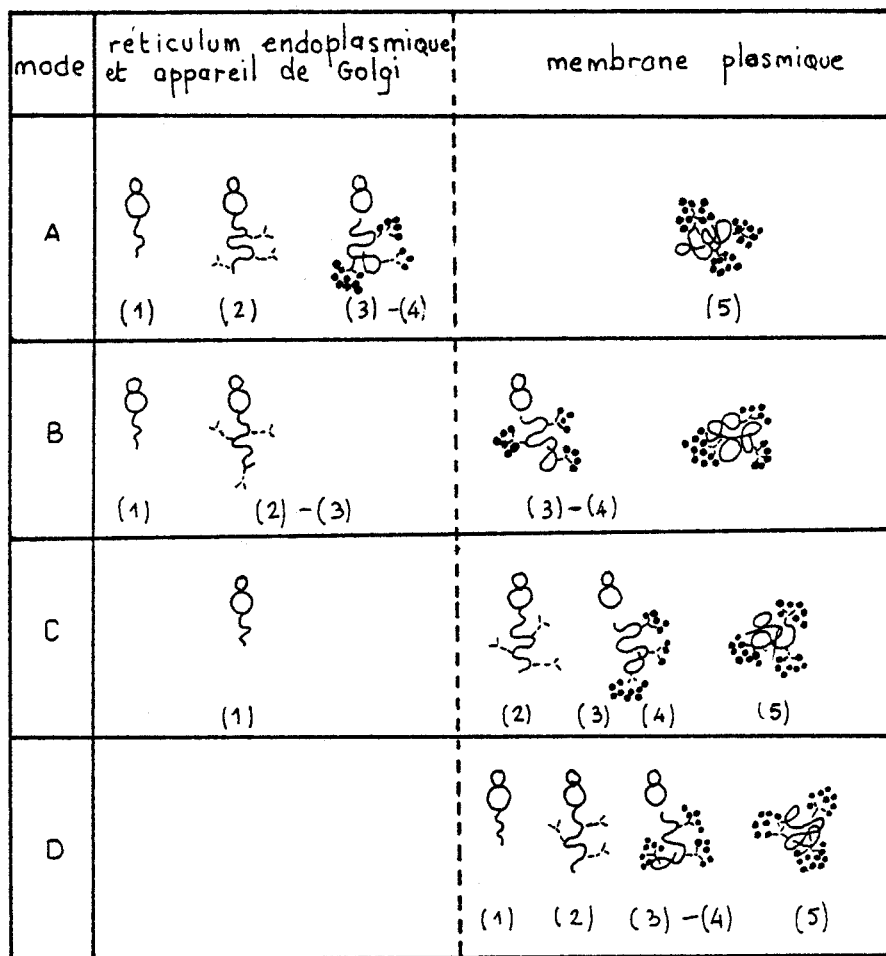


Figure B : Différents modes de synthèse des mannoprotéines chez *Saccharomyces cerevisiae*. 1 - synthèse de la protéine ; 2 - glycosylation ; 3 et 4 ; allongement des chaînes polysaccharidiques ; 5 - transport de la glycoprotéine (d'après WELTEN-VERSTEGEN, 1981).

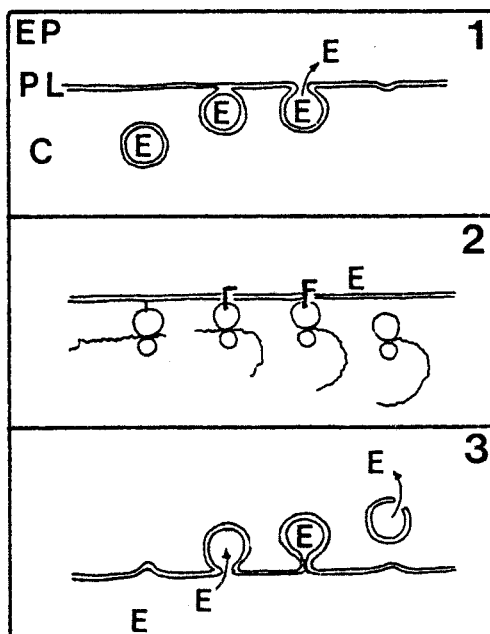


Figure C : Représentation schématique de différents types de translocation d'enzymes (E), du cytoplasme (C), vers l'espace périplasmique (EP), au travers du plasmalemme (PL), chez les levures (d'après ARNOLD,

dans la figure B. L'intervention du plasmalemmes peut se situer, A : au niveau du transport de la molécule (LINNEMANS *et al.*, 1977) B et C : au niveau de la glycosylation initiale de la protéine et de l'allongement des chaînes polysaccharidiques ; D : au niveau d'une synthèse complète de la glycoprotéine. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a été montré (WELTEN-VERSTEGEN, 1981) que le plasmalemmes intervient au niveau de l'allongement des chaînes polysaccharidiques (Mode B) mais que tous les composants (intermédiaires lipidiques de glycosylation, accepteurs polypeptidiques et transférases) impliquées dans la glycosylation initiale de la chaîne peptidique (Mode C), de même que les précurseurs nécessaires à une biosynthèse de la glycoprotéine (Mode D), y sont disponibles.

Plusieurs mécanismes de transport au travers du plasmalemmes ont été proposés (figure C). Le 1er (ou "membrane flow") suppose que les enzymes de l'espace périplasmique ou leurs précurseurs sont déversés à ce niveau par l'intermédiaire de vésicules d'origine golgienne ou ergastoplasmique, dont les membranes fusionnent avec le plasmalemmes (MOOR, 1967 ; MATILE *et al.*, 1971). Un deuxième processus (HOLBEIN et KIDBY, 1977) suggère une association intime entre le plasmalemmes et le système de synthèse (Ribosomes et ARN messager). Le bourgeonnement dans l'espace périplasmique de structures vésiculaires issues d'évaginations du plasmalemmes, constituerait une 3ème possibilité (ARNOLD et PRINGLE, 1980). Elle pourrait expliquer la difficulté de mise en évidence d'enzymes telles que l'invertase chez certaines espèces dont *Candida albicans*.

B) L'espace périplasmique

L'espace périplasmique comprend la région de l'enveloppe cellulaire située entre le plasmalemmes et la paroi proprement dite. Il constitue une zone de localisation privilégiée, pour les nombreuses enzymes digestives qui agissent sur des substrats nécessitant une hydrolyse avant leur assimilation par la cellule, suivant le schéma proposé par ARNOLD (1980) (fig. D).

Ces enzymes généralement stables, aux concentrations élevées, et facilement détectables, ont été parmi les plus étudiées chez les levures. Il s'agit principalement de glycoprotéines telles la

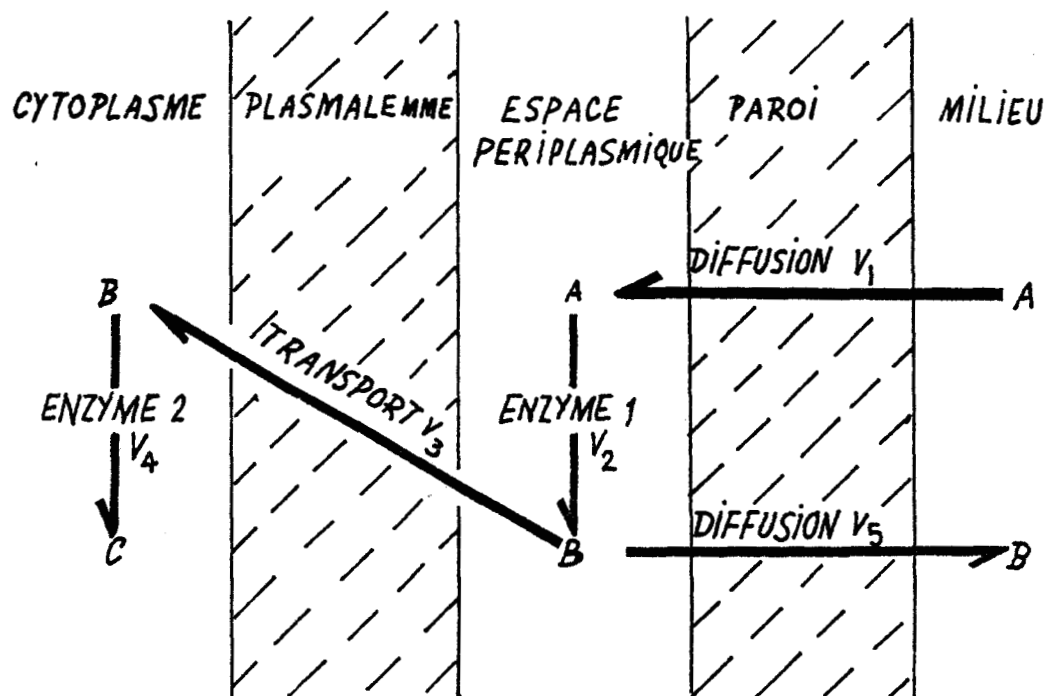


Figure D : Représentation schématique de l'assimilation d'un substrat A en dérivés intermédiaires B et C. L'enzyme 1 est localisée dans l'espace périplasmique, l'enzyme 2 dans le cytoplasme. v représente les vitesses respectives de diffusion, de transformation et de transport du substrat. (d'après ARNOLD, 1980).

β -fructofuranosidase (ou invertase - PM 135 000) et la phosphatase acide (PM 380 000). D'autres, mélibiose, hexokinase, α -galactosidase, tréhalase, aminopeptidase, ont été occasionnellement détectées à ce niveau, de même que des quantités importantes de glycogène : (GUNJA-SMITH et SMITH, 1974 ; GUNJA-SMITH *et al.*, 1977).

C) La paroi : Nature et Biosynthèse de ses composants

Il s'agit de la partie externe de l'enveloppe cellulaire qui confère à la levure à la fois sa forme, et sa stabilité mécanique. Grâce à ses propriétés physiques, elle permet au protoplasme généralement fragile de supporter de brusques variations de pH ou de pressions osmotiques. De sa perméabilité dépend la survie de la cellule, car c'est à son niveau que s'effectue, en fonction de leur taille et de leur configuration, un premier tri de molécules. Inversement, elle doit assurer une rétention spécifique des glycoprotéines de l'espace périplasmique.

Les parois de levures sont composées en majeure partie de polysaccharides. A la place de la cellulose universellement présente dans les parois végétales, elles contiennent toutes des glucanes, dont la diversité d'abord démontrée par diffraction aux rayons X (KREGER, 1954) fut ultérieurement précisée par spectroscopie infrarouge (MITCHELL et SCURFIELD, 1967) et par résonnance magnétique nucléaire (GORIN et SPENCER, 1970). Tout aussi importants sont les polysaccharides dans lesquels le mannose est le sucre dominant. Des progrès récents en microscopie électronique permettent de les localiser avec précision à l'aide d'anticorps ou de lectines associés à des marqueurs denses et enzymatiques. Enfin, chitine, lipides et peptides généralement liés aux polysaccharides, sont également des constituants pariétaux de levures.

1) Les glucanes

Ces polymères de D-glucose jouent un rôle majeur dans la détermination de la morphologie des levures et dans la préservation de l'intégrité cellulaire. Ce sont essentiellement des β -glucanes dans lesquels les liaisons β - (1 $\rightarrow$ 3) et β - (1 $\rightarrow$ 6) prédominent. Bien que rencontrés

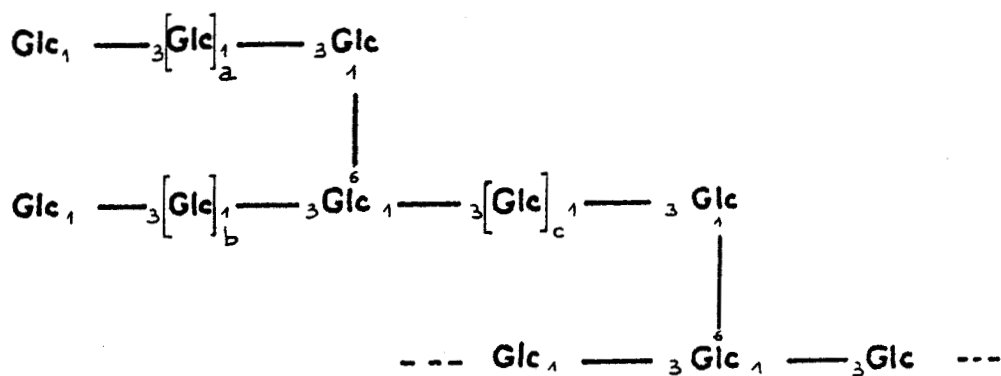


Figure E : Structure d'une portion de glucane de Saccharomyces cerevisiae (selon MANNERS et *al.*, 1973). G, résidu glucopyranose
a + b + c représentent environ 60 glucoses.

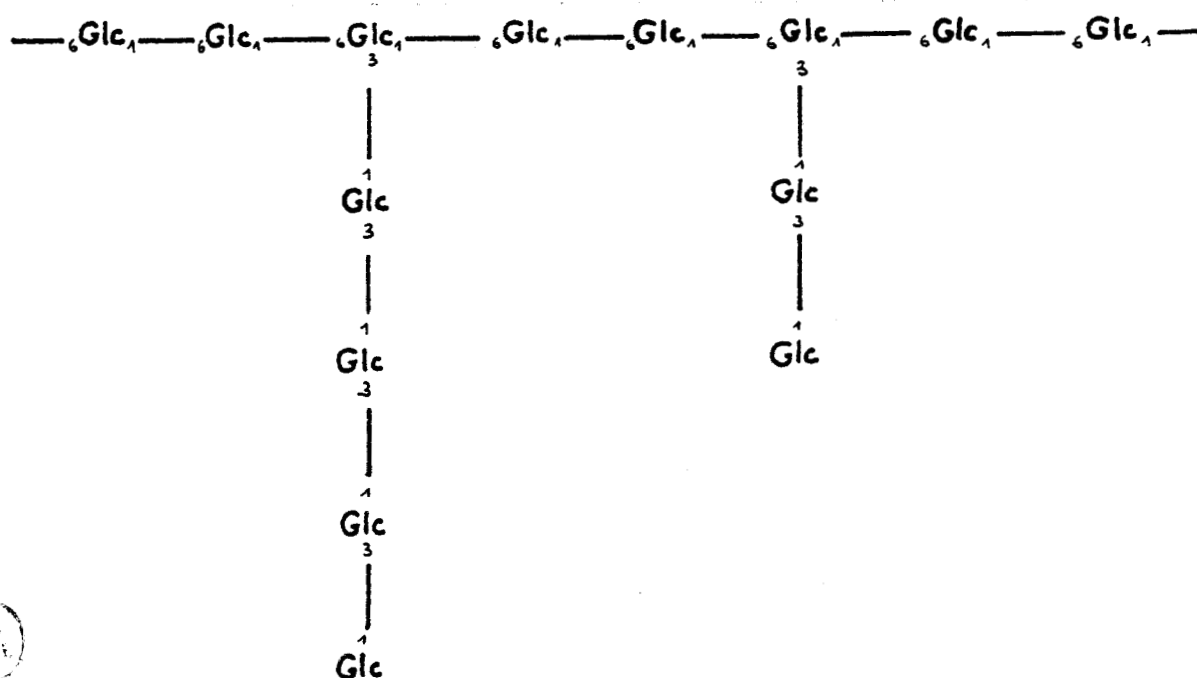


Figure F : Structure probable des glucanes de Candida albicans (d'après ODDS, 1979).

chez tous les champignons levuriformes, leur structure complexe varie considérablement suivant le degré de branchement et la taille des molécules (figures E et F). Chez *Candida albicans*, il s'agit de longues chaînes de glucoses liés en β -(1 $\rightarrow$ 6) présentant des ramifications latérales en β -(1 $\rightarrow$ 3). Certains de ces glucanes peuvent être reliés à des glycoprotéines enzymatiques telles que l'invertase (DICKERSON et BAKER, 1978).

Leur haut degré d'insolubilité après extraction par la potasse, suggère une association possible avec la chitine par l'intermédiaire d'acides aminés tels que la lysine et la citrulline (SIETSMA et WESSELS, 1979, 1981). C'est ce complexe Glucane/chitine qui constitue le squelette microfibrillaire pariétal de nombreuses levures (fig. G).

Les mécanismes de biosynthèse de ces glucanes sont encore très controversés. L'hypothèse de MOOR et MUHLETHALER (1963), selon laquelle les particules membranaires observées en cryodécapage constitueraient les sites de synthèse des glucanes, a longtemps prévalu. Elle a été mise en doute par NECAS (1971), et NECAS et SVOBODA (1974), qui n'ont observé aucune connection entre ces particules membranaires et les microfibrilles. Ces auteurs ont démontré d'autre part que des traitements enzymatiques par des protéases (trypsine, papaïne, pronase), des mannosidases, des phospholipases ou des lipases, n'affectent nullement ni la structure et la distribution des particules membranaires, ni la synthèse des composants fibrillaires. Toutefois l'hypothèse qu'ils ont formulée, et selon laquelle les macromolécules de glucanes seraient synthétisées dans le cytoplasme, puis transportées au travers du plasmalemme, n'a reçu à ce jour aucune confirmation. Au contraire, SHEMATEK *et al.*, 1980, SHEMATEK et CABIB (1980) et LARRIBA *et al.*, (1981) chez *Saccharomyces cerevisiae*, puis ORLEAN (1982) chez *Candida albicans*, ont mis en évidence puis isolé du plasmalemme une β -(1 $\rightarrow$ 3) glucane-synthétase, permettant une synthèse *in vitro* de microfibrilles de β -(1 $\rightarrow$ 3) glucanes de 0,5 μ m de long, et composés de 80 chaînes contenant chacune 700 glucoses.

SHEMATEK *et al.*, (1980) ont ainsi pu proposer un mécanisme de régulation de l'enzyme rendant compte de la synthèse des parois en

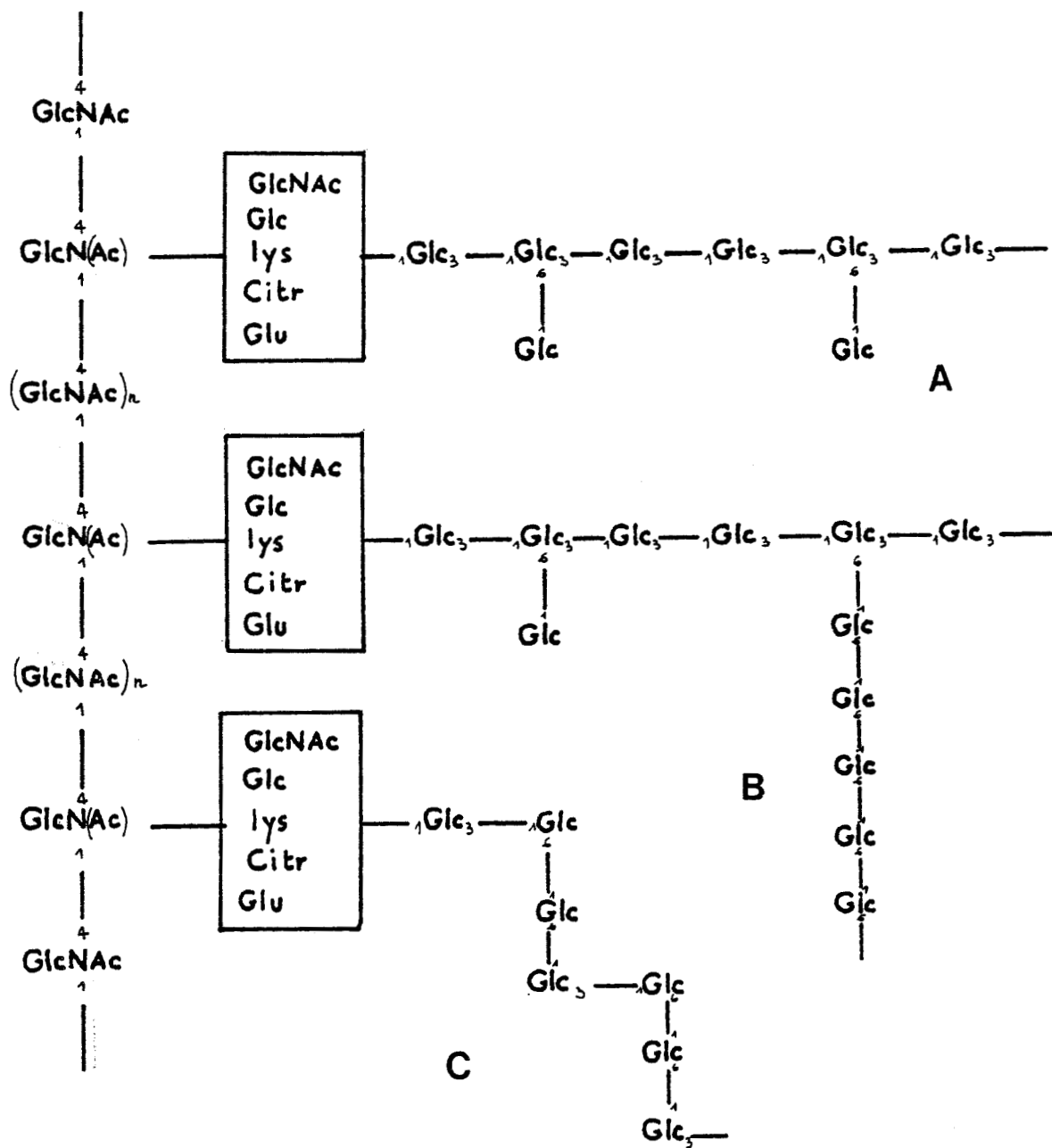


Figure G : Différents types de structures (A, B et C), du complexe R-glucane/chitine chez *Schizophyllum commune* (d'après SIETSMA et WESSELS, 1979). GlcNAc, N-Acetylglucosamine ; Glc, glucose ; Lys, lysine ; Citr, citrulline ; Glu, acide glutamique.



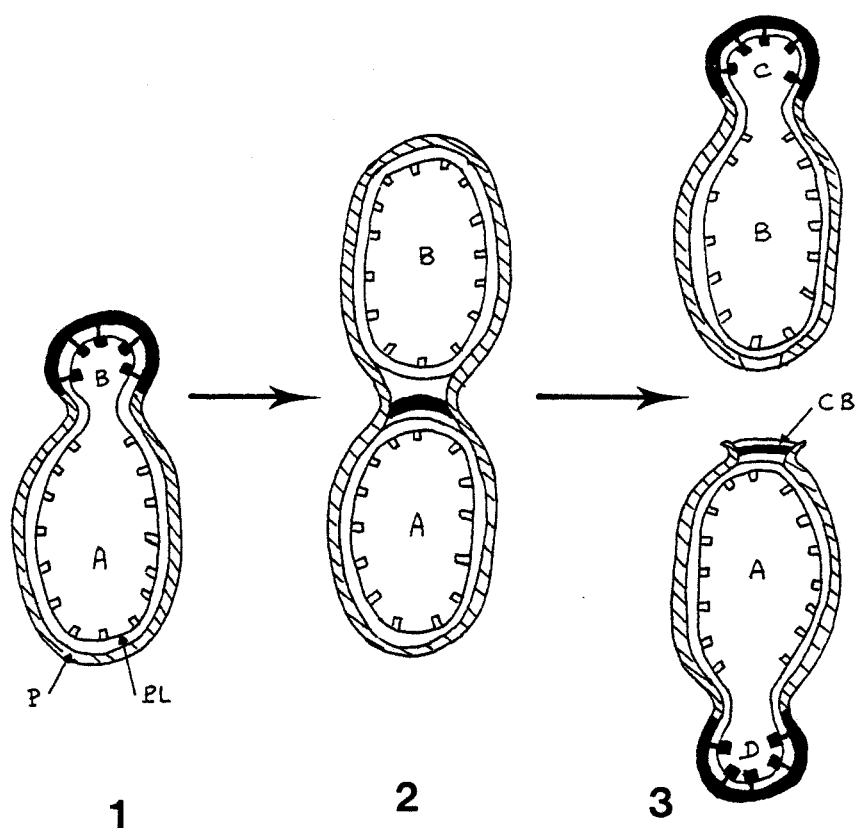


Figure H : Synthèse de la paroi en fonction du cycle cellulaire. Les portions de paroi en voie d'élaboration sont représentées en noir. P, paroi ; PL, plasmalemma ; CB, cicatrice de bourgeonnement

■ , glucane synthetase active
 □ , glucane synthetase inactive.

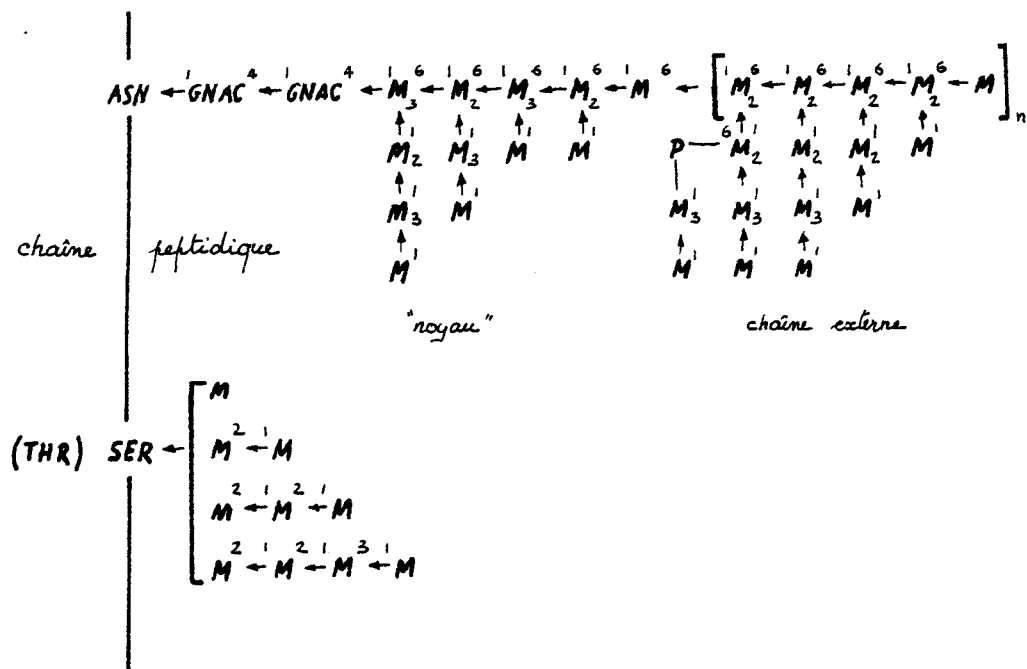


Figure I : Représentation schématique de la structure des Mannoprotéines des parois de levures (d'après BALLOU, 1976).
M, mannose ; GNAC, N-acetylglucosamine ; ASN, asparagine ;
SER, serine ; THR, thréonine ; P, groupes phospho-diesters.

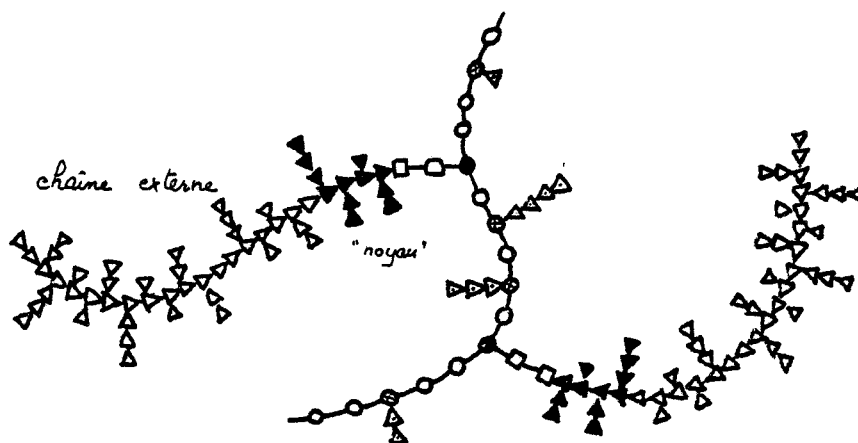


Figure J : Représentation schématique des mannanes de *Saccharomyces cerevisiae* illustrant l'importante ramification de la molécule (d'après BALLOU, 1976)

- ⊗ ● , résidus acides aminés
- Δ ▲ , résidus mannoses
- , résidus N-acetylglucosamine.

fonction du cycle cellulaire (figure H).

2) Les mannanes

Ces polysaccharides, le plus souvent liés à des protéines, représentent l'un des principaux constituants des parois. Leur fonction, structure et biosynthèse ont été analysées dans de nombreux articles et revues (NECAS, 1971; MASLER *et al.*, 1974 ; BALLOU, 1976 ; FARKAS, 1979 ; GRIMMECKE et REUTER, 1980 a et b, 1981). Contrairement aux glucanes et à la chitine, ils sont solubles dans l'eau, et ne semblent pas contribuer au maintien de la morphologie cellulaire. La nécessité d'utiliser successivement une endomannanase, une exo-mannosidase et une β -mannosidase pour obtenir des unités mannosidiques (NAKAJIMA et BALLOU, 1974) révèle leur haut degré de ramification (figures I et J).

Les liaisons covalentes mannanes-protéines sont les mêmes que pour la plupart des glycoprotéines des organismes supérieurs. Deux types de parties glycaniques, différentes par leur structure et leur mode d'attachement sur la protéine sont rencontrés. La première est constituée de longues chaînes linéaires de D-mannose liés en α - (1 $\rightarrow$ 6), sur lesquelles s'articulent des ramifications latérales à liaison α - (1 $\rightarrow$ 2) et α - (1 $\rightarrow$ 3) (BISHOP *et al.*, 1960 ; YU *et al.*, 1967 ; BALLOU, 1976). Le noyau de la glycoprotéine est composé de 12 à 17 mannoses, et d'un diacétylchitobiose attaché par une liaison de type N-glycosidique au résidu asparaginyll de la protéine. La chaîne externe est constituée de 100 à 150 mannoses.

Le second type de mannanes, plus rarement rencontré, est composé de courtes chaînes à liaisons α - (1 $\rightarrow$ 2) et α - (1 $\rightarrow$ 3) attachées par une liaison O-glycosidique à la sérine ou la thréonine de la protéine. Des ponts phosphodiester assurent un rôle de lien entre les mannanes de la chaîne externe. Avec les groupements carboxyles et amines des protéines, ils sont à l'origine d'importantes charges négatives de surface. Toutefois leur présence ne suffit pas à expliquer la stabilité de l'ensemble. Deux éléments sont en faveur de liaisons glucanes-mannanes. D'une part une extraction enzymatique par une β - (1 $\rightarrow$ 6) glucanase entraîne une perte des mannoprotéines (KOPECKA *et al.*, 1974). D'autre part les produits

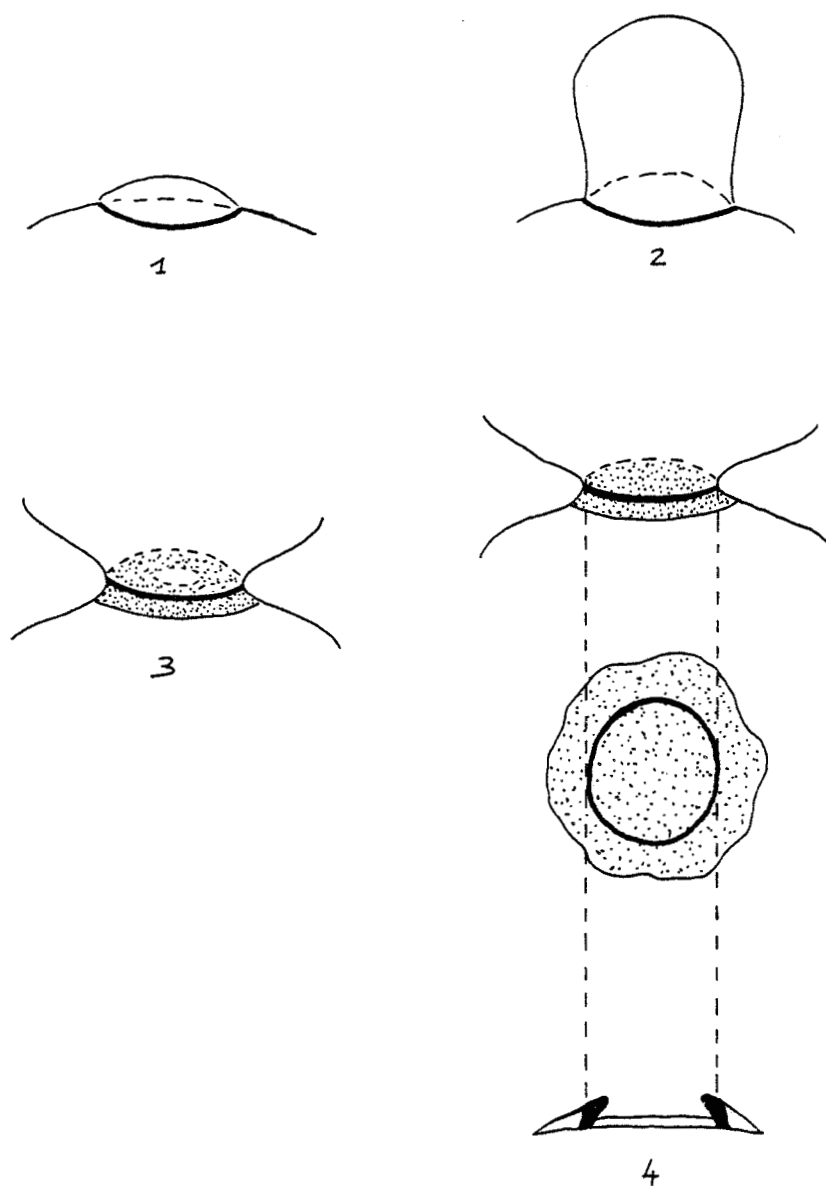


Figure K : Formation du septum primaire et synthèse de chitine (zones noire et pointillée) au cours du bourgeonnement (d'après CABIB et BOWERS, 1975).

1, anneau de chitine formé à la base du bourgeon dès son émergence. Au fur et à mesure de la croissance du bourgeon (2), extension de la zone de chitine vers l'intérieur et l'extérieur de l'anneau (3), jusqu'à ce que le septum soit clos (4).

de la digestion par une β - (1 $\rightarrow$ 3) glucanase contiennent à la fois mannose et β - (1 $\rightarrow$ 6) glucose (FLEET et MANNERS, 1977). Une telle association, dont les mécanismes restent à déterminer, serait en mesure d'expliquer comment les mannoprotéines, solubles dans l'eau, s'intègrent aussi solidement à l'ensemble de la paroi.

La synthèse des mannanes apparaît en relation très étroite avec celle des protéines. Elle nécessite la présence d'un sucre donneur (l'UDP glucose), d'un accepteur lipidique (le dolichol phosphate) et de glycosyltransférases. La "mannosylation" des protéines intracellulaires semble un préalable indispensable à leur sécrétion. Un blocage de la glycosylation par des sucres modifiés comme le 2-desoxyglucose (FARKAS *et al.*, 1970 ; VAN RIJN *et al.*, 1972) ou par des antibiotiques comme la tunicamycine (KUO et LANPEM, 1974) inhibe la formation et la sécrétion des glycoprotéines pariétales. L'initiation de cette glycosylation se ferait au niveau du réticulum endoplasmique, où 80 % des activités mannosyl transférases ont été localisées chez *Saccharomyces cerevisiae* (SANTOS *et al.*, 1978), tandis que le plasmalemmme interviendrait dans l'élongation des chaînes ; le mode de sécrétion, pinocytose inversée ou simple diffusion, restant à préciser.

Les mannanes constituent les principaux déterminants antigéniques de *Candida albicans*. La longueur des chaînes latérales et les liaisons α - (1 $\rightarrow$ 3) sont à l'origine des différences de réactivité entre les sérotypes A et B (FUKAZAWA *et al.*, 1980 ; SUZUKI et FUKAZAWA, 1982).

