

UNIVERSITES DE LILLE I ET LILLE II

Mémoire pour l'obtention du
diplôme d'études approfondies
des Sciences de la Vie et de la Santé
Option : IMMUNOLOGIE

ANALYSE PRELIMINAIRE DE LA REPONSE
HUMORALE HUMAINE VIS A VIS DES
OLIGOMANNOSIDES PARIETAUX DE
CANDIDA ALBICANS

Marie-Pierre HAYETTE

BIOLOGIE ET BIOCHIMIE PARASITAIRES
ET FONGIQUES
UNITE INSERM U42
Directeur : Professeur Daniel CAMUS

Soutenu devant le jury d'examen
Septembre 1990

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biologie et biochimie parasitaires et fongiques de l'unité INSERM U42.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur CAMUS, Directeur de l'Unité 42, qui a accepté de m'y accueillir.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Docteur Poulain qui m'a encadrée au cours de ce D.E.A., pour sa disponibilité et sa confiance.

Ce travail a été conduit en collaboration avec le laboratoire de chimie biologique de l'université des Sciences et techniques de Lille I.

Je tiens à remercier tout particulièrement Messieurs les Docteurs Jean-Claude Michalski et Gérard Strecker pour leur encadrement au cours de mon stage au C9.

J'exprime toute ma reconnaissance pour les conseils précieux qui m'ont été donnés par les membres de l'Unité 42 et plus particulièrement par tous ceux du Thème Candida.

Je remercie le personnel du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du C.H.R. de Lille pour leur participation dans la réalisation des tests de diagnostic sérologique des candidoses.

LISTE DES ABREVIATIONS

- ACP : Analyse en composante principale
- D.O. : Densité optique
- CCM : Chromatographie en couche mince
- COEL : Co-électrosynérèse
- CTE : Cand-Tec
- ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay
- IFI : Immunofluorescence indirecte
- Man : Mannose
- NGL : Néoglycolipide résultant du couplage d'oligomannosides (en pool ou isolés) à la 4-Hexadecylaniline.
- Oligomannosides H : Oligomannosides libérés par hydrolyse acide.
β : Oligomannosides libérés par β élimination.
- ppm : parties par million
- PPM : Phosphopeptidomannanes = constituants de la paroi des Candida.
- PPMT : Phosphopeptidomannanes totaux.
- PPMH : Phosphopeptidomannanes résiduels après hydrolyse acide.
- PPMβ : Phosphopeptidomannanes résiduels après β élimination.
- RMN : Résonance magnétique nucléaire
- SP : Système précipitant
- SPCS : Système précipitant à coalescence spécifique

RESUME

En vue d'évaluer la signification diagnostique des anticorps dirigés contre les différentes familles d'oligomannosides constitutifs de la molécule de phosphopeptidomannanes (PPM) pariétaux de Candida albicans, cette molécule a été soumise à une dépolymérisation séquentielle. Il s'agit tout d'abord d'une hydrolyse acide douce libérant les oligomannosides liés à la partie N-glycosylée de la molécule par des liaisons phosphodiesteres, puis d'une β élimination libérant les oligomannosides liés par liaisons O-glycosidiques.

Les oligomannosides ont été séparés des PPM résiduels, (PPMH et PPMB) par chromatographie de gel filtration.

Les oligomannosides libérés par hydrolyse acide portent de 1 à 8 résidus mannose, liés par des liaisons α ou β . Les oligomannosides libérés par β élimination portent de 1 à 7 résidus mannose, parmi ceux-ci le mannobiose et le mannotriose sont majoritaires, leur structure déterminée par RMN révèle la présence exclusive de liaisons (α 1-2).

Dans un premier temps, des tests ELISA impliquant les PPM totaux (PPMT), PPMH et PPMB a été mis au point vis à vis de sérums de de sujets candidosiques ou non. L'étude a ensuite porté sur 110 sujets : 30 sujets témoin, hospitalisés ou non, 50 sujets atteints de candidoses mycologiquement et/ou sérologiquement confirmées dont 30 ont présenté une séroconversion. L'analyse statistique a concerné la comparaison des résultats à ceux fournis par les méthodes sérologiques de routine: détection d'anticorps par immunofluorescence indirecte et co-électrosynérèse, détection d'antigènes par agglutination de particules de latex. Les résultats montrent que la présence d'antigène circulant n'interfère pas avec les résultats des différents tests ELISA mais qu'il existe par contre une corrélation étroite entre les divers tests de détection d'anticorps. Les PPMH et les PPMB permettent une meilleure discrimination entre les individus sains et les sujets atteints de candidose que les PPMT.

Dans un second temps, le pool d'oligomannosides libérés par β élimination a été testé également en ELISA après construction de néoglycolipides selon une méthode précédemment utilisée au laboratoire. Les résultats obtenus vis à vis des sérums de 15 patients ayant présenté une séroconversion démontrent l'antigénicité de ces constructions.

Ces résultats permettent d'envisager à court terme une amélioration de la spécificité des méthodes de diagnostic sérologique et à moyen terme une analyse de la reconnaissance du répertoire oligosaccharidique des Candida lors des processus infectieux.

SOMMAIRE

	page
INTRODUCTION	1
I. MATERIELS ET METHODES.	7
1.1. Origine des antigènes.	7
1.2. Méthodes de dépolymérisation des phosphopeptidomannanes.	7
1.3. Synthèse des néoglycolipides.	7
1.4. Fractionnement.	8
1.4.1. Chromatographie de gel filtration.	8
1.4.2. Chromatographie sur couche mince.	9
1.5. Dosages chimiques.	9
1.5.1. Dosage des glucides.	9
1.5.2. Dosages des protéines.	9
1.6. Méthylation des oligomannosides et analyse en spectrométrie de masse.	10
1.7. Analyse structurale des oligomannosides.	10
1.8. Sélection des sérums humains.	10
1.9. Technique immunoenzymatique (E.L.I.S.A.).	12
1.9.1. Antigènes.	12
1.9.2. Sensibilisation des plaques de microtitration.	12
1.9.3. Détection des anticorps sériques.	13
1.10. Analyse statistique.	14
II. RESULTATS.	15
2.1. Production des antigènes.	15
2.1.1. Séparation et analyse des fractions après hydrolyse acide.	15
2.1.2. Séparation et analyse des fractions après β élimination.	15
2.1.3. Composition chimique des PPM.	15
2.2. Analyse de la réponse humorale envers les phosphopeptidomannanes.	16
2.2.1. Mise au point de la technique E.L.I.S.A.	16
* Courbe de saturation en antigène.	16
* Dilution des séras et du conjugué.	16
2.2.2. Réactivité des sérums humains vis à vis des PPMT, PPMH et PPM β .	17
* Analyse des corrélations avec l'IFI.	18
* Analyse des corrélations avec la coélectrosynérèse.	18
* Analyse des rapports de séroconversion.	18
* Analyse en ACP.	18

2.3. Analyse de la réponse humorale sur les néoglycolipides β .	19
2.3.1. Synthèse des néoglycolipides β .	19
2.3.2. Mise au point de la technique E.L.I.S.A.	20
2.3.3. Réactivité des sérums humains sur les NGL β .	20
* Analyse des corrélations avec l'IFI,	20
la co-électrosynérèse.	
* Analyse en ACP.	21
III. DISCUSSION	22
CONCLUSION	27
BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

Candida albicans est une levure commensale du tube digestif humain, qui peut être à l'origine d'infections opportunistes localisées ou généralisées souvent sévères chez les patients affaiblis tels que les cancéreux (37), ou immuno-déprimés, qu'ils soient greffés (13) ou au stade SIDA (10, 28). Néanmoins, la majorité des candidoses survient chez les patients hospitalisés dans les services de chirurgie et de réanimation. Chez ces patients dont le terrain est transitoirement fragilisé vont se multiplier des facteurs de risque (57) : antibiothérapie à large spectre, contamination sanguine massive d'origine endogène consécutive à une intervention sur la sphère digestive, contamination exogène par cathéter, drain, plaie. Les candidoses profondes peuvent se manifester de façon immédiate par des syndromes infectieux très sévères mettant en jeu le pronostic vital ou se pérenniser durant des mois (49).

Le diagnostic des candidoses est rendu difficile par le manque de spécificité des signes cliniques, aussi les tests biologiques sont-ils indispensables. Ces tests reposent sur l'identification des Candida, la recherche d'anticorps spécifiques et la recherche d'antigènes circulants (27). Leur interprétation est néanmoins délicate en raison de l'endosaprophytisme du germe. En effet, seul l'isolement des levures dans des sites habituellement stériles (sang, liquide céphalo-rachidien, biopsies profondes), est significative d'un développement pathogène (40). Devant la difficulté de tels isollements, le diagnostic sérologique tient une place majeure

dans le diagnostic des candidoses (34).

De nombreux tests ont été préconisés pour la détection d'anticorps spécifiques (27, 40). Ces tests détectent soit des anticorps anti-protéines (59, 36) soit des anticorps anti-glycoprotéines. Les deux tests utilisés en routine au CHR de Lille rentrent dans cette seconde catégorie. Il s'agit de l'immunofluorescence indirecte (4, 48) et la co-électrosynérèse (48). Depuis quelques années des tests de détection d'antigène sont également utilisés en routine, ils permettent de détecter des antigènes protéiques (35) ou polysaccharidiques (Cand Tec° (19), Pastorex° (20) , IGSS (46)).

En pratique, les tests sérologiques offrent un compromis entre sensibilité et spécificité, l'analyse de l'évolution cinétique des paramètres détectés (mycologie, réponse humorale, antigénémie) permet d'informer le clinicien sur le niveau de prolifération fongique lié au pronostic de l'infection.

Les relations hôte-parasite au cours des infections opportunistes sont complexes et constamment fluctuantes, la paroi fongique y joue un rôle prépondérant d'interface. Parmi les composants de la paroi, les mannoprotéines ou phosphopeptidomannanes (PPM), sont majoritaires aussi bien sur le plan structural (50), que fonctionnel (enzymatique) (41), et ce sont également les composés pariétaux les plus réactifs sur le plan immunologique (50). De nombreux travaux ont porté sur le rôle biologique des mannoprotéines pariétales et leur utilisation à des fins diagnostiques, impliquant des anticorps polyclonaux puis plus récemment, des anticorps monoclonaux. L'utilisation de sérums

hyperimmuns produits contre les levures tuées, adsorbées sur des espèces hétérologues a pu conduire à une véritable classification sérologique des Candida (64), et à l'identification de sérotypes au sein des espèces C.albicans et C.tropicalis (22). Ces distinctions reposent sur la reconnaissance par les IgG de lapin des phosphopeptidomannanes (60). La même démarche a été appliquée avec succès à l'identification de nombreuses spécificités sérologiques d'espèces ou de genres. A la suite de ces travaux, de nombreuses équipes ont cherché à produire des anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement C.albicans pour remplacer les méthodes classiques d'identification, longues et onéreuses. Cependant, si des centaines d'anticorps ont été produits, aucune des spécificités annoncées lors de descriptions préliminaires (5, 38) n'a été confirmée par l'analyse d'un nombre important d'isolats sauvages. Cela remet en question les bases de la spécificité antigénique des levures établies à l'aide d'anticorps polyclonaux. Certes, la spécificité des anticorps monoclonaux est beaucoup plus étroite et non superposable à celle de sérums polyclonaux (65) mais l'utilisation des anticorps monoclonaux a permis de mettre en évidence la très grande variabilité antigénique de la partie polysaccharidique des PPM de C.albicans (2, 45). Elle se manifeste entre les souches d'une même espèce et entre les cellules d'une même souche au même stade morphologique (33). Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer la variabilité antigénique des oligosaccharides de surface : une sécrétion discontinue des protéines porteuses, indépendante du cycle cellulaire, ou un changement spontané du processus de glycosylation. Ces changements pourraient

correspondre à l'expression de phénotypes alternatifs (58) qui a été proposée comme base possible de l'adaptation parasitaire de C.albicans. Ainsi, l'expression spontanée d'épitopes différents au cours de la phase pathogène modulerait la population en relation avec la pression immune de l'hôte.

Deux études récentes sont en faveur de cette hypothèse. D'une part, un épitope reconnu par un anticorps monoclonal sur les souches de sérotype B déterminant des candidoses oropharyngées est exprimé de façon significativement plus faible chez les sujets immunodéprimés (3). D'autre part, des auteurs rapportent que parmi les 10% de souches hospitalières n'exprimant pas l'épitope 5B2, aucune d'entre elles n'ont été isolées dans des prélèvements pathologiques (16).