3) La chitine

Composant commun de la cuticule des arthropodes et des nématodes ce polymère de β - (1 $\rightarrow$ 4) N acétyl - D - glucosamine, ne se rencontre dans le règne végétal que chez les champignons filamenteux, et pour une part plus faible chez les levures. Sa signification structurale semble moins évidente au niveau des parois, où elle est présente en faible quantité (BACON *et al.*, 1966), qu'au niveau du septum primaire (fig. K), où constituant majeur associé à des glucanes (SEICHERTOVA *et al.*, 1973, 1975 ; HOLAN, 1981), elle assure la stabilité mécanique de la

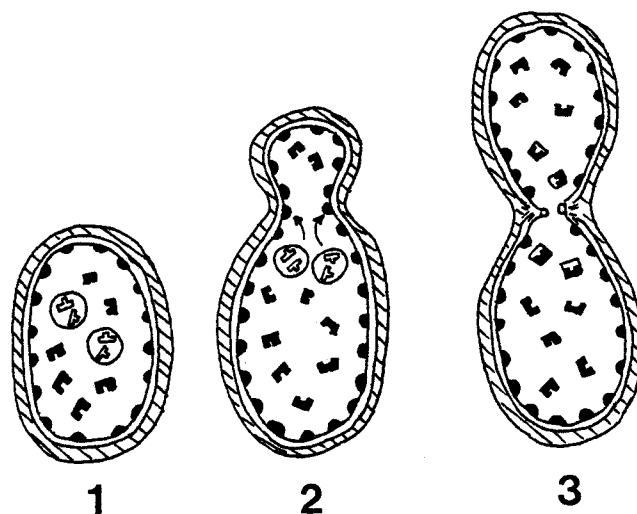


Figure L : Schéma hypothétique de l'initiation de la synthèse de chitine (d'après CABIB et FARKAS, 1971)

- ◐ chitine synthétase sous forme zymogène
- ◑ chitine synthétase active
- ⌞ activateur
- ⌞ inhibiteur

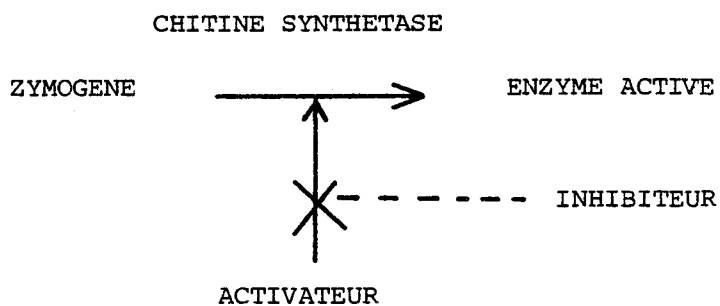


Figure M : Représentation schématique de la régulation de l'activité chitine-synthétase chez les levures (d'après CABIB et *al.*, 1973).

constriction cellule fille-cellule mère. L'inhibition de la synthèse de chitine par la polyoxine D, bien que n'affectant pas l'émergence du bourgeon, entraîne en effet rapidement une lyse cellulaire en l'absence de formation du septum (CABIB et BOWERS, 1971, 1975).

La synthèse discontinue de chitine au cours du cycle cellulaire en accord avec cette fonction spécialisée, a donné lieu à de nombreux travaux. CABIB et FARKAS (1971) chez *Saccharomyces carlsbergensis* puis DURAN *et al.*, (1975) chez *Saccharomyces cerevisiae* et BRAUN et CALDERONE (1978, 1979) à propos de *Candida albicans*, ont isolé une chitine synthétase uniformément distribuée sur le feuillet interne du plasmalemma sous forme zymogène. Celle ci catalyse *in vitro* l'incorporation de N-acetylglucosamine à partir d'UDP - N - acetylglucosamine. Cette activité serait deux fois plus importante dans le mycelium où la chitine est en plus grande quantité. L'enzyme est d'autre part activée par une protéase d'origine vacuolaire au niveau des sites spécifiques de dépôt de la chitine. Par la suite, les auteurs ont mis en évidence une 3ème composante de ce système permettant de rendre compte de son activation locale. Il s'agit d'un facteur cytoplasmique inhibiteur, de nature protéique, inactivant les protéases vacuolaires libres dans le cytoplasme et empêchant la stimulation de l'enzyme sur toute la périphérie cellulaire (figs. L et M). Cette séquence activation-inactivation serait régulée par la protéinase B (HASILIK, 1974).

Les préparations de chitine synthétase consistent en fait en particules, ou chitosomes, de 40 à 70 nm de diamètre (RUIZ - HERRERA *et al.*, 1975 ; BRACKER *et al.*, 1976). Plus récemment, de telles unités fonctionnelles ont été isolées de toute une série de champignons dont des levures (BARTNICKI-GARCIA *et al.*, 1978). Bien qu'elles soient capables de synthétiser des microfibrilles de chitine *in vitro*, leur existence *in vivo* n'a pas été confirmée. Etant donné leurs dimensions, les chitosomes ne peuvent être considérés comme des composants membranaires intégraux, mais pourraient véhiculer l'enzyme de son site de synthèse vers le plasmalemma.

4) Les lipides

Contrairement aux polysaccharides, les lipides des parois de levures, malgré des travaux prometteurs dans le domaine immunologique

(ISEMBERG *et al.*, 1963 ; KEMP et SOLOTOROVSKY, 1963) sont demeurés pratiquement inexplorés. Les explications à ce phénomène sont de deux ordres :

- d'une part, la proportion souvent élevée des lipides pariétaux (7 % du poids sec des parois isolées de *Candida albicans* - CHATTAWAY et HOLMES, 1968 ; jusqu'à 13 % pour d'autres levures - ARNOLD, 1981) semble due à une contamination membranaire. De fait la plupart des analyses chimiques révèlent une composition en lipides des parois voisine de celle des lipides totaux.

- d'autre part, aucune méthodologie ne permet leur visualisation directe en microscopie électronique, et donc il n'existe pas d'indication ultrastructurale sur leur localisation. Récemment cependant, POULAIN (1982), après extraction chimique ou enzymatique des lipides par le mélange méthanol-chloroforme ou une lipase, a suggéré que les lipides pariétaux de *Candida albicans* étaient associés superficiellement aux mannoprotéines, et plus en profondeur à la matrice interfibrillaire.

5) Les enzymes de la paroi

Toute la difficulté de l'étude des enzymes pariétales réside dans le fait de savoir si elles font partie intégrante de la paroi, ou si leur présence n'y constitue qu'une étape transitoire précédant leur excrétion dans le milieu extérieur. La plupart des indices biochimiques et cytochimiques (ARNOLD, 1981) sont davantage en faveur d'une rétention des enzymes de l'espace périplasmique par la paroi, plutôt que d'une liaison étroite avec certains de ces composants. Dans ce cas en effet le transport de l'enzyme au travers du plasmalemma ne constituerait pas le stade terminal de sa mise en place, mais il devrait être complété par des étapes supplémentaires, (migration dans la paroi, puis fixation à sa matrice), qui n'ont à ce jour été démontrées. La caractérisation de ces enzymes, et surtout leur distinction par rapport aux autres enzymes de l'enveloppe cellulaire, se trouvent confrontées à deux difficultés : d'une part la quasi inaccessibilité des substrats ; d'autre part la contamination des préparations pariétales par des enzymes de l'espace périplasmique. Pour ces différentes raisons les enzymes

pariétales ont été principalement étudiées lors de leur libération dans le milieu extérieur après autolyse des cellules. Pour l'essentiel, 2 β - glucanases, une β - (1 $\rightarrow$ 3) et une β - (1 $\rightarrow$ 6), ont été isolées et purifiées (ARNOLD 1972). Le problème de leur véritable localisation n'en demeure pas pour autant résolu, car toutes les enzymes détectées dans le milieu de culture peuvent provenir de la cellule ou de l'espace périplasmique qu'elles ont quitté via la paroi. Le temps pendant lequel elles vont y séjourner dépend du renouvellement des structures pariétales, donc à la fois de la nature des milieux de culture, et de l'âge des cellules.

D) Le revêtement pariétal

En plus de leur paroi qui présente une limite externe nette et parfaitement définie, certaines levures produisent des composants généralement de nature polysaccharidique, pouvant se dissoudre dans le milieu extérieur, ou rester en association plus ou moins étroite avec la paroi. Dans ce dernier cas il se constitue une capsule, ou plus modestement une couche muqueuse ou revêtement pariétal d'aspect tout à fait comparable au "cell coat" des cellules d'organismes supérieurs. Contrairement aux structures rigides et compactes des parois, constituées d'un nombre réduit d'homopolysaccharides à structure linéaire prédominante, les capsules les mieux connues comme celle de *Cryptococcus neoformans*, présentent des polysaccharides avec une grande variété de sucres et de types de liaison (BHATTACHARJEE *et al.*, 1979). Mais une fois encore on note une prédominance de mannose.

D'une manière générale ces formations sont incomplètement révélées par les fixations et colorations conventionnelles. Leur visualisation nécessite des techniques électives utilisant par exemple le rouge de ruthénium ou des lectines. Elles méritent une attention toute particulière, car associées aux parois elles en constituent les couches les plus externes, et conditionnent donc les rapports entre la cellule et son environnement, en particulier dans les processus d'adhérence, de phagocytose, et d'invasion tissulaire.

E) Régénération des parois

L'une des propriétés fondamentales de tout être vivant consiste à réparer les dommages consécutifs à une agression. Chez les levures, cette propriété s'exprime par la capacité à régénérer de nouveaux composants pariétaux à la suite d'altérations ou de destruction de leur paroi. L'extraction totale de cette dernière aboutit à la formation d'un protoplaste, c'est à dire d'une cellule invariablement sphérique, limitée uniquement par son plasmalemme, et donc débarrassée de tout autre composant de l'enveloppe cellulaire. Ce terme s'oppose à celui de sphéroplaste qui désigne une cellule dont la paroi n'est que partiellement extraite. La notion de protoplaste est difficile à apprécier en microscopie électronique à l'échelle d'une population cellulaire. D'une part la dissolution des parois, le plus souvent réalisée par attaque enzymatique (protéases, glucanases, hélicase, chitinase etc...) est rarement uniforme. BASTIDE *et al.*, (1976 a et b), puis MIEGEVILLE *et al.*, (1979) ont d'ailleurs montré que seuls certains points privilégiés de la paroi cellulaire, permettant la sortie des protoplastes, sont lysés. L'observation de coupes ultrafines ne préjugent donc en rien de la cellule entière. D'autre part, les méthodes de la microscopie classique n'objectivent pas, ou mal, certaines structures pariétales. Pour ces différentes raisons, il nous a paru souhaitable d'adopter dans notre étude le terme sphéro-protoplaste pour désigner les cellules à ce stade.

Chez la plupart des levures étudiées, la régénération des protoplastes s'effectue suivant un processus désormais classique :

1 - Mise en place d'une nouvelle paroi :

Ce stade, à l'évidence le plus étudié et le mieux documenté (voir revues de NECAS 1971 et de ARNOLD 1981) nécessite une succession d'évènements faisant intervenir synthèse de précurseurs, leur transport en des sites appropriés, et leur assemblage en composants microfibrillaires ou matriciels. Bien qu'il s'agisse là de phénomènes qui sont loin d'être synchrones à l'intérieur d'une population cellulaire (certaines cellules ne complètent jamais leur paroi, d'autres se lysent)

il est bien établi maintenant que :

- La synthèse de composants pariétaux est un processus qui ne nécessite pas la présence résiduelle de paroi, donc qui peut s'effectuer *de novo*.

- Les premiers composants à apparaître sont de nature microfibrillaire (glucanes et chitine), secondairement recouverts par les composants matriciels (mannanes et protéines).

- Enfin les parois régénérées montrent souvent des différences marquées dans leur composition chimique et dans leur structure par rapport à des cellules intactes (réseau microfibrillaire prédominant, absence de chaînes latérales des glucanes etc...).

2 - Croissance des protoplastes :

L'absence de parois n'affecte pas le cycle cellulaire. Les protoplastes poursuivent leur croissance (augmentation de volume, multiplication des organites cellulaires) tant que les nouveaux composants pariétaux ne sont pas assemblés.

3 - Initiation de la cytokinèse et bourgeonnement :

Ce processus débute dès que la paroi a atteint un stade suffisamment complexe tendant à restituer aux cellules leurs propriétés structurales et fonctionnelles de départ.

Dans l'ensemble, les auteurs ayant étudié ces phénomènes de régénération ont souvent limité leurs investigations à la seule paroi, ou à ses relations avec le plasmalemma. Or il est clair que cette reconstitution des parois ne peut avoir lieu sans remaniements cellulaires profonds, susceptibles de présenter une analogie avec ceux observés dans les conditions normales du développement cellulaire.

V - LES METHODES DE DETECTION DES GLYCOCONJUGUES

La détection des glucides chez des cellules apparentées au règne végétal telles que les levures, ne diffèrent pas en nature de celle des cellules animales. Jusqu'à ces dernières années, la cytochimie n'offrait pas de techniques permettant de révéler des oses ou leurs polymères, mais uniquement de détecter certains de leurs groupements chimiques. L'introduction des lectines, protéines se liant spécifiquement à certains glycanes, a accru les possibilités de localisation des glycoconjugués des microorganismes, d'autant que ces nouvelles techniques peuvent compléter les méthodes sélectives d'extractions chimiques ou enzymatiques.

A) Technique acide périodique-thiocarbohydrazide - protéinate d'argent

Cette technique dérivée du classique PAS, qui donne d'excellents résultats ultrastructuraux, est à la base de la plupart des études cytochimiques portant sur les glycoconjugués animaux et végétaux. Elle dérive de celle de SELIGMAN *et al.*, (1965), mise au point par THIERY (1967), et se déroule en 3 étapes successives.

1) Oxydation par l'acide périodique des fonctions α -glycols (hydroxyles primaires, secondaires et vic-glycols) qui sont transformées en aldéhydes.

2) Les aldéhydes libérés par l'oxydation périodique forment avec la thiocarbohydrazide (TCH) ou la thiosemicarbazide (TSC) des produits insolubles (Thiocarbohydrazones et thiosemicarbazones).

3) Ces derniers sont susceptibles de donner des complexes opaques aux électrons avec l' OsO_4 ou le protéinate d'argent. L'intensité de la réaction obtenue sera fonction de l'accessibilité des groupements vic-glycols ménagée par les différentes liaisons des oses constitutifs des chaînes glycaniques.

Pour démontrer la spécificité de la réaction, 3 types de contrôles sont nécessaires (THIERY et RAMBOURG, 1974) :

- omission de l'oxydation périodique pour la mise en évidence des groupements aldéhydes libres préexistant à l'étape oxydative.

- remplacement de l'acide périodique par le peroxyde d'hydrogène pour éliminer les substances de nature osmiophiles susceptibles d'interférer avec la réaction. Une fixation au glutaraldéhyde seul évite cette situation.

- omission de l'incubation par la TCH pour démasquer d'éventuelles structures argentaffines.

B) Les colorants cationiques

Ce terme englobe un ensemble de réactifs permettant la détection ultrastructurale des groupements anioniques membranaires, qui représentent environ 90 % des charges nettes des surfaces cellulaires. Elles sont essentiellement attribuées aux groupements carboxyles des acides sialiques des mucopolysaccharides acides et des acides aminés dicarboxyliques, aux groupements phosphates des phosphoprotéines, des phospholipides et des phosphoglycoprotéines, et aux groupements sulfates des mucopolysaccharides acides et des sulfoglycolipides. Parmi les nombreuses techniques développées, le rouge de ruthénium (RR), et la ferritine cationisée (FC), sont les colorants cationiques les plus utilisés pour la visualisation de ces charges dans les structures biologiques extra-membranaires, telles que le glycocalyx polysaccharidique des cellules eucaryotes (SCHREVEL, 1972 ; GROS *et al.*, 1980 ; FREHEL *et al.*, 1982 ; FREHEL et RYTER, 1982).

Longtemps utilisé pour colorer les pectines des parois végétales, le rouge de ruthénium (RR) fut introduit en cytochimie par LUFT (1964, 1971). Il s'utilise mélangé aux fixateurs et l'augmentation de contraste qu'il produit serait dû soit à l'association $RR-OsO_4$ (LUFT, 1971 ; BLANQUET, 1976) soit à une liaison RR-groupements carboxyles (YAMADA, 1970).

L'emploi de ferritine cationisée (ferritine enrichie en groupements NH_2 , $pH_i > 8$ au lieu de 4,6 pour la protéine native) fut préconisé

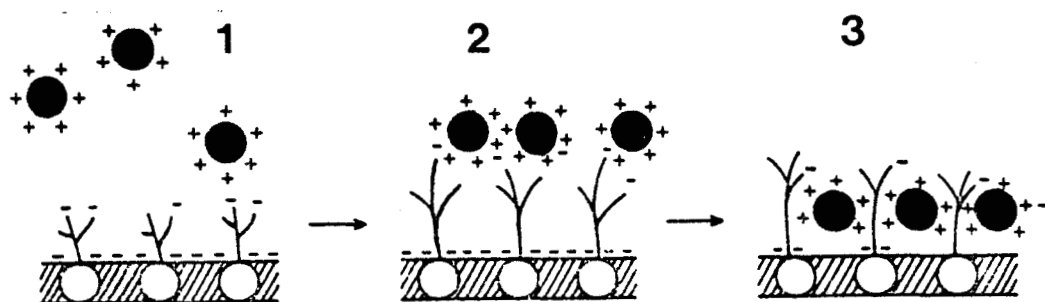


Figure A : Mécanisme d'action de la ferritine cationisée (d'après SKUTELSKY et *al.*, 1977).

par DANON *et al.*, (1972) pour la détection ultrastructurale des sites anioniques membranaires à pH physiologique. L'usage de cette technique a depuis été étendu à la microscopie photonique soit par couplage de la molécule à l'isothiocyanate de fluorescéine (KING et PRESTON, 1977 a) soit en l'utilisant directement pour visualiser les éléments du cytosquelette (microtubules, filaments d'actine) des fibroblastes (BEN-ZE'EV *et al.*, 1981). La ferritine cationisée possède sur les autres colorants cationiques l'avantage de permettre l'observation sur le vivant, et donc de suivre son éventuelle redistribution en aggrégats ou en cape observée en particulier chez les protozoaires (KING et PRESTON, 1977 b). SKUTELSKY *et al.*, (1977), ont tenté d'expliquer le mécanisme d'action de la ferritine cationisée par une interaction de la molécule d'abord avec les sites anioniques superficielles du "cell coat" (fig. A 1 et 2) puis avec les groupements anioniques situés au voisinage de la bicouche lipidique membranaire (fig. A 3).

La relative facilité d'utilisation de ces colorants, associée à la qualité des informations biologiques qu'ils fournissent, expliquent leur emploi courant en cytochimie. Toutefois, un mécanisme d'action encore mal compris, et une spécificité souvent très discutée, font que ces techniques n'apportent que peu de renseignements sur la nature des structures colorées.

Des traitements chimiques et des réactions de précipitation, il ressort que la fixation de ces substances n'apparaît spécifique que des sites poly-anioniques. Leurs molécules porteuses peuvent être toutefois partiellement identifiées par des extractions enzymatiques spécifiques, ou par blocage de certains groupements anioniques (THIERY et OVTRACHT, 1979).

C) Acide phosphotungstique (PTA) à bas pH.

Primitivement introduit par PEASE (1966, 1970) comme colorant des lamelles basales et des bordures en brosse des cellules rénales, cette technique a été largement expérimentée sur de nombreux tissus animaux et végétaux. Elle est le plus souvent réalisée à partir de coupes ultrafines de matériel inclus dans une résine hydrosoluble (GMA)

(RAMBOURG 1967, 1969 ; GROS *et al.*, 1975). ROLAND *et al.*, (1972) en ont développé une variante utilisée avec succès pour le matériel végétal, et consistant en une double fixation glutaraldéhyde- OsO_4 , et inclusion en résine hydrophobe (araldite, épon).

Cette technique peu sélective, dont le mécanisme d'action n'est pas établi, montre généralement une bonne corrélation avec le PAS, en faveur d'une affinité pour les polysaccharides. Les nombreux contrôles cytochimiques ont permis de préciser que le PTA à bas pH réagit avec les fonctions hydroxyles des groupements vic-glycols (MARINOZZI, 1967 ; GROS et CHALLICE, 1975). Cette spécificité a toutefois été mise en doute par de nombreux travaux (SCOTT 1971, 1973 ; SCOTT et GLICK, 1971 ; SOUTO-PADRON et DE SOUZA, 1979) qui démontrent l'intervention des protéines et des groupes cationiques dans la fixation du PTA. Ajoutons enfin que l'emploi de l'acide phosphotungstique s'est révélé fructueux pour la détection des peptidoglycannes des parois bactériennes (ROUSSEAU et HERNIER, 1975 ; FREHEL et RYTER, 1982), et peut donc fournir des renseignements utiles en complément des techniques précédentes.

D) Les lectines

1) Historique et définition

L'intérêt suscité par les lectines, s'est trouvé périodiquement stimulé par des observations contribuant chaque fois à élargir leur champ d'application. Plusieurs générations de travaux sont en effet à l'origine de la faveur dont elles bénéficient de nos jours, et leur connaissance qui atteint aujourd'hui son plein développement, a été jalonnée par plusieurs grandes étapes (COULET, 1979) :

- Mise en évidence en 1888 des propriétés hémagglutinantes par des extraits de la graine de ricin.
- Isolement d'une agglutinine dans les graines du "Jack bean" *Canavalia ensiformis* par SUMNER en 1919, capable de précipiter le glyco-gène en solution.
- Découverte en 1949 par BOYD, de la spécificité de certaines



ABREVIATION ET NOM COURANT	SOURCE	POIDS MOLECULAIRE	NB DE SITES DE FIXATION	NB DE SOUS-UNITES	SUCRES SPECIFIQUES	REFERENCES
CON A CONCANAVALINE A	<i>Canavalia</i> <i>ensiformis</i> (Jack bean)	102.000	4	4	-D-Mannose -D-Glucose -D-Fructose	AGRAWAL and GOLDSTEIN 1968 GOLDSTEIN <i>et al.</i> , 1969 PORETZ et GOLDSTEIN 1970
W G A Wheat Germ Agglutinine	<i>Triticum</i> <i>Vulgare</i>	36.000	4	2	N-acetyl-D Glucosamine Acide N- acetylneuram- inique	NAGATA et BURGER 1972, 1974 BHAVANADAN et KATLIC 1979 MONSIGNY <i>et al.</i> 1980

TABLEAU B

Caractéristiques biologiques de la con A et de la WGA.

lectines (extraites de *Phaseolus limensis*) vis à vis des groupes sanguins A. B. O.

- Mise en évidence par NOWELL en 1960 des propriétés de transformation lymphoblastique de l'agglutinine du haricot *Phaseolus vulgaris*.

- Enfin, quelques années plus tard se placent les résultats de AUB *et al.*, (1963), puis de BURGER et NOONAN (1970) sur la levée de l'inhibition de contact de cellules malignes en culture, en présence de wheat germ agglutinine et de concanavaline A.

Le terme lectine, introduit par BOYD (1954) pour désigner des protéines se liant sélectivement à des polysaccharides, s'est progressivement imposé dans la littérature scientifique (ne parle-t-on pas aujourd'hui de lectinologie, BALDING 1981). Il présente en effet l'avantage de ne pas anticiper sur l'origine de la molécule (contrairement aux phytoagglutinines et phytohémagglutinines), ni sur certaines de ses fonctions *in vivo* (contrairement aux protectines ou aux molécules type anticorps). Des substances aux propriétés analogues ayant été depuis isolées chez la plupart des organismes, des virus aux mammifères, on regroupe désormais les molécules ayant cette capacité de reconnaissance spécifique de sites membranaires (lectines, enzymes, et anticorps) sous le terme "affinitines" (FRANZ et ZISKA, 1981). Les lectines se définissent comme des protéines ou glycoprotéines d'origine non immunitaire, se liant spécifiquement à un sucre, et capables d'agglutiner des cellules et/ou de précipiter les glycoconjugués (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

2) Propriétés et caractéristiques

Si les lectines possèdent de grandes similitudes dans leurs propriétés biologiques (mitogénicité, agglutination, affinité, etc...), elles diffèrent souvent par leurs caractéristiques structurales. Celles ci ont fait l'objet de nombreux ouvrages et articles de synthèse. Citons notamment ceux de SHARON et LIS, 1972, 1975 ; ALLEN *et al.*, 1973 ; LIS et SHARON, 1973 ; NICOLSON, 1974 ; MONSIGNY *et al.*, 1978 ; SIMPSON *et al.*, 1978 ; GOLDSTEIN et HAYES, 1978 ; BOG HANSEN, 1981 ;

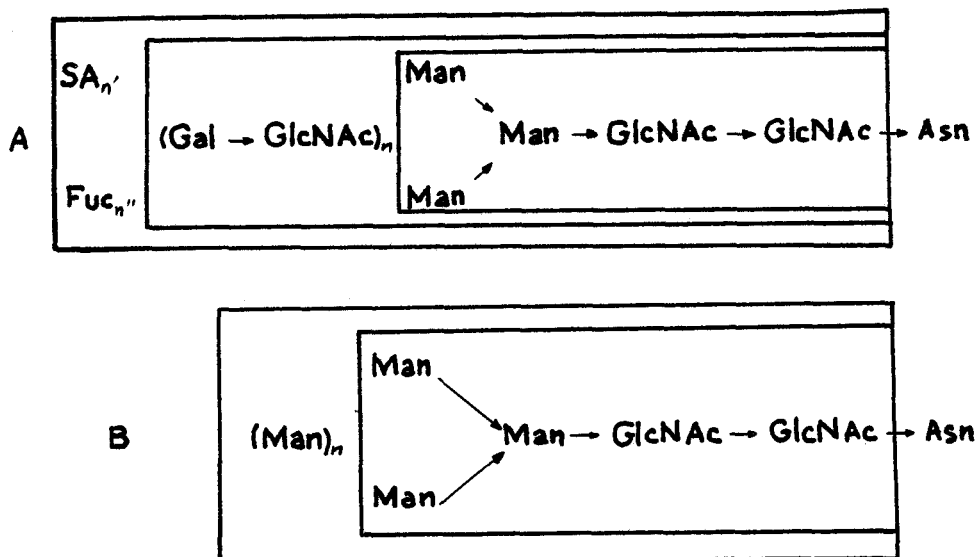


Figure C : Schéma de la structure générale de 2 glycannes de glyco-protéines à liaison N-Glycosylamine
 A) type N-acetyllactosaminique, B) type oligomannosidique (selon MONTREUIL, 1980).

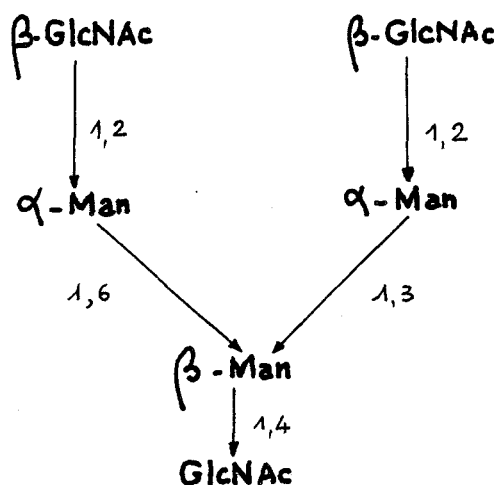


Figure D : Type de structure trimannosidique substituée par 2 résidus N-acetyl- β -glucosaminyl, présentant une grande affinité pour la Con A.

LOEWUS et RYAN, 1981). Nous nous limiterons ici à rappeler les caractéristiques des 2 lectines utilisées dans notre étude, la Con A et la W.G.A. (Tableau B), en insistant sur leur spécificité respective.

Il est maintenant bien établi que des lectines considérées comme "identiques" en terme de spécificité vis-à-vis de monosaccharides, sont en fait capables de reconnaître différentes séquences saccharidiques (communes à de nombreuses glycoprotéines membranaires), à l'intérieur de structures beaucoup plus complexes. A l'aide de glycoprotéines de type N-acetyllactosaminique et oligomannosidique (fig. C) DEBRAY *et al.*, (1981) ont précisé la spécificité de nombreuses lectines par des techniques d'inhibition d'hémagglutination. La Con A présente peu d'affinité pour les mannosides possédant un résidu α -D mannose non réducteur en position terminale, mais une grande affinité pour une structure trimannosidique substituée par 2 résidus N-acetyl- β -glucosaminyl (fig. D) ou par des résidus d' α -mannose en position terminale non réductrice (structure oligomannosidique). Selon KORNFIELD *et al.*, (1975), la partie la plus active d'un glycanne de type N-acetyllactosaminique serait, pour la Con A, le disaccharide N-acetyl- β -D-glucosaminyl (1 $\rightarrow$ 2)- α -D-mannoside.

Quant à la WGA, ses sites de fixations apparaissent complémentaires d'une séquence de 3 résidus β - (1 $\rightarrow$ 4) N-acetyl-glucosamine (GOLDSTEIN *et al.*, 1975 ; MONSIGNY *et al.*, 1978). Cependant, cette lectine peut interagir avec des glyco-asparagines β -Man- (1 $\rightarrow$ 4)- β -GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- β -GlcNAc - (1 $\rightarrow$)-Asn et β -GlcNAc- (1 $\rightarrow$ 4)- β -GlcNAc-(1 $\rightarrow$)-Asn. Plus récemment, il a été démontré que la WGA est capable de reconnaître spécifiquement les résidus terminaux N-acetylneuraminique et N-acetylgalactosamine des glycoprotéines et glycolipides (PETERS *et al.*, 1979). Ces interactions pourraient également impliquer un effet de charges (MONSIGNY *et al.*, 1980).

Dans ces expériences d'inhibition d'agglutination, le sucre le plus inhibiteur pour une lectine donnée ne représente pas nécessairement le véritable site reconnu par cette lectine dans un glycoconjugué. Ceci démontre clairement que les résultats obtenus avec les lectines, quelque soit le domaine d'application, doivent être interprétés avec beaucoup de précautions. Il faut de plus signaler que de nombreuses lectines (la Con A

notamment) possèdent à proximité de leurs sites de fixation des zones hydrophobes qui pourraient être à l'origine d'interactions non spécifiques avec les glycoprotéines et les glycolipides, ou qui renforceraient leurs interactions spécifiques.

3) Applications des lectines en Biologie Cellulaire. Le problème de leur visualisation.

Ces différentes propriétés des lectines (déclenchement de certaines activités cellulaires ; modification du comportement membranaire ; affinité pour les glycoconjugués) ont donné lieu à de multiples applications. Parmi celles-ci, la possibilité d'utiliser les lectines dans la détection et la localisation des glycoconjugués membranaires, explique sans aucun doute leur succès actuel en microscopie photonique ou électronique, depuis qu'il est possible de les visualiser.

A l'exception de quelques tentatives souvent difficiles soit en cryodécapage (BACHI et SCHNEBLI, 1975 ; MAURER et MUHLETHALER, 1981) soit en microscopie électronique à balayage (BRETTON *et al.*, 1973) ou encore en coloration négative (CALAFAT et HAGEMAN, 1972), les lectines natives ne sont pas directement observables. Leur visualisation requiert l'utilisation de composés directement détectables en microscopie photonique ou électronique. Le catalogue des méthodes proposées, actuellement très vaste, fait essentiellement appel à des composés de 2 types, marqueurs enzymatiques ou marqueurs denses aux électrons. La liaison marqueur-lectine peut être effectuée soit par affinité, soit par couplage. Nous rappellerons brièvement ici la liste des techniques les plus communément employées (voir SCHREVEL *et al.*, 1981).

* Méthodes de couplage (méthodes en une étape)

- lectines fluorescentes
- lectines conjuguées à des marqueurs denses
(ferritine, hemocyanine, mercure, or colloïdal)
- lectines conjuguées à des marqueurs enzymatiques
(Péroxydase du Raifort)
- lectines radioactives
- lectines couplées à des microsphères de latex ou

à des virus (utilisées en microscopie électronique à balayage)

* Méthodes d'affinité (méthodes séquentielles ou en deux étapes)

§ Lectines natives révélées par des marqueurs à affinité naturelle ou induite.

- marqueurs enzymatiques (Péroxydase du Raifort, sérum albumine bovine-péroxydase, glucose oxydase).

- marqueurs denses (Hemocyanine, complexes fer-glycane).

- marqueurs à affinité induite (cytomarqueurs glycosylés, ovomucoïde-péroxydase, or colloïdal-mannane, or colloïdal peroxydase, ou ovomucoïde ou encore ciruloplasmine).

- techniques immunologiques (lectine-antilectine).

§ Lectines conjuguées révélées par des marqueurs conjugués (lectines biotinylées et avidine-ferritine).

Parmi ces différentes techniques, les lectines couplées à l'isothiocyanate de fluorescéine (lectines-FTC) et à l'isothiocyanate de tetramethyl-rhodamine (lectines-TRTC), par leur commodité et leur rapidité d'utilisation, constituent un préalable désormais classique à la plupart des études cytochimiques faisant appel aux lectines. Elles ont actuellement la faveur de nombreux laboratoires de recherche, ainsi que les méthodes séquentielles faisant intervenir des marqueurs denses ou enzymatiques, aisément identifiables en microscopie électronique. Parmi ceux-ci, la peroxydase du Raifort constitue le marqueur enzymatique probablement le plus utilisé. C'est une glycoprotéine de poids moléculaire 40.000 (SHANNON *et al.*, 1966) contenant 18 % de glycannes dont 3 résidus pouvant réagir spécifiquement avec la Con A (α -D-glucopyranosyle, α -D-mannopyranosyle et β -D-fructofuranosyle) et un avec la WGA (N-acetyl-glucosamine ; CLARKE et SHANNON, 1976). Cette dernière affinité demeure cependant faible (FRANÇOIS *et al.*, 1972) et fonction des lots de peroxydase (GROS *et al.*, 1977). Seule la Con A réagit efficacement avec la peroxydase. L'enzyme est ensuite révélée selon la technique de

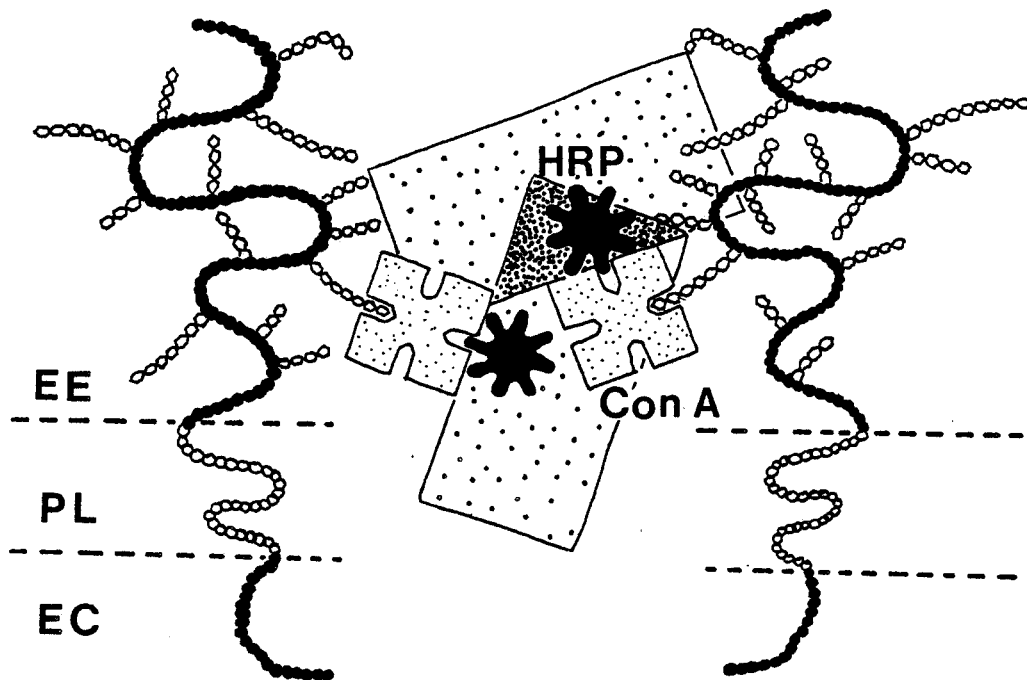
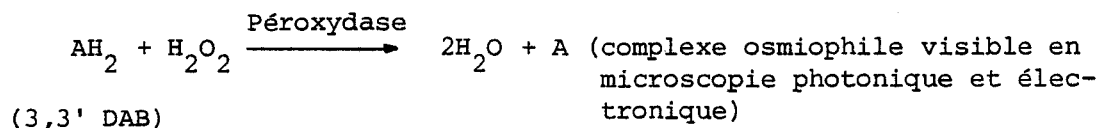


Figure E : Représentation schématique de la fusion des produits d'une réaction enzymatique en une zone plus dense aux électrons, obtenue par plus d'une combinaison lectine marqueur (selon TEMMINK, 1979).

EC, espace cytoplasmique ; EE, espace exo-cytoplasmique ; PL, plasmalemma.

GRAHAM et KARNOVSKI (1966) par la 3,3' diaminobenzidine (DAB) en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction suivante :



Pour permettre la détection de lectines autres que la con A, plusieurs auteurs ont développé des méthodes d'affinité en préparant des molécules de peroxydase substituées soit par des monosaccharides, soit par des glycoprotéines. KIEDA *et al.*, (1977) ont ainsi synthétisé des peroxydases glycosylées à partir des dérivés diazophenyles de monosaccharides (α -D-mannopyranosyl peroxydase ; β -di-N-acetylchitobiosyl peroxydase, etc...) dont la spécificité (MONSIGNY *et al.*, 1976) et les applications cytochimiques (SCHREVEL *et al.*, 1976 ; GROS *et al.*, 1982) ont été démontrées.

Parmi les marqueurs denses les plus employés, la ferritine, est une macromolécule de 12 nm de diamètre contenant plus de 20 % de fer, à poids moléculaire élevé, et rencontrée dans la plupart des tissus de mammifère. Elle est constituée d'une enveloppe protéique (ou apoferritine, P M 440 à 462 000) entourant un noyau ferrique central de 5,5 nm de diamètre, composé de 4 500 à 5 000 atomes de fer (PM 750 à 900 000), responsable de l'opacité aux électrons. Les molécules de ferritine apparaissent donc en microscopie électronique comme des particules denses, d'une taille approximative de 5,5 nm. Plusieurs techniques ont été proposées pour accroître la taille et la densité de ces particules, notamment par l'intermédiaire de ferrocyanure de potassium (PARMLEY *et al.*, 1979) et de sous-nitrate de bismuth (AINSWORTH et KARNOVSKY, 1972). La ferritine n'est capable de se lier à aucune lectine. De la même manière qu'ils ont synthétisé des peroxydases glycosylées, KIEDA *et al.*, (1977) ont préparé diverses molécules de ferritine glycosylées, dont les applications cytochimiques ont été développées par SANDOZ (1978), SCHREVEL *et al.*, (1979).

Associées à des expériences de contrôle rigoureuses, ces diverses techniques de marquage contribuent à une bonne appréciation de la

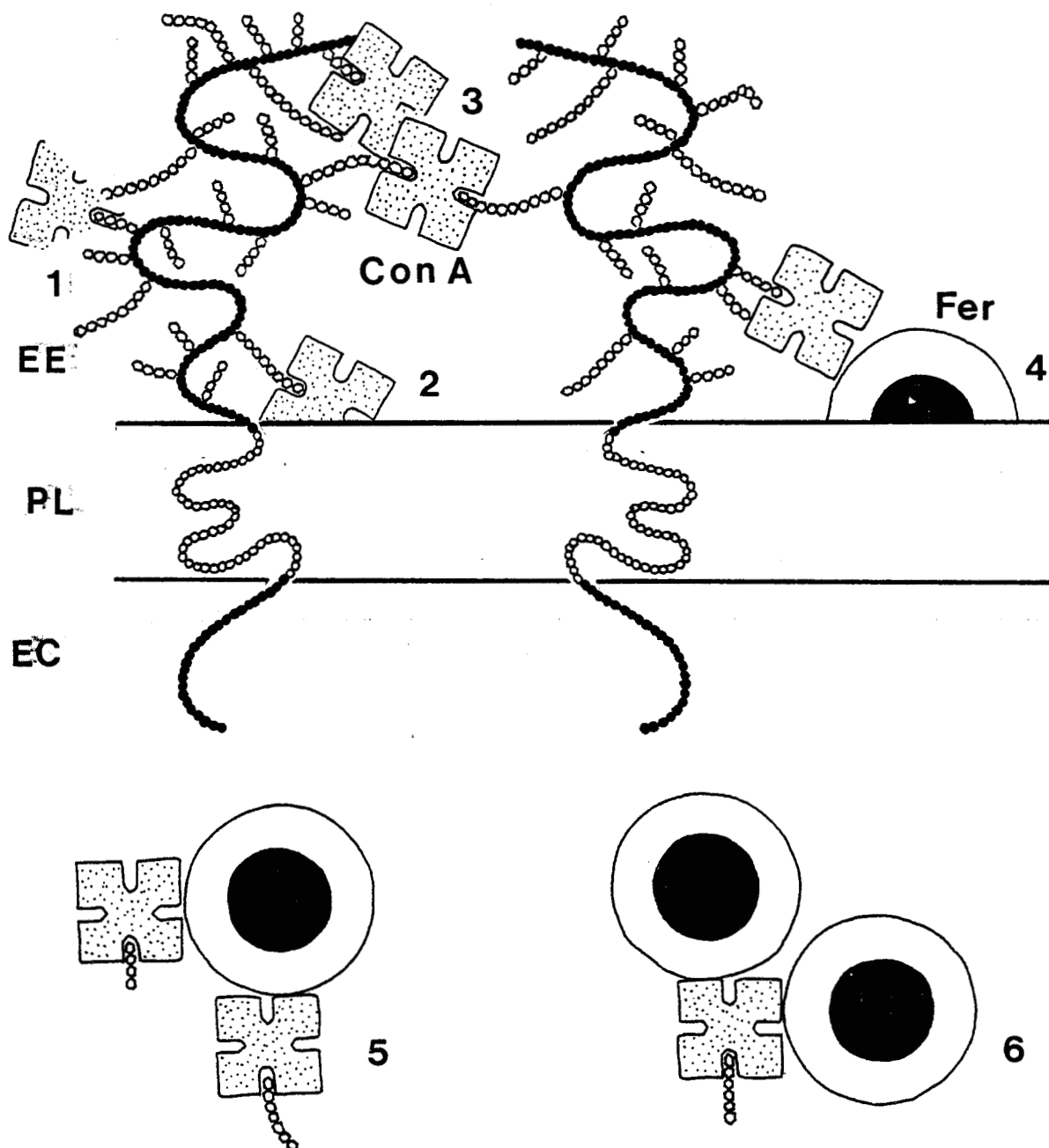


Figure F : Exemples de fausses interprétations quantitatives susceptibles d'intervenir dans la détermination des sites récepteurs des lectines (selon TEMMINK, 1979). Détection incomplète due soit à une interférence entre sites récepteurs (1), entre molécules de lectine (3), ou entre lectine et composants membranaires (2) ; soit à la taille importante du marqueur (4). Autre type de sous-estimation (5), lorsque plusieurs molécules de lectines sont fixées à une seule molécule de marqueur. Inversement, exemple de surestimation due à la fixation de plusieurs molécules de marqueurs sur une même molécule de lectine (6). Même légende que la fig. E.

distribution des sites récepteurs des lectines, principalement sur le plan qualitatif. L'utilisation de marqueurs enzymatiques, tels que la peroxydase, exclut en effet partiellement une détermination précise de la distribution des sites récepteurs, essentiellement à cause de la diffusion des produits de réaction ; les combinaisons lectine-marqueur se traduisent dans ce cas par des plages de différentes densités aux électrons (fig. E). En revanche, l'appréciation quantitative est théoriquement possible avec des marqueurs particuliers tels que la ferritine. Ce type d'informations se heurte toutefois à un certain nombre de facteurs limitants pouvant conduire soit à une sous-estimation (figs F 1 à 5), soit à une surestimation (fig. F 6) du nombre réel de sites récepteurs (TEMMINK, 1979). Compte tenu de ces obstacles, l'estimation du nombre de sites récepteurs d'une lectine (information "semi-quantitative" selon SCHREVEL *et al.*, 1981), n'a qu'une valeur limitée. Elle demeure très utile toutefois pour comparer par exemple l'effet de différents fixateurs (RENAU-PIQUERAS, 1981), ou de diverses concentrations lectines-marqueurs (HIXSON *et al.*, 1979) sur la distribution topographique de sites récepteurs membranaires :

L'un des facteurs limitants les plus importants qui s'oppose à la détection des glycoconjugués des surfaces cellulaires, mais avec plus d'acuité encore pour les parois de microorganismes, c'est la mauvaise pénétration des marqueurs, généralement de grande taille. Ce phénomène se rencontre surtout avec les techniques réalisées sur cellules entières ou encore sur "blocs" de tissus. Pour tenter d'identifier des sites intracellulaires ou intrapariétaux, divers auteurs ont mis au point des techniques de détection des lectines sur coupes ultrafines (techniques sur "coupes") par l'intermédiaire de peroxydase (GROS *et al.*, 1977) d'or colloïdal (HORISBERGER et VONLANTHEN, 1977) ou de ferritine (NIR, 1978 ; OHTSUKI *et al.*, 1978 ; SANDOZ, 1978 ; VIAN, 1981). D'autres auteurs (BRETTON et BARIETY, 1976 ; GUILLOUZO et FELDMANN, 1977) ont introduit une technique intermédiaire consistant à faire agir les lectines et leurs cytomarqueurs sur des coupes épaisses à congélation (10 à 50 μm). L'application d'une technique de ce type, associée à des digestions enzymatiques ménagées des parois, nous a permis de résoudre en partie les difficultés liées à la mauvaise pénétration des marqueurs chez les levures, tout en assurant une bonne préservation des structures cellulaires.

MATERIELS ET METHODES

I - SOUCHES UTILISEES

2 souches de *Candida albicans* ont été étudiées :

- une souche de référence entretenue au laboratoire depuis 1965 : la souche labo 405 (ou souche L)
- une souche isolée de candidose rénale (souche vw) et à partir de laquelle ont été préparés de nombreux clones, dont le clone [32] entretenu depuis 1979 au laboratoire, et utilisé dans cette étude parallèlement à la souche L.

II - CONDITIONS DE CULTURE ET D'ENTRETIEN DES SOUCHES

Les souches sont entretenues par repiquage bimensuel sur milieu de Sabouraud solide de composition : glucose, 20 g ; gélose, 20 g ; peptone, 10 g ; H₂O distillée, 1 000 ml ; elles sont mises en culture 24 heures à 37° C, puis maintenues à 4° C.

III - OBTENTION DES DIVERSES FORMES CULTURALES

A) BLASTOSPORES ET PSEUDOMYCELIUM

Les cellules sont recueillies après 24 heures de culture à 37° C. Dans ces conditions les 2 souches étudiées produisent une très grande majorité de blastospores (isolées ou en bourgeonnement) et quelques éléments pseudomycéliens.

B) TUBES GERMINATIFS

La transformation levure - mycelium s'obtient en incubant 3 heures à 37° C une suspension de levures âgées de 24 heures dans du sérum frais (généralement du sérum de cheval) ou dans un milieu synthétique tel que le milieu 199 (LANDAU et al., 1965).

Dans ces conditions, la majorité des blastospores émet un filament fin, flexueux, sans constriction à la base : il s'agit de tubes

germinatifs ou encore formes de blastèse.

IV - DIGESTION ENZYMATIQUE MENAGEE DES PAROIS

Les blastospores sont traitées pendant 60 min. à 37° C par un mélange de pronase (MERCK), 250 µg/ml et de 2 - mercaptoéthanol 0,2 M, dans un tampon tris HCL 0,05 M, pH 7,4. (CASSONE et *al.*, 1978).

V - OBTENTION DES SPHERO-PROTOPLASTES

Après traitement par la pronase et le 2 - mercaptoéthanol dans les conditions précédentes, les levures sont soumises à l'action de la chitinase (CALBIOCHEM - BEHRING) 1 mg/ml en tampon phosphate pH 6,8, pendant 4 heures à 30° C.

VI - REGENERATION DES SPHERO-PROTOPLASTES

De manière à faciliter la récupération des levures après digestion enzymatique de leurs parois, la régénération est réalisée en milieu de culture liquide : il s'agit du milieu de Sabouraud liquide normal (glucose, 20 g ; peptone, 10 g ; H₂O distillée, 1 000 ml) ou appauvri en glucose (1 g/l).

VII - TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

Ces techniques ont été appliquées à des cellules intactes, ou ayant subi différents traitements (digestions enzymatiques, régénération, ...).

A) MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Les blastospores entières ou coupées au cryostat, préalablement lavées et mises en suspension dans l'H₂O distillée, sont déposées dans les alvéoles de lames à fluorescence (Biomérieux). Ces lames, après séchage, sont recouvertes par une solution à 250 µg/ml de lectine (Industrie biologique française, I.B.F.) marquée par l'isothiocyanate de fluoresceine (Con A - FTC, WGA-FTC) dans un tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,4. Nous avons également employé la ferritine cationisée

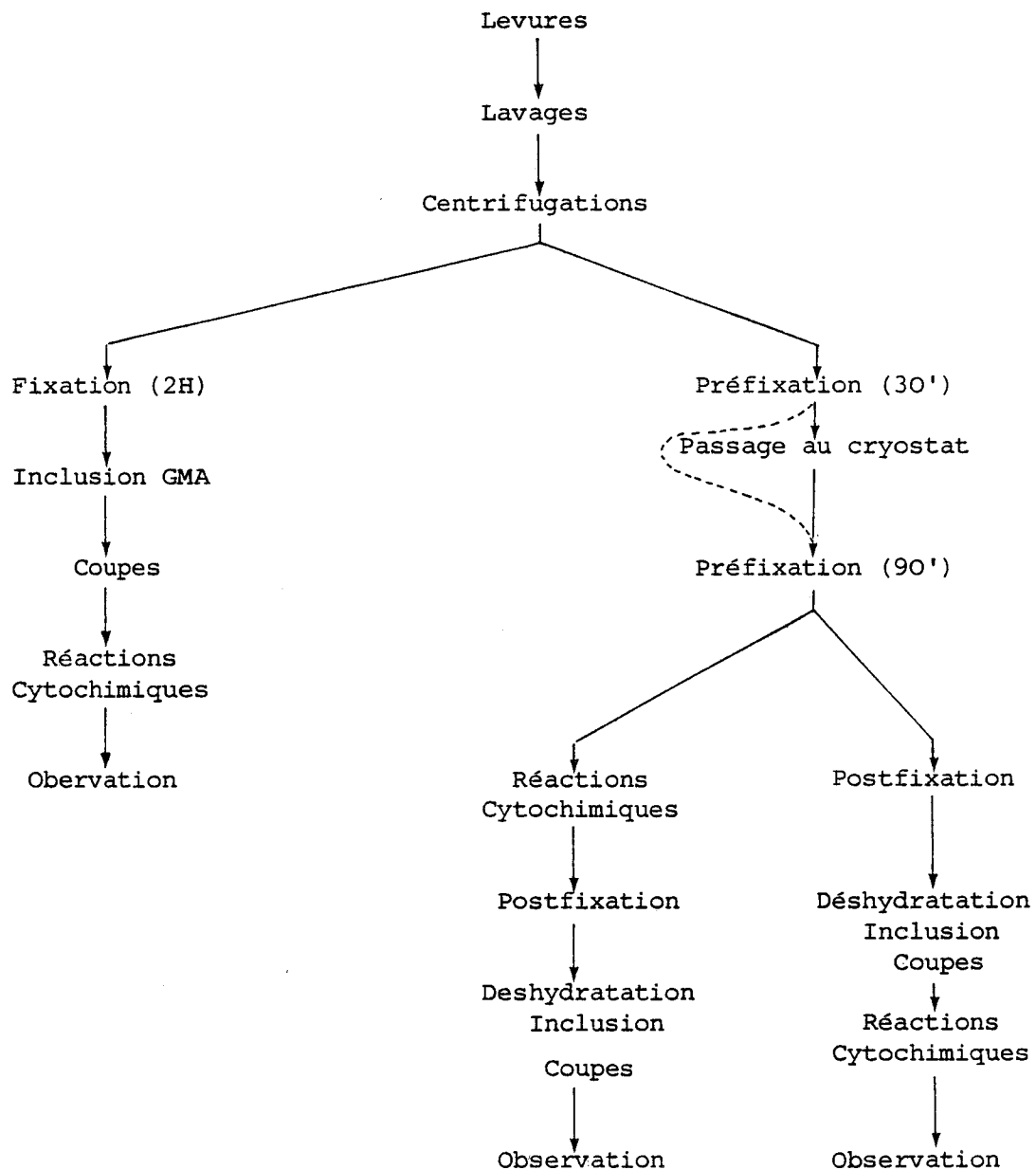


FIGURE A : Différentes étapes de préparation des levures pour l'observation en microscopie électronique.

fluorescente, (100 µg/ml) préparée à partir de ferritine cationisée native (MILES) et d'isothiocyanate de fluoresceine (I.B.F.), selon la méthode de KING et PRESTON (1977). Après 30 min. d'incubation, les lames sont rincées soigneusement (3 fois 10 min.) dans la solution tampon. Des préparations contrôles sont réalisées pour les lectines avec l' α - méthyl - D - mannopyranoside 0,2M, et la N - acetyl - D - glucosamine 0,5 M.

Les observations sont effectuées sur microscope Leitz orthoplan muni d'un dispositif d'épifluorescence, et enregistrées sur film Kodak Tri - x - pan 400 ASA.

B) MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (figure A)

a) Utilisation des lectines

1) Sur cellules entières ou préalablement coupées à congélation

Les cellules recueillies sont lavées 3 fois dans l' H_2O distillée, puis fixées par le glutaraldéhyde 5 % dans du tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,4, à 4° C. Cette fixation est soit poursuivie pendant deux heures, soit interrompue au bout de 30 min. Dans ce dernier cas, le matériel est rapidement congelé sur la table du cryostat, et sectionné à l'épaisseur de 5 - 7 µm. Les coupes ainsi réalisées sont fixées à nouveau pendant 1 h 30 min. par le glutaraldéhyde 5 %.

Les pièces sont alors traitées pendant 1 heure avec de la Con A ou de la WGA (I.B.F.) à des concentrations de 50 ou 100 µg/ml dans du tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,4 contenant 1 millimole de $MgCl_2$, $MnCl_2$ et $CaCl_2$, et lavées 3 fois 30 min. dans ce tampon. Puis elles sont incubées pendant 1 heure soit avec la peroxydase du Raifort (Sigma, type II) ou le mannosyl ferritine (I.B.F.) pour la Con A, soit avec le chitobiosyl ferritine ou le chitobiosyl peroxydase (I.B.F.) pour la WGA, à des concentrations de 50 ou 100 µg/ml dans le même tampon. Après lavage, le matériel traité par les solutions de ferritine glycosylée est directement postfixé 30 min. par le tétroxyde d'osmium 1 % en tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,4, deshydraté à l'alcool, et inclus dans le milieu de SPURR (1969).

La peroxydase est révélée selon GRAHAM et KARNOVSKY (1966) par un mélange de 3 - 3' diaminobenzidine - 4 HCL (DAB), (SERVA), à la concentration de 50 µg/ml dans un tampon tris HCL 0,2 M pH 7,4, et d'H₂O₂ 0,01 %, pendant 15 min. Les échantillons ainsi traités sont lavés et postfixés comme précédemment. Toutes ces opérations sont réalisées sous agitation constante.

Pour vérifier la spécificité de la réaction, 3 types d'expériences de contrôle sont effectuées :

- Incubation avec la lectine en présence d'un inhibiteur, 1'α - methyl - D - mannopyranoside 0,2 M pour la Con A et la N-Acetyl - D - glucosamine 0,5 M pour la WGA.

- Omission de l'incubation avec la lectine

- Incubation uniquement avec le mélange 3 - 3' DAB - H₂O₂.

Les coupes effectuées sur un ultramicrotome "Porter Blum MT1" sont examinées sans coloration, ou simplement contrastées 2 min. à l'acétate d'uranyle. Les échantillons traités par la peroxydase peuvent, préalablement à l'inclusion, être examinés en microscopie photonique.

2) Sur sections ultrafines de glycol methacrylate

Cette technique de détection des sites récepteurs aux lectines a été mise au point par GROS et al., (1977). Les cellules sont fixées par le glutaraldehyde 5 % dans un tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,4 pendant 2 heures à 4° C, lavées 1 nuit dans le même tampon, puis incluses dans une résine hydrosoluble, le glycol méthacrylate (G.M.A.) (LEDUC et BERNHARD, 1967). Les sections ultrafines sont recueillies dans des anneaux de plastic et mises à flotter sur les différents milieux d'incubation précédemment cités, sous agitation permanente. Des lavages d'une nuit à 24 heures sur l'eau bidistillée sépare chaque traitement. Les coupes sont examinées sans être contrastées, ou après coloration 2 min. par l'acétate d'uranyle.

b) Technique à l'acide périodique - Thiocarbohydrazide - protéinate d'argent (Technique de THIERY, 1967).

Les sections ultrafines de blastospores réalisées soit après fixation au glutaraldéhyde 5 % et inclusion dans le GMA, soit après double fixation (glutaraldéhyde 5 % - OsO_4 1 %), et inclusion dans le mélange de SPURR, sont recueillies sur grilles en or, et traitées selon la technique décrite par THIERY (1967) avec des temps de passage de 1 ou 24 heures dans le thiocarbohydrazide. Les expériences de contrôle suivantes ont été réalisées :

- Omission de l'acide périodique
- Absence de passage sur le thiocarbohydrazide
- Remplacement de l'acide périodique par de l'eau oxygénée à 10 % pendant 30 min.

Cette technique a également été appliquée à des sections ultrafines de blastospores préalablement traitées par la méthode Con A-péroxydase.

c) Technique à l'acide phosphotungstique à bas pH (technique au PTA).

Cette technique est réalisée sur du matériel fixé au glutaraldéhyde seul et inclus dans le GMA. Les coupes recueillies sur des grilles en or sont contrastées 10 min. par une solution à 1 % d'acide phosphotungstique dans l'acide chlorydrique 1 N (RAMBOURG, 1967), puis rincées rapidement dans l'eau distillée. La spécificité de la réaction est vérifiée par digestion enzymatique avec la trypsine (SIGMA) à 1 % dans un tampon tris-maléate 0,05, pH 8, pendant 4 heures à 37°C, puis coloration par l'acide phosphotungstique.

d) Utilisation de colorants cationiques

La préparation commercial de rouge de ruthénium (FLUKA) est ajoutée aux fixateurs, glutaraldéhyde et tetroxyde d'osmium, à une concentration de 0,5 % (LUFT 1971).

La ferritine cationisée est utilisée sur des cellules préalablement fixées par le glutaraldehyde, à raison de 1 mg/ml en tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,4 (BENCHIMOL et *al.*, 1979). Après lavage dans le tampon, le matériel est postfixé 30 min. par le tetroxyde d'osmium 1 %.

e) Recherche de l'activité phosphatasique acide

Les cellules préalablement coupées au cryostat et fixées par le glutaraldéhyde (comme indiqué précédemment) sont lavées une nuit en tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,4 additionné de 7,5 % de sucrose. Pour la localisation de l'activité phosphatasique acide, l'incubation est réalisée dans le milieu au plomb de GOMORI (1952) modifié par MILLER et PALADE (1964), utilisant le Na - β - Glycérophosphate à pH 5 comme substrat, pendant 30 min. à 37° C. Les pièces sont ensuite lavées dans un tampon acétate 0,05 M contenant 4 % de formaldéhyde et 7,5 % de sucrose pendant une nuit, puis postfixées 30 mn. à l' O_sO_4 1 %. Deux types de témoins ont été réalisés :

- Incubation des pièces dans un milieu dépourvu de substrat.
- Incubation dans un milieu additionné d'un inhibiteur, le fluorure de Na 1 %, à raison de 1 ml pour 25 ml de milieu d'incubation.

Les coupes sont examinées sans être contrastées.

f) Etude ultrastructurale

Pour l'examen morphologique, les cellules coupées ou non au cryostat, sont fixées avec le glutaraldehyde 5 % dans du tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,4 pendant 2 heures à 4° C, et postfixées à l' O_sO_4 1 %, ou au permanganate de potassium 2 % pendant 30 mn. Les coupes sont examinées non contrastées ou colorées par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique, et par le citrate de plomb selon REYNOLDS (1963).

Toutes les observations ont été réalisées au microscope électronique "SOPELEM 75" ou "HITACHI HU 11 E".

VIII - ANALYSE STATISTIQUE

Pour déterminer l'épaisseur moyenne de l'enveloppe cellulaire et la distribution de l'activité phosphatasique acide, 2 blocs choisis au hasard sont sectionnés en coupes d'épaisseur équivalente. A partir de chaque bloc, 5 grilles sont constituées. Les comptages sont effectués sur 2 coupes sélectionnées par grille et à raison de 20 blastospores par coupes. Les résultats exprimés par leur valeur moyenne et sa déviation standard ($\bar{X} \pm SD$) sont comparés par le test T de Student Fischer.

L'estimation quantitative des particules de ferritine a été réalisée à partir de micrographies de blastospores entières (10 micrographies par série) et sur des sections longitudinales de paroi (5 par cellule). Les résultats sont exprimés par le nombre moyen de particules de ferritine/ μm , et sa dérivation standard.

IX - ADHERENCE AUX CELLULES EPITHELIALES

A) PRELEVEMENT

Les cellules de l'épithélium buccal sont collectées par léger raclage de l'intérieur des joues à l'aide d'un écouvillon stérile. Elles sont mises en suspension et lavées 3 fois dans du PBS pH 7,2.

Pour tester l'adhérence des levures à l'épithélium intestinal, 2 types d'essai ont été réalisés :

- soit en utilisant un fragment d'intestin (≈ 2 cm de longueur) prélevé dans la portion proximale du jéjunum, ouvert longitudinalement, lavé en PBS, et enroulé de telle manière que les villosités soient dirigées vers l'extérieur, selon la technique de REILLY et KIRSNER (1965). La portion intestinale ainsi préparée est fixée 1 heure au formol neutre 1 %, puis lavée, avant d'être incubée avec les levures.

- soit en utilisant des entérocytes isolés obtenus selon la méthode d'IZHAR et al., (1982). Un fragment d'intestin prélevé dans la même région qui précédemment est attaché à ses extrémités puis rempli d'une solution de PBS 0,05 M pH 7,2 contenant 27 m M de citrate

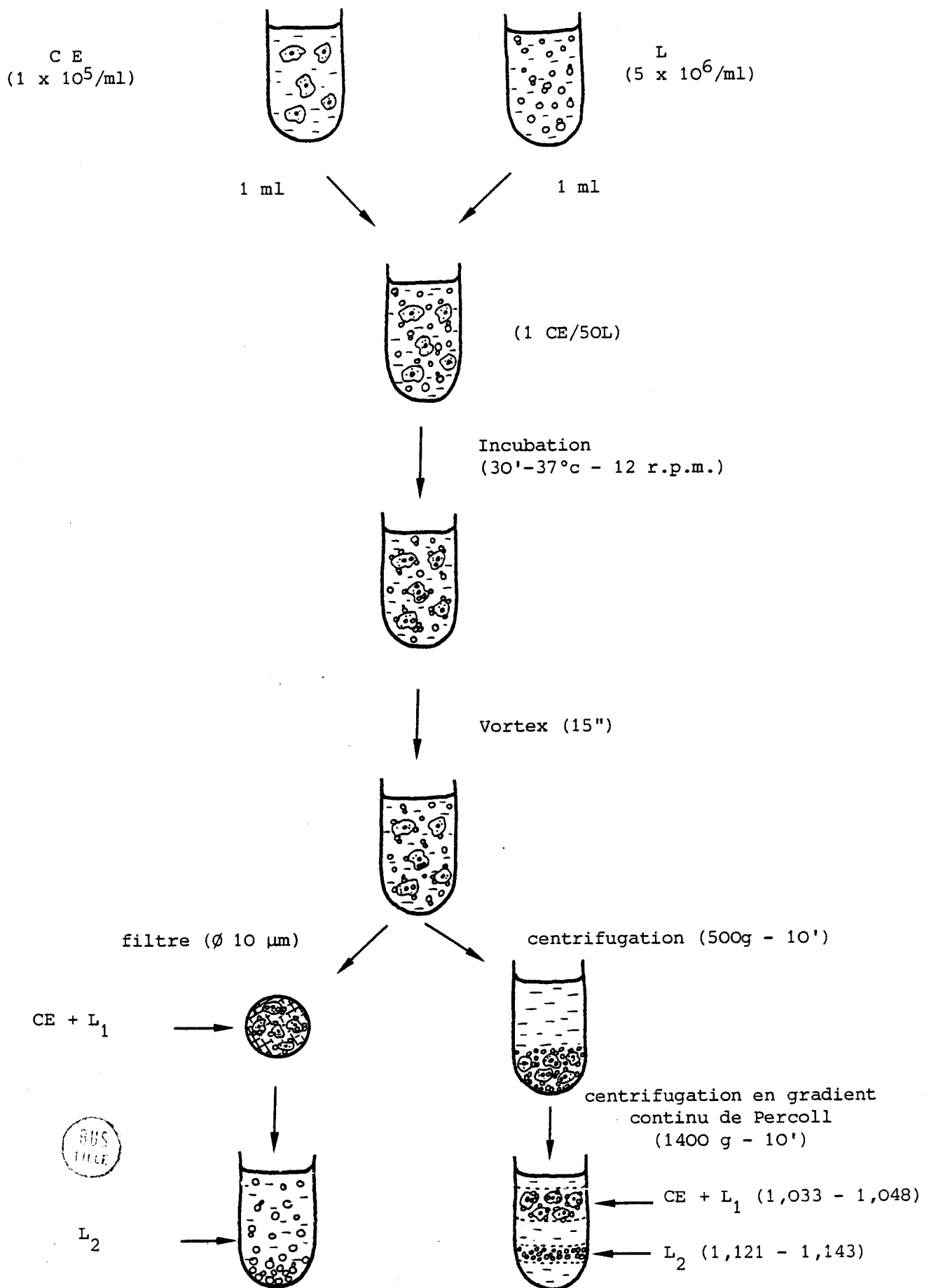


Figure B : Protocole expérimental d'adhérence. CE, cellules épithéliales ;
 L, levures ; L_1 , levures adhérentes ; L_2 , levures non-adhérentes.

de sodium. Il est incubé ainsi 15 min. à 37° C. Il est ensuite ouvert longitudinalement puis incubé à nouveau 30 min. à 37° C (sous agitation rotative à raison de 12 rotations/mn.) dans du PBS 0,1 M pH 7,2 contenant 1,5 m M d'EDTA et 0,5 m M de dithiothreitol. La suspension de cellules épithéliales est centrifugée (10 min. à 500 g) puis lavée en PBS, et fixée au formol 1 % pendant 1 heure pour stopper toute réaction enzymatique (GIRARDEAU, 1980).

B) PROTOCOLE D'ADHERENCE (Figure B)

Toutes les manipulations ont lieu en PBS 0,1 M pH 7,2. 1 ml d'une suspension de cellules épithéliales à la concentration de 1×10^5 /ml et 1 ml d'une suspension de levures à 5×10^6 /ml (1 cellule épithéliale/50 levures) sont incubés 30 min. à 37° C en agitation (12 rotations/min.).

Après passage rapide au vortex (≈ 15 sec.) pour détacher les levures peu adhérentes, les cellules épithéliales sont collectées :

- soit sur des membranes filtrantes polycarbonate (NUCLEOPORE - diamètre des pores 10 μ m), lavées avec 50 ml de PBS pour éliminer les levures non adhérentes.

- soit par centrifugation (1400 g pendant 10 min.) en gradient continu 1,015 - 1,160 de percoll. Les cellules épithéliales sont récupérées à l'interface 1,033 - 1,048, alors que les levures non adhérentes se rassemblent à l'interface 1,121 - 1,143.

C) OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

Après lavages, les 2 fractions (cellules épithéliales + levures isolées) sont préparées pour la microscopie électronique à transmission, et pour la microscopie de fluorescence, comme indiqué au paragraphe VIII B.

Pour la microscopie électronique à balayage, les échantillons sont fixés au glutaraldehyde 5 % en tampon cacodylate de Na 0,1 M pH 7,4 1 heure à 4° C, lavés à l'eau distillée, puis lyophilisés. Après métallisation, ils sont observés au microscope à balayage MINI-SEM, MSM-2 (ISI).

Les observations en microscopie photonique sont réalisées après fixation des échantillons au formol neutre 10 % pendant 1 heure, inclusion en paraffine, réalisation de coupes à l'épaisseur de 6 μm et coloration au PAS - bleu de toluidine.

CHAPITRE I

LOCALISATION DE COMPOSANTS PARIETAUX

I - INTRODUCTION

La composition chimique des parois de *Candida albicans* ne diffère pas en nature de celle des autres levures. Bien que souvent contradictoires sur le plan quantitatif, les données de la littérature s'accordent pour y mentionner la présence de lipides, de protéines, et surtout de polysaccharides (chitine, glucanes et mannanes) principaux composants pariétaux à bénéficier des développements récents de la cytochimie ultrastructurale. Leur abondance dans les parois facilite par ailleurs la mise en oeuvre de techniques de détection.

La synthèse des travaux réalisés dans les domaines ultrastructuraux et cytochimiques (CASSONE *et al.*, 1973, 1978, 1979 ; PARTRIDGE et DREWE, 1974 ; POULAIN *et al.*, 1978, 1981) et biochimiques (CHATTAWAY *et al.*, 1968, 1976 ; DOMANSKI et MILLER, 1968 ; GRIMMECKE et REUTER, 1980, a, b,) révèle, au sein d'une organisation générale typique des parois fongiques (FARKAS, 1979), une hétérogénéité de l'architecture pariétale qui témoigne d'une évolution permanente de ces structures.

La paroi de *Candida albicans* fut d'abord décrite comme constituée d'une zone externe amorphe, dense aux électrons, et d'une zone interne plus claire, de nature microfibrillaire. Les études ultérieures de DJACZENKO et CASSONE (1971) puis de POULAIN *et al.*, (1978), en y décrivant un arrangement concentrique successivement de 5, puis de 8 couches, devaient démontrer l'existence d'une stratification pariétale beaucoup plus complexe et variable que celle initialement décrite. Dans la mesure où ces deux aspects fondamentaux de la biologie des parois (complexité et variabilité), témoignent de la capacité d'adaptation des levures à leur environnement, il nous est apparu opportun de les aborder, en utilisant des techniques plus sélectives.

Parmi les méthodologies proposées, l'utilisation des lectines conduit actuellement à une grande précision dans la localisation de certains résidus polysaccharidiques des surfaces et des parois cellulaires (SHARON et LIS, 1972). Ainsi la concanavaline A, dont l'emploi en cytochimie ultrastructurale fut proposé dès 1971 par BERNHARD et AVRAMEAS, révèle préférentiellement les mannanes chez les levures (TKACZ *et al.*, 1971 ; CASSONE *et al.*, 1978). De même la wheat germ agglutinine, permet

la détection de la chitine des parois fongiques (MOLANO *et al.*, 1980).

Plusieurs auteurs ont décrits des techniques tendant à accroître l'efficacité de ces réactions. Quelques publications font état notamment de méthodes permettant la visualisation des lectines sur coupes de tissus par divers marqueurs tels que l'or colloïdal (HORISBERGER et VONLANTHEN, 1977 ; HORISBERGER *et al.*, 1978 a et b) la peroxydase (GROS *et al.*, 1977) ou la ferritine (NIR, 1978 ; SANDOZ, 1978).