Sur le plan diagnostique, l'attention s'est portée vers l'utilisation d'antigènes mannoprotéiques isolés dans le but de détecter des anticorps (14, 25, 26) ou des antigènes circulants (51, 18, 21). L'ensemble de ces études a montré que les anticorps anti-PPM sont présents dans les sérums de sujets sains. Ainsi, quelque soit la méthode, la détermination d'un seuil discriminant est nécessaire pour séparer les sujets colonisés de ceux qui présentent une candidose invasive (6, 52).

Sur le plan immunochimique, la connaissance de la structure de la partie polysaccharidique des PPM suggère l'existence de nombreux épitopes potentiels, confirmée par la production de nombreux anticorps monoclonaux de spécificités différentes et capables de reconnaître cette molécule. Les progrès effectués dans les techniques de fractionnement et de détermination structurale, ont permis de proposer un modèle pour la partie N-

glycosylée des phosphopeptidomannanes de C.albicans. Cette structure est composée d'une chaîne principale de résidus D-mannopyranosyl liés en $\alpha(1-6)$ sur lesquelles sont branchées des chaînes latérales constituées des mêmes résidus liés en $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$, $\beta(1-2)$, $\beta(1-6)$ et par des ponts disulfures (17, 61, 31, 29, 56).

Ces structures apparemment très complexes interagissent avec le système immunitaire comme le prouvent les études sur la réponse humorale (déjà citées) et sur la réponse cellulaire.

D'une part la reconnaissance par les lymphocytes T des molécules de mannanes présentées par des monocytes, est restreinte par les molécules de classe II du système HLA (HLA-DQ) (11). D'autre part, les mêmes auteurs ont montré que les mannanes sont capables de se fixer directement sur les lymphocytes T, induisant un état de non-réponse. D'autres études montrent leur rôle immunomodulateur (8).

La connaissance des bases moléculaires de ces interactions constitue un des objectifs majeurs dans la recherche sur les Candida. Néanmoins, le choix des méthodes d'analyse des épitopes oligomannosidiques potentiels se heurte à certaines difficultés. En effet, les méthodes immunochimiques conventionnelles sont peu adaptées à cette étude : de grandes quantités d'oligosaccharides sont nécessaires pour les réactions d'inhibition en phase liquide (42, 17), et l'interprétation des résultats est rendue difficile par le caractère multivalent des IgM, l'isotype prédominant des anticorps monoclonaux produits chez les rats et les souris contre des oligosaccharides (38, 24, 63).

Cette étude s'inscrit dans une approche globale du laboratoire concernant l'exploration de l'immunoréactivité des oligomannosides isolés de la paroi de C.albicans, notamment, par construction de néoglycolipides (NGL) (12).

Les objectifs de ce travail sont l'étude de la réponse humorale de patients atteints de candidose vis à vis des PPM de C.albicans. La déplétion successive de familles oligosaccharidiques opérée sur la molécule totale de PPM conduit à l'obtention de PPM résiduels. D'une part leur antigénicité respective est étudiée par une technique immunoenzymatique de type E.L.I.S.A. afin de connaître l'antigène le plus discriminant pour un test à visée diagnostique.

D'autre part, une famille oligosaccharidique a été choisie pour l'étude spécifique de sa réactivité vis à vis des sérums humains. Cette famille correspond aux oligomannosides libérés après hydrolyse alcaline ménagée (β élimination) : les composés libérés et partiellement caractérisés ont été couplés à une substance "pseudo-lipidique" pour former des néoglycolipides dont l'antigénicité a été étudiée par une technique E.L.I.S.A.

I . MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS ET METHODES.

1.1. Origine des antigènes.

La culture en fermenteurs de Candida albicans sérotype A (souche VW32) permet d'obtenir de grandes quantités de levures. L'extraction des antigènes a été préalablement réalisée au laboratoire selon la technique de Kocourek et Ballou (32). La fraction obtenue représente les phosphopeptidomannanes totaux et sera appelée par la suite PPMT (12).

1.2. Méthodes de dépolymérisation des phosphopeptidomannanes.

Deux méthodes ont été successivement appliquées :

1) Hydrolyse acide.

Cette technique a été préalablement décrite par Ballou (1).

1g de PPMT est mis en suspension dans 50 ml d'HCL 10 mM et placé 30 minutes à 100°C. Après refroidissement, la solution est neutralisée par de la soude (NaOH) puis lyophilisée.

Les produits d'hydrolyse sont appelés PPMH et oligomannosides H..

2) β Elimination.

La méthode a été adaptée de la technique appliquée par Nakajima et Ballou (39), sur Saccharomyces cerevisiae. Les PPMH sont dialysés sous vide puis lyophilisés. Une fraction est conservée.

585 mg sont mis en suspension dans 50 ml de NaOH 0,1 N. La solution est laissée 24 heures à 25°C sous agitation, puis neutralisée par de l'acide acétique 1N et lyophilisée. Les produits d'hydrolyse sont appelés PPM β et oligomannosides β .

1.3. Synthèse des néoglycolipides β .

Les néoglycolipides sont synthétisés à partir du pool d'oligomannosides β selon une adaptation de la technique de Tang (62) précédemment décrite (12). Ils seront appelés néoglycolipides β . La fonction aldéhydique du monosaccharide en position terminale réductrice est condensée sur la fonction amine de l'aniline avec élimination d'eau et formation d'une base de Schiff. La fonction est ultérieurement stabilisée par réduction au cyano-borohydrure. La réaction est équimolaire. La solution (B) est préparée en dissolvant 100 mg de 4-Hexadécylaniline (C15)(Aldrich Chem. Co.) dans 500 μ l de la solution (A) (35 mg de cyano-borohydrure de Na (BH₄CN) dans 3,5 ml de méthanol, puis 400 μ l d'acide acétique). Le tube est placé à 80°C pour solubiliser le C15. A 200 μ l de solution B, 50 μ l de la solution d'oligomannosides (1 mg) sont ajoutés. L'incubation dure 1h30 à 80°C. Après refroidissement les néoglycolipides sont extraits par adjonction de 2 ml d'une solution chloroforme/eau (v/v). Les néoglycolipides passent dans la phase aqueuse. Après deshydratation, les composés sont repris par une solution chloroforme/méthanol (v/v), puis les solvants sont évaporés sous azote.

1.4. Fractionnement.

1.4.1. Chromatographie de gel filtration.

Les différentes fractions obtenues après dépolymérisation des PPM sont reprises par un faible volume d'eau distillée (quelques ml), puis déposées sur colonne (1,8 x 150 cm) de Biogel P4 extrafine (Biorad, Hertforshire, England). Les colonnes sont éluées par de

l'eau distillée avec un débit de 5 ml/heure. Des fractions de 2ml sont collectées.

1.4.2. Chromatographie sur couche mince (CCM).

* Les oligomannosides présents dans les fractions sont séparés sur gel de silice (DC-Alufolien Kieselgel 60, Merck, Darmstadt, FRG). L'élution est réalisée dans un solvant n-butanol/acide acétique/eau (20/10/10).

* Les néoglycolipides sont séparés sur gel de silice (DC-Alufolien Kieselgel 60 F 254, Merck, Darmstadt, FRG) par élution dans le solvant chloroforme/butanol/eau (54/35/9,3).

On visualise les néoglycolipides en plaçant la plaque sous lumière ultraviolette (254 nm): la fluorescence du noyau aromatique de l'aniline permet de repérer uniquement la fraction aglycone du néoglycolipide.

Dans les deux cas, la révélation des sucres est réalisée en vaporisant sur la plaque une solution d'orcinol sulfurique (orcinol à 2g/l en solution sulfurique à 20%), puis en la chauffant à 105°C.

1.5. Dosages chimiques.

1.5.1. Dosages des protéines.

Le dosage des protéines présentes dans les PPM est réalisé en microméthode selon la technique de Pierce (kit BCA Protein Assay. Pierce, Rockford, Illinois, 61105 USA).

1.5.2. Dosages des glucides.

Le dosage des glucides portés par les PPM est réalisé par la méthode au phénol sulfurique (9).

1.6. Analyse des oligomannosides après méthylation.

Les oligomannosides présents dans les néoglycolipides sont identifiés par méthylation suivie d'une méthanolyse (Méthanol/HCL 0,5 N, 80°C, 24h) selon la technique décrite par Paz-Parente (43). Les différents éthers méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse selon la technique décrite par Fournet (15).

1.7. Analyse structurale.

Les structures des oligomannosides ont été déterminées en résonance magnétique nucléaire (RMN, 400MHZ) du proton. L'analyse des composés en solution dans l'eau (D2O) a été réalisée dans un spectromètre (Bruker AM-400 WB), opérant en transformée de Fourier à 300K.

1.8. Sélection des sérums humains.

110 sérums provenant de quatre groupes d'individus ont été sélectionnés. Sur chaque sérum les tests suivants, utilisés en routine pour le diagnostic sérologique des candidoses ont été effectués :

- Détection d'anticorps par immunofluorescence indirecte (IFI). L'IFI est réalisée sur blastoconidies de la souche de C.albicans (VW 32) obtenues après culture de 24 heures en milieu de Sabouraud (49). Le seuil de positivité retenu est un titre à 200.

- Détection d'anticorps par co-électrosynérèse (48). Le principe repose sur la migration conjointe des sérums à étudier et d'un sérum témoin, contre un antigène somatique extrait de la souche VW 32 de C.albicans sérotype A. Le sérum témoin a été obtenu par immunisation de lapins avec des tubes germinatifs de la même souche. Seuls les arcs de précipitation présentant une identité avec l'arc témoin (systèmes précipitants à coalescence spécifique) sont considérés comme positifs.

- Détection d'antigènes circulants : celle-ci a été également pratiquée sur tous les sérums sauf sur les témoins, en utilisant un kit commercialisé sous le nom de Cand-Tec^o (RAMCO INC. HOUSTON, TX, USA). C'est un test d'agglutination sur lame, réalisé directement sur le sérum et dont le seuil significatif est un titre égal à 2.

Les quatre groupes d'individus ont été définis selon les critères suivants.

1) Individus sains (Sérums T1 à T23). Il s'agit de 23 adultes sains des deux sexes recrutés parmi le personnel de l'Unité 42 de l'INSERM.

2) Patients hospitalisés dans le service de chirurgie adulte ouest du CHU de Lille (Sérums T24 à T30). Il s'agit de sujets ayant subi 5 jours auparavant une intervention en chirurgie digestive et ne présentant aucun signe clinique de candidose.

Les troisième et quatrième groupes correspondent à des patients hospitalisés dans divers services du CHU de Lille dont les sérums sont parvenus au laboratoire pour un diagnostic sérologique de candidose (sélection rétrospective).

Nos	Service	Isolement	Date/isol.	Date/sérums	Titre IFI	Co-électr. scores	PPMT	PPMH	PPMG
							Rapports de D.O.		
* S1	Réanimation	Hémoculture	05-10-89	03-10-89	200	1	3,3	3,8	4,1
S2				10-10-89	1600	8			
S3	Réanimation	Hémoculture	16-02-90	09-02-90	200	2	6,6	9,8	10
S4				20-02-90	1600	8			
S5	Oxygéno-thérapie	Urines	04-01-90	19-12-89	200	ni	4,7	5,3	4,8
S6				03-01-90	800	ni			
* S7	Chirurgie	Urines	18-11-89	?	50	1	19	33,1	31,26
S8				20-11-89	400	6			
* S9	Réanimation chirurgicale	Biopsie	02-04-90	28-03-90	50	1	9,2	11,6	11
S10				09-04-90	400	7			
* S11	Chirurgie	Epanchement pleural	20-03-90	19-03-90	100	1	7,1	10,7	12,2
S12				13-04-90	400	7			
* S13	Chirurgie	Drain	28-03-89	14-11-88	100	1	22,6	28	43
S14				20-03-89	800	6			
S15	Chirurgie	Sonde	01-08-89	29-07-89	50	4	1,7	9,3	4,8
S16		Hémoculture		06-07-89	800	8			
S17	Chirurgie	Hémoculture	19-08-89	18-08-89	100	4	3,6	3,3	3,7
S18				14-09-89	400	6			
* S19	Chirurgie	Liquide pancréatique	24-03-89	17-07-89	100	4	2,5	2,9	2,7
S20				28-08-89	400	6			
* S21	Chirurgie	Hémoculture	19-10-89	19-09-89	50	1	10,1	11,2	12,2
S22				18-10-89	400	6			
S23	Soins intensifs	LBA	18-04-90	26-02-90	200	2	3,6	4,1	4
S24				08-03-90	800	7			
S25	Urologie	Urines	03-05-90	09-05-90	200	5	1,3	1,4	1,3
S26				15-05-90	800	7			
S27	Réanimation	Urines	17-01-90	03-01-90	200	5	6	5,1	6,3
S28				09-01-90	400	7			
S29	Réanimation	Prélèvt bronchique	01-06-90	15-05-90	200	4	2	1,8	1,8
S30				29-05-90	800	7			
S31	Réanimation	Canule	11-05-90	11-04-89	50	3	12,5	17,1	18,1
S32				16-05-90	800	8			
* S33	Réanimation	Urines	01-06-89	30-05-89	200	5	1,6	1,8	1,8
S34				07-06-89	800	7			
S35	Medecine interne	Aspiration bronchique	02-02-90	22-01-90	200	5	2,2	2,3	2,2
S36				02-02-90	400	7			
S37	Chirurgie	Lame abdominale	17-04-90	09-04-90	50	1	7,3	9	8,8
S38				24-04-90	400	6			
S39	Réanimation	Trachée	01-06-90	06-06-90	200	1	4,9	4,6	4,8
S40				18-06-90	400	6			
S41	Urologie	Urines	31-01-90	16-11-90	100	1	9,2	9,5	9,4
S42				03-04-90	400	7			
S43	Chirurgie	Hémoculture	16-02-90	31-01-90	200	2	2	1,8	1,9
S44				06-02-90	100	6			
* S45	Réanimation	Liquide bronchique	16-02-90	20-02-90	400	ni	3,1	3,4	3,6
S46				21-02-90	400	6			
* S47	Urologie	Urines	04-01-90	28-12-89	200	1	3,1	3,5	3,5
S48				11-01-90	800	5			
* S49	Chirurgie	Liquide péritonéal	06-12-89	05-12-89	100	1	3,6	5,3	4,6
S50				20-12-89	800	8			
* S51	Oxygéno-thérapie	Urines	07-02-90	03-01-90	50	1	17,9	21,3	19,9
S52				27-03-90	800	7			
S53	Réanimation	Urines	05-01-90	19-12-89	200	3	1,6	1,8	1,6
S54				23-01-89	800	7			
* S55	Réanimation	Urines	?	31-10-89	100	1	21,7	27,3	20,5
S56				10-11-89	1600	6			
* S57	Urologie	Urines	25-05-90	19-03-90	200	5	2	2,2	2,2
S58				22-05-90	800	7			
* S59	Réanimation	Liquide Péritonéal	23-03-90	22-03-90	200	1	3,1	3,4	3,6
S60				29-03-90	400	7			

Tableau A. Liste des 60 séroconversions (sérums S1 à S60) pour lesquelles la candidose a été confirmée par la mycologie.
Scores en co-électrosynérèse : 1/négatif 2/douteux 3/un SP
4/un SPCS très faible 5/ un SPCS faible 6/un SPCS assez intense
7/ un SPCS intense 8/ un SPCS très intense.
* séroconversion étudiée sur NGLB
ni : non interprétable

3) 20 patients dont les sérums ont présenté un titre en IFI de 400 dont 10 avaient conjointement un test de détection d'antigène positif à un titre supérieur ou égal à 4 (sérums 31 à 40) et 10 pour lesquels le même test était négatif (sérums 41 à 50).

4) 30 patients (sérums S1 à S60) pour lesquels, au cours du suivi sérologique, la candidose a été confirmée par l'isolement de C.albicans dans un site normalement stérile (Tableau A).

1.9. Technique immunoenzymatique (E.L.I.S.A.).

La méthodologie suivie est une adaptation d'une technique déjà utilisée au laboratoire (12).

1.9.1. Antigènes.

La réactivité des sérums a été testée sur quatre antigènes : PPMT, PPMH, PPMB et NGLB.

1.9.2. Sensibilisation des plaques de microtitration.

* PPM.

On dépose au fond de chaque puits de plaques en polystyrène (Nunc Immuno type II), 100 µl d'antigène (PPMT à 1 µg/ml, PPMH et PPMB à 20 µg/ml) dilué en tampon carbonate 60 mM à pH 9,6.

Les plaques sont incubées (en chambre humide) 1 heure à 37°C, puis une nuit à + 4°C. Les puits sont ensuite lavés 4 fois en tampon TNT (Tris 50mM, NaCL 150 mM, HCL, pH 7,5, Tween 20 à 0,05 %), le dernier lavage durant 5 mn. On sature les puits pendant 1 heure à 37°C avec 100 µl d'albumine sérique bovine (BSA,

Fraction V, Boehringer, Mannheim) diluée à 3% en TNT sans Tween. Les puits sont ensuite lavés 3 fois avec du TNT.

* NGLB.

Les temps d'incubation, lavages et tampons sont identiques à ceux utilisés pour les PPM. Chaque puits est sensibilisé avec 50 μ l d'antigène à 10 μ g/ml. Parallèlement est réalisé sur la même plaque et pour chaque sérum un témoin lipide en déposant 50 μ l de C15 à 4,7 μ g/ml en tampon carbonate. Les plaques sont saturées avec une solution de BSA à 3%.

500 ng/puits

1.9.3. Détection des anticorps sériques.

* Antigènes : PPM.

100 μ l de serum dilué au 8000ème en tampon TNT, sont déposés au fond de chaque puits et incubés pendant une heure à 37°C. Les puits sont ensuite lavés 4 fois en TNT. 100 μ l d'anticorps couplé à la peroxydase (conjugué, sérum polyclonal de chèvre anti-immunoglobulines humaines IgG, IgM, IgA, couplé à la peroxydase. Zymed Laboratories, USA), dilué au 2000ème en TNT sont déposés dans chaque puits et incubés 1h à 37°C. Les puits sont lavés 5 fois en TNT. 100 μ l par puits d'une solution d'orthophénylène diamine (OPD) diluée en TNT à 1 g/l sont ensuite déposés et incubés pendant 30 mn. La réaction est arrêtée par 50 μ l d'H₂SO₄ 4N. Les densités optiques (D.O.) sont lues à 490 nm. Chaque sérum est également testé vis à vis d'un puits uniquement saturé avec de la BSA 3% : la soustraction des deux D.O. (Δ D.O.) permet d'obtenir la valeur réelle du sérum. Toutes les mesures sont

réalisées en duplicat et les valeurs correspondent à la moyenne des deux $\Delta D.O.$

* NGLB.

La méthodologie est la même que ci-dessus. Seules changent les quantités et concentrations suivantes: pour les sérums (50 μ l dilué au 1000ème) et le conjugué (50 μ l dilué au 1000ème). La D.O. de chaque sérum et la D.O. de son témoin lipide sont soustraites ($\Delta D.O.$). Toutes les mesures ont été effectuées en duplicat et la moyenne des D.O. fixe la valeur finale du sérum.

1.10. Analyse statistique.

Trois méthodes ont été utilisées : la méthode des couples qui compare la moyenne de n différences à zéro et le test d'indépendance entre deux variables d'une part (54) d'autre part, un test plus puissant, l'analyse en composante principale. Celle-ci a comporté six variables : PPMT, PPMH, PPMB,IFI, COEL et Cand-Tec° et a été réalisée sur les 107 sérums pour lesquels la totalité des variables avaient pu être déterminées.

II. RESULTATS.

2.1. Production des antigènes.

La dépolymérisation partielle des PPMT permet d'obtenir d'une part, des PPM et d'autre part des oligomannosides séparés par chromatographie de gel filtration.

2.1.1. Séparation et analyse des fractions après hydrolyse acide.

L'hydrolyse acide provoque une coupure des liaisons phosphodiester. L'analyse en CCM des oligomannosides H montre qu'ils sont constitués d'oligosaccharides possédant de 1 à 8 résidus mannose (Figure 1). Les composés majoritaires s'étendent du mannose au mannotétraose. Le spectre RMN effectué sur le pool révèle la présence de liaisons osidiques α et β (Figure 2).

2.1.2. Séparation et analyse des fractions après β élimination.

L'analyse en CCM montre que les oligomannosides β sont constitués de 1 à 7 résidus mannose (Figure 3). Les deux oligomannosides quantitativement majoritaires sont le mannobiose et le mannotriose, pour lesquels le spectre R.M.N. a été réalisé (Figure 4). Leurs paramètres ont été interprétés d'après les données fournies par Cohen et Ballou (7) (Tableau B).

2.1.3. Composition chimique des PPM.

La composition en glucides et en protéines a été réalisée sur les PPMT et PPM β .

Les PPMT contiennent 70 % de glucides et 5,8 % de protéines.

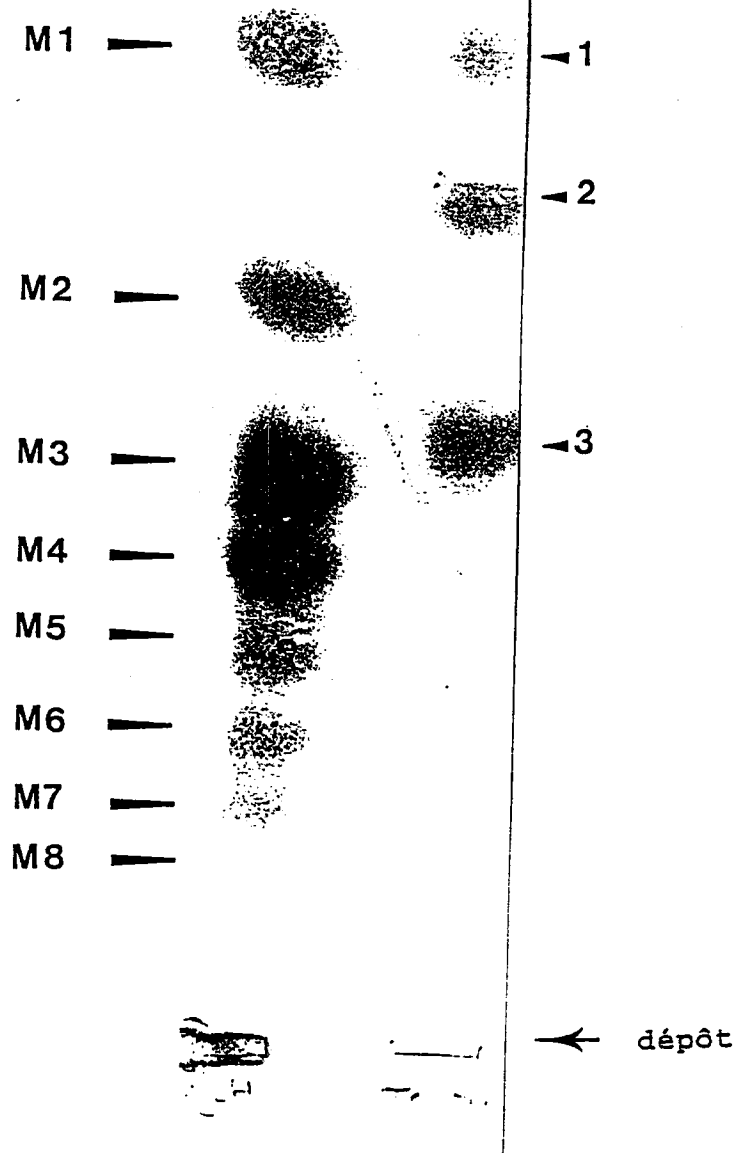


FIGURE 1. CCM (révélée à l'orcinol) des oligomannosides H ayant migré en parallèle avec un témoin composé de mono, di et tri-saccharides (1,2,3). Le disaccharide témoin migre plus haut que M2 . La figure montre que les oligomannosides H comportent de 1 à 8 résidus mannoſe (M1 à M8); M1, M2, M3, M4 sont majeurs.