Ainsi, GROS *et al.*, (1977) décrivent une méthode permettant d'étudier en microscopie électronique la distribution intracellulaire des sites récepteurs aux lectines, sur différents tissus de mammifères, sporozoaires et bactéries, inclus dans une résine hydrosoluble, le glycol méthacrylate. L'intérêt des coupes à congélation dans l'utilisation des lectines a par ailleurs été rapporté (BRETTON et BARIETY, 1976 ; GUILLOUZO et FELDMANN, 1977). Enfin, MONSIGNY *et al.*, (1976) et SCHREVEL *et al.*, (1976, 1979) ont développé une méthode séquentielle permettant de révéler les lectines grâce à des marqueurs substitués par un sucre (marqueurs glycosylés).

Dans ce chapitre, nous rapportons les informations obtenues par l'application de ces différentes techniques à la paroi de *Candida albicans*, en association avec des digestions enzymatiques et la coloration de Thiery. Ces résultats ont fait l'objet des publications suivantes :

TRONCHIN, G., POULAIN D. and BIGUET J., 1979. Etudes cytochimiques et ultrastructurales de la paroi de *Candida albicans*. I. Localisation des mannanes par utilisation de Concanavaline A sur coupes ultrafines. Arch. Microbiol., 123, 245-249.

TRONCHIN G., POULAIN D., HERBAUT J. and BIGUET J., 1981. Localization of chitin in the cell wall of *Candida albicans* by means of wheat germ agglutinin. Fluorescence and ultrastructural studies. Eur. J. Cell. Biol., 26, 121-128.

TRONCHIN G., POULAIN D., HERBAUT J. and BIGUET J., 1981. Cytochemical and ultrastructural studies of *Candida albicans*. II. Evidence for a cell wall coat using Concanavalin A. J. Ultr. Res., 75, 50-59.

II - RESULTATS

A) LOCALISATION DES MANNANES

Ce sont les constituants polysaccharidiques majeurs de la paroi de *Candida albicans* (YU *et al.*, 1967 a et b ; DOMANSKI et MILLER, 1968 ; CHATTAWAY *et al.*, 1976), ils s'y présentent principalement sous la configuration α D, α -(1 $\rightarrow$ 2) et α -(1 $\rightarrow$ 6).

a) Localisation sur coupes ultrafines

Les observations ultrastructurales témoignent d'une préservation convenable de la morphologie générale des blastospores, et révèlent la présence des principaux organites cytoplasmiques déjà décrits. La double coloration (fig. 6) et la technique acide périodique - thiocarbohydrazide - protéinate d'argent (fig. 7) attestent de l'intégrité de la stratification pariétale. Les dépôts d'argent se localisent principalement à la périphérie de la paroi en une couche dense et épaisse. Le plasmalemme apparaît également souligné d'un fin liseré.

Les sections ultrafines soumises à l'action de la Concanavaline A et de la peroxydase montrent 2 couches pariétales périphériques opaques aux électrons (fig. 8). Ces lames sont constamment individualisées et le plus souvent nettement séparées par une zone claire (fig. 9). Quant aux couches pariétales internes, elles ne réagissent pas ou très faiblement, tandis qu'un dépôt cytoplasmique intense masque la plupart des organites cellulaires. Les réactions pariétales ne sont pas observées sur les coupes soumises aux traitements de contrôle, alors que des précipités non spécifiques ou une coloration de fond insuffisamment éliminée lors des différents lavages, demeurent dans le cytoplasme (fig. 10).

Après traitement des coupes par la concanavaline A et le mannosyl ferritine, l'ensemble de la paroi des blastospores réagit positivement. Toutefois, la réaction est plus intense dans les zones pariétales denses aux électrons, qu'il s'agisse des couches périphériques, ou de certaines portions intrapariétales (figs. 11 et 13) dont la présence inconstante et la disposition irrégulière sont confirmées par les méthodes de coloration usuelles (fig. 14). Les zones internes de l'enveloppe cellulaire (plasmalemme et espace périplasmique) sont également fortement marquées (fig. 13).

L'existence de zones de nature ou d'organisation différentes est soulignée beaucoup plus nettement au niveau des parois de tubes germinatifs. Seules les couches superficielles y font l'objet d'un marquage, alors que les zones internes ne réagissent pas (fig. 15). Aucune réaction n'est détectée dans les expériences de contrôle en présence d'inhibiteur de la lectine (fig. 12).

b) Localisation sur cellules entières ou préalablement coupées à congélation :

1 - Microscopie photonique :

Avec la concanavoline A - FTC, une fluorescence homogène très intense est observée à la périphérie des blastospores (figs 16 et 20) et des tubes germinatifs (fig. 22). Toutefois, lorsque les éléments cellulaires ainsi traités sont remis en suspension dans un milieu de développement approprié (Sabouraud liquide pour les blastospores et milieu 199 pour les tubes germinatifs, à une température de 37° c), aucune des structures pariétales des blastospores filles issues du bourgeonnement, (figs. 20 et 21), ou des tubes germinatifs provenant de la blastèse, (figs. 22 et 23), ne font l'objet d'un marquage.

Un dépôt brunâtre recouvre la surface des cellules traitées par la concanavoline A et la peroxydase (fig. 17). Ce marquage, bien que plus discret, s'étend également à la paroi des tubes germinatifs dont l'apex est fortement réactif (fig. 18). Dans les deux cas, les réactions sont totalement inhibées en présence de méthyl α -D mannopyranoside 0,2 M (fig. 19).

2 - Microscopie électronique : mise en évidence d'un revêtement pariétal.

α . Par la Concanavoline A

Sur les blastospores préalablement coupées à congélation et traitées par la méthode Con A - peroxydase, les précipités denses aux électrons forment un dépôt intense et irrégulier autour de la paroi, dont la limite externe clairement définie fait également l'objet d'un marquage (figs. 24 et 25). Le revêtement pariétal ainsi individualisé est particulièrement contrasté en périphérie, alors que la réaction

apparaît plus diffuse vers l'intérieur (fig. 25). Un marquage analogue à celui des blastospores peut être observé au niveau des tubes germinatifs (fig. 27). Enfin, le plasmalemma apparaît soulignée par places de précipités irréguliers (fig. 26).

D'une manière générale, ni les colorations classiques acétate d'uranyle - citrate de plomb (fig. 41), ni la technique acide périodique - thiocarbohydrazide - protéinate d'argent (figs. 29 et 30) qui contrastent intensément la surface de la paroi, ne permettent la mise en évidence des structures pariétales superficielles. Toutefois, cette dernière technique appliquée à des cellules incluses dans le milieu de SPURR (fig. 32) ou dans le GMA (fig. 31), révèle occasionnellement l'existence d'une bande de matériel faiblement contrasté autour de la paroi. L'utilisation combinée de cette technique et de la méthode Con A - peroxydase permet une bien meilleure appréciation de l'architecture pariétale. Les micrographies (fig. 33) montrent alors, d'une part le revêtement pariétal révélé par ses affinités pour la Con A, et d'autre part le contraste intrapariétal visualisé par la technique de Thiery.

Après incubation des coupes à congélation dans la Con A et le mannosyl ferritine, les particules de ferritine apparaissent localisées sous forme d'une bande continue et régulière à la périphérie des cellules (fig. 34). L'utilisation du cryostat dans la préparation du matériel entraîne parfois sinon une véritable coupe, tout au moins une fracture des levures rendant plus accessibles à la fois les zones profondes de l'enveloppe cellulaire et les organites cytoplasmiques. Dans ce cas, un marquage associé aux vacuoles (fig. 49) et à l'espace périplasmique (fig. 50) peut être décelé. Les constituants intrapariétaux apparaissent également marqués à la faveur de cassures (fig. 48).

Dans les expériences de contrôle en présence d'inhibiteur (fig. 39), ou après omission de la lectine, aucune réaction pariétale n'est observée. Seule l'incubation dans le mélange DAB-H₂O₂ révèle la présence d'une activité peroxydasique au niveau des crêtes mitochondriales (fig. 40).

L'épaisseur moyenne de l'enveloppe cellulaire obtenue pour chacun des tests cytochimiques précédents est reportée dans



COLORATION	ASPECT DE LA PAROI	Epaisseur moyenne (nm) + déviation standard		
		PAROI (1)	REVETEMENT (2)	TOTAL
Coloration de Thiery		162 + 18	---	162 + 18
Con A - HRP		170 + 28	93 + 22	263 + 37
Con A - Manfer		156 + 11	82 + 7	238 + 24
Con A - HRP + coloration de Thiery		153 + 20	80 + 14	233 + 19

TABLEAU A : Epaisseur moyenne de l'enveloppe cellulaire après différentes "colorations".

le tableau A. Elle met nettement en évidence l'existence de structures superficielles révélées par la Con A.

β. Par Les colorants cationiques et l'acide phosphotungstique à bas pH

Avec la ferritine cationisée, l'enveloppe cellulaire présente une réaction superficielle intense, à l'exception des cicatrices de bourgeonnement (fig. 52). Les particules de ferritine y apparaissent sous forme de fins filaments disposés en grappes, et orientés perpendiculairement à la paroi (fig. 53). Alors que l'examen ultrastructural ne révèle aucune différence de marquage entre blastospores et structures mycéliennes, l'utilisation de ferritine cationisée fluorescente entraîne une réaction beaucoup plus forte sur la paroi des tubes germinatifs (fig. 51).

Une coloration iniforme et continue, mais également plus discrète au niveau des cicatrices de bourgeonnement, est obtenue à la surface des parois par le rouge de ruthénium (fig. 57). De la même manière, les zones pariétales périphériques des blastospores et des tubes germinatifs réagissent intensément avec l'acide phosphotungstique, mais les dépôts sont ici plus grossiers (figs. 54 et 55). Le plasmalemme fait également l'objet d'un marquage. Ces différentes zones ne présentent plus d'affinité pour l'acide phosphotungstique après action de la trypsine à 1 % (3 H. à 37°C) (fig. 56).

c) Effets du traitement par la pronase et le 2 - mercaptoéthanol

Le traitement par la pronase et le 2 mercaptoéthanol qui dégrade considérablement la paroi des jeunes cellules en extrayant une grande partie des composés polysaccharidiques périphériques (figs. 35 et 37) favorise la pénétration des réactifs. Les zones pariétales internes font alors l'objet d'un marquage par la ferritine (figs. 36 et 37). Au contraire, ce traitement n'affecte que superficiellement la paroi des blastospores parentales et il aboutit la plupart du temps à l'élimination du revêtement pariétal qui n'adhère plus alors à la paroi. Ce processus est bien démontré par l'emploi de peroxydase (fig. 28). Inversement, la restauration du revêtement pariétal est plus aisément visualisée par la ferritine et la

redistribution des sites récepteurs à la Con A à ce niveau peut être quantifiée (figs. 42 - 43 et 44 à 47). Les comptages font apparaître une distribution régulière et une augmentation rapide du nombre de particules de ferritine sur le revêtement pariétal des cellules en régénération, qui acquièrent progressivement les caractéristiques des cellules intactes (tableau B).

Le revêtement pariétal est d'autre part extrêmement labile. Une simple agitation rotative des blastospores dans du PBS (1 heure à 37° c à raison de 12 rotations/minute) suffit à en libérer de nombreux fragments (figs. 59 et 60), dont seule la face externe fait l'objet d'un marquage (fig. 58). De même qu'après le traitement par la pronase et le mercaptoéthanol, aucune réaction n'est détectée au niveau des zones sous-jacentes alors exposés aux réactifs (voir chapitre 4).

B) LOCALISATION DE LA CHITINE

Chez les levures, ce polysaccharide est connu pour jouer un rôle essentiel dans les processus de bourgeonnement (CABIB *et al.*, 1974, CABIB et BOWERS, 1975) ainsi que dans le maintien de la rigidité cellulaire (CHATTAWAY *et al.*, 1976). Des travaux de microscopie électronique à transmission et à balayage utilisant la WGA marquée à l'or colloïdal (HORISBERGER et ROSSET, 1976 ; HORISBERGER et VONLANTHEN, 1977) ont montré, en accord avec les résultats fournis par les techniques biochimiques (CHATTAWAY *et al.*, 1968, 1976) que la présence de chitine n'est pas limitée aux seules cicatrices de bourgeonnement. Dans le présent travail nous nous sommes proposés d'en préciser la localisation chez *Candida albicans* à l'aide de wheat germ agglutinine.

a) Sur cellules intactes ou coupées au cryostat

La technique de THIERY et la double coloration appliquées à des blastospores intactes ou coupées au cryostat, révèlent dans les zones pariétales profondes, l'existence d'un squelette de nature microfibrillaire, en continuité avec les structures observées au niveau de la cicatrice de bourgeonnement (figs. 61, 62, 63, 65 et 68). Celle-ci apparaît surmontée d'une calotte de matériel non contrastée (fig. 64). Par ailleurs, aucune

différence fondamentale ne peut être observée entre l'organisation pariétale des cellules mères et filles (fig. 69).

Les cellules entières traitées par la WGA-FTC montrent une fluorescence très diffuse de leur paroi. La réaction est plus intense, mais irrégulièrement répartie, lorsque les levures sont préalablement sectionnées au cryostat (fig. 70).

L'examen ultrastructural révèle, avec le chitobiosyl peroxydase, un marquage continu à la périphérie des blastospores, interrompu uniquement au niveau de leur cicatrice de bourgeonnement (fig. 72). Celles-ci sont coiffées d'une zone dense ancrée plus profondément (figs. 67 et 72). Avec le chitobiosyl ferritine, un léger dépôt de particules s'observe au niveau de ces mêmes cicatrices (figs. 66 et 73), mais également sur les faces internes et externes des parois fracturées ou décollées du cytoplasme sous-jacent, et dans les vacuoles (fig. 74). Les réactions sont inhibées en présence de N-acétyl-D-glucosamine.

b) Sur cellules traitées par la pronase et le 2- Mercaptoéthanol

La digestion enzymatique, en éliminant les composants amorphes superficiels, dévoile l'organisation des structures pariétales profondes et met nettement en évidence la texture microfibrillaire des couches internes (fig. 75). Les altérations sont particulièrement sensibles chez les jeunes cellules (fig. 76) et au niveau du septum des cellules en bourgeonnement (fig. 77).

Après un tel traitement, la paroi des jeunes cellules fait l'objet d'un marquage intense en microscopie de fluorescence (figs. 78 a et b). Ces observations sont confirmées par la microscopie électronique. Seules les cellules filles montrent une accessibilité de leurs composants pariétaux aux différents réactifs et font l'objet d'un marquage (fig. 79). Un important dépôt opaque aux électrons peut en effet être observé sur le plasmalemma et ses invaginations, dans l'espace périplasmique, et au niveau de vésicules intracytoplasmiques (fig. 80). La zone de jonction entre cellules mère et fille est également fortement marquée (figs. 82 et 83). Ces réactions sont inhibées en présence de N-acétyl-D glucosamine 0,5 M (fig. 81).

Aucun marquage n'a pu être visualisé par la WGA et le chitobiosyl ferritine après digestion modérée des parois par la pronase et le mercaptoéthanol.

c) Sur cellules traitées par le mélange pronase -
2 mercaptoéthanol, puis par la chitinase

Un tel traitement provoque la formation de sphéro-protoplaste chez les cellules filles alors que certaines cellules parentales conservent une partie de leurs composants polysaccharidiques pariétaux (fig. 84). Dans ce cas, la fluorescence consécutive au traitement par la WGA-FTC n'est observée que dans les parois des blastospores mères (figs. 85 a et b). En revanche, et quel que soit le cytomarqueur utilisé, aucune réaction n'est décelée en microscopie électronique (figs. 86 et 87).

d) Sur coupes ultrafines

En raison de la mauvaise appréciation des limites pariétales et cytoplasmiques, les résultats fournis par cette technique sont souvent imprécis. Les coupes de résine hydrosoluble traitées par la WGA et le chitobiosyl ferritine révèlent toutefois un marquage pariétal hétérogène plus spécialement localisé au niveau de deux zones, l'une périphérique, et l'autre située au voisinage de l'espace périplasmique. Cette observation concerne aussi bien la paroi des blastospores (fig. 88) que celle des tubes germinatifs (fig. 89).

III - DISCUSSION

A) Validité des techniques

a) Détection des sites récepteurs

La détection correcte des sites intracellulaires et pariétaux récepteurs aux lectines dépend pour une large part de leur accessibilité aux différents réactifs. L'utilisation de cellules préalablement fracturées au cryostat, en facilitant la pénétration des marqueurs, constitue un complément intéressant entre les méthodes de détection sur cellules entières et celles faisant intervenir des coupes ultrafines. Ces

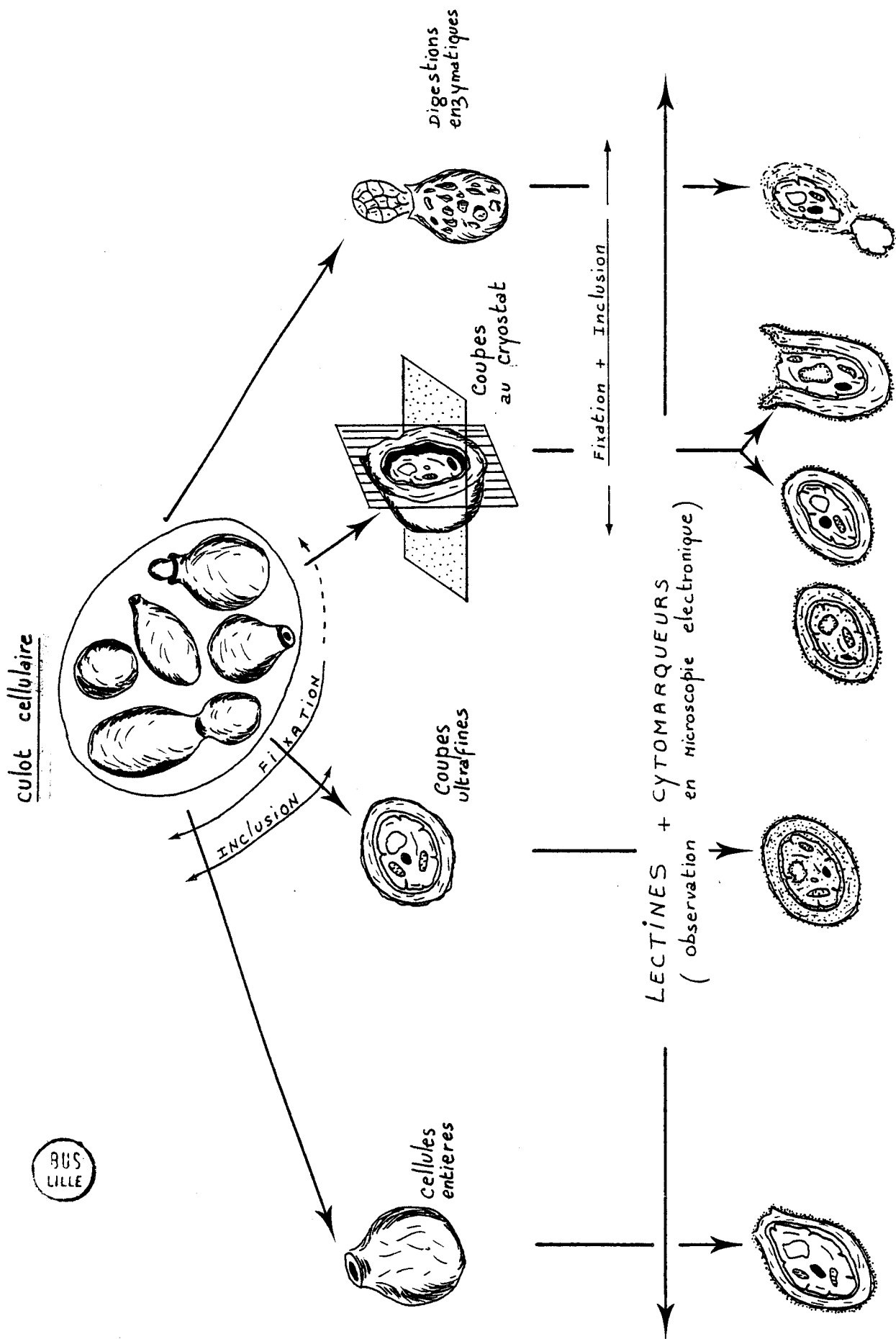


Figure C : Interprétation schématique des résultats obtenus en microscopie électronique, par différentes méthodes de détection des glycoconjugués utilisant des lectines.

dernières donnent en effet des résultats d'interprétation délicate, en raison des manipulations répétées de coupes particulièrement fragiles. Toutefois, une préparation de l'objet minimisant considérablement les pertes d'activités cytochimiques (courte fixation et absence de déshydratation) et un contact homogène entre toutes les structures cellulaires et les réactifs, plaident en leur faveur. De fait les résultats obtenus donnent une bonne idée d'ensemble de la composition de la paroi.

A l'inverse, en demeurant limitées aux seules structures superficielles des cellules entières, les mêmes réactions objectivent un revêtement pariétal dont la révélation peut s'expliquer par la nature des composants. Ils constitueraient un réseau suffisamment dense et tenace pour fixer les molécules de lectine sur des cellules entières, mais néanmoins trop lâche pour être détecté sur coupes fines.

L'interprétation des informations obtenues par l'utilisation de cellules préalablement fracturées au cryostat ou traitées par des enzymes, se doit de demeurer prudente. En effet, les cellules réagissent différemment aux traitements enzymatiques. Certaines d'entre elles ne sont pas cassées lors de leurs passages au cryostat, ou le sont à des niveaux différents. De plus, les réactifs ayant généralement une pénétration limitée, l'intensité et l'homogénéité du marquage dépendront largement de la position du plan de coupe des sections ultrafines, par rapport à la fracture initialement réalisée au cryostat (fig. C). Dans ces conditions, la comparaison des résultats ne peut se faire qu'entre groupes de cellules, et non d'une cellule à l'autre ; et l'absence de réactions cellulaire ou intrapariétale n'a de signification que si elle concerne toute une population cellulaire à un stade donné.

b) Visualisation des sites récepteurs

En plus de leur accessibilité la visualisation des sites récepteurs aux lectines appelle quelques remarques. La peroxydase pénètre en effet mieux au travers de la paroi que la ferritine, et elle donne une définition de l'architecture pariétale superposable à la stratification établie par les méthodes conventionnelles. Toutefois, le produit opaque aux électrons provoqué par la réaction est très diffusible (GROS, 1979)

ce qui interdit une localisation précise des composés recherchés. La réaction finale peut en effet soit masquer, soit révéler d'une manière identique, des zones de différentes concentrations en sites récepteurs. Ces difficultés ne se rencontrent pas avec les marqueurs denses. La possibilité de quantifier les particules de ferritine confère à la technique une plus grande précision (SCHREVEL *et al.*, 1979, 1981), en particulier tant que leur pénétration n'est pas mise en cause.

B) Les constituants pariétaux

a) Les mannanes

L'intérêt de leur localisation n'a cessé de croître depuis qu'ils sont connus comme les déterminants antigéniques majeurs de *Candida albicans* et surtout comme les supports de 2 sérotypes, (A et B), différents par leur comportement pathogène et leur sensibilité aux antifongiques (SUMMERS *et al.*, 1964 ; FUKAZAWA *et al.*, 1980 ; SUZUKI et FUKAZAWA, 1982). Les études respectives de POULAIN *et al.*, (1978, 1981) et de CASSONE *et al.*, (1978, 1979) avaient déjà suggéré leur existence dans les couches les plus superficielles de la paroi. L'utilisation de méthodes de détection plus spécifiques (HORISBERGER et VONLANTHEN, 1977) faisant intervenir des anticorps homologues anti-mannanes ou de la Con A marquée à l'or colloïdal, a révélé une localisation intrapariétale des mannanes, bien qu'assez imprécise, chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis*.

De l'analyse des résultats fournis par les différentes méthodes utilisées dans cette étude, et compte tenu de leur spécificité, il ressort :

* que les molécules de mannose, ou leurs polymères, sont réparties dans l'ensemble de la paroi des blastospores, mais sont détectées en plus grande quantité au niveau de l'espace périplasmique et surtout dans les zones pariétales les plus superficielles. La répartition des mannanes à ce niveau en 2 couches concentriques périphériques corroborent les résultats immunocytochimiques de POULAIN *et al.*, 1981. Celle-ci serait d'ailleurs commune à d'autres espèces de *Candida* (FISCHER et REUTER, 1982). Leur localisation profonde est en accord avec

une conception plus actuelle de l'organisation des parois fongiques, qui vise à considérer les mannanes comme des constituants intégrés dans un squelette microfibrillaire constitué de glucanes et de chitine (FARKAS, 1979). Elle pourrait refléter un phénomène sécrétoire de la zone périplasmique vers la périphérie cellulaire s'effectuant par l'intermédiaire de pores et, confirmant ainsi les observations originales de TOKUNAGA et TOKUNAGA (1980) et de VOGT *et al.*, (1980).

* que seules les couches externes des tubes germinatifs contiennent des mannanes, en accord avec la nature vraisemblablement chitineuse des zones les plus internes (CASSONE *et al.*, 1978).

* enfin que les mannanes préexistant dans la paroi ne semblent pas être intégrés aux nouvelles structures pariétales formées au cours des processus de bourgeonnement et de blastèse.

b) La chitine

L'ensemble des résultats obtenus concernant la localisation de la chitine dans la paroi de *Candida albicans* apparaît sur de nombreux points en accord avec ceux d'auteurs ayant utilisé des techniques cytochimiques similaires. C'est surtout le cas de la WGA marquée à l'or colloïdal, appliquée à des coupes ultrafines de *Candida utilis* (HORISBERGER et VONLANTHEN, 1977) ou à des ghosts de *Saccharomyces cerevisiae* (MOLANO *et al.*, 1980). D'une part ils apportent la confirmation d'une localisation préférentielle de la chitine au niveau de la cicatrice de bourgeonnement et du septum. D'autre part ils révèlent sa présence dans l'ensemble de la paroi. Ce dernier fait n'est pas nouveau, MOLANO *et al.*, (1980), l'avaient déjà signalé à propos de *Saccharomyces cerevisiae*. Toutefois l'originalité de nos observations concerne la distribution précise de ce polysaccharide dans la paroi. Ainsi, l'important marquage observé dans l'espace périplasmique est en accord avec les travaux de BRAUN et CALDERONE (1978, 1979) et DURAN *et al.*, (1975), selon lesquels la chitine serait synthétisée à partir de chitine synthétase uniformément répartie sous forme zymogène le long du plasmalemma. De même, il est clair que le squelette microfibrillaire interne, invariablement observé, est en partie de nature chitineuse. L'association de la chitine à des β -(1 $\rightarrow$ 6) glucanes est démontrée par la nécessité

de combiner l'action d'une β -(1 $\rightarrow$ 6) glucanase à celle d'une chitinase, pour obtenir l'extraction complète de la chitine chez *Saccharomyces cerevisiae* (MOLANO *et al.*, 1980). Ce phénomène serait de nature à expliquer les réactions positives inattendues, obtenues chez les cellules traitées par la pronase et la chitinase.

L'observation la plus surprenante de cette étude concerne la présence d'une faible quantité de chitine dans les couches superficielles de la paroi, par ailleurs riches en mannoprotéines. L'absence d'une telle réaction au niveau du revêtement pariétal, région contenant également des mannoprotéines, paraît exclure ici la révélation par les marqueurs des ponts diacetylchitobiose reliant les résidus asparagine des chaînes protéiques, aux polymères de mannose (NAKAJIMA et BALLOU, 1974). Alors que le squelette microfibrillaire interne est sensé assurer le maintien de la conformation de la cellule fongique, il est difficile de préciser la signification, structurale ou métabolique, de cette seconde composante pariétale de nature chitineuse. Sa présence à un stade précoce du bourgeonnement cellulaire plaide en faveur de la première hypothèse. Dans ce cas, elle pourrait renforcer la rigidité de la paroi, et assurer la rétention de certains composants plus labiles de l'enveloppe cellulaire, comme les mannanes ou les enzymes de l'espace périplasmique.

c) Le revêtement pariétal

L'affinité des lectines pour certains glycoconjugués des surfaces cellulaires, et leur détection ultrastructurale par différents marqueurs, ont été mis à profit pour l'étude de nombreuses structures biologiques de surface chez les cellules eucaryotes. Plusieurs procédés d'utilisation, dérivés de la méthode originale décrite par BERNHARD et AVRAMEAS (1971) ont été proposés : FRANÇOIS et MONGIAT, 1977 ; GROS *et al.*, 1977 ; NIR, 1978 ; HORISBERGER, 1979 ; SANDOZ *et al.*, 1979 ; SCHREVEL *et al.*, 1979 ; SKUTELSKY et BAYER, 1979. L'application de certaines d'entre elles aux levures fournit des informations intéressantes sur le revêtement externe des parois de ces microorganismes.

L'attention sur l'existence d'une couche muqueuse adhérente à la paroi de *Candida albicans* fut tout d'abord attirée par JOSHI *et al.*, (1975)

qui décrivirent une matrice intercellulaire amorphe ou "surface coat" présente entre les levures en colonies. Cette structure, en l'absence toutefois de véritable démonstration, fut progressivement admise par l'ensemble des auteurs et fut successivement qualifiée de "capsule" (STOETZER et KEMMER, 1975), "mucus coat" (PUGH et CAWSON, 1978), "capsule like coat" (CASSONE *et al.*, 1978) ou encore "slime layer" (ARNOLD, 1981). De la même manière, la propriété des parois de présenter des variations morphologiques de surface en fonction de leur environnement a été signalée sur certains milieux synthétiques (YAMAGUCHI, 1974 ; KULKURANI *et al.*, 1980 ; POULAIN, 1982); en position pathogène dans les tissus (MONTES et WILBORN, 1968 ; CAWSON et RAJASINGHAM, 1972 ; STOETZNER et KEMMER, 1975 ; MYEROWITZ, 1978 ; GARCIA-TAMAYO *et al.*, 1982 ; SCHERWITZ, 1982); ou lors des phénomènes d'adhérence (HOWLETT et SQUIER, 1980 ; Mc COURTIE et DOUGLAS, 1981).

L'utilisation de Con A, d'acide phosphotungstique, et de colorants cationiques, révèle un revêtement pariétal relativement homogène, réparti uniformément à la surface des levures. Les réactions positives obtenues à la périphérie des parois par ces différents colorants montrent :

- * que le revêtement pariétal de *Candida albicans* contient des résidus mannopyranosyles, principaux récepteurs de la Con A à la surface de cette levure (CASSONE *et al.*, 1978).

- * qu'il est de nature glycoprotéinique. Sa sensibilité à la pronase et à la trypsine démontre en effet que des protéines sont nécessaires à son intégrité.

- * qu'il est à la fois présent sur les blastospores et sur les tubes germinatifs. Mais alors que la Con A ne permet de déceler aucune différence de marquage entre ces deux formations, l'utilisation de ferritine cationisée en microscopie de fluorescence révèle une densité plus importante de groupements anioniques au niveau des formes de blastèse. Cette différence, qui n'est pas objectivée par la microscopie électronique, pourrait être à l'origine de l'autoagglutination des tubes germinatifs.

* qu'il est constitué de composés extrêmement labiles, susceptibles d'expliquer les taux élevés de mannose (MONSON et WILKINSON, 1981 ; MARIER *et al.*, 1982) et d'antigènes mannanes pouvant être utilisés à des fins diagnostiques (WIENER et COATS STEPHEN, 1979 ; ROBERT *et al.*, 1980) dans le sérum d'individus atteints d'infections candidosiques. Cette relative fragilité des revêtements de surface a déjà été évoquée à propos de *Sporothrix schenckii* (BENCHIMOL *et al.*, 1979) et chez les mycoplasmes (BERTOLONI *et al.*, 1980).

* qu'il est capable de se régénérer rapidement et progressivement après son extraction, donc qu'il ne s'agit pas d'une structure dérivant du milieu de culture, mais bien d'origine fongique. Cet enrichissement en glycoprotéines du revêtement pariétal pose le problème, en l'absence de systèmes de synthèse pariétaux, de l'élaboration (composés nouvellement synthétisés ou préexistants dans la cellule) de l'origine (cytoplasme ou enveloppe cellulaire) et surtout de la mobilité, ou de la réorganisation, des glycoconjugués au travers de la paroi. Il traduit un phénomène de sécrétion actif et continu, nécessaire au maintien de l'intégrité pariétale.

La présence d'un revêtement à la surface des parois, si elle constitue le reflet de l'activité métabolique de la cellule fongique, conditionne surtout les rapports entre cette cellule et son environnement, en même temps qu'elle reflète leur nature. L'intervention dans les phénomènes de perméabilité et d'échanges ioniques classiquement attribuée au revêtement des surfaces cellulaires paraît ici plus complexe en raison de l'épaisse paroi qui le sépare de la cellule fongique. En particulier la relative facilité d'extraction de ses composants, en provoquant la libération de macromolécules dans le milieu ambiant, et en démasquant des sites pariétaux sous-jacents, est susceptible de jouer un rôle non négligeable dans l'adhérence aux cellules hôtes.

IV - CONCLUSION

L'utilisation de méthodes de détection des glycoconjugués associées à des digestions enzymatiques, nous a permis de préciser la localisation de certains composants de l'enveloppe cellulaire de *Candida albicans*, et de

montrer que leur distribution se superpose à une stratification pariétale. Mais c'est principalement la mise en évidence d'un revêtement de nature polysaccharidique qui retiendra notre attention, car associé aux parois, il en constitue les couches les plus superficielles, et doit donc favoriser une approche nouvelle des interactions cellule hôte-levure.

CHAPITRE II

MECANISMES DE SECRETION ET
"DEVENIR" DES ENZYMES DE L'ENVELOPPE
CELLULAIRE : EXEMPLE DE LA PHOSPHATASE ACIDE

I - INTRODUCTION

L'activité phosphatasique acide chez *Candida albicans* fait l'objet d'informations limitées et contradictoires qui nous ont incité à reprendre son étude sous l'angle de la cytochimie ultrastructurale. En effet, bien que sa recherche ait été entreprise d'abord en microscopie photonique (NARKATES *et al.*, 1968 ; REISS, 1973) puis en microscopie électronique (DE NOLLIN *et al.*, 1975), elle n'a été observée que dans une très faible proportion de cellules et localisée aux seules vacuoles. Ces données contrastent avec celles de CHATTAWAY *et al.*, (1976), qui après traitement chimique des parois par le dithiothreitol (DTT) ou extractions enzymatiques faisant intervenir seules ou associées chitinase, protéase et β - (1 $\rightarrow$ 3) glucanase, ont dosé des quantités importantes de cette enzyme dans l'enveloppe cellulaire des blastospores et des formes mycéliennes. 20 % de l'activité enzymatique restent associés au plasmalemme des protoplastes, 80 % sont libérés, indiquant que l'enzyme est retenue au niveau de l'espace périplasmique, et que sa diffusion y est limitée par les composants pariétaux.

La phosphatase acide isolée de *Candida albicans* est une glycoprotéine contenant 88 % de sucres, exclusivement du mannose (ODDS et HIERHOLZER, 1973), et sa mise en évidence par la microscopie électronique (voir au chapitre matériels et méthodes) est relativement aisée.

L'exploration cytochimique de cette enzyme, dont la destinée est principalement extracellulaire, est intéressante à plus d'un titre :

- Pour l'organisme eucaryote "inférieur" qu'est *Candida albicans*, elle constitue un indicateur de sécrétion glycoprotéique. Sa localisation ultrastructurale peut donc permettre d'en identifier les sites de synthèse, ou d'obtenir des informations sur son mode de sécrétion. En particulier, l'étude de cette enzyme en tant que "prototype" de mannoprotéine extracellulaire peut fournir des renseignements sur l'élaboration des parois. De la même manière, en tant qu'hydrolase, sa localisation fine serait en mesure d'apporter des arguments au problème controversé de l'existence des lysosomes (MATILE et WIEMKEN, 1967 ; WILSON *et al.*, 1969) et de l'appareil de Golgi (MATILE *et al.*, 1969).

- Pour la levure, cellule entourée d'une paroi, elle représente un marqueur de l'enveloppe cellulaire, et son devenir à ce niveau constitue un indice pour l'étude de l'évolution des parois au cours de la différenciation cellulaire.

- Enfin pour l'organisme pathogène, sa présence à la surface des cellules doit être considérée comme un facteur susceptible de contribuer à l'invasion tissulaire et à l'immunogénicité des levures. La localisation définitive de l'enzyme au sein de l'enveloppe cellulaire est donc intéressante à établir, car une distribution extrapariétale serait à rapprocher de la pathogénicité de *Candida albicans*.