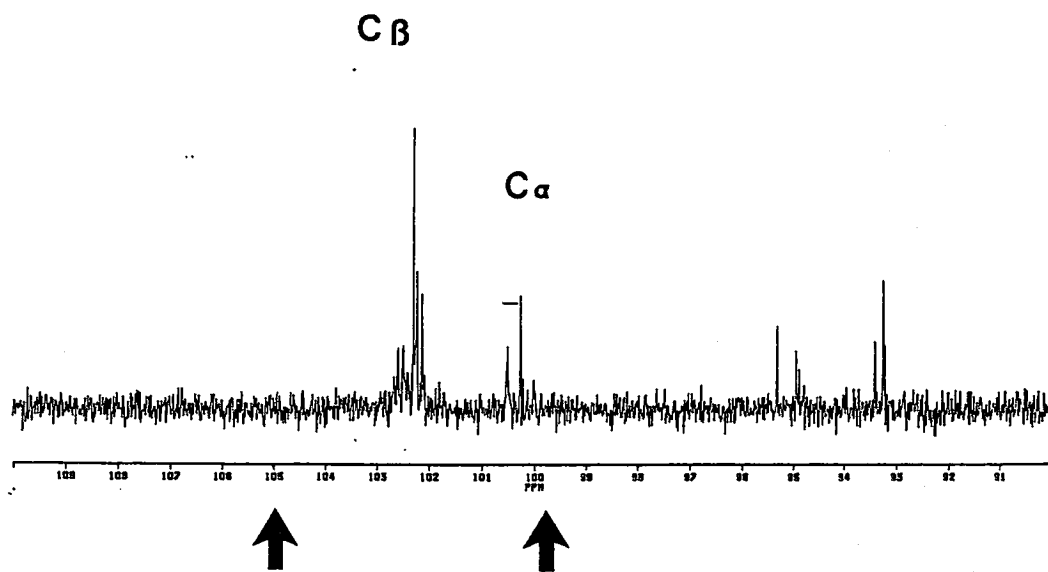


FIGURE 2a

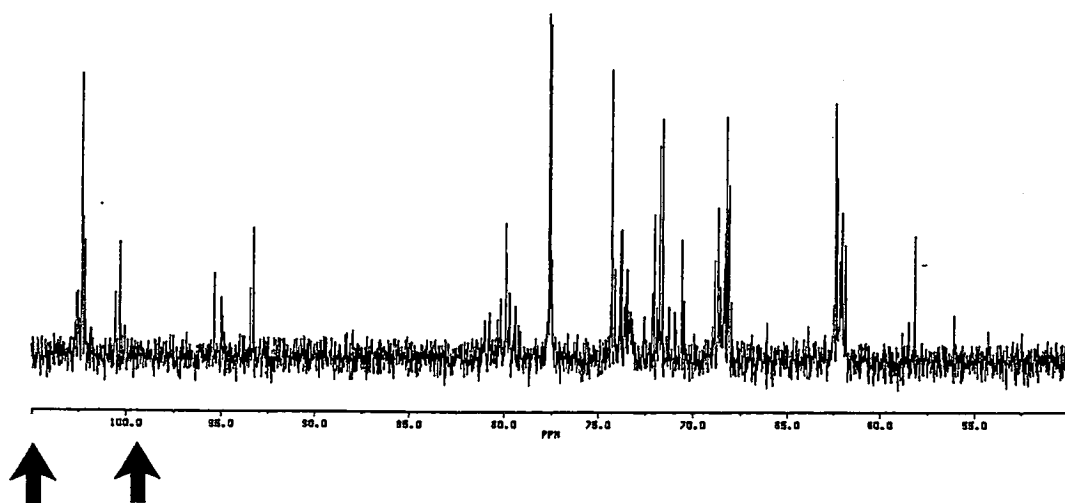


FIGURE 2b

FIGURE 2. Analyse en R.M.N. (C^{13}) des oligomannosides H. La figure 2b représente le spectre total. La figure 2a est une extension de la région des carbones anomériques (indiquée par les flèches). L'analyse du spectre fait apparaître des anomères α (région 100-101 ppm) et β (région 102-103 ppm).

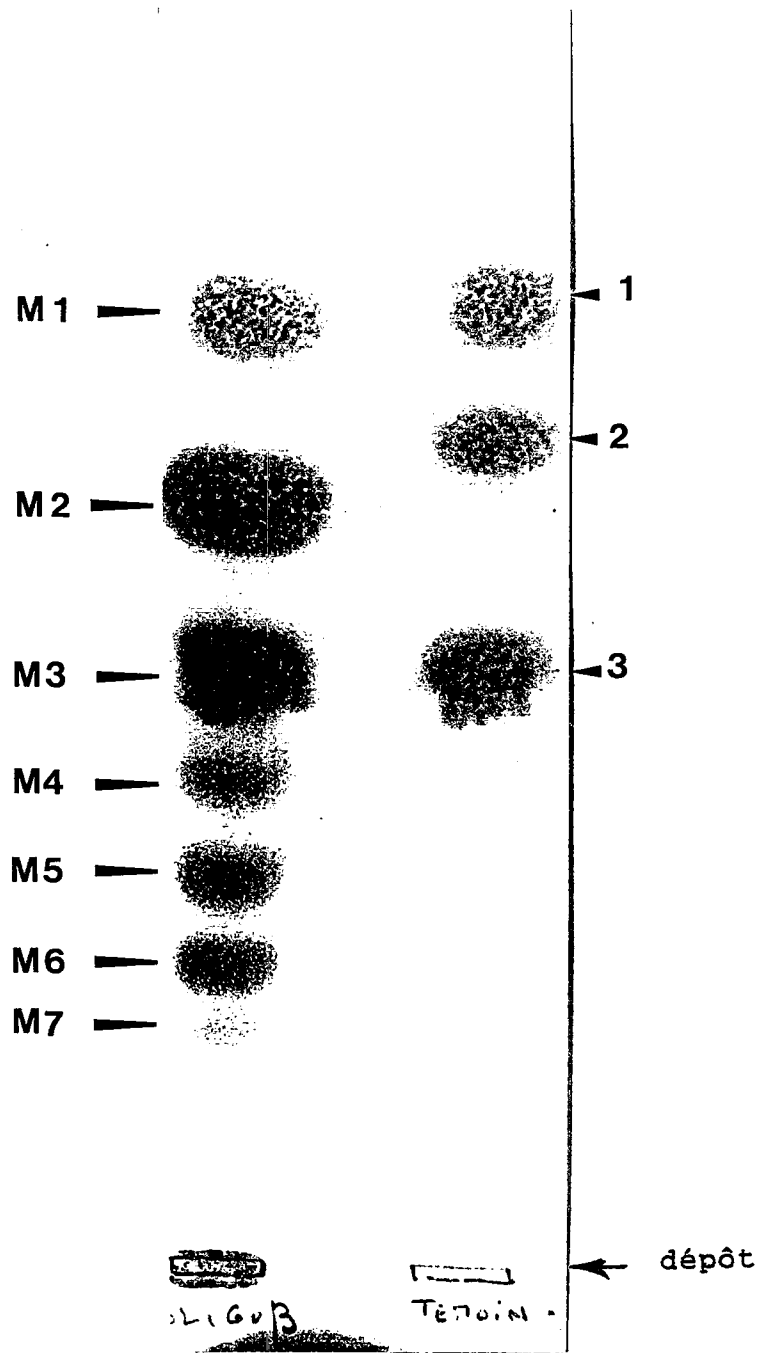


FIGURE 3. CCM (révélée à l'orcinoï) des oligomannosides β ayant migré en parallèle avec un témoin composé de mono, di et tri-saccharides (1,2,3). Les oligomannosides β sont constitués de 1 à 7 résidus mannoses (M1 à M7); M2 et M3 sont majeurs.

	B	A	C	B	A
	MAN (α 1-2) Man	Man (α 1-2) Man	Man (α 1-2) Man	Man (α 1-2) Man	Man (α 1-2) Man
H1	5,043	5,378(α) 4,916(β)	5,045	5,297	5,368(α) 4,911(β)
H2	4,072	3,951	4,065	4,109	N.D.

Tableau B Glissements chimiques des protons H1 et H2 des oligomannosides libérés par β élimination (25°C).

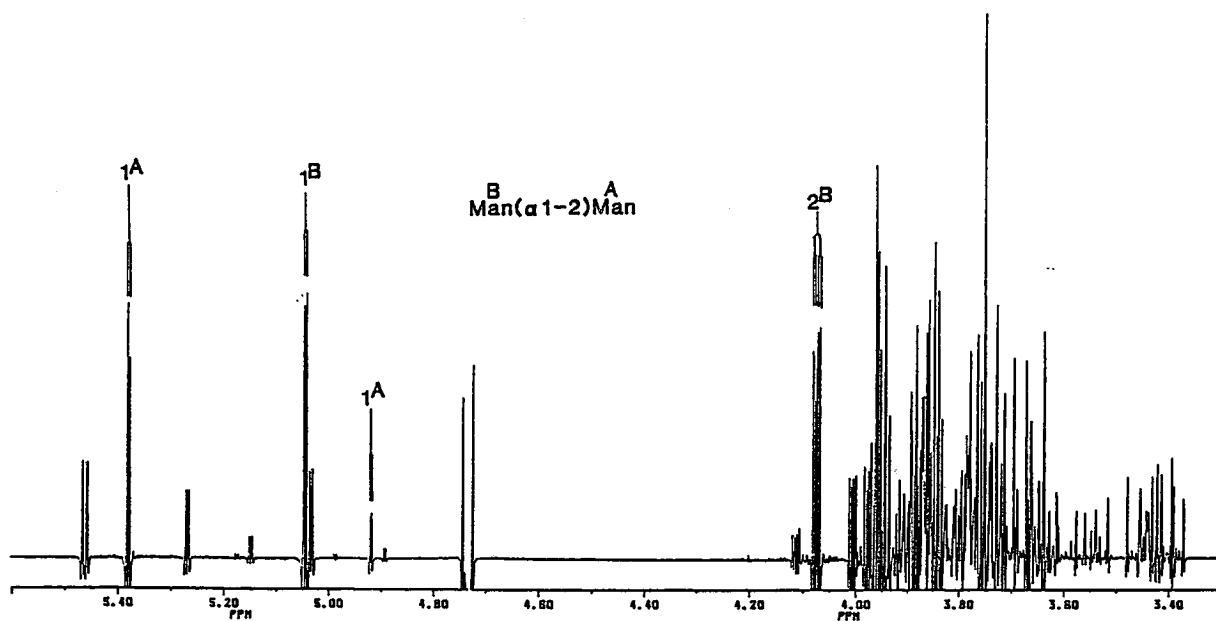


FIGURE 4a

FIGURES 4 : Analyse en résonance magnétique nucléaire (RMN-400MHz) du proton de deux oligomannoses β , le mannobiose (FIGURE 4a) et le mannotriose (FIGURE 4b). L'analyse du spectre fait apparaitre des liaisons ($\alpha 1-2$)

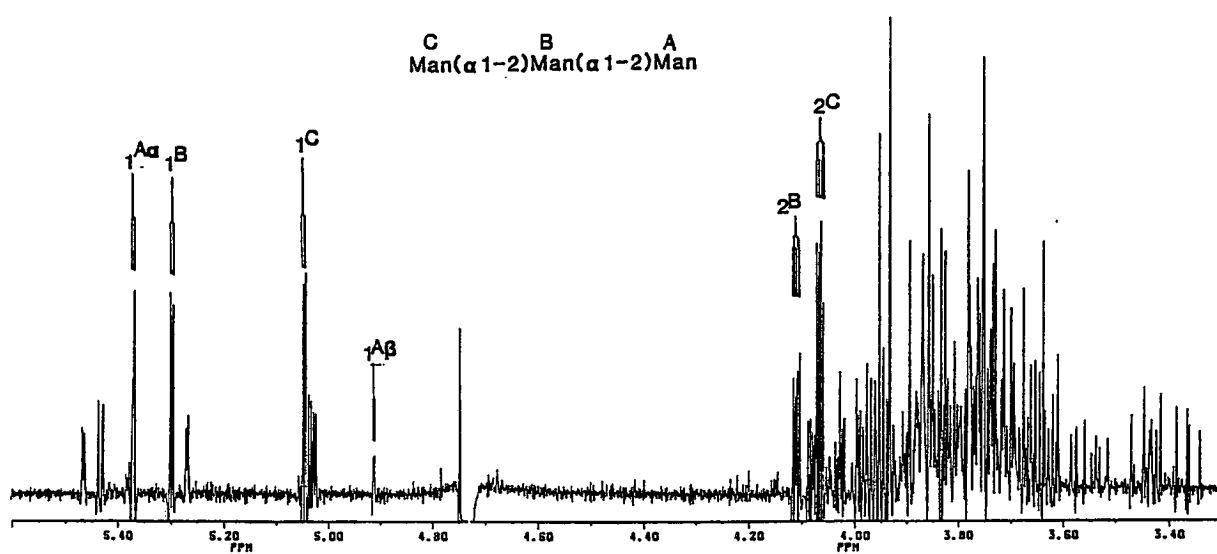


FIGURE 4b

Les PPM β contiennent 92 % de glucides et 4,4 % de protéines. Ces valeurs ont été calculées par rapport au poids sec de PPM.

2.2. Analyse de la réponse humorale envers les phosphopeptidomannanes.

2.2.1. Mise au point de la technique E.L.I.S.A.

* Courbes de saturation en antigène.

La concentration de PPM à utiliser pour sensibiliser les plaques a été déterminée avec 4 sérums: un sérum témoin sain, T22; un sérum de patient après séroconversion, S4; deux sérums d'un même patient avant et après séroconversion S1 et S2.

Ce travail a été réalisé par la méthode de l'échiquier qui permet l'étude parallèle des dilutions du conjugué et des sérums. Les résultats obtenus avec le conjugué dilué au 1/4000ème et les sérums au 1/2000ème sont présentés sur les figures 5a, 5b, 5c.

Les concentrations suivantes ont été retenues (en $\mu\text{g/ml}$):

PPMT = 1, PPMH = 20, PPM β = 20.

* Dilution des sérums et du conjugué.

Les conditions optimales pour atteindre le maximum de sensibilité ont été déterminées avec les sérums S2, S4, S39, T22 et S46.

Les figures 6a à 6i (6a à 6c/PPMT; 6d à 6f/PPMH; 6g à 6i/PPM β) représentent les courbes en fonction de trois concentrations de conjugué. Pour les 5 sérums et sur les trois types de PPM, les courbes tendent vers une droite, quand le conjugué est dilué au 1/1000ème ou au 1/2000ème.

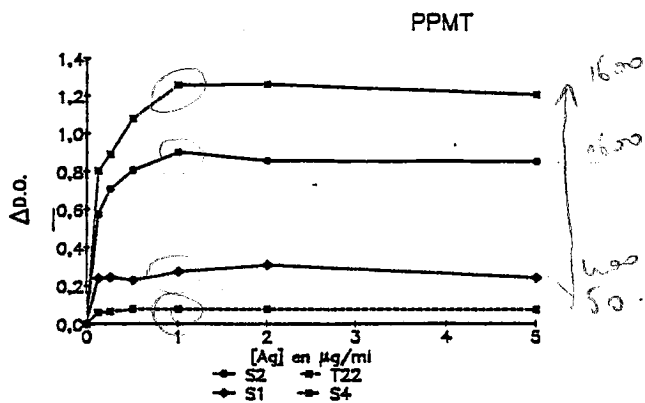


FIGURE 5a

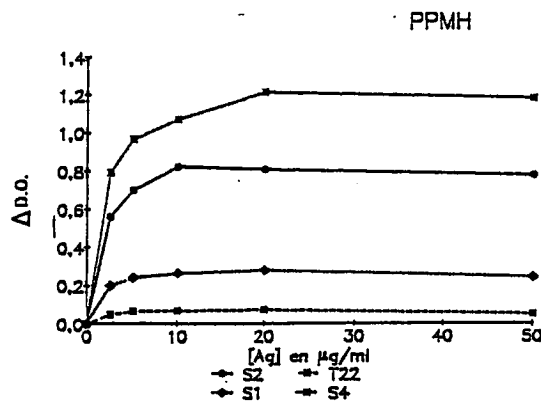


FIGURE 5b

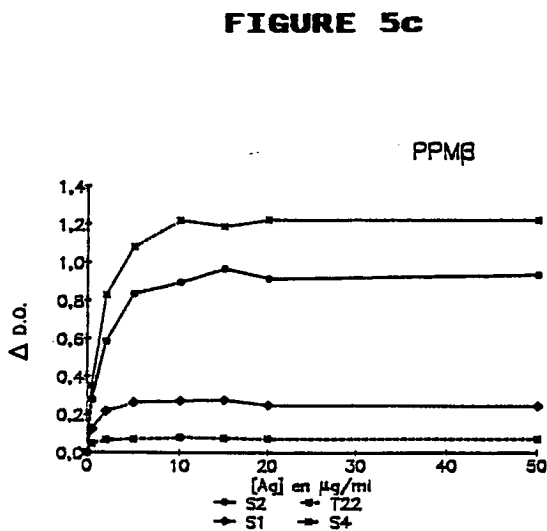


FIGURE 5c

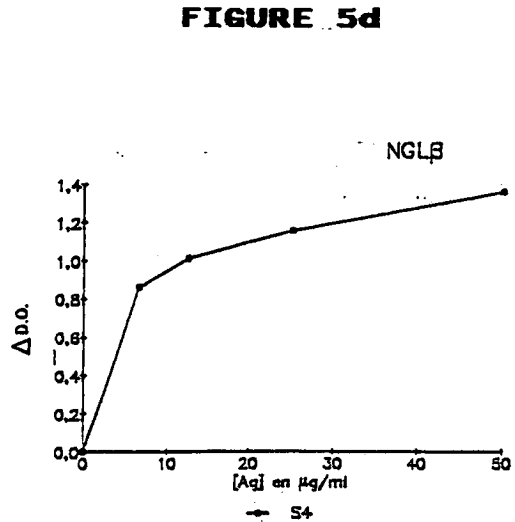


FIGURE 5d

FIGURES 5a à 5c. Courbes de saturation en antigène réalisées en E.L.I.S.A sur PPMT (5a), PPMH (5b) et PPMB (5c) avec 4 sérums S1, S2, S4 et T22. Les concentrations en antigènes choisies pour sensibiliser les plaques de microtitration sont 1μg/ml pour les PPMT et 20 μg/ml pour les PPMH et PPMB.

FIGURE 5c. Courbe de saturation en antigène réalisée en E.L.I.S.A. sur NGLB avec le sérum S4. Le plateau n'est pas atteint. Néanmoins, la concentration d'antigène choisie est 10 μg/ml.

ETUDE DE LA SENSIBILITE

SUR PPMT

CONJUGUE à $2,5 \cdot 10^{-4}$

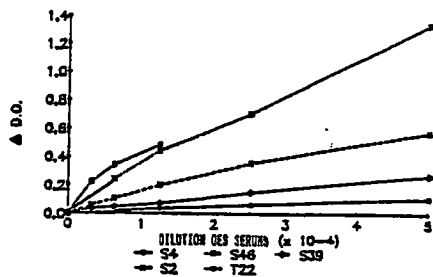


FIGURE 6a

SUR PPMH

CONJUGUE à $2,5 \cdot 10^{-4}$

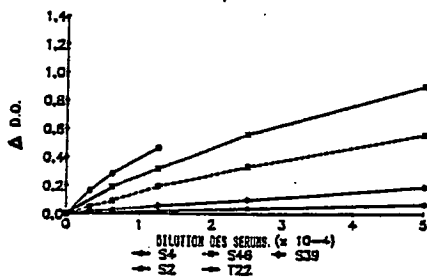


FIGURE 6d

SUR PPMβ

CONJUGUE à $2,5 \cdot 10^{-4}$

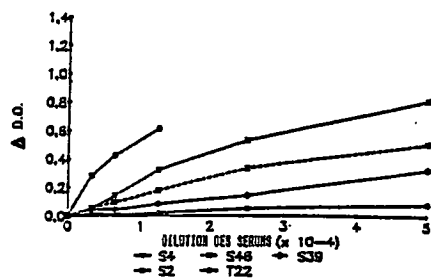


FIGURE 6g

CONJUGUE à $5 \cdot 10^{-4}$

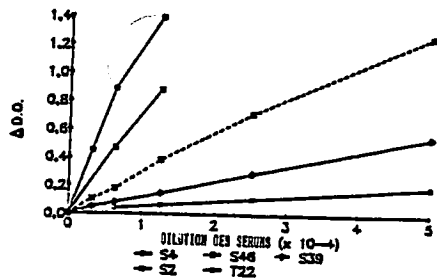


FIGURE 6b

CONJUGUE à $5 \cdot 10^{-4}$

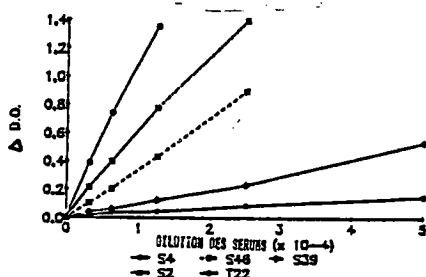


FIGURE 6e

CONJUGUE à $5 \cdot 10^{-4}$

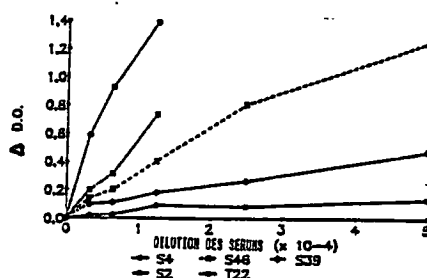


FIGURE 6h

CONJUGUE à 10^{-3}

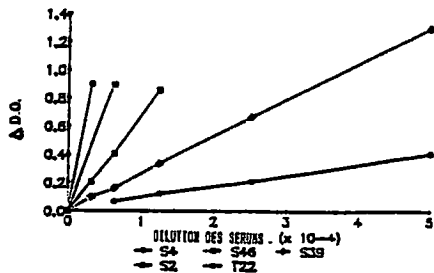


FIGURE 6c

CONJUGUE à 10^{-3}

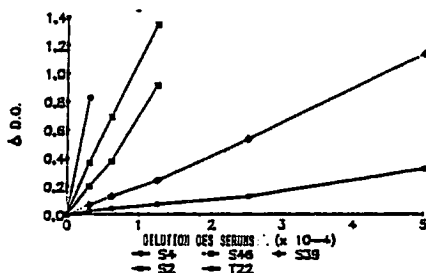


FIGURE 6f

CONJUGUE à 10^{-3}

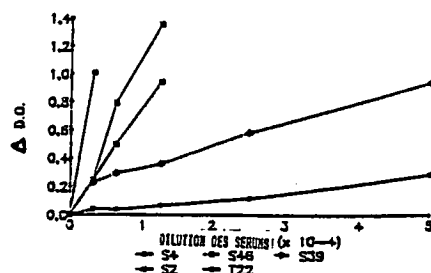


FIGURE 6i

FIGURES 6a à 6i. Etude de la sensibilité du test E.L.I.S.A. sur PPMT, PPMH et PPMβ. Les courbes représentent les réponses de 5 sérums en fonction de leur concentration : trois dilutions différentes de conjugué ont été étudiées. Les dilutions du conjugué et des sérums choisies sont respectivement $1/2000$ et $1/8000$.

Les dilutions retenues sont 1/2000ème pour le conjugué et 1/8000ème pour les sérums, ce qui permet de s'approcher des conditions où les D.O. sont proportionnelles aux concentrations.

2.2.2. Réactivité des sérums humains vis à vis des PPMT, PPMH et PPMB.

* Analyse des corrélations avec l'IFI.

Les figures 7 à 9 rapportent les résultats obtenus en ELISA vis à vis des 3 catégories d'antigène, en fonction de l'origine des sérums et de leur titre en IFI. Sont également définis, sur chacune de ces figures les coefficients de corrélations observés pour chaque antigène, toutes catégories de sujets confondus. Les coefficients de corrélation diffèrent significativement de 0 avec un risque d'erreur inférieur à 1 pour 1000. Le coefficient de corrélation le plus élevé a été observé avec les PPMH.

En définissant le seuil significatif comme la moyenne des D.O. des sérums des 30 sujets témoins, augmentée de deux déviations standard, le maximum de discordances entre l'ELISA et l'IFI apparaît quelque soit la nature de l'antigène utilisé en ELISA, pour un titre d'IFI de 200, seuil charnière de cette dernière méthode. Cependant, les seuils significatifs plus faibles de l'ELISA impliquant les PPMH et les PPMB permettent une meilleure discrimination entre les sujets sains et les sujets candidosiques (Figures 7 à 9).