Les résultats ont fait l'objet de la publication suivante :

TRONCHIN, G. ; POULAIN, D. & BIGUET, J. ; 1980. Localisation ultrastructurale de l'activité phosphatasique acide chez *Candida albicans*. Biol. Cell. 38 : 147-152.

II - RESULTATS

Plusieurs sites d'activité enzymatique ont été mis en évidence sur les 2 souches étudiées.

A) Les structures cytoplasmiques

Le produit de la réaction est particulièrement dense dans des vacuoles associées le plus souvent aux globules lipidiques (Fig. 91). Des structures marquées, moins volumineuses que les précédentes, et en relation avec le plasmalemme font parfois intrusion dans le cytoplasme (fig. 92). Toutefois, la fusion de ces formations à la membrane plasmique, ou leur élaboration à partir de celle-ci, ne peuvent être démontrées à partir des observations ultrastructurales actuelles. Il est clair cependant qu'il ne s'agit pas de dépôts au niveau d'invaginations du plasmalemme tels qu'ils sont classiquement observés (comparer avec les figures 97 et 98).

Les précipités de phosphate de plomb sont en outre localisés

dans les cavités du réticulum endoplasmique (fig. 93) et au niveau de structures évoquant des saccules golgiens (figs. 94 et 95). Des petites inclusions denses entourent ces formations. Certaines d'entre elles ont été également observées à l'apex de cellules en voie de bourgeonnement (fig. 96).

Ces différents lieux de marquage se rencontrent parincipalement après 24 heures de culture sur milieu de Sabouraud. En revanche, les cellules incubées 3 heures sur sérum ne révèlent aucun marquage cytoplasmique, tant au niveau des blastospores (fig. 97), que des tubes germinatifs. Aucun précipité n'a été observé sur les préparations témoins qui donnent des images identiques à celle de la fig. 90.

B) L'enveloppe cellulaire

Un dépôt de phosphate de plomb d'intensité variable, associé au plasmalemma et à ses projections intracytoplasmiques, est décelé chez la plupart des cellules (figs. 97 et 98). Le manque de définition de l'architecture membranaire ne permet pas toutefois d'attribuer cette activité phosphatasique à l'un ou l'autre des 2 feuilletts. Fréquemment même, un marquage plus grossier localisé au niveau de l'espace périplasmique se superpose au précédent, rendant les deux réactions pratiquement indissociables.

De fins dépôts de phosphate de plomb intrapariétaux disposés soit en couches concentriques continues (fig. 101), soit perpendiculairement à l'enveloppe cellulaire entre les microfibrilles des zones internes (Figs. 99 a et b), mais suggérant dans les deux cas une migration de l'enzyme vers l'espace extracellulaire, sont également souvent observés. (Les micrographies 99 à 102 montrent les cas de figures le plus couramment rencontrés). De fait, une réaction intense et irrégulièrement distribuée recouvre la paroi de nombreux éléments pseudomycéliens et blastospores (figs. 101, 102, 105, 106), et de la plupart des tubes germinatifs obtenus sur milieu synthétique (figs. 103 et 104). Cette réaction superficielle des éléments filamenteux contraste étrangement avec celle des blastospores qui leur ont donné naissance (figs. 104 et 105). Aucun marquage pariétal n'est mis en évidence après filamentation des levures sur sérum.

% de blastospores montrant une activité phosphatasique acide

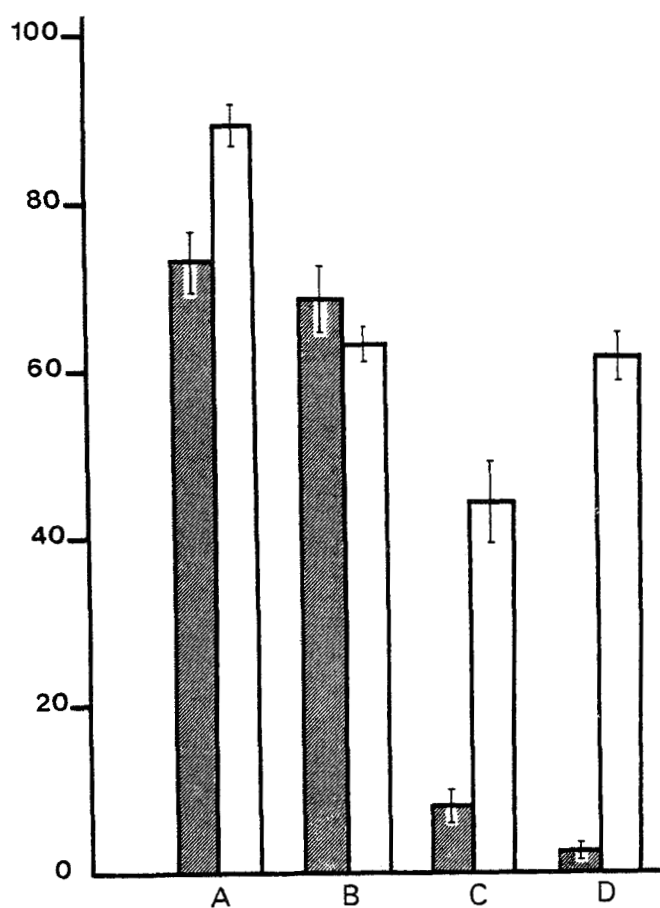


Figure A : Diagramme représentatif de la distribution de phosphatase acide, souche labo. ▨ clône [32] □ . (A) activité phosphatasique acide globale. (B) marquage au niveau des structures cytoplasmiques. (C) marquage pariétal. (D) marquage associé au plasmalemme.



Dans le but de préciser au cours du développement cellulaire, la cinétique de mise en place de l'enzyme dans les zones précédemment individualisées, nous avons observé de nombreuses figures de division. Aucun dépôt n'est tout d'abord détecté dans le jeune bourgeon (fig. 109), et contrairement aux observations réalisées sur les éléments filamenteux, les réactions pariétales n'intéressent ici que la cellule mère. Puis l'enzyme est simultanément révélée dans les organites cytoplasmiques, et au niveau des zones pariétales basales de la jeune cellule (fig. 110). La réaction s'étend alors à l'ensemble du plasmalemma et de l'espace périplasmique, de la paroi, puis du septum (figs. 111 et 112). Une fois le processus de séparation terminé, la cicatrice de bourgeonnement de la cellule mère fait l'objet d'une réaction très intense (fig. 91). Les figures 109 à 112 illustrent parfaitement cette évolution.

Afin de comparer la distribution des sites d'activité enzymatique dans les deux souches étudiées (figs. 113 et 114), des comptages ont été effectués (voir chapitre matériels et méthodes). Quatre paramètres ont été retenus : détection d'une activité phosphatasique globale ; marquages associés aux structures cytoplasmiques, au plasmalemma ou à la paroi. Les résultats statistiques, nombre moyen de cellules présentant une réaction, et leur déviation standard ($\bar{X} \pm SD$) sont rapportés sous forme graphique dans la figure A. Si une différence de marquage significative est observée en ce qui concerne l'activité phosphatasique acide globale, le pourcentage de levures à localisation enzymatique cytoplasmique n'est pas significativement différent dans les deux souches. En revanche, une différence de marquage hautement significative (au niveau 1 %) est mise en évidence pour l'activité phosphatasique acide associée à la membrane plasmique et à la paroi.

III - DISCUSSION

Les résultats obtenus tant sur le plan cytochimique que physiologique, loin d'apporter une réponse à tous les problèmes posés, nous permettent cependant d'envisager de manière plus précise quelques aspects évolutifs de l'enveloppe cellulaire chez *Candida albicans*. La migration de l'enzyme au travers de la paroi, et sa sécrétion au niveau du

revêtement pariétal, constituent à nos yeux les caractéristiques les plus intéressantes de cette étude. De telles propriétés rarement rapportées dans la littérature nous semblent en mesure d'expliquer certains caractères du comportement biologique de cette levure.

A) Validité de la technique utilisée

Comme il est fréquent pour de nombreuses réactions cytochimiques, et plus particulièrement pour la recherche d'activités enzymatiques, le produit de la réaction finale résulte d'un compromis entre 2 processus inverses : d'une part une possible dénaturation de l'enzyme par le fixateur, provoquant son inactivation ; d'autre part la nécessité pour localiser l'enzyme de façon précise d'empêcher sa diffusion, et donc de préserver l'ultrastructure cellulaire par une fixation adéquate.

Les levures, et plus particulièrement *Candida albicans*, ne constituent pas un matériel très favorable aux études cytochimiques. La plupart des techniques de fixation usuelles se révèlent en effet impropres à une bonne conservation de la morphologie générale des cellules (voir au chapitre fixation). Nous avons utilisé la technique de BORGERS et DE NOLLIN (1974) faisant intervenir des coupes préalables à congélation. Elle nous paraît être actuellement la mieux adaptée aux études morphologiques et cytochimiques de *Candida albicans* (DE NOLLIN *et al.*, 1975). BAUER et SIGARLAKIE (1973), VAN RIJN *et al.*, (1975), puis BOHM et UNGER (1979), rapportent une perte d'activité enzymatique de l'ordre de 25 % après une 1/2 heure de fixation par le glutaraldehyde. Pour RAININA *et al.*, (1979) en revanche, la congélation - décongélation des cellules entraîne une augmentation de cette activité de l'ordre de 30 %.

La critique majeure à la coloration standard de GOMORI utilisée ici, a été formulée par ARNOLD et GARRISON (1981) qui ont mis en cause la validité des réactions extrapariétales chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces rouxii*. En effet, la quantité importante d'enzyme de l'espace périplasmique entraînerait une production rapide d'ions phosphate diffusant à l'extérieur des parois avant de précipiter. Si l'abaissement de la concentration en substrat limite bien la réaction

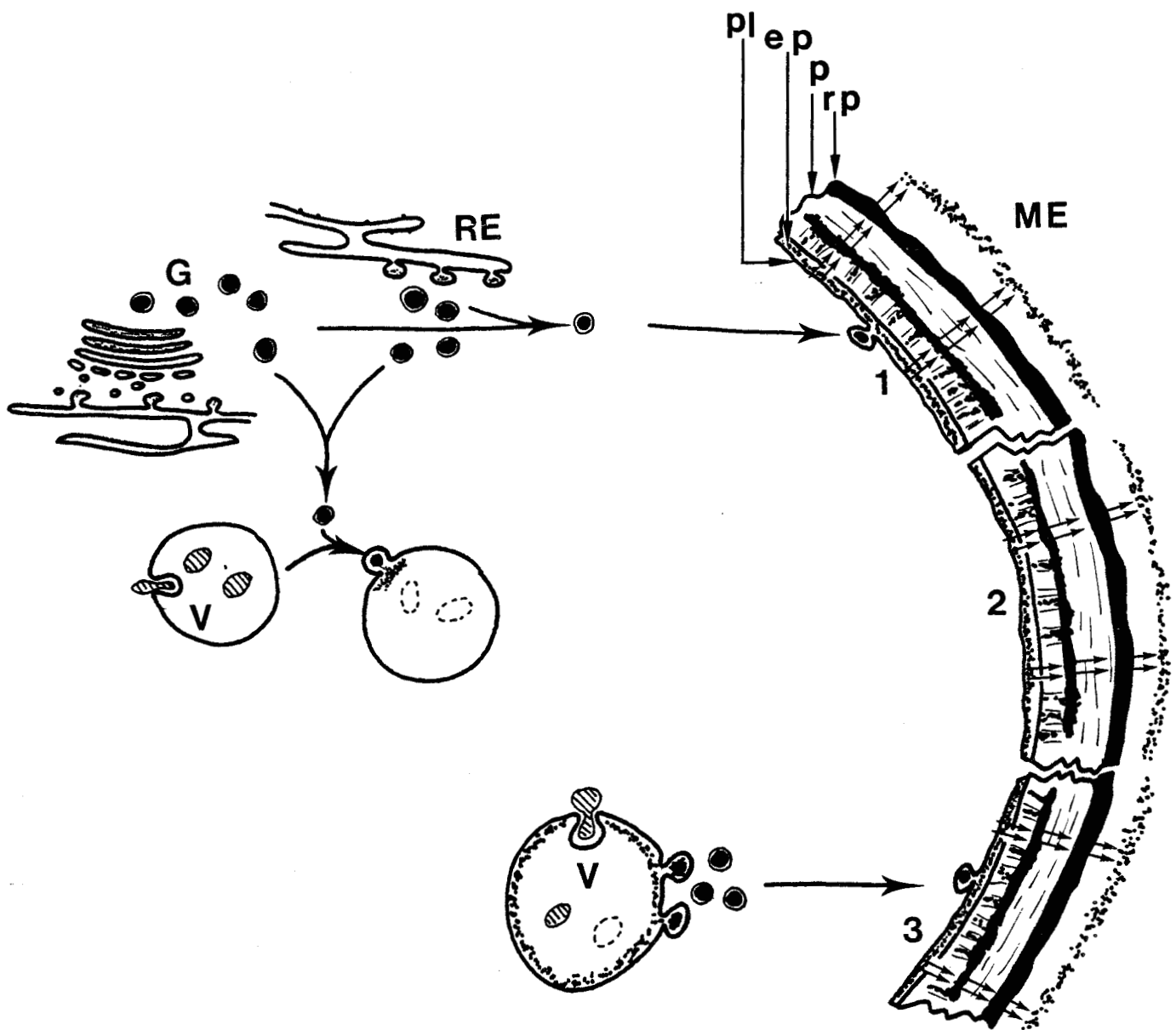


Figure B : Représentation schématique des mécanismes hypothétiques de synthèse, transport et sécrétion de la phosphatase acide, par l'intermédiaire : 1 - du système Golgi/réticulum endoplasmique. 2 - du plasmalemme. 3 - des vacuoles. EP, espace périplasmique ; G, appareil de Golgi ; ME, milieu extracellulaire ; P, paroi ; PL, plasmalemme ; RE, réticulum endoplasmique ; RP, revêtement pariétal ; V, vacuoles.



au seul espace périplasmique des espèces étudiées par ces auteurs, ceux-ci n'ont pas omis de remarquer qu'une véritable diffusion devrait provoquer un dépôt de plomb dans l'ensemble de la paroi. L'hypothèse selon laquelle la nature de la matrice pariétale ne permet pas de tels précipités est pour le moins peu convaincante, et en désaccord total avec nos propres observations qui suggèrent au contraire un processus de migration, de l'espace périplasmique vers la surface de la paroi.

B) Appareil de Golgi-lysosomes

Les résultats cytochimiques obtenus ici permettent d'établir l'existence d'une structure évoquant un appareil de Golgi rudimentaire analogue à ceux décrits chez *Saccharomyces cerevisiae* (VAN RIJN *et al.*, 1975 ; LINNEMANS *et al.*, 1977) et chez *Cryptococcus neoformans* (MAHVI *et al.*, 1974). Le problème de savoir s'il s'agit d'un organite présentant tous les caractères morphologiques d'un appareil de Golgi classiquement décrit, ou bien d'une différenciation locale et transitoire du réticulum endoplasmique, est ici secondaire en regard du fait que cette formation, jamais identifiée sur de simples critères structuraux, semble impliquée dans l'élaboration de vésicules de sécrétion identiques aux lysosomes des cellules animales eucaryotes.

Les vacuoles (MATILE et WIEMKEN, 1967 ; WIEMKEN *et al.*, 1979) et l'espace périplasmique (BAUER et SIGARLAKIE, 1973) ont été longtemps considérés comme les seuls compartiments du système lysosomal des levures. En réalité l'activité autophagique des vacuoles leur confère davantage le rôle de lysosomes secondaires. Toutefois, la pauvreté des cellules en structures ergastoplasmiques ou golgiennes faisant l'objet d'un marquage, observation recoupant celle de VAN RIJN *et al.*, (1975) ne permet pas de rendre compte de manière satisfaisante de la quantité importante de phosphatase acide détectée dans l'enveloppe cellulaire ; elle nous conduit à envisager l'hypothèse d'une participation du tonoplaste (de même que RAININA *et al.*, 1979) et/ou du plasmalemma (comme LINNEMANS *et al.*, 1977) à la synthèse de l'enzyme (fig. B). Dans le premier cas le transport de phosphatase acide au niveau de l'espace périplasmique se ferait par l'intermédiaire d'un système de vésicules ("Flat vesicles" de VAN RIJN *et al.*, 1975 ou "peripheric vesicles" de BOHM et UNGER, 1979 chez

Saccharomyces cerevisiae) fusionnant avec le plasmalemme. La deuxième hypothèse quant à elle est en accord avec les résultats biochimiques de WELTEN-VERSTEGEN (1981) qui démontrent la présence de précurseurs du glycoenzyme dans le plasmalemme.

Les résultats de cette étude cytochimique ne nous permettent pas de préciser les différentes séquences de l'élaboration de l'enzyme. Mais l'évolution du marquage (organites cytoplasmiques → plasmalemme → enveloppe cellulaire) au cours de la différenciation, nous paraît être un argument en faveur d'un processus de sécrétion identique à celui établi chez les cellules eucaryotes animales ou végétales.

C) Problème de l'élaboration et de l'évolution de l'enveloppe cellulaire

Considérant la phosphatase acide comme molécule représentative de l'ensemble des mannoprotéines pariétales, LINNEMANS *et al.*, (1977) ont développé un modèle théorique de construction des parois chez *Saccharomyces cerevisiae*, basé sur la localisation de l'enzyme dans l'enveloppe cellulaire. Celui-ci comporte deux étapes successives et indépendantes dans l'assemblage des composants pariétaux. Au cours de la première, la paroi est édiflée chez le bourgeon grâce à des matériaux d'origine cytoplasmique. Elle est ultérieurement complétée chez les cellules âgées par une couche plus épaisse déposée par l'intermédiaire du plasmalemme.

Aucun argument ne nous permet de tirer de telles conclusions quant à l'élaboration des parois de *Candida albicans*. Une précision intéressante cependant concerne l'origine des composants pariétaux, à la fois du bourgeon et des tubes germinatifs. Il est clair en effet que les processus de bourgeonnement et de blastèse n'affectent pas de la même manière la paroi des cellules parentales. A cela deux explications : soit, les mannoprotéines superficielles des formes mycéliennes tirent leur origine de la paroi des blastospores, alors que celles qui sont incorporées à la surface du bourgeon doivent être nouvellement synthétisées ; soit la sécrétion de l'enzyme s'effectue préférentiellement au niveau des formes mycéliennes.

De nombreux indices sont en faveur d'une migration de l'enzyme, de son site de stockage primitif qu'est l'espace périplasmique, vers la surface de la paroi qui pourrait constituer sa localisation terminale, avant son élimination dans le milieu extérieur. Les dépôts de phosphate de plomb intrapariétaux observés ne constituent donc que des étapes intermédiaires dans l'élaboration de la zone externe à activité phosphatasique acide. L'hypothèse d'une diffusion de l'enzyme au cours de sa détection nous paraît à exclure en raison des réserves évoquées plus haut, et principalement parce que cette évolution est concentrique, et se superpose à la stratification pariétale bien connue chez *Candida albicans* (POULAIN 1982). De tels arguments ultrastructuraux suggèrent en fait une édification discontinue de la paroi en fonction du cycle cellulaire, les dépôts observés correspondant en quelque sorte à des "anneaux de croissance". Proches de nos observations les résultats biochimiques de BIELY (1978) font état de l'inconstance et de la discontinuité du taux de synthèse de certains composants des parois de *Saccharomyces cerevisiae*.

D) Phosphatase acide extracellulaire et pathogénicité

La présence d'enzymes à la surface d'une cellule adaptée à la vie saprophytique et parasitaire comme *Candida albicans*, peut suivant les cas être un des éléments de sa pathogénicité, mais peut également constituer un mécanisme de protection. On peut en effet supposer qu'elle est impliquée dans les processus de pénétration tissulaire par lyse des composants cytoplasmiques (au même titre que pour certains parasites végétaux ou animaux) ou dans les modifications de surface, lors de l'adhérence aux cellules des muqueuses (destruction ou mise en évidence de récepteurs membranaires. Voir chapitre IV).

La présence d'une forte activité phosphatasique acide, mise en évidence de façon constante à la surface des éléments filamenteux est à ce titre significative de même que celle d'une phospholipase (PUGH et CAWSON, 1978). L'envahissement tissulaire s'opère en effet préférentiellement sous cette forme, et l'adhérence des tubes germinatifs aux cellules épithéliales est très nettement supérieure à celle des blastospores

(KIMURA et PEARSALL, 1980). L'absence d'activité détectée au niveau des parois chez des blastospores et tubes germinatifs incubés dans du sérum (peut-être par suite d'une inactivation de l'enzyme) est également révélatrice, dans le cadre de la pathogénicité des levures, de leur caractère d'adaptation au milieu ambiant.

Le rôle catabolique et la capacité digestive de la phosphatase acide, son abondance au niveau des parois, suggèrent une intervention dans la dégradation des macromolécules extracellulaires de certaines substances nutritives, suivant le schéma proposé par MAHVI *et al.*, (1974) chez *Cryptococcus neoformans*, ou d'une manière plus générale par HUGON et BORGERS (1968) au niveau des cellules intestinales de rongeurs. De la même manière, cette zone de forte activité enzymatique pourrait constituer un système protecteur de la cellule contre les produits de l'immunité ou des substances toxiques.

Enfin concernant les deux souches étudiées, il est remarquable de constater que les différences d'activité enzymatiques se superposent aux différences antigéniques révélées lorsqu'elles sont confrontées à des sérums de malade ; le clone [32] s'avère en effet toujours plus réactif que la souche L dans ces conditions (POULAIN *et al.*, 1980). Il faut noter de plus, que la souche la plus riche en phosphatase acide pariétale, est également celle qui révèle le plus d'anticorps lors du processus pathologique.

IV - CONCLUSION

Les processus évolutifs que nous venons de décrire sont à replacer dans un contexte plus général du "devenir" des composants pariétaux. Nos résultats démontrent en effet que certaines des glycoprotéines de l'espace périplasmique, après avoir migré dans le squelette microfibrillaire glucane-chitine, se disposent en strates dans la matrice pariétale, puis sont déposées à la périphérie des levures. Elles s'incorporent alors au revêtement pariétal, structure labile et perpétuellement renouvelée. Ce schéma est en accord avec une conception dynamique de l'enveloppe cellulaire qui vise à considérer la paroi non plus comme une région inerte, mais plutôt comme le reflet de l'activité métabolique de la cellule qu'elle entoure.

CHAPITRE III

REGENERATION DES PAROIS ET MODIFICATIONS CELLULAIRES ASSOCIEES

I - INTRODUCTION

La plupart des études ultrastructurales réalisées sur les protoplastes de cellules eucaryotes concernent les différentes étapes de la régénération des parois (URUBU et *al.*, 1968 ; NECAS, 1971 ; VAN DER VALK et WESSELS, 1976). Dans tous les systèmes étudiés, les premières structures à être déposées sont les composants fibrillaires (glucanes, chitine) qui sont recouverts ensuite par une matrice amorphe. Certains travaux effectués sur les levures (NECAS et SVOBODA, 1976) ont toutefois clairement démontré que les phénomènes de régénération ne reflètent pas seulement la capacité des cellules à reconstituer leur paroi. Plus qu'un simple renouvellement des structures pariétales, interviennent, en particulier dans le cytoplasme, des mécanismes régulateurs complexes, responsables du maintien de l'intégrité cellulaire.

L'étude de la régénération des protoplastes constitue donc une bonne approche pour apprécier le comportement des structures cellulaires impliquées dans la reconstitution de la paroi. Parmi celles-ci, le plasmalemma, et certains organites cytoplasmiques comme l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique ou les vacuoles, dont le rôle dans l'élaboration et la mise en place des composants pariétaux fait encore l'objet d'avis discordants. (MATILE et *al.*, 1969. NECAS et SVOBODA, 1974 ; MOELLER et THOMSON, 1979 a et b ; NECAS et *al.*, 1981).

De plus, la détection de sites récepteurs à la Con A sur des membranes plasmiques et vacuolaires isolées (BOLLER et *al.*, 1976) nous a incité à reprendre l'étude de leur distribution *in situ* chez des protoplastes en régénération. Pour mieux apprécier les diverses modalités de reconstitution des parois et les remaniements cellulaires qui leur sont associés, deux milieux de régénération différents par leur teneur en glucose ont été utilisés.

Ces résultats ont fait l'objet des publications suivantes :

TRONCHIN G., POULAIN D., HERBAUT J. et BIGUET J., 1982. Aspects ultrastructuraux et cytochimiques de la régénération des sphéro-protoplastes chez *Candida albicans*. Ann. Microbiol. (Inst. Past.), 133 A, 275 - 291.

TRONCHIN G., POULAIN D., HERBAUT J. et BIGUET J., 1982. Localisation intracellulaire et pariétale des sites récepteurs à la Con A : Application à l'étude ultrastructurale des mécanismes de régénération chez les levures (*Candida albicans*) Biol. cell., 46, 85 - 92.

II - RESULTATS

A) STRUCTURE DES SPHERO-PROTOPLASTES FRAICHEMENT OBTENUS

L'examen de levures traitées par la pronase et la chitinase dans les conditions énoncées au chapitre Matériel et Méthodes, démontre l'hétérogénéité de l'attaque enzymatique. Celle-ci s'observe à l'intérieur d'une population cellulaire où les bourgeons et les éléments mycéliens sont plus facilement débarrassés de leur paroi que les cellules parentales (figs. 115 - 116). De la même manière, sur une même blastospore on note la présence contigüe de zones sensibles et résistantes (figs. 116). Ces dernières se situent le plus souvent aux 2 pôles de la cellule, au niveau des cicatrices de naissance et de bourgeonnement (figs. 117 - 118).

Sur de nombreuses cellules, le traitement enzymatique aboutit à l'extraction de la plus grande partie des différents composants pariétaux, principalement des constituants polyosidiques colorés par la technique de THIERY (figs. 119 a et b). Seules demeurent quelques franges protéiques résiduelles (figs. 120 a et b). Les sphéro-protoplastes obtenus sont en outre caractérisés par des organites cytoplasmiques mal définis, et le plus souvent altérés.

B) REGENERATION DES SPHERO PROTOPLASTES

a) Manifestations propres à un milieu riche en glucose (20g/l)

1 - Glycogène et plasmalemme

Les modifications structurales les plus remarquables révélées par l'examen des sphéro-protoplastes après 1/2 heure de régénération concernent l'élaboration de constituants glucidiques et l'évolution du plasmalemme. Des particules de glycogène, intensément colorées par la coloration acétate d'uranyle - citrate de plomb (fig. 123) et par la technique

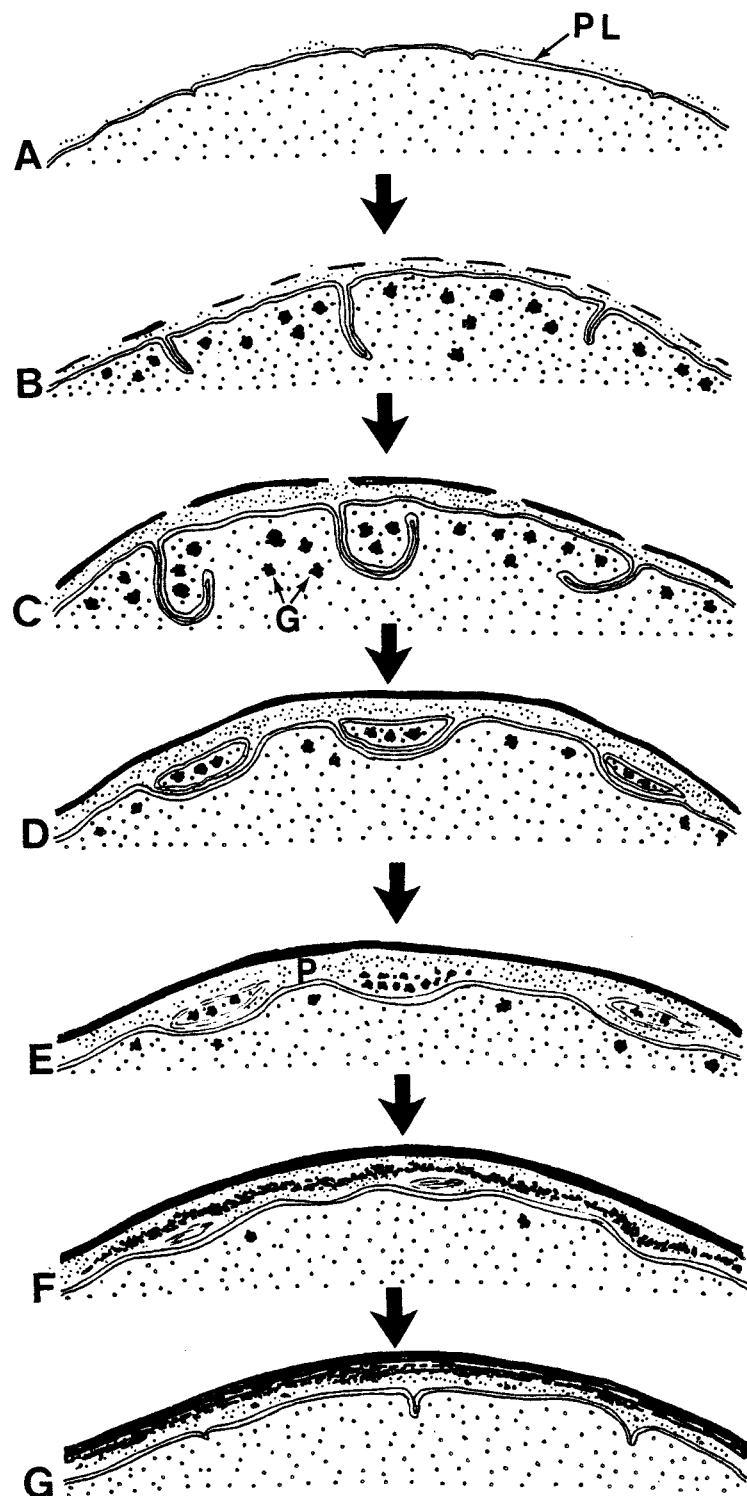


Figure A : Représentation schématique et interprétation des phénomènes observés lors de la régénération des parois.

A = sphéro-protoplaste.

B et C = 30 min de régénération : synthèse de glycogène ; croissance et inflexion des invaginations membranaires.

D et E = 1 h de régénération : fusion des invaginations avec le plasma-lemme et rejet dans la paroi des territoires cytoplasmiques ainsi délimités. F = 2 h de régénération : lyse des membranes et association des particules polysidiques libérées.

G = 4 h de régénération : incorporation des couches néoformées aux zones pariétales préexistantes. (P, paroi ; PL, plasmalemme ; G, glycogène).

de THIERY après 24 heures d'action du TCH (fig. 121), sont abondantes à la périphérie des cellules. En allégeant les conditions de traitement (TCH d'une heure), ces particules sont insuffisamment contrastées (fig. 122). La spécificité de la réaction est attestée par l'absence de coloration des témoins (figs. 124, 125, 126). A ce stade la paroi apparaît encore peu organisée, constituée d'une matrice protéique homogène présentant une grande affinité pour l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (fig. 123), et recouverte par place de dépôts polysaccharidiques (fig. 121).

La présence en abondance de glycogène s'accompagne d'une extension considérable des invaginations du plasmalemme, certaines d'entre elles pouvant atteindre jusqu'à 2 μ m de longueur sur des sections transversales de levures. Ce phénomène est particulièrement net sur des blastospores coupées tangentiellement (fig. 131). L'accroissement s'effectue tout d'abord vers le cytoplasme, puis ces expansions s'infléchissent en direction du plasmalemme avec lequel elles fusionnent (figs. 127, 132) délimitant ainsi de petits îlots cytoplasmiques entourés par une membrane unitaire (figs. 128, 133). Ceux-ci sont progressivement repoussés vers la périphérie (fig. 129). Ultérieurement, l'observation révèle au sein de la paroi, et suivant le type de coloration utilisé, soit des masses denses aux électrons contenant des ribosomes (fig. 130), soit des territoires plus clairs avec ou sans particules de glycogène (figs. 134, 135). Dans les deux cas, la membrane limitante apparaît de plus en plus altérée au fur et à mesure que l'on s'éloigne du cytoplasme. Les particules polysaccharidiques réactives ainsi libérées (figs. 136, 139) apparaissent ensuite réparties concentriquement en couches d'aspect homogène au sein de la paroi (fig. 137). Le processus dans son ensemble est représenté schématiquement sur la figure A.

Après 4 heures de régénération la paroi présente son aspect classique, en particulier les couches polysaccharidiques externes sont reconstituées. A ce stade également la plupart des cellules sont engagées dans des processus de division.

2 - Les organites cellulaires

α) Appareil de Golgi et réticulum endoplasmique

Parallèlement à l'évolution précédente, on remarque

au niveau cytoplasmique, le développement d'une structure finement marquée sous forme soit d'un réseau alvéolaire "en nid d'abeille", soit d'un empilement lamellaire grossier (figs. 138, 142, 143). Cette formation que nous n'avons jamais observée en dehors des phénomènes de régénération, présente une certaine parenté avec l'appareil de Golgi tel qu'il a été décrit chez d'autres levures. Les dépôts d'argent sont également importants dans les cavités dilatées du réticulum endoplasmique périphérique (figs. 135, 140). Des amas de petites vésicules sont occasionnellement rencontrés le long du plasmalemme (fig. 141).

β) Les vacuoles

Chez les sphéro-protoplastes, la vacuole possède une forme irrégulière et occupe une grande partie de la cellule. Elle présente un contenu épars peu contrasté (fig. 144). Au fur et à mesure de la régénération, la vacuole centrale se fragmente en unités plus petites (fig. 145), qui apparaissent progressivement sphériques et remplies d'un matériel dense aux électrons (figs. 146, 147 et 148). De nombreuses figures d'autophagies sont observables au cours de cette période. Elles proviennent de la phagocytose d'éléments divers : territoires cytoplasmiques avec ribosomes, globules lipidiques, particules de glycogène, mitochondries (figs. 144, 146 et 148).

b) Manifestations propres à un milieu pauvre en glucose (1g/l)

Lorsque la régénération est réalisée dans un milieu appauvri en glucose, les invaginations du plasmalemme et les particules de glycogène sont absentes, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique apparaissent peu développés. En revanche, un matériel amorphe tapisse le tonoplaste et constitue parfois des amas plus grossiers adhérents à la membrane vacuolaire et à ses bourgeonnements, ou libres dans la vacuole (figs. 160, 161, 162). Ce matériel fait l'objet d'un marquage intense avec la Con A et le mannosyl ferritine (fig. 163), qui révèlent par ailleurs l'existence de 2 types de vésicules intracytoplasmiques (fig. 166).

c) Manifestations communes aux deux milieux de régénération

Aucun marquage de la vacuole et du plasmalemme des sphéro-

protoplastes fraîchement obtenus n'est observé avec la Con A et le mannosyl ferritine (fig. 152). En revanche, les particules de ferritine apparaissent régulièrement réparties le long du feuillet interne du tonoplaste au cours des processus de régénération cellulaire (figs. 149, 150, 151), et la réaction s'intensifie au fur et à mesure de leur déroulement. Cette technique révèle en outre l'absence de sites récepteurs à la lectine au niveau d'invaginations du tonoplaste provoquées par la pénétration des globules lipidiques dans la vacuole (figs. 164, 165).

Après 1/2 heure de régénération, la surface externe du plasmalemma est régulièrement marquée (fig. 153), alors que quelques sites récepteurs à la Con A sont détectés par place sur le feuillet interne (fig. 154). Il faut cependant remarquer, malgré le manque de définition des images observées, que les molécules de ferritine ne sont pas étroitement associées à la surface membranaire, mais situées à distance de celles-ci. Au fur et à mesure de la mise en place des différents constituants pariétaux, une partie importante de la paroi fait l'objet d'un marquage (figs. 155, 156, 159), tandis que le plasmalemma devient de moins en moins accessible aux marqueurs (fig. 157). Aucun marquage vacuolaire ou pariétal n'a été observé sur les sections contrôles en présence d' α -methyl -D- mannoside 0,2 M (fig. 158).