PPMT

CORRELATION IFI/ELISA

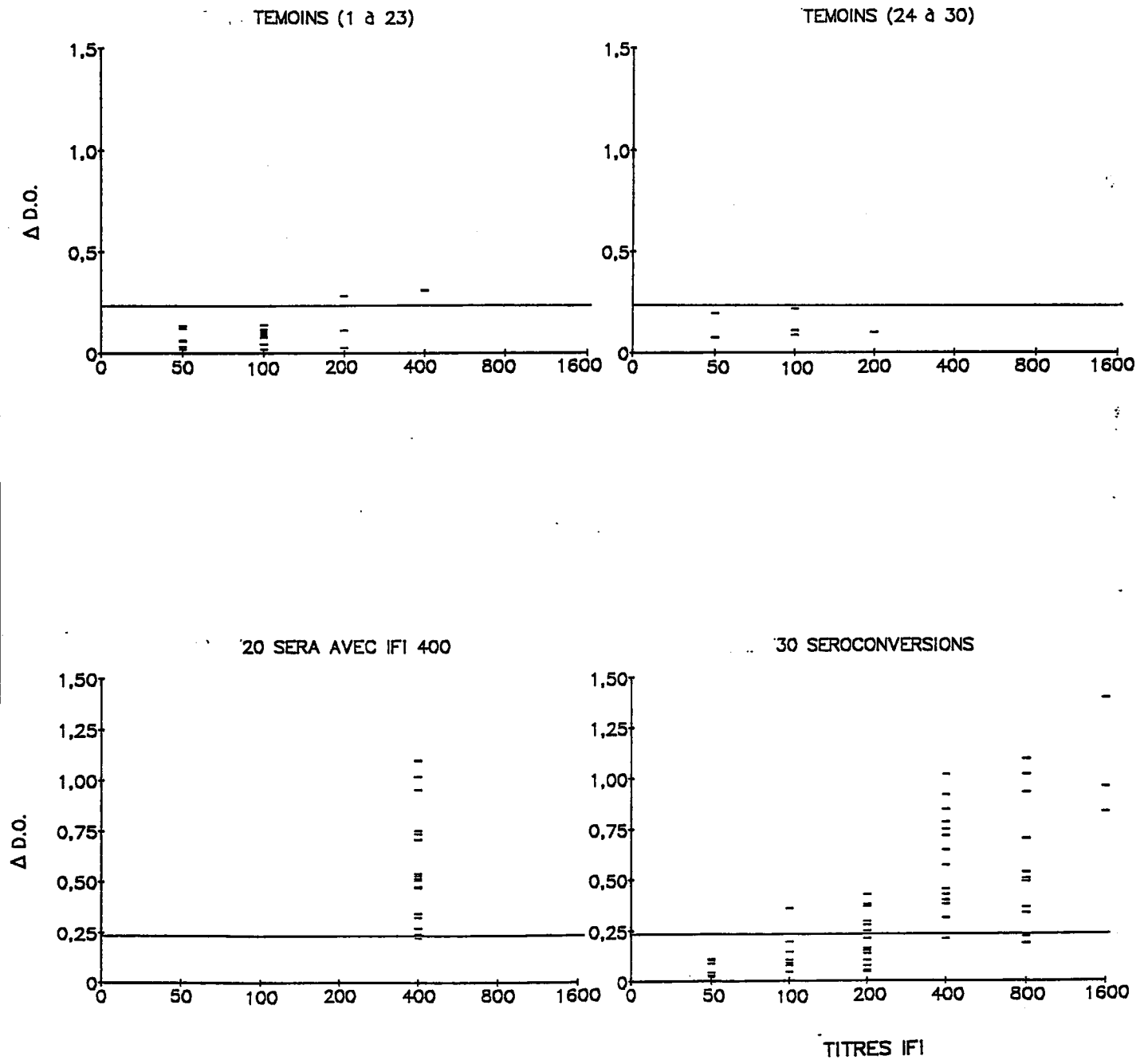


FIGURE 7. Etude de la réponse en E.L.I.S.A. sur PPMT des quatres groupes de sérums en fonction de leur titre IFI. Chaque tiret correspond à une D.O. La barre horizontale représente le seuil significatif du test E.L.I.S.A./PPMT. Le coefficient de corrélation global (défini sur les 4 groupes) est 0,75.

PPMH

CORRELATION IFI/ELISA

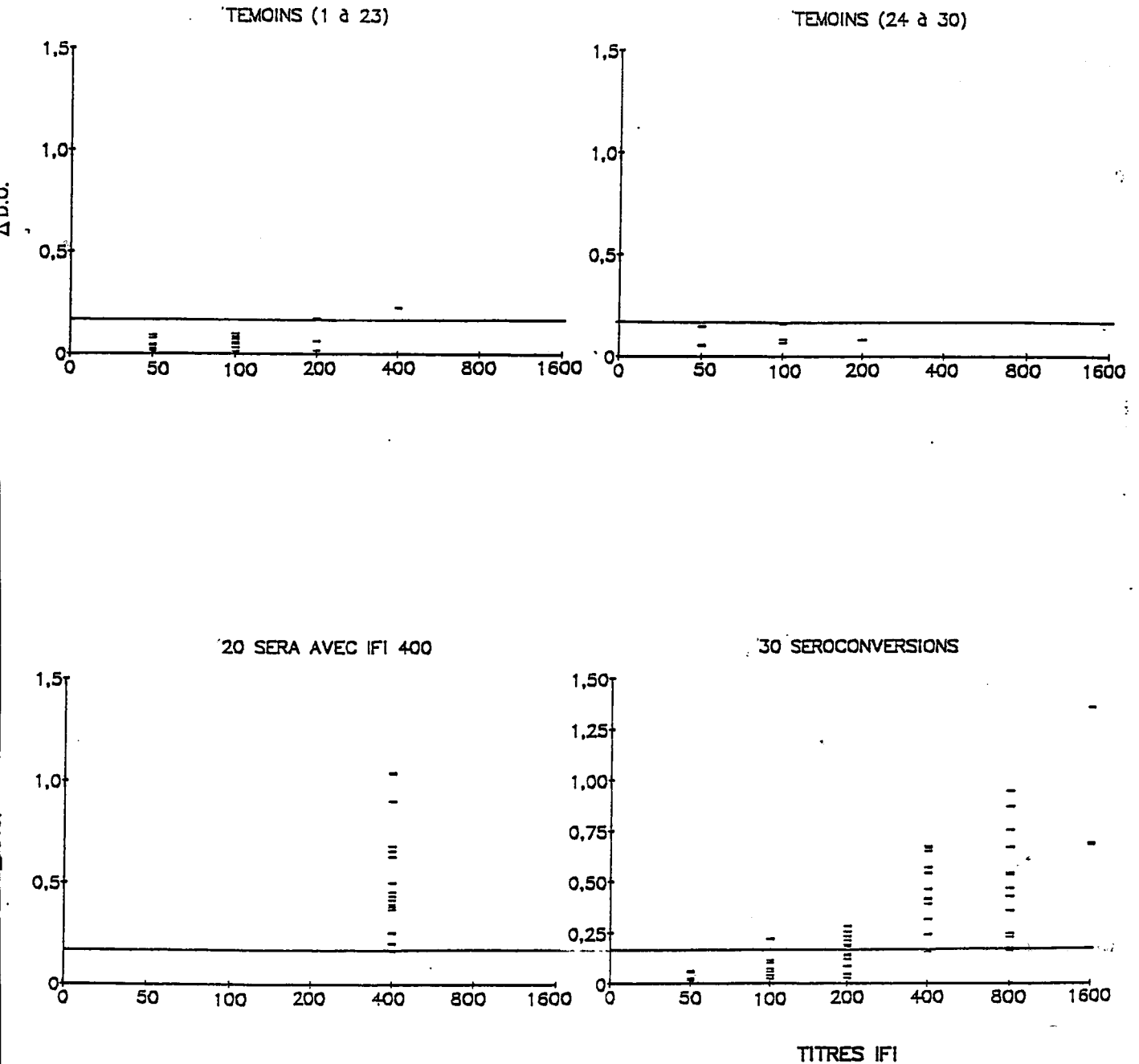


FIGURE 8. Etude de la réponse en E.L.I.S.A. sur PPMH des quatres groupes de sérums en fonction de leur titre IFI. Chaque tiret correspond à une D.O. La barre horizontale représente le seuil significatif du test E.L.I.S.A./PPMH. Le coefficient de corrélation global (défini sur les 4 groupes) est 0,80.

PPM_B

CORRELATION IFI/ELISA

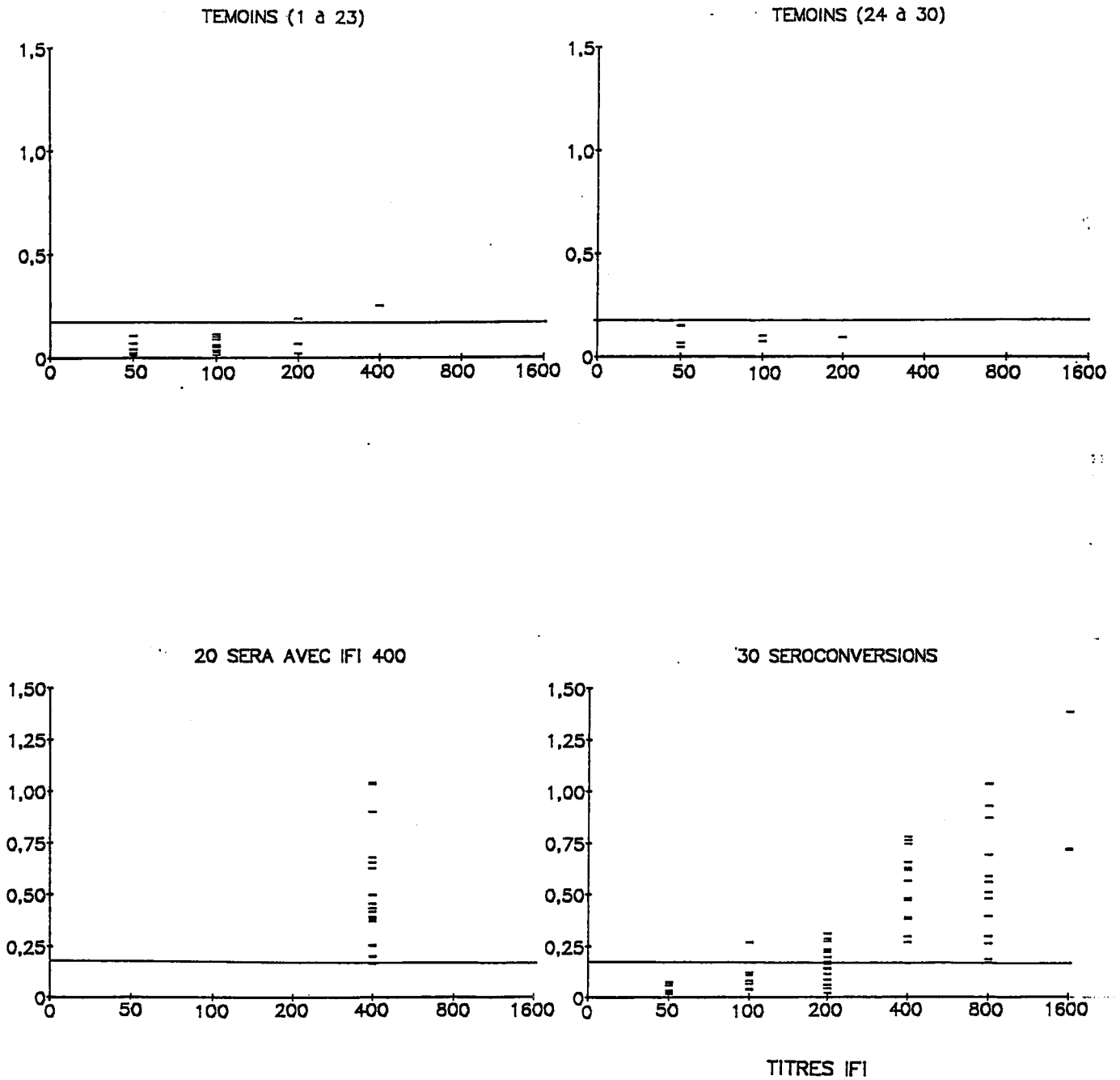


FIGURE 9. Etude de la réponse en E.L.I.S.A. sur PPM_B des quatres groupes de sérums en fonction de leur titre IFI. Chaque tiret correspond à une D.O. La barre horizontale représente le seuil significatif du test E.L.I.S.A./PPM_B. Le coefficient de corrélation global (défini sur les 4 groupes) est 0,76.

* Analyse des corrélations avec la co-électrosynérèse.

Les résultats sont reportés sur les figures 10 à 12 selon des modalités identiques à celles utilisées précédemment pour l'IFI. Les coefficients de corrélation diffèrent de 0 avec un risque d'erreur inférieur à 1 pour 1000, ils sont par ailleurs supérieurs à ceux observés pour l'IFI, le coefficient de corrélation le plus élevé étant observé dans le cas présent pour les PPMT. Cependant, en considérant les seuils significatifs associés à chaque antigène, comme dans le cas de l'IFI, ce sont les antigènes PPMH et PPM β qui fournissent les résultats les plus concordants avec le diagnostic posé par co-électrosynérèse (nombre inférieur de faux négatifs).

* Analyse des rapports de séroconversion.

L'analyse cinétique de l'évolution du taux des anticorps chez un patient étant un facteur essentiel du diagnostic sérologique, nous avons comparé, sur chaque antigène les rapports des D.O. avant et après séroconversion pour les sérums S1 à S60 (Tableau A). L'analyse statistique (comparaison à 0 de la moyenne des différences des rapports) montre que les rapports observés sur les PPMH et les PPM β sont significativement plus élevés que sur les PPMT avec un risque d'erreur nettement inférieur à 5%. Par contre la différence n'est pas significative entre les PPMH et PPM β . Ces résultats montrent la meilleure valeur diagnostique des antigènes PPMH et PPM β par rapport à l'antigène PPMT. Ils confirment l'analyse précédente qui avait permis de suspecter ces propriétés.

PPMT

CORRELATION CO-ELECTROSYNERESE/ELISA

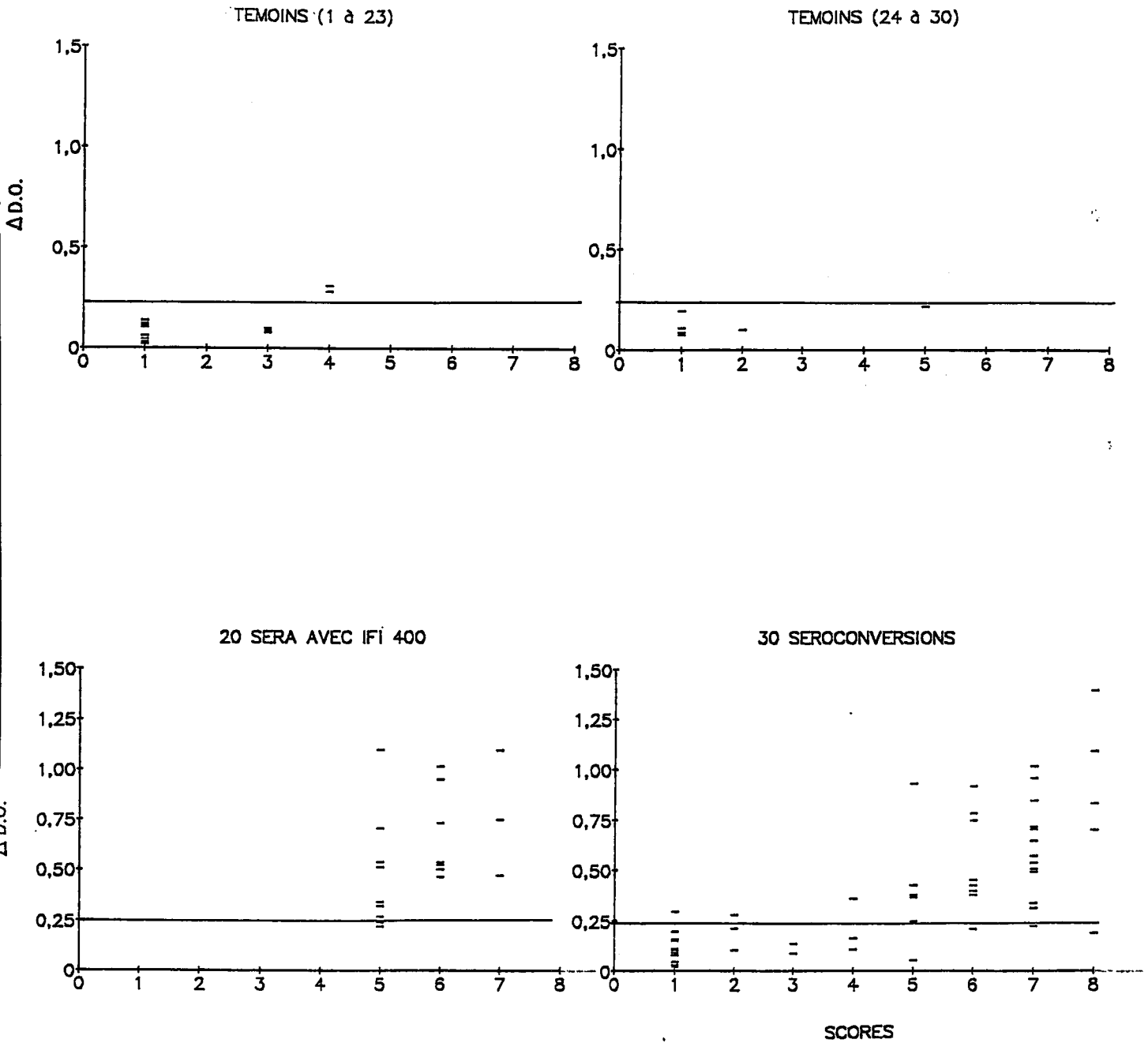


FIGURE 10. Etude de la réponse en E.L.I.S.A. sur PPMT des quatres groupes de sérums en fonction de leur score en co-électrosynérèse. Chaque tiret correspond à une D.O. La barre horizontale représente le seuil significatif du test E.L.I.S.A./PPMT. Le coefficient de corrélation global (défini sur les 4 groupes) est 0,77.

PPMH

CORRELATION CO-ELECTROSYNERESE/ELISA

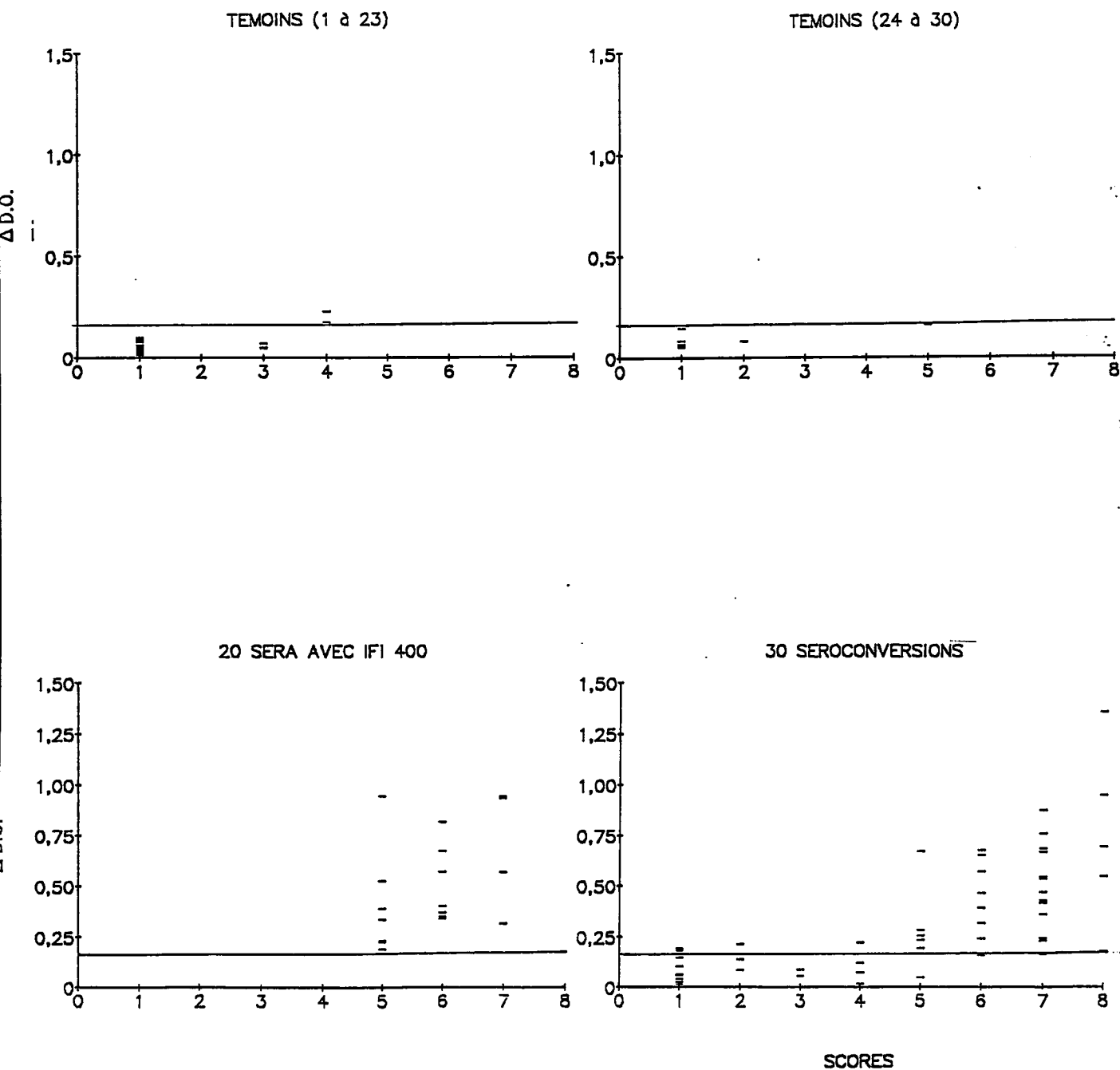


FIGURE 11. Etude de la réponse en E.L.I.S.A. sur PPMH des quatres groupes de sérums en fonction de leur score en co-électrosynérèse. Chaque tiret correspond à une D.O. La barre horizontale représente le seuil significatif du test E.L.I.S.A./PPMH. Le coefficient de corrélation global (défini sur les 4 groupes) est 0,75.

PPM β
CORRELATION CO-ELECTROSYNERESE/ELISA

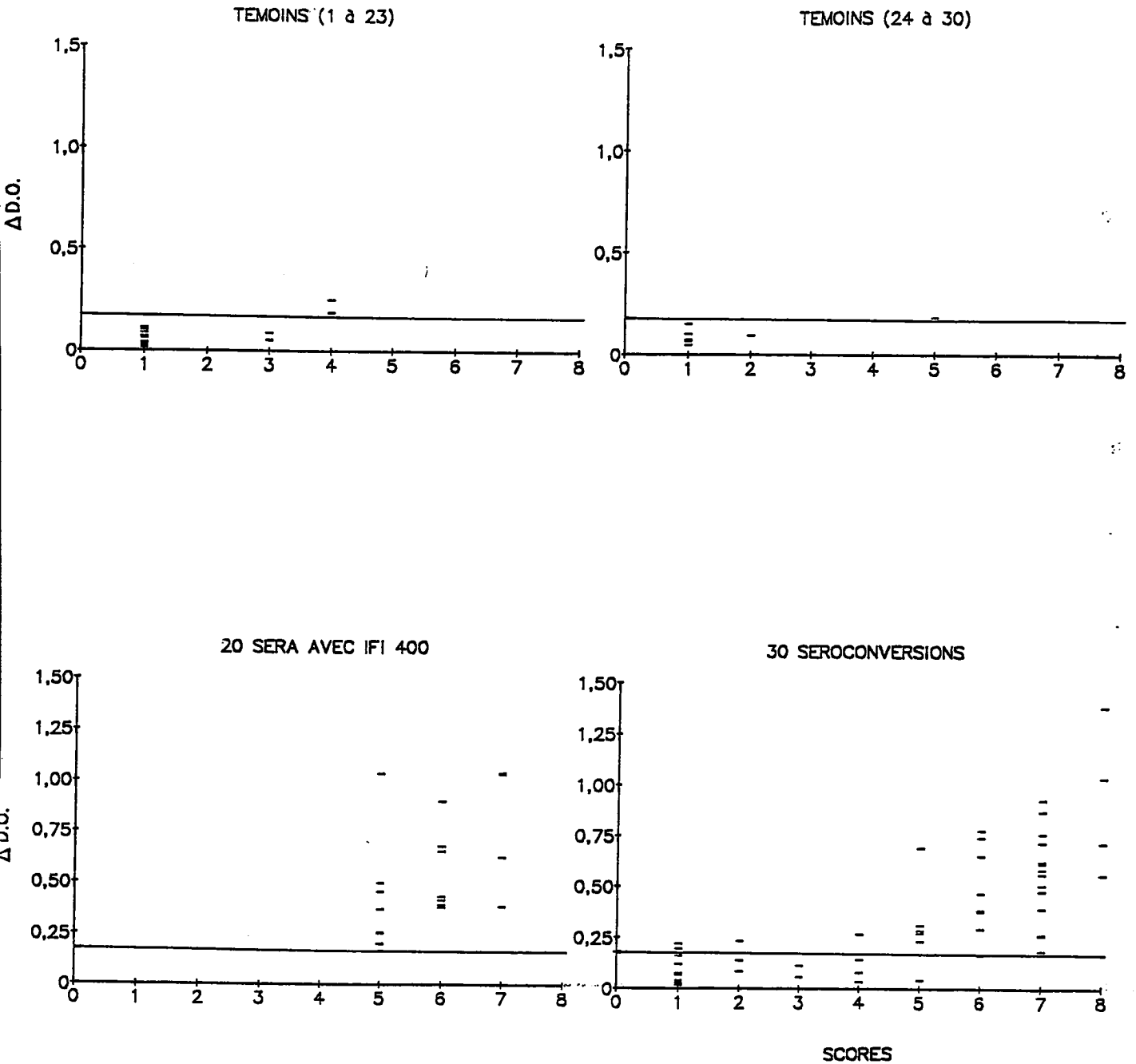


FIGURE 12. Etude de la réponse en E.L.I.S.A. sur PPM β des quatres groupes de sérums en fonction de leur score en co-électrosynérèse. Chaque tiret correspond à une D.O. La barre horizontale représente le seuil significatif du test E.L.I.S.A./PPM β . Le coefficient de corrélation global (défini sur les 4 groupes) est 0,76.