III - DISCUSSION

A l'exception des travaux de NECAS (1971, 1979) et de NECAS et al., (1974, 1976, 1981), le rôle du plasmalemma dans la biosynthèse et l'organisation des structures microfibrillaires pariétales au cours de la régénération, ainsi que l'intervention de vésicules d'origine golgienne ou ergastoplasmique dans le transport des composants matriciels, apparaissent comme une référence quasi permanente des auteurs souvent en contraste avec leur manque d'informations. Nous rapportons ici quelques aspects ultrastructuraux de la réponse cellulaire à l'action d'enzymes actifs sur la paroi. Ces résultats complètent nos connaissances sur la cytologie fonctionnelle encore mal connue de *Candida albicans* et apportent certaines informations originales sur les remaniements cellulaires associés à la reconstitution des parois chez les levures.

A) PLASMALEMME ET COMPOSANTS FIBRILLAIRES

Les invaginations du plasmalemmes sont reconnues comme des formations permanentes et caractéristiques des levures (MOOR et MUHLETHALER 1963, PREUSSER et ROSTEK, 1979, NECAS et *al.*, 1981), et leur accroissement considérable constitue l'observation la plus surprenante de cette étude. Certaines modifications structurales du plasmalemmes en relation avec les phénomènes de régénération avaient déjà été signalées chez *Schizosphaeria commune* (VAN DER VALK et WESSELS, 1976) et chez *Saccharomyces cerevisiae* (POPOV et *al.*, 1980 ; NECAS et *al.*, 1981). Mais c'est l'utilisation de la cryofracture qui a apporté les informations les plus spectaculaires et les plus convaincantes sur la différenciation des invaginations membranaires. En particulier, leur allongement apparaît être la conséquence de la migration dans le plan de la membrane, puis de l'arrangement bout à bout, des invaginations préexistantes (NECAS et SVOBODA, 1976). En plus des modifications dans leur répartition, leur nombre (environ $4,5/\mu m^2$ chez les cellules intactes) diminue chez les protoplastes en régénération ($1,6/\mu m^2$) pour atteindre une valeur normale après reconstitution des parois, où l'on observe des invaginations de petite taille régulièrement distribuées. Cette technique ne révèle d'autre part aucune modification dans la densité et la distribution des particules intramembranaires du plasmalemmes des protoplastes en régénération, même après traitement par des enzymes protéolytiques (NECAS et SVOBODA, 1974). Ce dernier résultat, ajouté au fait que les mêmes traitements enzymatiques n'affectent pas la synthèse des microfibrilles, avaient permis aux auteurs de suggérer une intervention du plasmalemmes au niveau du seul transport de macromolécules de glucanes préalablement synthétisés à la surface des protoplastes.

La présence de "corps périplasmiques" (ARNOLD et PRINGLE, 1980) et de "structures vésiculaires" (POPOV et *al.*, 1980) respectivement chez des protoplastes en régénération de *Saccharomyces rouxii* et *cerevisiae* est en accord avec nos observations, et confirme le rejet de constituants d'origine cytoplasmique dans la paroi. La disposition de réserves polysaccharidiques identifiées à du glycogène (MANNERS et WRIGHT, 1962 ; YAMAGUCHI et *al.*, 1974 ; RAJASINGHAM et CAWSON, 1980 b) à la périphérie de protoplastes en régénération, implique des relations étroites avec

le plasmalemme. Le passage du compartiment cytoplasmique vers le compartiment pariétal pose le problème de sa participation à l'élaboration des glucanes pariétaux. Celle-ci supposerait une dégradation du glycogène et la réorganisation des molécules de glucose libérées en glucanes. Une activité glucane synthétase a d'ailleurs été détectée sur la face cytoplasmique du plasmalemme (SHEMATEK et CABIB, 1980). Dégradation du glycogène et synthèse de macromolécules de glucanes pourraient avoir lieu au sein des vésicules cytoplasmiques refoulées dans la paroi. Deux arguments sont en faveur de cette hypothèse. D'une part les particules de glycogène ainsi isolées perdent progressivement leur organisation caractéristique initiale. D'autre part, la technique de cryofracture révèle dans ces vésicules la présence de structures microfibrillaires pouvant correspondre à des glucanes (POPOV et *al.*, 1980). Ceux-ci une fois libérés dans la paroi et après avoir atteint une concentration "critique", cristalliseraient et s'organiseraient en réseau microfibrillaire.

Les glucanes pariétaux et leurs précurseurs cytoplasmiques souffrent d'un manque évident de techniques cytochimiques permettant leur visualisation. L'autoradiographie à haute résolution après différents "pulse-chasse" n'a apporté que des informations très approximatives (NECAS 1971). Seule l'utilisation en microscopie de fluorescence de bleu d'aniline et de lacmoïde a fourni quelques résultats prometteurs chez les végétaux supérieurs (REYNOLDS et DASHEK, 1976).

B) PLASMALEMME ET COMPOSANTS MATRICIELS

La dispersion des molécules de ferritine dans une zone distante de la face externe du plasmalemme indique que les résidus glucidiques des glycoprotéines ainsi révélés constituent des chaînes de longueur importante, intermédiaire entre celles du plasmalemme et celles de la paroi. Cette hypothèse a été vérifiée chez *Saccharomyces cerevisiae* où les glycoprotéines marquées par la Con A apparaissent associées aux particules intramembranaires identifiées en cryodécapage (MAURER et MUHLETHALER, 1981). Etant donné que chaque particule est susceptible de fixer 36 à 44 molécules de lectine, la longueur des chaînes polysaccharidiques s'établit entre 150 et 350 nm.

Les plasmalemmes isolés de protoplastes de levures possèdent un taux élevé de glucides (rapport sucres/protéines >15). Ce dernier est considérablement diminué en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide (SANTOS et *al.*, 1978). De telles observations, ajoutées à la mise en évidence d'activités glucosyl et mannosyl transferase à ce niveau, ont conduit les auteurs à suggérer que les glucides membranaires ne sont pas uniquement des composants de glycoprotéines structurales, mais également de glycoprotéines pariétales transportées au travers du plasmalemme, et activement secrétées. Ce serait notamment le cas pour l'invertase associée au plasmalemme et précurseur de l'invertase extracellulaire (RODRIGUEZ et *al.*, 1978 ; MAURER et MUHLETHALER, 1982).

Il est généralement admis que les membranes plasmiques et les endomembranes des cellules animales (NICOLSON et SINGER, 1974) présentent une distribution asymétrique de leurs résidus glycosylés, exposés exclusivement sur les surfaces opposées au cytoplasme. Il en va de même pour des membranes vacuolaires, ou des plasmalemmes, isolés de protoplastes de levures (BOLLER et *al.*, 1976). La détection de sites récepteurs aux lectines sur les deux faces de la membrane plasmique a toutefois été signalée chez *Dictyostelium discoideum* (RYTER et HELLIO, 1980). En ce qui concerne les protoplastes en régénération, une telle distribution des sites récepteurs à la Con A pourrait correspondre à un transport au travers de la paroi, de glycoprotéines préalablement synthétisées au niveau des systèmes membranaires internes, selon l'hypothèse développée par SANTOS et *al.*, (1980) à propos de *Saccharomyces cerevisiae*. L'irrégularité du marquage observé sur la face interne du plasmalemme serait en faveur de l'existence de sites privilégiés impliqués dans ce transport. Toutefois, les images obtenues ne permettent pas d'écarter l'hypothèse de réactions localisées au niveau du réticulum endoplasmique périphérique, site préférentiel de synthèse et de glycosylation des protéines.

C) LES ORGANITES CELLULAIRES

a) Appareil de Golgi et réticulum endoplasmique

La rapidité de reconstitution des parois chez les protoplastes de *Candida albicans* suppose des mécanismes d'élaboration particulièrement

développés. Les réactions positives obtenues avec la technique de THIERY révèlent certains organites cellulaires impliqués dans le métabolisme glucidique. Il s'agit tout d'abord du réticulum endoplasmique périphérique (selon la nomenclature de MOOR, 1967). L'extension de ce système, et son hypertrophie à proximité du plasmalemme, constituent l'une des caractéristiques les plus remarquables des protoplastes en régénération (NECAS et SVOBODA, 1976). De plus son intervention dans la biosynthèse des mannanes est bien connue (CORTAT et *al.*, 1973 ; KOSINOVA et *al.*, 1974). Beaucoup plus rarement signalé, l'hyperdéveloppement d'une formation difficile à identifier sur de simples critères morphologiques, mais dont nous avons précédemment établi, à propos de la phosphatase acide, la parenté avec l'appareil de Golgi rudimentaire décrit chez certaines levures (KOPECKA, 1972 ; HAVELKOVA et MENSÍK, 1966). L'évolution du système réticulum endoplasmique - appareil de Golgi chez des protoplastes engagés dans la régénération, implique une intervention dans la synthèse et le transport de composants membranaires et/ou pariétaux. Le processus universellement invoqué à l'appui de cette dernière hypothèse est la décharge de vésicules golgiennes ou ergastoplasmiques au niveau du plasmalemme. Aucune tentative n'a malheureusement permis de visualiser ce phénomène, soit parce qu'il s'agit d'un processus extrêmement rapide interrompu au cours de la préparation des spécimens, comme l'ont invoqué NECAS et SVOBODA (1976) ; soit parce que ce transport s'effectue suivant d'autres mécanismes, dont nos résultats suggèrent l'existence. De fait, les quelques structures vésiculaires généralement observées quelque soit leur origine, ne peuvent à elles seules expliquer la rapidité de régénération des protoplastes de levures.

b) Les vacuoles

La vacuole, dont les activités enzymatiques sont nombreuses, constitue le site principal de stockage et de dégradation des constituants cytoplasmiques (MATILE et WIEMKEN, 1967 ; WIELKEN et *al.*, 1979) et en particulier des protéines comme en témoigne l'intensité des réactions obtenues après double coloration. Les processus de phagocytose à l'origine de cette incorporation de matériel semblent s'effectuer, en particulier pour les globules lipidiques, au niveau de zones du

tonoplaste dépourvues au moins transitoirement en sites récepteurs à la Con A. Proche de notre observation, la démonstration récente de MOELLER et THOMSON en cryodécapage (1979), selon laquelle la pénétration des globules lipidiques dans la vacuole s'effectuerait à la faveur d'invaginations du tonoplaste, dans des régions sans particules membranaires. Ces dernières pourraient donc être associées aux glycoprotéines révélées par la Con A, suivant une organisation comparable à celle du plasmalemme.

Lorsque la régénération est réalisée dans un milieu appauvri en glucose, les structures cytoplasmiques impliquées dans l'élaboration des parois apparaissent fondamentalement différentes de celles précédemment évoquées. Les invaginations du plasmalemme et les particules de glycogène sont absentes ; l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique apparaissent peu développés. Seul le tonoplaste fait l'objet d'un marquage. Dès lors, pour rendre compte de la reconstitution rapide des parois dans un tel système, il est nécessaire de savoir si le tonoplaste participe à une synthèse effective de matériel, et si le transport de ce matériel vers la paroi est assuré par l'intermédiaire de vésicules issues de la vacuole centrale.

L'existence d'un revêtement vacuolaire interne correspond davantage à une élaboration, plutôt qu'à une accumulation de matériel. Toutefois, si l'intensification du marquage par la Con A traduit un enrichissement du tonoplaste en glycoprotéines, les présentes observations ne permettent pas d'indiquer quelle est la contribution de ce système membranaire à l'élaboration des constituants pariétaux. En revanche, aucune structure cytoplasmique, à l'exception des membranes vacuolaires, n'est marquée par la Con A et le mannosyl ferritine. Cette spécificité permet donc de suivre l'évolution du tonoplaste au cours de la régénération. Dès lors, et dans la mesure où la fragmentation de la vacuole centrale est un processus bien établi (MATILE et *al.*, 1969), il devient logique d'admettre que les vésicules qui font l'objet d'un marquage par la ferritine prennent naissance à ce niveau. Elles pourraient correspondre à celles décrites par CORTAT et *al.*, (1972) qui contiennent une quantité importante de mannose. Les mannanes, principaux sites récepteurs de la Con A, sont en effet non seulement présents dans la vacuole (HORISBERGER et VONLANTHEN, 1977) mais sont également retrouvés au niveau du

plasmalemma (MATILE et *al.*, 1967), et distribués dans toute la paroi. Si l'existence d'un cycle vésiculaire impliqué dans le transport de matériaux constitue un mécanisme susceptible d'assurer la reconstitution des parois, aucune précision d'ordre ultrastructural ne peut être fournie actuellement sur le mode de déversement de ce matériel au niveau du plasmalemma. Quel que soit ce dernier, la vacuole des levures pourrait présenter une double activité : phagocytose et destruction des éléments usés ou synthétisés en excès, avec stockage et éventuellement remise en circulation de molécules provenant de cette dégradation ; et participation au maintien de l'intégrité cellulaire par synthèse et transport de constituants pariétaux.

IV - CONCLUSION

Dans le cas de *Candida albicans* les phénomènes morphologiques observés traduisent vraisemblablement l'amplification de processus banaux qui passent inaperçus dans les conditions normales de développement des cellules. Toutefois, on ne peut éliminer actuellement l'hypothèse qu'ils témoignent de réactions inhabituelles et originales consécutives au traumatisme causé par le traitement enzymatique, dans les conditions de l'expérimentation. En particulier, la présence de structures vésiculaires refoulées dans la paroi, pourrait être en rapport avec le rejet de portions de cytoplasme ou de plasmalemma dénaturées. En tout état de cause, ces phénomènes traduisent les remarquables capacités d'adaptation de ces organismes à leur environnement.

CHAPITRE IV

L'ADHERENCE AUX CELLULES

EPITHELIALES

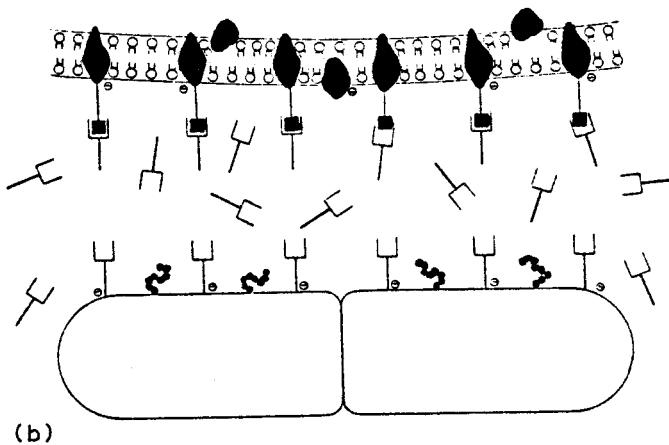
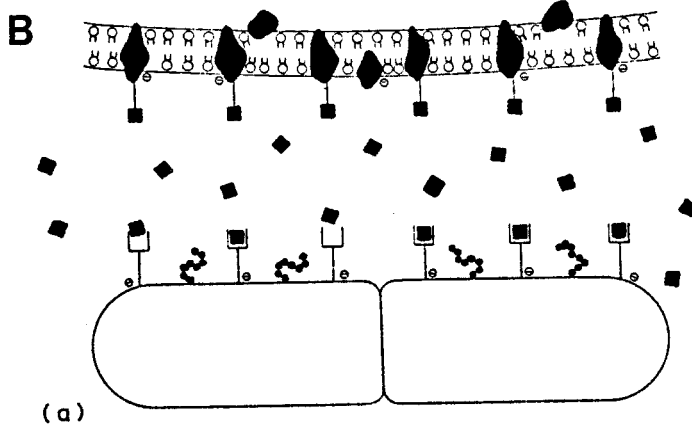
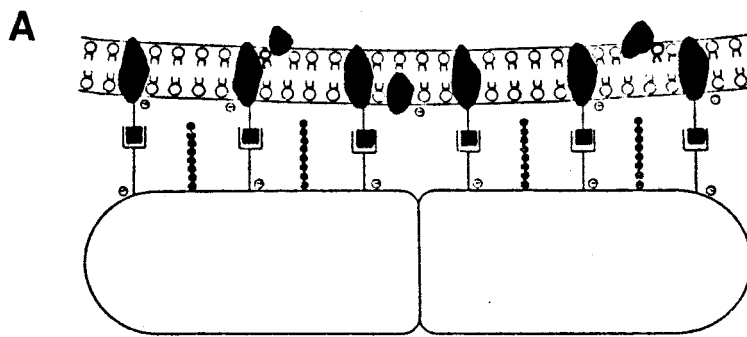


Figure A : Attachement d'une bactérie à la membrane d'une cellule animale par l'intermédiaire de ligands spécifiques (Y) et de récepteurs complémentaires (■). ⊖, Charges négatives ; ♦, molécules hydrophobes de la bactérie. U, phospholipides de la membrane cellulaire. ●, protéines membranaires (d'après BEACHEY, 1980).

Figure B : Blocage spécifique de l'adhérence par un excès (a) de récepteurs (■) ou (b) de ligands (Y). (d'après BEACHEY, 1980).

I - INTRODUCTION

L'adhérence des microorganismes, principalement des bactéries, puis tout récemment des levures, a fait l'objet d'attentions particulières en tant qu'étape décisive de l'infection bactérienne ou fongique. L'interaction microorganisme surface tissulaire est si complexe qu'elle représente la somme de processus (mobilité, attraction, pénétration dans un gel muqueux et fixation à ses récepteurs, adhérence à la surface cellulaire, et finalement élaboration de toxines ou pénétration dans les tissus) difficiles à tester sur un seul modèle. Puisque les interactions initiales constituent des phénomènes de surface, les expérimentateurs ont surtout recherché les molécules susceptibles de s'attirer et de se fixer les unes aux autres à l'aide de modèles expérimentaux développés *in vitro*. Globalement (fig. A), bactéries ou levures peuvent être considérées comme des particules chargées négativement et recouvertes de molécules ou ligands (BEACHEY, 1980), qui possèdent la capacité de se fixer spécifiquement à des molécules réceptrices situées à la surface, également négativement chargée, des membranes cellulaires. Des molécules hydrophobes interagissent pour contrebalancer les charges répulsives négatives, et permettre secondairement l'interaction spécifique ligand-récepteur. En conséquence, ces phénomènes d'adhérence doivent être considérés non comme des interactions entre molécules, mais plutôt entre deux cellules.

L'interaction ligand-récepteur est comparable aux interactions mieux connues antigène-anticorps ou encore lectine-sucre. Sa spécificité peut, en pratique, être démontrée par un excès de ligands ou de récepteurs natifs (fig. B), par des traitements chimiques ou enzymatiques altérant les structures interagissant, ou encore en bloquant ligands ou récepteurs par des anticorps spécifiques.

Les molécules de ligand les mieux connus (BEACHEY, 1980) sont soit des protéines (pour *Escherichia coli*, les gonocoques et les mycoplasmes), la portion lipidique de glycolipides (pour les streptocoques du groupe A) ou des sucres et des glycoprotéines (pour *Streptococcus mutans*). A l'inverse, seules les fractions glycaniques des glycoprotéines ou des glycolipides ont été identifiées comme récepteurs à la

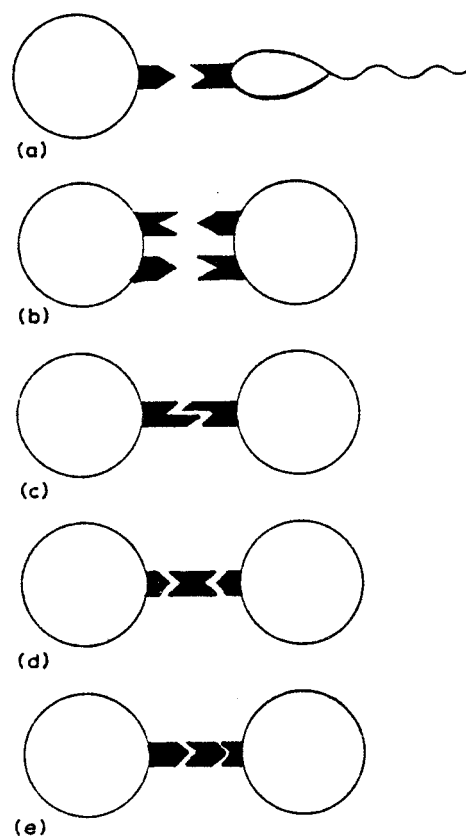


Figure C : Représentation schématique de différents types d'interactions cellulaires.

surface des cellules animales. En particulier le mannose pour *Escherechia coli* (OFEK et al., 1981) le fucose pour *Vibrio cholera* (JONES et al., 1976) ou encore des résidus β galactosyl pour *Escherechia coli* K. 88 (GIBBONS et VAN HOUTE, 1975). Récemment l'intervention de glycoprotéines membranaires telles que la fibronectine dans les phénomènes d'adhérence a été envisagée, et des lectines membranaires ont été caractérisées à la surface des nombreuses cellules (WOODS et al., 1981).

Ces interactions cellulaires, essentielles au fonctionnement de nombreux organismes, font intervenir (fig. C).

* soit des molécules complémentaires distribuées asymétriquement sur les membranes cellulaires, ou simultanément à la surface des 2 partenaires, ou encore portées par une même molécule membranaire.

* soit des molécules extramembranaires possédant des sites de fixation identiques, et facilitant l'interaction d'un même type cellulaire ; ou possédant des sites différents provoquant l'interaction de types cellulaires hétérologues.

II - GENERALITES

"Tenter de comprendre l'adhérence cellulaire revient à la position d'un homme aveugle examinant un éléphant : ce qu'il décrit dépend essentiellement de la zone qu'il touche". Cette phrase empruntée à GINGELL et VINCE (1980) dans leur revue générale sur les phénomènes d'adhérence, nous semble parfaitement illustrer la situation actuelle de nos connaissances sur l'adhérence *Candida albicans*, tant les modèles expérimentaux sont nombreux et les résultats qui en découlent parfois fort différents, voir contradictoires. L'analyse de quelques publications récentes en fournit une éloquente démonstration.

Contrairement à d'autres microorganismes, l'adhérence de *Candida albicans* à un support n'est nécessaire ni à sa survie, ni à sa multiplication, ni même à un quelconque mouvement de glissement. On peut simplement supposer qu'elle représente la première étape de phénomènes plus complexes, telle que la colonisation de surfaces qui ne constituent pas forcément un environnement hospitalier, et pour laquelle doivent être développés des mécanismes de fixation efficaces. Le support mécanique offert par la cellule hôte et l'association intime entre paroi et membrane plasmique permet alors la croissance de la cellule fongique, principalement sous forme mycelienne (HOWLETT et SQUIER, 1980), et secondairement l'invasion tissulaire qui s'effectue à distance du site d'attachement de la blastospore parentale.

A) CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les cellules de l'épithélium buccal, digestif ou vaginal, isolées, ou en cultures organotypiques ou cellulaires, les cellules hela en culture monocouche, les caillots de fibrine, les phagocytes, constituent les supports naturels les plus fréquemment utilisés pour tester l'adhérence de *Candida albicans*. Il en est de même pour les surfaces acryliques, en tant que supports inertes, recouvertes ou non de substances organiques (salive, sérum, etc...). Les modes d'incubation, suspension ou sédimentation, mettent en jeu différentes forces permettant le contact des deux partenaires de l'adhérence, mouvements browniens dans le 1er cas, gravité dans le second.

Si pour la majorité des auteurs, la température optimale d'incubation se situe autour de 37°C, des variations considérables persistent dans les concentrations en levures (de 5×10^5 à 5×10^8) et en cellules épithéliales (2×10^4 à 2×10^5), dans les ratios cellules épithéliales - levures (de 1 pour 5 à 1 pour 500) et dans les temps d'incubation (de 1/2 heure à 3 heures). De telles variations, à priori d'intérêt secondaire, peuvent considérablement influencer sur les résultats, dans le cas par exemple, de l'intervention de "facteurs d'aggrégation" secrétés par les levures.

De la même manière, l'adhérence maximale se situe à pH 7,3 pour KING et *al.*, (1980), pH 6 pour SOBEL et *al.*, (1981) et pH 3 pour SAMARANAYAKE et MACFARLANE (1982). Enfin, et surtout, aucune méthode d'évaluation de l'adhérence ne s'est encore réellement révélée efficace.

B - FACTEURS INFLUENÇANT L'ADHERENCE

a) Espèces, viabilité, et formes culturelles

Parmi les différentes espèces testées, *Candida albicans* est celle qui présente la plus grande capacité à adhérer aux caillots de fibrine (MAISCH et CALDERONE, 1980) et aux cellules de l'épithélium buccal et vaginal (KING et *al.*, 1980). *Candida tropicalis* et *stellatoïdea* adhèrent plus modérément, alors que les autres espèces présentent peu ou pas d'interactions avec le substratum. Cet attachement est fonction de la viabilité des levures. Les blastospores tuées par la chaleur ou le formaldéhyde adhèrent moins que les blastospores vivantes (MAISCH et CALDERONE, 1980 ; SOBEL et *al.*, 1981), et les blastospores en phase logarithmique moins que celles en phase stationnaire (KING et *al.*, 1980). Enfin, seul résultat à n'être pas contesté, ce sont les tubes germinatifs qui présentent la plus grande adhérence, indépendamment d'ailleurs de leur viabilité (DIAMOND et KREZESICKI, 1978 ; KIMURA et PEARSALL, 1980 ; SAMARANAYAKE et MACFARLANE, 1982 ; SANDIN et *al.*, 1982).

b) Lectines et sucres

Parmi les nombreuses lectines testées, seule la Con A inhibe l'adhérence des blastospores ou des tubes germinatifs aux cellules épithéliales, que ce soit les levures ou les cellules épithéliales qui

aient été traitées par la lectine (SANDIN et ROGERS, 1982; SANDIN et *al.*, 1982). Cette inhibition est levée lors d'une préincubation de la lectine avec l' α -D-méthylmannopyranoside.

De nombreux effets contradictoires ont été rapportés pour les sucres :

- l'addition d' α -D-méthylmannopyranoside entraîne une réduction importante de l'adhérence aux cellules buccales alors que d'autres sucres (D-ribose, D-galactose, N-acetyl-D-glucosamine ou α -D-méthylglucopyranoside) sont pratiquement sans effets (SANDIN et *al.*, 1982).

- une préincubation des blastospores dans du mannose, du galactose ou dans l' α -D-méthylmannopyranoside ne modifie pas l'adhérence alors que l' α -D-(+) et α -L(-) fucose la diminuent de 25 %.

- des mannanes extraits de *Candida albicans* à des concentrations de 1 à 10 mg/ml inhibent l'attachement aux phagocytes (DIAMOND et KREZESICKI, 1978).

- une préincubation des blastospores dans du sucrose stimule l'adhérence des formes vivantes, mais demeure sans effet sur les levures tuées (SAMARANAYAKE et MACFARLANE, 1980).

- enfin, des études plus complètes de Mc COURTIE et DOUGLAS (1981), et de DOUGLAS et *al.*, (1981), sont en faveur d'une augmentation de l'adhérence aux surfaces acryliques des levures cultivées sur des milieux riches en sucres. Cette augmentation qui s'observe avec la plupart des sucres, et principalement avec le galactose et le maltose, est proportionnelle à la concentration en sucre du milieu de culture. Elle pourrait être en relation avec des changements de composition de paroi manifestés par une résistance accrue à l'obtention de protoplastes, et au développement d'une couche granulo-fibrillaire à la surface des parois.

c) Enzymes et cations

Un prétraitement de l'un des 2 partenaires de l'adhérence par

des enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, pronase) diminue considérablement l'adhérence des blastospores, germées ou non, aux caillots de fibrine (MAISCH et CALDERONE, 1980), aux cellules de l'épithélium buccal ou vaginal (SOBEL et *al.*, 1981) et aux phagocytes (DIAMOND et KREZESICKI 1978). En revanche l'addition de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , et de FeCl_2 augmente l'adhérence aux surfaces acryliques (Mc COURTIE et DOUGLAS, 1981).

d) Salive - sérum - filtrat de culture

L'action de la salive est parmi l'une des plus étudiées du fait même que *Candida albicans* colonise fréquemment les muqueuses buccales. Au contraire de Mc COURTIE et DOUGLAS (1981) qui signalent une inhibition de l'adhérence des levures aux supports inertes traités par la salive, ou après son addition au milieu d'incubation, KIMURA et PEARSALL (1978), et SAMARANAYAKE et MACFARLANE (1982), rapportent une augmentation de l'adhérence des blastospores préincubées 90' à 37° C dans la salive, ou lorsque celle-ci est utilisée comme milieu d'incubation.

L'adhérence de blastospores tuées préincubées dans du sérum sain, ou dans un immun sérum anti-*Candida albicans*, diminue respectivement de 40 et 100 % (MAISCH et CALDERONE, 1980). En revanche le prétraitement des cellules hôtes par un sérum sain n'a aucun effet sur l'adhérence (SAMARANAYAKE et MACFARLANE, 1982).

Enfin, un surnageant de blastospores germées et tuées aurait une action inhibitrice sur l'adhérence (SOBEL et *al.*, 1981).

e) Les germes

La microflore de la bouche, du tube digestif, et du vagin, peut affecter la colonisation des muqueuses par des microorganismes comme *Candida albicans*, en entraînant une "compétition" pour les sites d'attachement aux cellules épithéliales. De fait, l'utilisation de cellules d'origine variée préalablement recouvertes de lactobacilles (SOBEL et *al.*, 1981) ou par certains streptocoques (SAMARANAYAKE et MACFARLANE, 1982) entraîne une réduction importante de l'adhérence des blastospores.

CONCLUSION

De la synthèse de ces différents travaux, les seules conclusions qui peuvent être objectivement retenues, sont :

* d'une part, que l'adhérence de *Candida albicans* est en relation avec des changements superficiels de sa paroi, susceptibles de survenir au cours de la transformation blastospore - tube germinatif.

* d'autre part, qu'elle pourrait impliquer un produit du métabolisme cellulaire des levures, probablement une mannoprotéine. Une étude très élégante de MAISCH et CALDERONE (1981), consistant à tester l'adhérence de différents extraits de parois de *Candida albicans* fixés par l'intermédiaire de Con A ou de périodate de sodium sur des hématies de mouton, a d'ailleurs très clairement démontré le rôle primordial joué par les mannanes pariétaux dans ces phénomènes.

Paradoxalement, aucune approche morphologique de l'adhérence de *Candida albicans* n'a à ce jour été effectuée. En entreprenant cette étude préliminaire, et grâce à notre acquis sur la cytochimie des parois de levures, notre but était triple :

1) mettre en évidence les structures pariétales impliquées dans l'adhérence.

2) définir le type d'interaction des levures avec leur substratum : interactions directes par l'intermédiaire de composants exclusivement membranaires et pariétaux ; interactions indirectes via des molécules libres reliant les deux types cellulaires.

3) enfin, tenter d'apprécier les éventuelles modifications pariétales qui accompagnent ces interactions

III - RESULTATS

Nos observations ont été réalisées après une demi-heure d'incubation dans du PBS à 37° C. A ce stade de nombreuses blastospores adhèrent étroitement aux cellules de l'épithélium buccal (figs. 167, 168) et

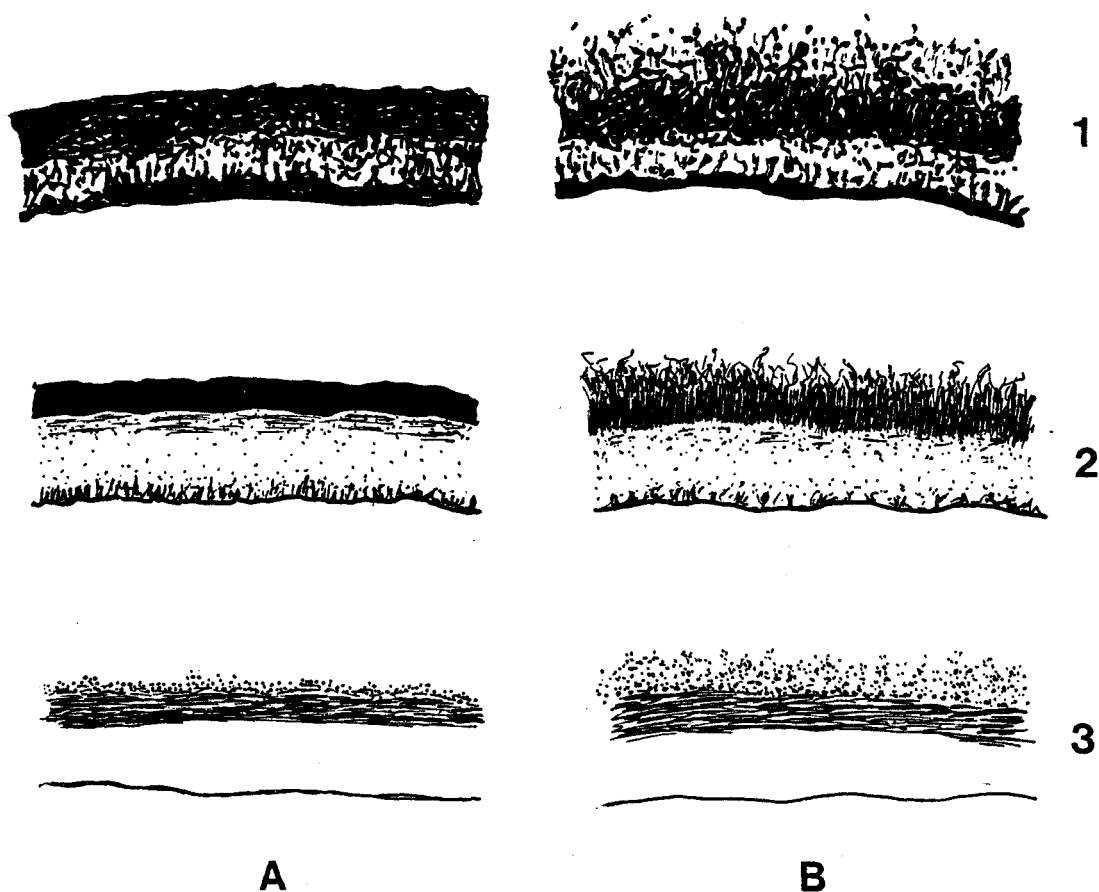


Figure D : Représentations de l'enveloppe cellulaire décalquées à partir de micrographies de blastospores au repos (A) ou adhérentes (B).
 1 - Coloration de Thiery. 2 - double coloration. 3 - Con A et Mannosyl ferritine.

aux villosités intestinales (figs. 169, 170, 171), tandis que les phénomènes d'invasion tissulaire ne sont pas encore initiés. Bien que la plupart des levures adhèrent directement aux cellules des muqueuses, des interactions entre levures sont fréquemment observées. Elles résultent soit d'une coadhérence de blastospores à des levures préalablement fixées à la muqueuse (fig. 170), soit à une autoagglutination dans le milieu d'incubation, en particulier pour les formes de blastèse (fig. 171).

A) MODIFICATIONS PARIETALES ASSOCIEES A L'INCUBATION DES BLASTOSPORES AVEC DES CELLULES DES MUQUEUSES BUCCALES OU INTESTINALES

Les principales modifications universellement révélées chez les blastospores adhérentes, mais également chez de nombreuses blastospores encore libres dans le milieu d'incubation, et quelle que soit la technique de coloration utilisée, concernent le revêtement pariétal. Tandis que la double coloration y révèle l'existence de fins filaments enchevêtrés disposés radiairement (figs. 172, 173), la coloration de Thiery met en évidence de nombreuses granulations réparties sur ces filaments ainsi que les ramifications dichotomiques de leurs extrémités (fig. 174). Enfin un marquage beaucoup plus intense des structures pariétales superficielles (nombre de particules de ferritine approximativement X 3 par rapport à des blastospores au repos), est observé avec la Con A et le mannosyl ferritine (fig. 176). L'examen des blastospores incubées seules dans les mêmes conditions révèlent également un marquage plus important du revêtement pariétal, et confirment sa relative facilité d'extraction (fig. 175).

Ces modifications apparaissent nettement par rapport à des blastospores au repos, en comparant les limites du revêtement pariétal décalquées à partir de micrographies de parois. L'hyperdéveloppement des structures pariétales superficielles est de cette manière clairement mis en évidence (fig. D).

B) OBSERVATION DES ZONES DE JONCTION BLASTOSPORES-CELLULES HOTES

L'observation en microscopie électronique de coupes, réalisées au niveau des zones de jonction blastospores - cellules épithéliales préalablement repérées sur coupes semi-fines, révèle deux types d'attachement :

1) soit par l'intermédiaire de matériel amorphe, peu contrasté par la double coloration ou la réaction de Thiery, mais bien marqué par la Con A et le Mannosyl ferritine (figs. 179, 180, 181). Le fait qu'aucune de ces trois techniques n'ait permis la détection de telles structures à la surface des cellules de l'épithélium buccal (figs. 177, 178), est en faveur de l'origine fongique de ce matériel.

2) soit un contact direct, membrane plasmique de la cellule épithéliale - revêtement pariétal superficiel de la blastospore. Dans ce cas, la jonction semble s'opérer préférentiellement par l'intermédiaire des granules périphériques précédemment décrits, qui viennent s'insérer à l'intérieur de la membrane plasmique de la cellule hôte (figs. 183, 184, 185). La zone de contact cellule épithéliale blastospore ne fait alors l'objet d'aucun marquage par la Con A et le Mannosyl ferritine (fig. 182).

IV - DISCUSSION

Les observations réalisées en microscopie électronique démontrent :

1) que l'adhérence de *Candida albicans* aux cellules hôtes est précédée par des modifications superficielles de sa paroi. Tout se passe en effet comme si une réorganisation spatiale des glycoprotéines du revêtement pariétal, permettant une meilleure accessibilité aux récepteurs cellulaires, était nécessaire à l'adhérence des levures. Ce fait est intéressant car dans de nombreux systèmes étudiés (voir BEACHEY, 1980), les modifications d'adhérence ne reflètent pas seulement des différences dans le nombre de molécules de ligand, mais surtout dans leur organisation ou dans leur présentation.

Les stimuli à l'origine de ces changements d'organisation du revêtement pariétal, agitation et/ou libération de composants d'origine épithéliale modifiant la composition du milieu d'incubation, restent à préciser. Leur nature est d'un intérêt considérable car toute modification intervenant dans l'environnement de la cellule fongique se traduit invariablement par des changements morphologiques de sa paroi. Or le milieu d'incubation cellules épithéliales/PBS constitue un véritable milieu

de culture pour les levures, et on comprend dès lors les résultats contradictoires obtenus suivant les concentrations en cellules épithéliales, ou suivant les temps d'incubation.

Nos observations sont à rapprocher de celles de Mc COURTIE et DOUGLAS (1981) et de SAMARANAYAKE et MACFARLANE (1980, 1981) qui rapportent des modifications pariétales, en particulier la production de structures polysaccharidiques à la surface des parois facilement relarguées dans le milieu ambiant, après augmentation de la teneur en sucres du milieu de culture.

2) l'intervention directe des structures glycoprotéiniques superficielles dans l'interaction cellule hôte - levure.

* soit en tant que ligand (impliquant la présence de molécules réceptrices membranaires type lectine à la surface des cellules buccales).

Le rôle des glycoprotéines, et plus particulièrement de leur partie saccharidique dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire n'est plus à démontrer (HUGHES, 1975). Le mannose en particulier est bien connu pour moduler l'adhérence d'*Escherichia coli* aux cellules buccales (OFEK et BEACHEY 1977, 1981). Si certaines glycoprotéines du revêtement pariétal, notamment des mannoprotéines, jouent un rôle prépondérant dans l'interaction substratum - levure, comme suggéré par MAISCH et CALDERONE (1981), celui-ci pourrait s'avérer beaucoup plus complexe qu'une simple intervention au niveau de l'interaction ligand - récepteur. En particulier, l'élimination continue de structures pariétales superficielles dans le milieu ambiant peut :

- démasquer des molécules de ligands sous-jacentes (tels que des résidus N-acetyl-D-glucosamine par exemple)

- modifier les charges nettes de surface des parois

- constituer un excès de ligand susceptible d'inhiber partiellement l'adhérence en se fixant sur les récepteurs des cellules hôtes (voir fig. B)

- enfin, grâce à leur contenu important en phosphatase acide,

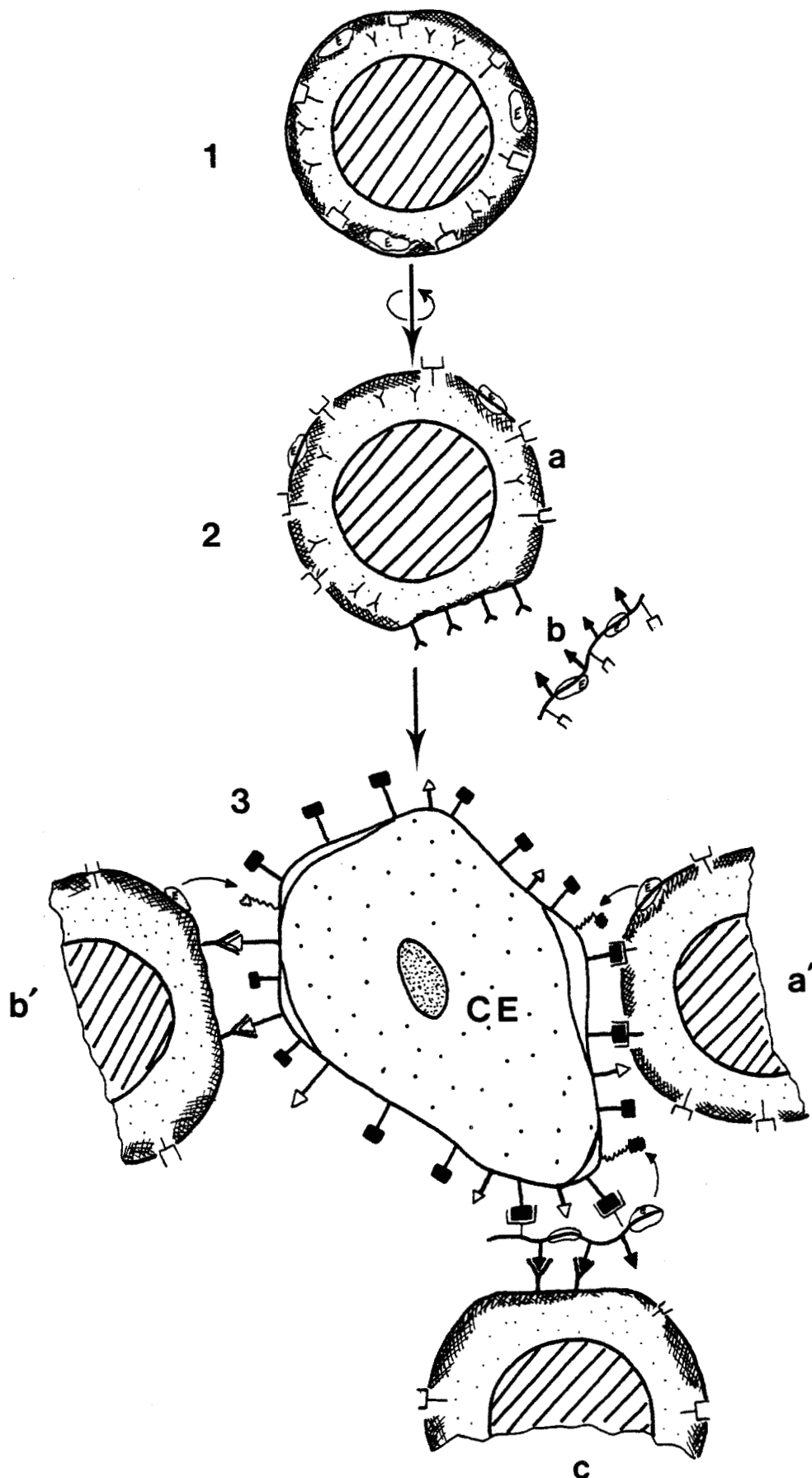


Figure E : Mécanismes hypothétiques d'attachement de *Candida albicans* aux cellules épithéliales in vitro.

1 - Blastospore au repos. 2 - Incubation en présence de cellules épithéliales. (a) réorganisation des structures superficielles modifiant la présentation des ligands (Y). (b) élimination d'éléments du revêtement pariétal démasquant d'autres ligands (Y). 3 - L'interaction levure/cellule épithéliale est alors possible soit directement par interactions ligands/récepteurs membranaires (a' et b') soit indirectement via des molécules éliminées dans le milieu d'incubation (c). E. enzyme. A. ■ récepteurs membranaires.

détruire ou démasquer des sites récepteurs, ou des charges négatives répulsives des cellules hôtes.

* soit en tant que "facteur d'aggrégation".

L'interaction levure - cellule hôte semble en effet dans certains cas s'effectuer via des molécules du milieu ambiant, vraisemblablement d'origine fongique. De telles associations bien connues chez certaines bactéries telles les streptocoques (GIBBONS et VAN HOUTE, 1975), pourraient constituer une étape préliminaire indispensable à l'adhérence proprement dite.

3) enfin, que les deux surfaces opposées sont séparées par un intervalle au moins égal ou inférieur à 12 nm. Les micrographies de levures sectionnées à leur point de contact avec la surface de la cellule hôte, après avoir été exposées à la Con A et au mannosyl ferritine, montrent que les particules de ferritine (d'un diamètre approximatif de 12 nm) ne pénètrent pas cette zone de jonction, malgré la présence à ce niveau de sites récepteurs à la Con A identifiés en microscopie de fluorescence. WARD and WATT (1975), à l'aide de thorium colloïdal, ont estimé à 13 nm la distance minimum entre l'enveloppe des gonocoques et la membrane de la cellule hôte, pour que soient vaincues les forces électrostatiques de répulsion, et que devienne possible l'interaction spécifique ligand-récepteur.

V - CONCLUSION

Le revêtement de surface des parois de *Candida albicans*, de nature glycoprotéinique, s'avère jouer un rôle essentiel dans les relations avec les cellules des muqueuses. Son intervention dans les phénomènes d'adhérence fait suite à des remaniements structuraux importants, favorisant l'interaction avec les récepteurs membranaires des cellules épithéliales. Mais ces interactions peuvent être modulées par l'élimination de composants superficiels de l'enveloppe cellulaire dans le milieu ambiant, notamment d'enzymes lytiques. La figure E tente de résumer ces différentes hypothèses.

CONCLUSION GENERALE

L'activité biologique des levures, orientée en grande partie vers l'édification d'une enveloppe protectrice et le maintien de son intégrité, constitue l'un des caractères les plus originaux de ces organismes. La possibilité de détecter d'une manière précise certains polymères des parois *in situ*, tout en ayant accès à la cellule fongique, prend dès lors tout son intérêt.

Notre travail a abordé différents aspects de ce phénomène. Il a consisté dans un premier temps en la mise au point d'une technique de préparation permettant de résoudre certaines difficultés posées par la présence d'une épaisse paroi. Il nous a alors été possible de préciser la localisation de constituants pariétaux, fondamentaux sur le plan structural tels que la chitine, ou par leurs propriétés antigéniques comme les mannanes. Nos résultats suggèrent en fait pour ces composants une distribution beaucoup plus complexe à l'intérieur de l'enveloppe cellulaire que celles initialement décrites. En particulier, l'existence de stratifications pariétales semble davantage refléter des rythmes dans la croissance de ces organismes, plutôt que constituer des entités structurales permanentes. Une telle discontinuité dans l'élaboration des parois est nettement objectivée par la localisation d'enzymes de l'enveloppe cellulaire telles que la phosphatase acide. Et la présence d'un revêtement pariétal activement secrété à la surface des levures confirme bien que la paroi n'est pas un simple tégument inerte, mais au contraire un complexe extrêmement changeant en fonction du cycle cellulaire. Dès lors, obtenir un développement synchrone de ces microorganismes apparaît comme une nécessité pour tenter de préciser l'organisation et l'évolution de leurs parois. L'application de méthodologies associant marqueurs spécifiques (anticorps ou lectines) à des digestions enzymatiques très purifiées, devrait alors permettre de progresser dans la connaissance des structures pariétales de levures.

D'autre part, nous avons été amenés à définir les caractéristiques ultrastructurales du cytoplasme de la cellule fongique. Parmi les nombreux travaux publiés dans ce domaine, notre contribution permet de préciser quelques éléments de la morphologie de *Candida albicans*. On a longtemps supposé que l'élaboration d'une enveloppe cellulaire, phénomène encore énigmatique, nécessitait l'intervention dans la synthèse, le

transport, ou la mise en place des composants pariétaux, d'organites cytoplasmiques propres aux levures. De fait, nous n'avons jamais observé de telles structures. La mise en évidence d'un appareil de Golgi et de lysosomes est au contraire en faveur d'une unité structurale avec les autres cellules eucaryotes. C'est donc surtout la présence de nombreuses enzymes impliquées dans le turnover des polymères pariétaux, principalement d'enzymes de synthèse, qui confère à ces organites des fonctions spécifiques, et qui caractérise ces éléments fongiques, plus que toute particularité morphologique de leur cytoplasme. Bien que la seule étude cytochimique ne suffise pas pour définir précisément le rôle de tous les organites cytoplasmiques, elle apporte néanmoins quelques éclaircissements sur l'évolution des vacuoles et du plasmalemme, au cours des phénomènes de régénération.

Par ailleurs, ces acquis fondamentaux nous ont amené à aborder des questions d'intérêt plus général. Ainsi l'adhérence qui constitue actuellement la principale préoccupation de biologie cellulaire pour *Candida albicans*. Notre approche de ce problème nous a permis de définir le type d'interactions à l'origine de ces phénomènes, et surtout de montrer qu'il nécessite de profonds remaniements de l'enveloppe cellulaire. Elle montre par ailleurs les limites des systèmes utilisés, et surtout combien sont difficiles à maîtriser les conditions expérimentales. Les surprenantes capacités d'adaptation de *Candida albicans* à son environnement rendent pratiquement vain tout traitement susceptible d'altérer chimiquement ou enzymatiquement ses composants pariétaux. Il en va de même pour les tentatives de stimulation ou d'inhibition de l'adhérence. De fait, ces résultats risquent d'aboutir à définir des mécanismes totalement différents de ceux rencontrés *in vivo*. Dans leur environnement naturel, les épithéliums sont en effet baignés par des glycoprotéines (cell coat, mucus, salive, etc...), dont certaines constituent des récepteurs spécifiques qui peuvent entrer en compétition avec ceux des membranes cellulaires. Bien que d'un passé récent, les travaux sur l'adhérence de *Candida albicans* doivent désormais s'orienter vers des modèles plus fiables. En particulier ceux visant à fixer les molécules pariétales à tester sur des particules inertes, et par conséquent à les isoler du reste de la cellule fongique, semblent promis à un meilleur avenir.

Elucider l'organisation de l'enveloppe cellulaire et ses mécanismes de mise en place, et mieux définir les interactions levure - cellule hôte requièrent nécessairement un éclaircissement des bases moléculaires de ces phénomènes. C'est en tout cas une orientation indispensable à leur compréhension.

REFERENCES



A

- AGAR H.D. & DOUGLAS H.C., 1957. Studies on the cytological structure of yeast : electron microscopy of thin sections. J. Bact. 73, 365 - 375.
- AGRAWAL B.B. & GOLDSTEIN I.J., 1968. Protein - carbohydrate interaction. Physical and chemical studies on Concanavalin A, the hemagglutinin of the jack bean. Arch. Biochem. Biophys. 24, 218 - 219.
- AINSWORTH S.K. & KARNOVSKY M.J., 1972. An ultrastructural staining method for enhancing the size and electron opacity of ferritin in thin sections. J. Histochem. Cytochem. 20, 225 - 229.
- ALLEN A.K., NEUBERGER A. & SHARON N., 1973. The purification, composition and specificity of wheat germ agglutinin. Biochem. J. 131, 155 - 162.
- ARAI T., MIKAMI Y., YOKOYAMA K., KAWATA T. & MASUDA K., 1977. Morphological changes in yeasts as a result of the action of 5 - fluorocytosine. Antimicrob. Agents and Chemotherapy. 12, 255 - 260.
- ARNOLD W.N., 1972. Location of acide phosphatase and β -fructofuranosidase within yeast cell envelopes. J. Bacteriol. 112, 1346 - 1352.
- ARNOLD W.N. & PRINGLE A.T., 1980. Scanning electron microscopy of cells and protoplasts of Saccharomyces rouxii. Current Microbiol. 3, 283 - 285.
- ARNOLD W.N., 1981. Yeast cell envelopes : Biochemistry, biophysics and ultra-structure (vol. 1 & 2). ARNOLD Edit., C R C. Press inc Boca Raton, Florida, U.S.A.
- ARNOLD W.N. & GARRISON R.G., 1981. Kinetic limitations on the trapping of nascent phosphate for cytochemical localization of yeast acid phosphatase. Current Microbiol. 5, 57 - 60.
- AUB J.C., TIESLAU C. & LANKESTER A., 1963. Reactions and tumor cell surfaces enzymes I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. Proc. Nat. Acad. Sci. (wash.) 50, 613 - 619.

B

- BACHI T. & SCHNEBLI H.P., 1975. Reactions of lectins with human erythrocytes II. Mapping of Con A receptors by freeze-etching electron microscopy. Exp. Cell Res. 91, 285 - 295.
- BACON J.S.D., DAVIDSON E.D., JONES D. & TAYLOR I.F., 1966. The location of chitin in the yeast cell wall. Biochem. J. 101, 36.
- BAHAREEN S. & VISHNIAC H.S., 1982. A fixation method for visualization of yeast ultrastructure in the electron microscope. Mycopath. 77, 19 - 22.
- BALDING P., 1981. Lectins : Sugar - Specific or receptor - Specific proteins ? In "Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Proceedings of the third lectin meeting - Copenhagen. vol. 1. P11-16. Walter de Gruyter edit. BERLIN - NEW YORK.

BALLOU C., 1976. Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. Adv. Microb. Physiol. 14, 93 - 157.

BARTNICKI-GARCIA S., BRACKER C.E., REYES E. & RUIZ-HERRERA J., 1978. Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils in vitro. Exp. Mycol. 2, 173 - 192.

BASTIDE J.M. & BASTIDE M., 1976 a. Les protoplastes de levures : application à la connaissance de la paroi et incidence taxonomique. Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd. 5, 3 - 6.

BASTIDE J.M., TRAVE P. & BASTIDE M., 1976 b. La formation de protoplaste par les champignons filamenteux et leur position systématique. C.r. hebdom. Séanc. Acad. Sci. Paris 238 D, 979.

BAUER H. & SIGARLAKIE E., 1973. Cytochemistry on ultrathin frozen section of yeast cells. Localization of acid and alkaline phosphatase. J. Microscopie 99, 205 - 218.

BAUMGARTNER B., LAMBILLOTTE M. & MUHLETHALER K., 1980. Immunochemical analysis of the plasma membrane from baker's yeast Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Cell. Biol. 23, 6 - 15.

BEACHEY E.H., 1980. Bacterial adherence. Receptors and recognition. Series B vol. 6. CHAPMAN & HALL eds. London and New York.

BENCHIMOL M., DE SOUZA W. & TRAVASSOS L.R., 1979. Distribution of anionic groups at the cell surface of different Sporothrix schenckii cell types. Infect. Immun. 24, 912 - 919.

BEN - ZE'EV A., BOREJDO J. & OPLATKA A., 1981. A rapid technique for the visualization of cytoskeletal elements using cationized ferritin. Cell. Biol. Int. Reports 5, 1127 - 1135.

BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P. & LACROIX J.C., 1977. Architecture moléculaire. In : "Biologie et physiologie cellulaire. I. Membrane plasmique, etc.." Hermann ed. Paris, 15 - 28.

BERNHARD W. & AVRAMEAS S., 1971. Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A. Exp. cell. Res. 64, 232 - 236.

BERTOLONI G., BASSI R., CONVENTI L. & BUSOLO F., 1980. An extramembranous structure on the surface of mycoplasma cells after staining with ruthenium red. Microb. Letters 14, 125 - 130.

BHATTACHARJEE A.K., KWON - CHUNG K.J. & GLAUDEMANS C.P.J., 1979. The structure of the capsular polysaccharide from Cryptococcus neoformans serotype D. Carbohydr. Res. 73, 183 - 192.

BHAVANANDAN V.P. & KATLIC A.W., 1979. The interaction of wheat germ agglutinin with sialo glycoproteins. The role of sialic acid. J. Biol. Chem. 254, 4000 - 4008.

BIELY P., 1978. Changes in the rate of synthesis of wall polysaccharides during the cell cycle of yeast. Arch. Microbiol. 119, 213 - 214.

BISHOP C.T., BLANK F. & GARDNER P.E., 1960. The cell wall polysaccharides of Candida albicans : glucan, mannan, and chitin. Can. J. Chem. 38, 869 - 881.

BLANQUET P.R., 1976. Ultrahistochemical study on the ruthenium red surface staining II. Nature and affinity of the electron dense marker. Histochemistry 47, 175 - 189.

BLOK J., MULDER-STAPEL A.A., GINSEL L.A. & DAEMS W.T., 1980. Binding of cationized ferritin to the cell coat glycoproteins of human and rat small intestinal absorptive cells. Histochem. 69, 131 - 135.

BOG-HANSEN T.C., 1981. Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry Proceedings of the third lectin meeting. Copenhagen. Vol. 1. Walter de GRUYTER edit. Berlin - New York.

BOHM K.J. & UNGER E., 1979. Ultracytochemical characterization of non specific acid phosphatase activities in Saccharomyces cerevisiae. Z. Allg. Mikrobiol. 19, 455 - 465.

BOLLER T., DURR M. & WIEMKEN A., 1976. Asymetric distribution of concanavalin A binding sites on yeast plasmalemma and vacuolar membrane. Arch. Microbiol. 109, 115 - 118.

BORGERS M. & DE NOLLIN S., 1974. The preservation of subcellular organelles of Candida albicans with conventional fixatives. J. Gen. Microbiol. 95, 335 - 347.

BOYD W.C. & REGUERA R.M., 1949. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. J. Immunol. 62, 333 - 339.

BOYD W.C. & SHAPLEIGH E., 1954. Specific precipating activity of plant agglutinins (lectins). Science 119, 419.

BRACKER C.E., RUIZ-HERRERA J. & BARTNICKI-GARCIA S., 1976. Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4570 - 4574.

BRAUN P.C. & CALDERONE R.A., 1978. Chitin synthesis in Candida albicans : comparison of yeast and hyphal forms. J. Bacteriol. 135, 1472 - 1477.

BRAUN P.C. & CALDERONE R.A., 1979. Regulation and solubilization of Candida albicans chitin synthetase. J. Bacteriol. 140, 666 - 670.

BRETTON R., CLARK D.A. & NATHANSON L., 1973. The cytochemical detection of Concanavalin A binding on cell surface by scanning electron microscopy. J. Microsc. (PARIS) 17, 93 - 96.

BRETTON R. & BARIETY J. 1976. A comparative ultrastructural localization of Concanavalin A, wheat germ and Ricinus communis on glomeruli of normal rat Kidney. J. Histochem. Cytochem. 24, 1093 - 1100.

BURGER M.M. & NOONAN K.D., 1970. Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumour cell surface. Nature (Lond.) 228, 512 - 515.

C

- CABIB E. & BOWERS B., 1971. Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars. J. Biol. Chem. 246, 152 - 159.
- CABIB E. & FARKAS V., 1971. The control of morphogenesis : an enzymatic mechanism for the initiation of septum formation in yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2052 - 2056.
- CABIB E., FARKAS V., ULANE R.E. & BOWERS B., 1973. Yeast septum formation as a model system for morphogenesis, p. 105 - 106. In J.R. VILLANUEVA, I. GARCIA-ACHA, S. GASCON, & F. URUBURU (Ed.). Yeast, mould and plant protoplasts. Academic Press Inc., New York & London.
- CABIB E., ULANE R. & BOWERS B., 1974. A molecular model for morphogenesis : the primary septum of yeast. Curr. Top. Cell. Regul. 8, 1 - 32.
- CABIB E. & BOWERS B., 1975. Timing and function of chitin synthesis in yeast. J. Bacteriol. 124, 1587 - 1593.
- CALAFAT J. & HAGEMAN P.C., 1972. Binding of Concanavalin A to the envelope of two murine tumour viruses. J. Gen. Virol. 14, 103 - 106.
- CASSONE A., SIMONETTI N. & STRIPPOLI V., 1973. Ultrastructural changes in the wall during germ-tub formation from blastospores of Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 77, 417 - 426.
- CASSONE A., MATTIA E. & BOLDRINI L., 1978. Agglutination of blastospores of Candida albicans by Concanavalin A and its relationship with the distribution of mannan polymers and the ultrastructure of the cell wall. J. Gen. Microbiol. 105, 263 - 273.
- CASSONE A., KERRIDGE D. & GALE E.F., 1979. Ultrastructural changes in the cell wall of Candida albicans following cessation of growth and their possible relationship to the development of polyene resistance. J. Gen. Microbiol. 110, 339 - 349.
- CASSONE A., MASON R.E. & KERRIDGE D., 1981. Lysis of growing yeast form cells of Candida albicans by echinocandin : a cytological study. Sabouraudia 19, 97 - 110.
- CAWSON R.A. & RAJASINGHAM K.C., 1972. Ultrastructural features of the invasive phase of Candida albicans. Br. J. Derm. 87, 435 - 443.
- CHATTAWAY F.W., SHENOLIKAR S., O'REILLY J. & BARLOW A.J.E., 1976. Change in the cell surface of the dimorphic forms of Candida albicans by treatment with hydrolytic enzymes. J. Gen. Microbiol. 95, 335 - 347.
- CHATTAWAY F.W. & HOLMES M.R., 1968. Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 51, 367 - 376.
- CLARKE J. & SHANNON L.M., 1976. The isolation and characterization of the glycopeptides from horseradish peroxidase isoenzyme c. Biochim. Biophys. Acta 427, 428 - 442.

CORTAT M., MATILE P. & WIEMKEN A., 1972. Isolation of glucanase - containing vesicles from budding yeast. Arch. Mikrobiol. 82, 189 - 205.

CORTAT M., MATILE Ph. & KOPP F., 1973. Intracellular localization of mannan synthetase activity in budding baker's yeast. Biochem. Biophys. Res. Communications. 53, 482 - 489.

COULET M., 1979. Lectines d'hier et d'aujourd'hui. Ann. Immunol. (Inst. Past.) 1, 2 - 16.

D

DANON D., GOLDSTEIN L., MARIKOVSKY Y. & SKUTELSKY E., 1972. Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. J. Ultrastruct. Res. 38, 500 - 510.

DEBRAY H., DECOUT D., STRECKER G., SPIK G. & MONTREUIL J., 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. Eur. J. Biochem. 117, 41 - 55.

DE NOLLIN S., THONE F. & BORGERS M., 1975. Enzyme cytochemistry of Candida albicans. J. Histochem. Cytochem. 23, 758 - 765.

DIAMOND R.D. & KRZESICKI R., 1978. Damage to pseudohyphal forms of Candida albicans by neutrophils in the absence of serum in vitro. J. Clin. Invest. 61, 349 - 369.

DICKERSON A.G. & BAKER R.C.F., 1978. The binding of enzymes to fungal β -glucans. J. Gen. Microbiol. 112, 67 - 75.

DJACZENKO W. & CASSONE A., 1971. Visualization of new ultrastructural components in the cell wall of Candida albicans with fixatives containing TA20. J. Cell Biol. 52, 186 - 190.

DOMANSKI R.E. & MILLER R.E., 1968. Use of a chitinase complex and β (1-3) glucanase for spheroplast production from Candida albicans. J. Bact. 96, 270 - 271.

DOUGLAS L.J., HOUSTON J.G. & Mc COURTIE J., 1981. Adhérence of Candida albicans to human buccal epithelial cells after growth on different carbon sources. FEMS Microb. Letters 12, 241 - 243.

DREWE J.A., 1981. The ultrastructural appearance of Candida albicans with different fixatives. Med. Lab. Sciences, 38, 237 - 244.

DURAN A., BOWERS B. & CABIB E., 1975. Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3952 - 3955.

F

- FARKAS V., 1979. Biosynthesis of cell walls of fungi. Microbiol. Rev. 43, 117 - 144.
- FARKAS V., SVOBODA A. & BAUER S., 1970. Secretion of cell wall glycoproteins by yeast protoplasts. The effect of 2 - deoxy - D - glucose and cycloheximide. Biochem. J. 118, 755.
- FISCHER W. & REUTER G., 1982. Mannan - lokalisation durch Concanavalin A im Zusammenhang mit elektromikroskopischem und chemisch-analytischen Untersuchungen an unterschiedlich präparierten Zellwänden der Futterhefe Candida spec. H. Z. Allg. Mikrobiol. 22, 29 - 40.
- FLEET G.H. & MANNERS D.J., 1977. The enzymic degradation of an alkali-soluble glucan from the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 98, 315.
- FRANÇOIS D., VAN TUYEN V., LEBVRE V. & HAGENAU F., 1972. Etude au microscope électronique de la fixation de lectines marquées à la peroxydase de Raifort sur des cellules embryonnaires humaines transformées in vitro par le virus du sarcome de Rous (RSV), souche Bryan. C.R. Acad. Sci. (Paris) 274, 1981 - 1984.
- FRANÇOIS D. & MONGIAT F., 1977. An ultrastructural study of wheat germ agglutinin binding sites using glucose oxidase as a marker. J. Ultrastruct. Res. 59, 119 - 125.
- FRANZ H. & ZISKA P., 1981. Affinitins : combining sites containing proteins. In "Lectins - Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry". Proceedings of the third lectin meeting. Copenhagen. Vol. 1, p. 17 - 21. Walter de GRUYTER édit. Berlin - New York.
- FREHEL C., ROBBE P., TINELLI R. & RYTER A., 1982. Relationship between biochemical and cytochemical results obtained on Bacillus megaterium and Bacillus subtilis cell wall polysaccharides. J. Ultr. Res. 81, 78 - 87.
- FREHEL C. & RYTER A., 1982. Electron microscopic cytochemical study of cell wall polysaccharides in Bacillus subtilis and two strains of Bacillus megaterium. J. Ultr. Res. 81, 66 - 77.
- FUKAZAWA Y., NISHIKAWA A., SUZUKI M. & SHINODA T., 1980. Immunochemical basis of the serological specificity of the yeast : Immunochemical determinants of several antigenic factors of yeasts. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1, suppl. 8, 127.

G

- GARCIA TAMAYO J., CASILLO G. & MARTINEZ A.J., 1982, Human genital candidiasis. Acta Cytol. 26, 7 - 14.
- GIBBONS R.P. & VAN HOUTE J., 1975. Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann. Rev. Microbiol. 29, 19 - 44.

- GINGELL D. & VINCE S., 1980. Long range forces and adhesion : an analysis of cell substratum studies. In : CURTIS ASG and PITTS JD (Eds), "Cell adhesion and motility". Cambridge University Press, Cambridge, p 1 - 37.
- GIRARDEAU J.P., 1980. A new in vitro technique for attachment to intestinal villi using enteropathogenic Escherichia coli. Ann. Microbiol. (inst. Pasteur) 131 B, 31 - 37.
- GOLDSTEIN I.H., SO L.L., YOUNG Y. & COLLIES Q.C., 1969. Protein carbohydrate interaction XX. The interaction of Concanavalin A with IgM and the glycoprotein phytohemagglutinins of the waxbean and the soybean. J. Immunol., 103, 695 - 698.
- GOLDSTEIN I.J., HAMMARSTROM S. & SUNDBLAD S., 1975. Precipitation and carbohydrate - binding specificity studies on wheat germ agglutinin. Biochim. Biophys. Acta. 405, 53 - 61.
- GOLDSTEIN I.J. & HAYES C.E., 1978. Lectins. Carbohydrate binding proteins of plants and animals. Adv. Carboh. Chem. Biochem. 35, 127 - 310.
- GOLDSTEIN I.J., HUGHES R.C., MONSIGNY M., OSAWA T. & SHARON, N., 1980. What should be called a lectin ? Nature, 285, 66.
- GOMORI G., 1952. Microscopic Histochemistry : Principles and Practice. Chicago : Univ. of Chicago Press, ed. 1958.
- GORIN P. A. & SPENCER J.F.T., 1970. Proton magnetic resonance spectroscopy - an aid in identification and chemotaxonomy of yeasts. Adv. Appl. Microbiol. 13, 25.
- GOW N.A.R., GOODAY G.W., NEWSAM R.J. & GULL K., 1980. Ultrastructure of the septum in Candida albicans. Current Microbiol. 4, 357 - 359.
- GRAHAM R.C. & KARNOVSKY M.J., 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in proximal tubes of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem Cytochem. 14, 291 - 302.
- GRIMMECKE H.D. & REUTER G., 1980 a. Struktur der Zellwandpolyasaccharide in der Futtereiweib I. Struktur des alkalistabilen Mannan - Proteins. Z. Allg. Mikrobiol. 21, 95 - 107.
- GRIMMECKE H.D. & REUTER G., 1980 b. Struktur der Zellwandpolysaccharide in der Futtereiweib - Hefe Candida Spec. H. IV Struktur der alkalilabilen oligosaccharide im Mannan - Protein - Phosphat - Komplex. Z. Allg. Mikrobiol. 21, 211 - 218.
- GRIMMECKE H.D. & REUTER G., 1981. Struktur der Zellwandpolysaccharide in der Futtereiweib - Hefe Candida Spec. H. Z. Allg. Mikrobiol. 21, 643 - 650.
- GROS D. & CHALLICE C.E., 1975. The coating of mouse myocardial cells. A cytochemical electron microscopical study. J. Histochem. Cytochem. 23, 727 - 744.
- GROS D., MOCQUARD J.P., CHALLICE C.E. & SCHREVEL J., 1975. Evolution de la surface des cellules myocardiques de la Souris au cours de l'ontogénèse I. Etude cytochimique des glucides. J. Microsc. Biol. Cell. 23, 249 - 270.

GROS D., OBRENOVITCH A., CHALLICE C.E., MONSIGNY M. & SCHREVEL J., 1977. Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of lectins on ultrathin glycol methacrylate sections. J. Histochem. Cytochem. 25, 104 - 114.

GROS D., 1979. Ultrastructure de la membrane plasmique des cellules myocardiques adultes et embryonnaires de la souris (Mus musculus). Thèse de Doctorat d'ETAT. Université de Poitiers.

GROS D., BRUCE B., CHALLICE E.C. & SCHREVEL J., 1982. Ultrastructural localization of Concanavalin A and wheat germ agglutinin binding sites in adult and embryonic mouse myocardium. J. Histochem. Cytochem. 30, 193 - 200.

GUILLOUZO A. & FELDMANN G., 1977. Surface and intracellular localization of Concanavalin A binding sites in rat liver cells. J. Histochem. Cytochem. 25, 1303 - 1310.

GUNJA SMITH Z. & SMITH E.E., 1974. Evidence for the periplasmic location of glycogen in Saccharomyces. Biochim. Biophys. Res. Commun. 56, 588.

GUNJA SMITH Z., PATIL N.B. & SMITH E.E., 1977. Two pools of glycogen in Saccharomyces. J. Bacteriol. 130, 818.

H

HASILIK A., 1974. Inactivation of chitin synthase in Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 101, 295 - 301.

HAVELKOVA M. & MENSİK P., 1966. The golgi apparatus in the regenerating protoplasts of Schizosaccharomyces. Naturwissenschaften 53, 562.

HIRANO T., TACREITER W., EAVES A. & KAPLAN J.G., 1980. The plasma membrane of yeast protoplasts. Cytologia 33, 558 - 564.

HIXSON D.C., MILLER M.F., MARUYAMA K., WALBORG E.F., WAGNER S., STARLING J.J. & BOWEN J.M., 1979. A statistical evaluation of the binding of ferritin-conjugated lectins to the surface of rat cells. J. Histochem. Cytochem. 27, 1618 - 1629.

HOLAN Z., POKORNY V., BERAN K., GEMPERLE A., TUZAR Z. & BALORIAN J., 1981. The glucan - chitin complex in Saccharomyces cerevisiae V. Precise location of chitin and glucan in bud scar and their physico - chemical characterization. Arch. Microbiol. 130, 312 - 318.

HOLBEIN B.E. & KIDBY D.K., 1977. Effects of proteolytic enzymes on invertase secretion in sphaeroplasts of Saccharomyces : inhibition by trypsin. Can. J. Microbiol. 23, 202.

HORISBERGER M. & VONLANTHEN M., 1977. Localisation of mannan and chitin on thin sections of budding yeasts with gold markers. Arch. Microbiol. 115, 1 - 7.

HORISBERGER M., FARR D.R. & VONLANTHEN M., 1978. Ultrastructural localization of β - D - galactan in the nuclei of the myxomycete Physarum polycephalum. Biochim. Biophys. Acta 542, 308 - 314.

HORISBERGER M., VONLANTHEN M. & ROSSET J., 1978. Localization of - Galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in Schizosaccharomyces pombe. Arch. Microbiol. 119, 107 - 111.

HORISBERGER M., 1979. Evaluation of colloidal gold as a cytochemical marker for transmission and scanning electron microscopy. Biol. Cell. 36, 253 - 258.

HOWLETT J.A. & SQUIER C., 1980. Candida albicans ultrastructure : Colonization and invasion of oral epithelium. Infect. and Immun. 29, 252 - 260.

HUGHES R.C., 1976. The complex carbohydrates of mammalian cell surfaces and their biological roles. Essays Biochem. 11, 1 - 36.

HUGON J. & BORGERS M., 1968. Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase activities in the absorbing cells of the duodenum of rodents. Histochemie 12, 42 - 66.

I - J

ISENBERG H., ALLERHAND J., BERKMAN J.J. & GOLDBERG D., 1963. Immunological and toxic differences between mouse virulent and mouse avirulent Candida albicans. J. Bacteriol. 86, 1010 - 1018.

IZHAR M., NUCHAMOWITZ Y. & MIRELMAN D., 1982. Adherence of Shigella flexneri to guinea pig intestinal cells is mediated by a mucosal adhesin. Infect. Immun. 35, 1110 - 1118.

JONES G.W., ABRAMS G.D. & FRETER R., 1976. Adhesive properties of Vibrio cholerae : adhesion to isolated rabbit brush border membranes and hemagglutinating activity. Infect. Immun. 14, 232 - 239.

JOSHI K.R., GAVIN J.B. & ARMIGER L.C., 1975. Intercellular matrix in colonies of Candida. J. Bacteriol. 123, 1139 - 1143.

K

KEMP G. & SOLOTOROVSKY T., 1963. Localization of antigens in mechanically disrupted cells of certain species of the genera Candida and Torulopsis. J. Immunol. 93, 305 - 314.

KIEDA C., DELMOTTE F. & MONSIGNY M., 1977. Preparation and properties of glycosylated cytochemical markers. FEBS Lett. 76, 257 - 261.

KIMURA L.H. & PEARSALL N.N., 1978. Adherence of Candida albicans to human buccal epithelial cells. Infect. Immun. 21, 64 - 68.

- KIMURA L.H. & PEARSALL N.N., 1980. Relationship between germination of Candida albicans and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect. Immun. 28, 464 - 468.
- KING C.A. & PRESTON T.M., 1977 a. Fluoresceinated - cationized ferritine as a membrane probe for anionic sites at the cell surface. F.E.B.S. Lett. 73, 59 - 63.
- KING C.A. & PRESTON T.M., 1977 b. Studies of anionic sites on the cell surface of the Amoeba Naegleria gruberi using cationized ferritin. J. Cell. Sci. 28, 133 - 149.
- KING R., LEE J. & MORRIS A., 1980. Adherence of Candida albicans and other Candida species to mucosal epithelial cells. Infect. Immun. 27, 667 - 674.
- KOPECKA M., 1972. Dictyosomes in the yeast Schizosaccharomyces pombe. Antonie van Leeuwenhoek 38, 27 - 31.
- KOPECKA M., PHAFF H.J. & FLEET G.H., 1974. Demonstration of a fibrillar component in the cell wall of the yeast Saccharomyces cerevisiae and its chemical nature. Cell. Biol. 62, 66.
- KORNFELD R. & FERRIS C., 1975. Interaction of immunoglobulin glycopeptides with concanavalin A. J. Biol. Chem. 250, 2614 - 2619.
- KOSINOVA A., FARKAS V., MACHALA S. & BAUER S., 1974. Site of mannan synthesis in yeast. An autoradiographic study. Arch. Microbiol. 99, 255 - 263.
- KREGER D.R., 1954. Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by X - ray diffraction and solubility tests, Biochim. Biophys. Acta 13, 1.
- KULKURANI R.K., HOLLINGSWORTH P.J. & VOLZ P.A., 1980. Variation in cell surface features of Candida albicans with respect to carbon sources. Sabouraudia 18, 255 - 260.
- KUO S.C. & LAMPEN J.O., 1974. Tunicamycin an inhibitor of yeast glycoprotein synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 287.

L

- LANDAU J.W., DABROWA N. & NEWCOMER V., 1965. The rapid formation in serum of filaments of Candida albicans. J. Invest. Dermatol. 44, 171 - 179.
- LARRIBA G., MORALES M. & RUIZ-HERRERA J., 1981. Biosynthesis of β - glucan microfibrils by cell free extracts from Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 124, 375 - 383.
- LEDUC E. & BERNHARD W., 1967. Recent modification of the glycol methacrylate embedding procedure. J. Ultrastruct. Res. 19, 196 - 199.
- LINNEMANS W.A.M., BOER P. & ELBERS P.F., 1977. Localization of acid phosphatase in Saccharomyces cerevisiae : a clue to cell wall formation. J. bacteriol. 131, 638 - 644.

LIS H. & SHARON N., 1973. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). Annu. Rev. Biochem. 42, 541 - 574.

LOEWUS F.A. & RYAN C.A., 1981. The phytochemistry of cell recognition and cell surface interaction. Plenum press edit. New York and London.

LOGAN D.A., BECKER J.M. & NAIDER F., 1979. Peptide transport in Candida albicans. J. Gen. Microbiol. 114, 179 - 186.

LUFT J.H., 1964. Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red. J. Cell Biol. 54 A - 55 A.

LUFT J.H., 1971. Ruthenium red and violet I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat. Rec. 171, 347 - 368.

M

MAHVI A.T., SPICER S.S. & WRIGHT N.J., 1974. Cytochemistry of acid mucosubstance and acid phosphatase in Cryptococcus neoformans. Canad. J. Microbiol. 20, 833 - 838.

MAISCH A.P. & CALDERONE R.A., 1980. Adherence of Candida albicans to a fibrin platelet matrix formed in vitro. Infect. Immun. 27, 650 - 656.

MAISCH A.P. & CALDERONE R.A., 1981. Rôle of surface mannan in the adherence of Candida albicans to fibrin - platelet clots formed in vitro. Infect. Immun. 32, 92, 97.

MANNERS D.J. & WRIGHT A., 1962. The interaction of Concanavalin A with glycogens. J. Chem. Soc. 4592 - 4595.

MARIER R.L., MILLIGAN E. & FAN Y.D., 1982. Elevated mannose levels detected by GAS-LIQUID chromatography in hydrolysates of serum from rats and human with Candidiasis. J. Clin. Microbiol. 16, 123 - 128.

MARINOZZI V., 1967. Réaction de l'acide phosphotungstique avec la mucine et les glycoprotéines des plasmamembranes. J. Microscopie 6, 68a - 69a.

MASLER L., KOLAROVA N., SIKL D. & BAUER S., 1974. Structure and biosynthesis of yeast cell wall glycoproteins. In Actes du colloque International N°221 du Centre National de la Recherche Scientifique sur les glycoconjugués, Villeneuve d'Ascq, 20-27 Juin 1973 : 1027 - 1029. Ed. C.N.R.S., Paris.

MATILE P., MOOR H. and MÜHLETHALER K., 1967. Isolation and properties of the plasmalemma in yeast. Arch. Microbiol. 58, 201 - 211.

MATILE P. & WIEMKEN A., 1967. The vacuole as the lysosome of the yeast cell. Arch. Microbiol. 56, 148 - 155.

MATILE P., MOOR H. & ROBINOW C.F., 1969. Yeast cytology. In the yeasts. Vol. A, Biology of yeasts. ROSE A.H. & HARRISON J.S., ed. Academic Press, New York, 219 - 302.

- MATILE P., CORTAT M., WIEMKEN A. & FREY-WYSSLING A., 1971. Isolation of glucanase containing particles from budding Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68, 636.
- MAURER A. & MUHLETHALER K., 1981. Specific labeling of glycoproteins in yeast plasma membrane with concanavalin A. Eur. J. Cell. Biol. 25, 58 - 65.
- MAURER A. & MUHLETHALER K., 1982. Isolation and localization of plasma membrane bound invertase in yeast (Saccharomyces cerevisiae). Eur. J. Cell. Biol. 26, 219 - 227.
- Mc COURTIE J. & DOUGLAS J., 1981. Relationship between cell surface composition of Candida albicans and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. Infect. Immun. 32, 1234 - 1241.
- MIEGEVILLE M., BASTIDE M., BASTIDE J.M. & VERMEIL C., 1979. Etude en microscopie electronique à balayage de la formation des protoplastes chez diverses espèces de levures. Cell. Mol. Biol. 25, 17 - 23.
- MILLER F. & PALADE G.E., 1964. Lytic activities in renal absorption protein droplets. J. Cell. Biol. 23, 519 - 552.
- MITCHELL A.J. & SCURFIELD G., 1967. Composition of extracted fungal cell walls indicated by infrared spectroscopy. Arch. Biochem. Biophys. 120, 628.
- MOELLER C.H. & THOMSON W.W., 1979 a. An ultrastructural study of the yeast tonoplast during the shift from exponential to stationary phase. J. Ultr. Res. 68, 28 - 37.
- MOELLER C.H. & THOMSON W.W., 1979 b. Uptake of lipid bodies by the yeast vacuole involving areas of the tonoplast depleted of intramembranous particles. J. Ultr. Res. 68, 38 - 45.
- MOLANO J., BOWERS B. & CABIB E., 1980. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. J. Cell. Biol. 85, 199 - 212.
- MONSIGNY M., KIEDA C., GROS D. & SCHREVEL J., 1976. New markers to visualize cell surface glycoconjugates : glycosylated horseradish peroxidase and glycosylated ferritin. Sixth Eur. Congr. Elect. Microsc., Jerusalem, 2, 39 - 40.
- MONSIGNY M., ROCHE A.C. & KIEDA C., 1978. Lectins as tools to study cell surface membrane. Commission of the European Communities, Brussels, 161 - 234.
- MONSIGNY M., ROCHE A.C., SENE C., MAGET-DANA R. & DELMOTTE F., 1980. Sugar - lectin interactions : How does wheat germ agglutinin bind sialoglycoconjugates ? Europ. J. Biochem. 104, 147 - 153.
- MONSON T.P. & WILKINSON K.P., 1981. Mannose in body fluids as an indicator of invasive candidiasis. J. Clin. Microb. 14, 557 - 562.
- MONTES L.F., PATRICK T.A., MARTIN S.A. & SMITH, M.A., 1965. Ultrastructure of blastospores of Candida albicans after permanganate fixation. J. Invest. Dermatol. 45, 227 - 232.
- MONTES L.F. & WILBORN W.H., 1968. Ultrastructural features of host - parasite relationship in oral candidiasis. J. Bacteriol. 96, 1349 - 1356.
- MONTREUIL J., 1980. Primary structure of glycoprotein glycans basis for the molecular biology of glycoproteins. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37, 157 - 223.

MOOR H. & MUHLETHALER K., 1963. Fine structure in frozen - etched yeast cells. J. Cell. Biol. 17, 609 - 628.

MOOR H., 1967. Endoplasmic reticulum as the initiator of bud formation in yeast (*S.cerevisiae*). Arch. Microbiol. 57, 135 - 146.

MYEROWITZ R., 1978. Ultrastructural observations in disseminated candidiasis. Arch. Pathol. Lab. Med. 102, 506 - 511.

N

NAGATA Y. & BURGER M.M., 1972. Wheat germ agglutinin. J. Biol. Chem. 247, 2248 - 2250.

NAGATA Y. & BURGER M.M., 1974. Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. J. Biol. Chem. 249, 3116 - 3122.

NAKAJIMA T., & BALLOU C.E., 1974. Structure of the linkage region between the polysaccharide and protein parts of *Saccharomyces cerevisiae* mannan. J. Biol. Chem. 249, 7685 - 7694.

NARKATES A.J., MONTES L.F. & WILBORN W.H., 1968. Biochemical and cytochemical correlation of acid phosphatase activity with phases of growth in *Candida albicans*. J. Histochem. Cytochem. 16, 513.

NECAS O., 1971. Cell wall synthesis in yeast protoplasts. Bact. Rev. 35, 149 - 170.

NECAS O. & SVOBODA A., 1974. Effect of proteases, phospholipases and polysaccharide-splitting enzymes on plasma membrane particles and on the synthesis of the fibrillar cell wall component in yeast protoplasts. Folia Microbiol. 19, 81 - 87.

NECAS O. & SVOBODA A., 1976. Regeneration of yeast protoplasts. A freeze - etching study. Zschr. Allg. Mikrobiol. 16, 615 - 625.

NECAS O., 1979. Regeneration of protoplasts. Adv. in Prot. Res., Proc. of the 5 th. Int. Prot. Symp. July 9-14, SZEGED, HUNGARY, 151 - 161.

NECAS O., SVOBODA A. & PIVNICKOVA E., 1981. Plasma membrane particles in yeast protoplasts. Acta Histochem. 23, 151 - 155.

NICOLSON G.L., 1974. The interactions of lectins with animal cell surface. Int. Rev. Cytol. 39, 89 - 100.

NICOLSON G.L. & SINGER S.J., 1974. The distribution and asymetry of mammalian cell surface saccharides utilizing ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains. J. Cell. Biol. 60, 236 - 248.

NIR I., 1978. Visualization of intracellular Concanavalin A binding sites in retinal photoreceptors. J. Histochem. Cytochem. 26, 822 - 828.

NOWELL P.C., 1960. Phytohemagglutinin : an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Res. 20, 462 - 466.

O

ODDS F.C. & HIERHOLZER J.C., 1973. Purification and properties of a glyco-protein acid phosphatase from Candida albicans. J. Bacteriol. 114, 257.

ODDS F.C., 1979. Candida and Candidosis. Leicester University Press. Spottiswoode Ballantyne Ltd. Colchester, London.

OFEK I., MIRELMAN D. & SHARON N., 1977. Adherence of Escherichia coli to human mucosal cells mediated by mannose receptors. Nature (London) 265, 623 - 625.

OFEK I., MOSEK A. & SHARON N., 1981. Mannose - specific adherence of Escherichia coli freshly excreted in the urine of patients with urinary tract infections, and of isolates subcultured from the infected urine. Inf. and Immun. 34, 708 - 711.

OHTSUKI I., MANZI M.R., PALADE G.E. & JAMIESON J.D., 1978. Entry of macromolecular tracers into cells fixed with low concentrations of aldehydes. Biol. Cell. 31, 119 - 126.

ORLEAN P.A.B., 1982. (1,3) - β - D - glucan synthase from budding and filamentous cultures of the dimorphic fungus Candida albicans. Eur. J. Biochem. 127, 397 - 403.

OSUMI M., NIWA N., TERANISHI Y., TANAKA A. & FUKUI S., 1974. Ultrastructure of Candida yeast grown on n alkanes. Appearance of microbodies and its relationships to high catalase activity. Arch. Microbiol. 99, 181 - 201.

P

PARMLEY R.T., DENYS F.R. & ALVAREZ C.J., 1979. Ferrocyanide enhancement of Concanavalin A - ferritin and cationized ferritin staining blood cell surface glycoconjugates. Histochem. J. 11, 379 - 389.

PARTRIDGE N. & DREWE A., 1974. Candida Protoplasts and their ultrastructure. Sabouraudia 12, 166 - 178.

PEASE D.C., 1966. Polysaccharides associated with the exterior surface of epithelial cells : kidney, intestine, brain. J. Ultrastruct. Res. 15, 555 - 588.

PEASE D.C., 1970. Phosphotungstic acid as a specific electron stain for complex carbohydrates. J. Histochem. Cytochem. 18, 455 - 458.

PERSI M. & BURNHAM J., 1981. Use of tannic acid as a fixative mordant to improve the ultrastructural appearance of Candida albicans blastospores. Sabouraudia 19, 1 - 8.

PESTI M., NOVAK E.K., FERENCZY L. & SVOBODA A., 1981. Freeze fracture electron microscopical investigation of Candida albicans cells sensitive and resistant to Nystatin. Sabouraudia 19, 17 - 26.

PETERS B.P., EBISU S., GOLDSTEIN I.J. & FLASHNER M., 1979. Interactions of W.G.A. with sialic acid. Biochemistry 18, 5505 - 5511.

PHAFF H.J., MILLER M.V. & MRAK E., 1978. The life of yeasts. Second edition. Harvard University Press. Cambridge Mass. USA.

POPOV B., REUTER G. & MEYER H.W., 1980. Cell wall regeneration of Candida spec. protoplasts. Z. Allg. Mikrobiol. 20, 47 - 62.

PORETZ R.D. & GOLDSTEIN I.J., 1970. An examination of the topography of the saccharide binding sites of Concanavalin A and of the forces involved in complexation. Biochem. 9, 2890 - 2896.

POULAIN D., TRONCHIN G. DUBREMETEZ J. & BIGUET J., 1978. Ultrastructure of the cell wall of Candida albicans blastospores : study of its constitutive layers by the use of a cytochemical technique revealing polysaccharides. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 129 A, 141 - 153.

POULAIN D., VERNES A. & FRUIT J., 1980. Variation de la structure antigénique pariétale de Candida albicans. Mise en évidence au niveau des blastospores d'un antigène P dépendant de leur origine. Sabouraudia 18, 61 - 68.

POULAIN D., TRONCHIN G., JOUVERT S., HERBAUT J. & BIGUET J., 1981. Architecture pariétale des blastospores de Candida albicans. Localisation de composants chimiques et antigéniques. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 132 A, 219 - 238.

POULAIN D., 1982. Ultrastructure et variations antigéniques pariétales de Candida albicans. Relations avec la biologie du parasite. Thèse de doctorat d'état. Université de LILLE I.

PREUSSER H.J., 1978. The influence of preparation on the ultrastructure of fungi. Mykosen 1, 43 - 51.

PREUSSER H.J. & ROSTEK H., 1979. Freeze fracture studies of the plasmalemma of Candida albicans after treatment with econazole nitrate. Sabouraudia 17, 389 - 398.

PUGH D. & CAWSON R., 1975. The cytochemical localization of phospholipase A and lysophospholipase in Candida albicans. Sabouraudia 13, 110 - 115.

PUGH D. & CAWSON R., 1978. The surface layer of Candida albicans. Microbios 23, 19 - 23.

R

RAININA E.I., ZUBATOV A.S., BUCHWALOW I.B. & LUZIKOV V.N., 1979. A cytochemical study of the localization of acid phosphatase in Saccharomyces cerevisiae at different growth phases. Histochem. J. 11, 299 - 310.

RAJASINGHAM K. & CAWSON R., 1980. Cell wall and plasma membrane ultrastructure of the invasive hypha of Candida albicans. I.R.C.S. Med. 8, 430.

RAJASINGHAM K.C. & CAWSON R.A., 1980 b. Ultrastructural study of glycogen in Candida albicans. Microbios 27, 163 - 166.

RAMBOURG A., 1967. Détection des glycoprotéines en microscopie électronique : coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique. C.R. Acad. Sci., Paris, D, 265, 1426 - 1428.

RAMBOURG A., 1969. Localisation ultrastructurale et nature du matériel coloré au niveau de la surface cellulaire par le mélange chromique-phosphotungstique. J. Microscopie 8, 325.

REILLY R.W. & KIRSNER J.K., 1965. Runt intestinal disease. Lab. Invest. 14, 102 - 107.

REISS J., 1973. Enzyme cytochemistry of fungi. Progress in Histochemistry and Cytochemistry 5, 1 - 40.

RENAU-PIQUERAS J., KNECHT E. & HERNANDEZ-YAGO J., 1981. Effects of different fixative solutions on labeling of Concanavalin A receptors sites in human T-lymphocytes. Histochem. 71, 559 - 565.

REYNOLDS E., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17, 208 - 212.

REYNOLDS J.D. & DASHEK W.V., 1976. Cytochemical analysis of callose localization in Lilium longiflorum pollen tubes. Ann. Bot. 40, 409 - 416.

ROBERT R., LEYNIA DE LA JARRIGE P., GUILBERT F., CHABASSE D., SENET J.M. & HOCQUET P., 1980. Diagnostic des candidoses : recherche d'antigènes Mannanes et d'immunocomplexes dans le sang et les urines. Bull. Soc. Fr. Myco. Med. 9, 209 - 214.

RODRIGUEZ L., RUIZ T., VILLANUEVA J.R. & SENTANDREU R., 1978. Yeast invertase : subcellular distribution and possible relationship between the isoenzymes. Current Microbiol. 1, 41 - 45.

ROLAND J.C. & VIAN B., 1971. Réactivité du plasmalemmes végétal. Etude cytochimique. Protoplasma 73, 121 - 137.

ROLAND J.C., LEMBI C.A. & MORRE D.J., 1972. Phosphotungstic acid- chromic acid as a selective electron dense stain for plasma membranes of plant cells. Stain Techn. 47, 195 - 200.

ROUSSEAU M. & HERMIER J., 1975. Localisation en microscopie électronique des polysaccharides de la paroi chez les bactéries en sporulation. J. Microscopie 23, 237 - 248.

RUIZ-HERRERA J., SING U., VAN DER WOUDE W. & BARTNICKI-GARCIA S., 1975. Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 72, 2706 - 2710.

RYTER A. & HELLIO R., 1980. Electron microscope study of Dictyostelium discoideum plasma membrane and its modifications during and after phagocytosis. J. Cell. Science 41, 75 - 88.

S

SAMARANAYAKE L.P. & Mac FARLANE T.W., 1980. An In Vitro study of the adherence of Candida albicans to acrylic surfaces. Archs. oral Biol. 25, 603 - 609.

SAMARANAYAKE L.P. & Mac FARLANE T.W., 1981. The adhesion of the yeast Candida albicans to epithelial cells of human origin in vitro. Archs. Oral Biol. 26, 815 - 820.

- SAMARANAYAKE L.P. & Mac FARLANE T.W., 1982. Factors affecting the in vitro adherence of the fungal oral pathogen Candida albicans to epithelial cells of human origin. Archs. oral Biol. 27, 869 - 873.
- SANDIN R.L., ROGERS A.L., PATTERSON R.J. & BENEKE E.S., 1982. Evidence for mannose - mediated adherence of Candida albicans to human buccal cells in vitro. Infect. Immun. 35, 79 - 85.
- SANDOZ D., 1978. Détection des glycoprotéines de l'acrosome par des lectines et les ferritines-glycosylées. Biol. Cell. 32, 28 a.
- SANDOZ D., BOISVIEUX-ULRICH E. & CHAILLEY B., 1979. Relationships between intramembrane particles and glycoconjugates in the ciliary membrane of the Quail Oviduct. Biol. Cell. 36, 267 - 280.
- SANTOS E., VILLANUEVA J.R. & SENTANDREU R., 1978. The plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae. Isolation and some properties. Biochim. Biophys. Acta. 508, 39 - 54.
- SCHERWITZ C., MARTIN R. & VEBERBERG H., 1978. Ultrastructural investigations of the formation of Candida albicans germ tubes and septa. Sabouraudia. 16, 115 - 124.
- SCHERWITZ C., 1982. Ultrastructure of human cutaneous candidosis. J. invest. Dermatol. 78, 200 - 205.
- SCHREVEL J., 1972. Les polysaccharides associés à la surface cellulaire des grégaires (protozoaires parasites) I. Ultrastructure et cytochimie. J. Microsc. (Paris) 15, 21 - 40.
- SCHREVEL J., KIEDA C., GROS D., CAIGNEAUX E., DELMOTTE F. & MONSIGNY M., 1976. Nouveaux marqueurs des glycoconjugués membranaires : peroxydase et ferritine glycosylées. J. Microsc. Biol. Cell. 27, 23a.
- SCHREVEL J., KIEDA C., CAIGNEUX E., GROS D., DELMOTTE F. & MONSIGNY M., 1979. Visualization of cell surface carbohydrates by a general two-step lectin technique : lectins and glycosylated cytochemical markers. Biol. Cell. 36, 259 - 266.
- SCHREVEL J., GROS D. & MONSIGNY M., 1981. Cytochemistry of cell glycoconjugates. Progress in Histochemistry and Cytochemistry Vol. 14 N° 2. Gustav Fischer verlag. ed. stuttgart - New York.
- SCHWAB D.W., JANNEY A.H., SCALA J. & LEWIN L.W., 1970. Preservation of fine structure of yeasts by fixation in dimethyl sulfoxide - Acrolein - Glutaraldehyde solution. Stain technology 45, 143 - 147.
- SCOTT J.E., 1971. Phosphotungstate : a "universal" (non specific) precipitant for polar polymers in acid solution. J. Histochem. Cytochem. 19, 689 - 691.
- SCOTT J.E. & GLICK D., 1971. The invalidity of "phosphotungstic acid as a specific electron stain for complex carbohydrates". J. Histochem. Cytochem. 19, 63 - 64.
- SCOTT J.E., 1973. Phosphotungstic acid : "Schiff-reactive" but not a "glycol reagent". J. Histochem. Cytochem. 21, 1084 - 1085.
- SEICHERTOVA O., BERAN K., HOLAN Z. & POKORNY V., 1973. The chitin - glucan complex of Saccharomyces cerevisiae II. Location of the complex in the encircling region of the bud scar. Folia Microb. 18, 207 - 211.

SEICHERTOVA O., BERAN K., HOLAN Z. & POKORNY V., 1975. The chitin-glucan complex of *Saccharomyces cerevisiae* III. Electron microscopic study of the prebudding stage. Folia Microb. 20, 371 - 378.

SELIGMAN A.M., HANKER J.S., WASSERKRUG H.L., DMOCHOWSKI H. & KATZOFF L., 1965. Histochemical demonstration of some oxidized macromolecules with thiocarbonyldrazide (TCH) or thiosemicarbazide (TSC) and osmium tetroxide. J. Histochem. Cytochem. 13, 629 - 639.

SHANNON L.M., KAY E. & LEW J.Y., 1966. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. Isolation and physical properties. J. Biol. Chem. 241, 2166 - 2172.

SHANNON J.L. & ROTHMAN A.H., 1971. Transverse septum formation in budding cells of the yeastlike fungus *Candida albicans*. J. Bacteriol. 106, 1026 - 1028.

SHARON N. & LIS H., 1972. Lectins : cell-agglutinating and sugar specific proteins. Science 177, 949 - 959.

SHARON N. & LIS H., 1975. Use of lectins for the study of membranes. Methods Membrane Biol. 3, 147 - 200.

SHEMATEK E.M., BRAATZ J.A. & CABIB E., 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall I. Preparation and properties of β - (1 $\rightarrow$ 3) glucan synthetase. J. Biol. Chem. 255, 888 - 894.

SHEMATEK E.M. & CABIB E., 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall II. Regulation of β - (1 $\rightarrow$ 3) glucan synthetase by ATP and GTP. J. Biol. Chem. 255, 895 - 902.

SIETSMA J.H. & WESSELS G.H., 1979. Evidence for covalent linkages between chitin and β - glucan in a fungal wall. J. Gen. Microbiol. 114, 99 - 108.

SIETSMA J.H. & WESSELS G.H., 1981. Solubility of (1 $\rightarrow$ 3) - β - D/ (1 $\rightarrow$ 6) - β - D - Glucan in fungal walls : Importance of presumed linkage between glucan and chitin. J. Gen. Microbiol. 125, 209 - 212.

SIMPSON D.L., THORNE D.R. & LOH H.H., 1978. Lectins : endogenous carbohydrate - binding proteins from vertebrates tissues. Functional role in recognition processes ? Life Sci. 22, 727 - 748.

SKUTELSKY E., DANON D., WILCHEK M. & BAYER E.A., 1977. Localization of sialyl residues on cell surfaces by affinity cytochemistry. J. Ultrastruct. Res. 61, 325 - 335.

SKUTELSKY E. & BAYER E.A., 1979. The ultrastructural localization of cell surface glycoconjugates : affinity cytochemistry via the avidin - Biotin complex. Biol. Cell. 36, 237 - 252.

SOBEL J.D., MYERS P.G., KAYE D. & LEVISON M.E., 1981. Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. J. infect. Dis. 143, 75 - 82.

SOUTO PADRON T. & DE SOUZA W., 1979. Cytochemical analysis at the fine structural level of trypanosomatids stained with phosphotungstic acid. J. Protozool. 26, 551 - 557.

SPURR A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultr. Res. 26, 31 - 43.

STOETZNER H. & KEMMER C., 1975. The morphology of Candida albicans in human candidosis. A light and electron microscopic study. Mykosen 18, 511 - 518.

SUMNER J.B., 1919. The globulins of the jack bean, Canavalia ensiformis. J. Biol. Chem. 37, 137 - 142.

SUZUKI M. & FUKAZAWA Y., 1982. Immunochemical characterization of Candida albicans cell wall antigens : specific determinant of Candida albicans Sero-type A Mannan. Microbiol. Immunol. 26, 387 - 402.

T

TEMMINK J.H.M., 1979. Application of cytochemical methods to electron microscope investigations of cell surface receptors. Biol. cell. 36, 227 - 236.

THIERY J.P., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie 6, 978 - 1018.

THIERY J.P. & RAMBOURG A., 1974. Cytochimie des polysaccharides. J. Microscopie 21, 225 - 232.

THIERY J.P. & OVTRACHT L., 1979. Differential characterization of carboxyl and sulphate groups in thin sections for electron microscopy. Biol. cell. 36, 281 - 288.

TKACZ J.S., CYBULSKA E.B. & LAMPEN J.O., 1971. Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein - conjugated Concanavalin A. J. Bact. 105, 1 - 5

TOKUNAGA J. & TOKUNAGA M., 1980. Ultrastructural changes in various cell forms of Candida albicans. In Human and Animal Mycology. Proceedings of the VII ISHAM Congress Jérusalem. 1979.: 229 - 232. E. KUTTIN & G. BAUM Ed. Excerpta Medica, Amsterdam.

TSUKAHARA T. & SATO A., 1964. A cytological study of Candida albicans by electron microscopy. Acta Med. Biol. 11, 233 - 242.

U - V

URUBURU F., ELORZA V. & VILLANUEVA J.R., 1968. The fine structure of yeast regenerating protoplasts. J. Gen. Microbiol. 51, 195 - 198.

VAN DER VALK P. & WESSELS J.G.H., 1976. Ultrastructure and localization of wall polymers during regeneration and reversion of protoplasts of Schizophyllum commune. Protoplasma 90, 65 - 87.

VAN RIJN H.J.M., BOER P. & STEYN-PARVE E.P., 1972. Biosynthesis of acid phosphatase of baker's yeast. Factors influencing its production by protoplasts and characterization of the secreted enzyme. Biochim. Biophys. Acta 268, 431 - 441.

VAN RIJN H.J.M., LINNEMANS W.A.M. & BOER P., 1975. Localization of acid phosphatase in Protoplasts from Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 123, 1144 - 1149.

VIAN B., 1981. In cell walls 81. Proceeding of the 2 nd cell wall meeting. Göttingen April 8 th - 11 th 1981. D.G. ROBINSON & M. QUADER eds. Wissenschaftliche verlagsjesellschaft stuttgart.

VOGT A., BATSFORD S., KUTTIN E., MULLER J. & TAKANIYA H., 1980. Immuno-electro-microscopic localization of polysaccharide antigen in Candida albicans. In Human and Animal Mycology. Proceedings of the VII Congress of ISHAM Jérusalem, 1979 : 134 - 137. E.S. KUTTIN, G.L. BAUM Ed. Excerpta Medica, Amsterdam.

W

WARD M.E. & WATT P.J., 1975. Adherence of NEISSERIA GONORRHOEAE and other Neisseria species to mammalian cells. In : Genital infections and their complications (DANIELSSON D., JUHLIN L. and MARDH P.A. eds), pp. 229 - 241, Almqvist and Wiksell, Stockholm.

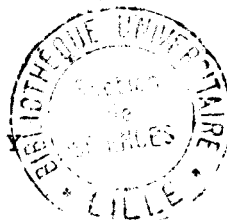
WELTEN-VERSTEGEN G.W., 1981. The rôle of the plasma membrane in glycosylation of proteins in yeast. Thèse. Université d'Utrecht.

WIEMKEN A., SCHELLENBERG M. & VRECH K., 1979. Vacuoles : the sole compartments of digestive enzymes in yeast (Saccharomyces cerevisiae) Arch. Microbiol. 123, 23 - 35.

WIENER M. & COATS-STEPHEN M., 1979. Immunodiagnosis of systemic candidiasis : Mannan antigenemia detected by radioimmunoassay in experimental and human infections. J. Infec. Dis. 140, 989 - 993.

WILSON C.L., STIERS D.L. & SMITH G.G., 1969. Fungal lysosomes or spherosomes. Phytopathol. 60, 216 - 227.

WOODS D.E., STRAUS D.C., JOHANSON W.G. & BASS J.A., 1981. Role of fibronectin in the prevention of adherence of Pseudomonas aeruginosa to buccal cells. J. Inf. Dis. 43, 784 - 790.



YAMADA K., 1970. Dual staining of some sulfated mucopolysaccharides with alcian blue (pH 1,0) and ruthenium red (pH 2.5). Histochemie 23, 13 - 20.

YAMAGUCHI H., KANDA Y. & IWATA K., 1974. Macromolecular structure and morphology of native glycogen particles isolated from Candida albicans. J. Bacteriol. 120, 441 - 449.

YU R., BISHOP C., COOPER F., HASENCLEVER H. & BLANK F., 1967. Structural studies of mannan from Candida albicans (serotype A et B), Candida parapsilosis, Candida stellatoidea and Candida tropicalis. Can. J. Chem. 45, 2205 - 2211.

RESUME

Le comportement et les propriétés biologiques des levures s'expriment au niveau d'une structure complexe protégeant la cellule fongique : l'enveloppe cellulaire. Son étude ultrastructurale et cytochimique revêt donc un intérêt tant fondamental que pratique lorsqu'il s'agit d'un organisme pathogène opportuniste comme *Candida albicans*, et plus particulièrement celle des structures pariétales superficielles qui conditionnent les relations avec l'environnement.

La détection et la visualisation correctes des composants pariétaux de levures dépendent principalement de leur accessibilité aux différents réactifs. L'utilisation de coupes à congélation, en association avec des digestions enzymatiques, favorise la pénétration des marqueurs, tout en préservant les structures cytoplasmiques. L'application de techniques faisant appel aux lectines permet ainsi de localiser deux constituants fondamentaux de l'enveloppe cellulaire, les mannanes et la chitine, et de mettre en évidence un revêtement de nature glycoprotéinique à la surface des levures. De la même manière, certaines des modalités de reconstitution des parois, ainsi que les modifications cellulaires qui leur sont associées au cours des phénomènes de régénération, sont précisées. L'étude de la distribution d'enzymes de l'espace périplasmique telles que la phosphatase acide, permet par ailleurs de suivre l'évolution des parois au cours de la différenciation cellulaire.

Ces données nouvelles permettent de définir la nature des relations levures - cellules épithéliales au cours des phénomènes d'adhérence aux muqueuses, première étape de la colonisation tissulaire. Les interactions s'effectuent par l'intermédiaire du revêtement pariétal, et nécessitent de profonds remaniements de l'enveloppe cellulaire.

Mots clefs

Candida albicans : enveloppe cellulaire - cytochimie

Candida albicans : sphéro-protoplastes - régénération

Candida albicans : revêtement pariétal - adhérence