* Analyse en ACP.

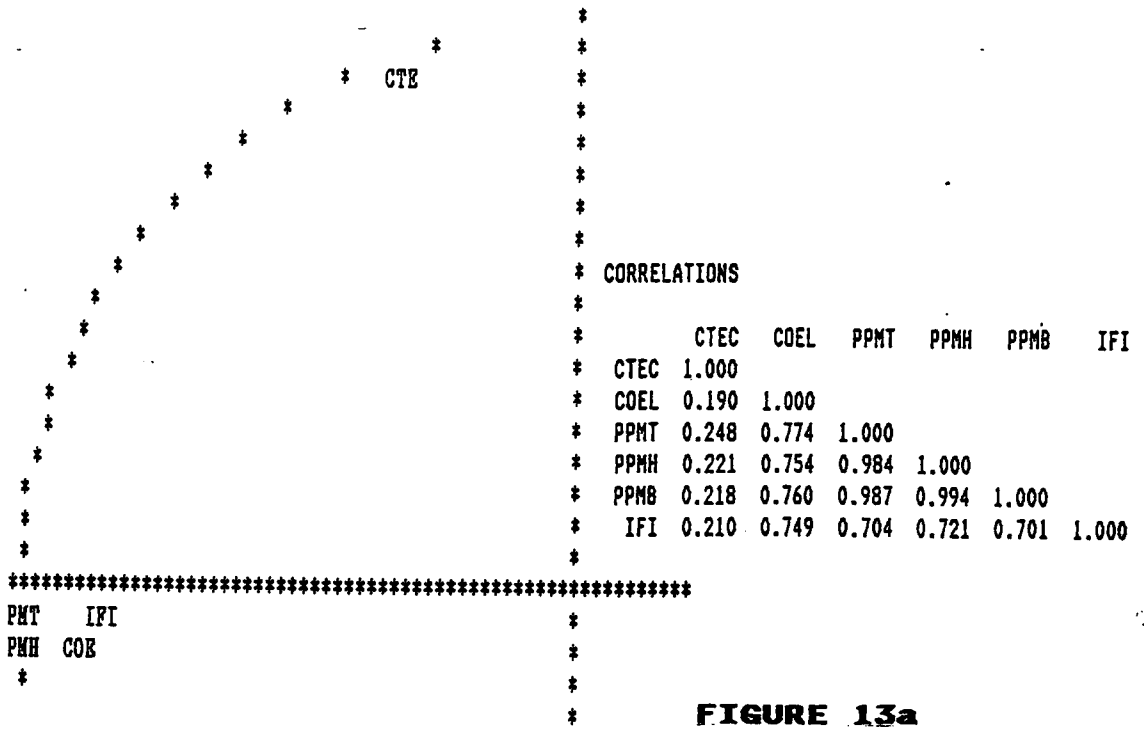
Une analyse globale de l'ensemble des données réalisée en ACP a été entreprise afin de rechercher l'influence éventuelle de la présence d'antigène circulant sur les signaux E.L.I.S.A. Deux axes principaux de corrélation ont été obtenus (Figure 13a). L'un est défini par 5 variables: IFI, Coel, PPMT, PPMH, et PPM β : il explique 72 % de la variation. Le second est défini par le Cand-Tec° : il explique 15 % de la variation. Les deux axes sont rigoureusement orthogonaux, ce qui traduit l'indépendance des variables définissant les axes.

Après avoir étudié la réponse humorale des patients sur les PPM successivement déplétés, l'exploration de l'antigénicité des oligomannosides libérés après β élimination puis couplés (NGL β) a été testée en E.L.I.S.A. vis à vis de 15 séroconversions précédemment étudiées sur les PPM.

2.3. Analyse de la réponse humorale sur les néoglycolipides β .

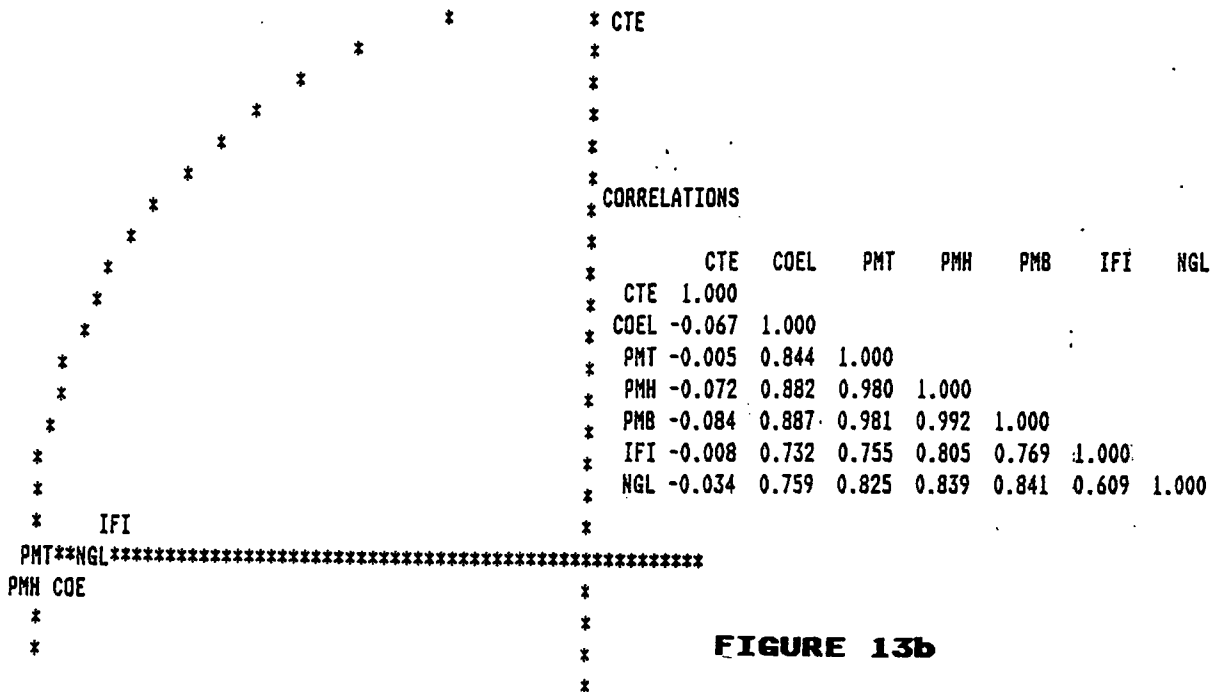
2.3.1. Synthèse des néoglycolipides β .

Le pool d'oligomannosides β été couplé à l'hexadecylaniline pour former des néoglycolipides. Leur analyse en CCM révèle la présence de 6 composés révélés en lumière UV grâce à la fluorescence des copules lipidiques (Figure 14a) et de 5 composés après coloration à l'orcino1 (Figure 14b) - le couplage d'un mannose libre engage sa fonction aldéhydique ce qui gêne sa



POINT VU : PMH

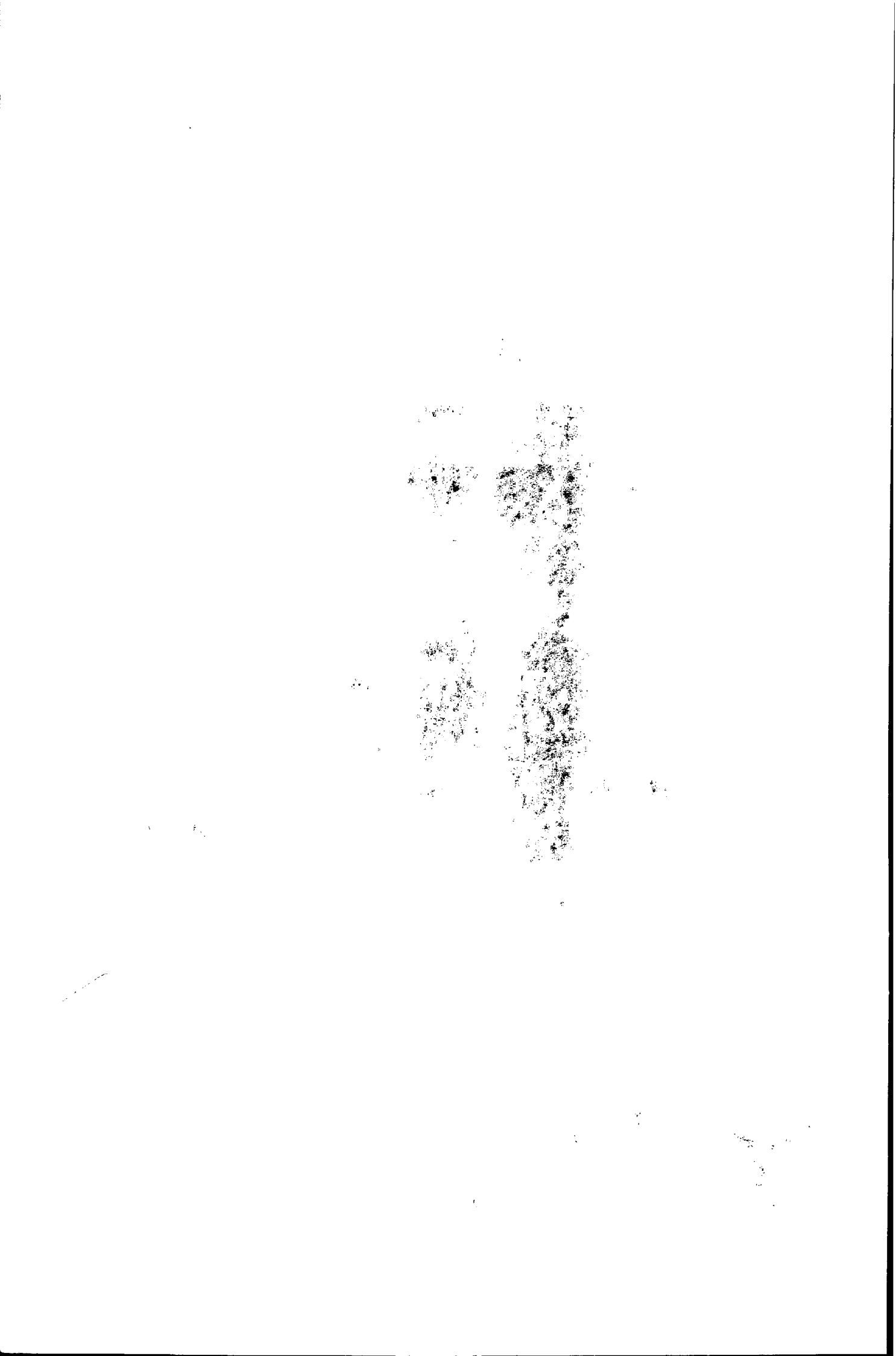
POINT CACHE : PMB



FIGURES 13a et 13b. Analyse en ACP, cercle et coefficients de corrélation.

FIGURE 13a. Sur cette figure apparaissent les deux axes de corrélation définis par l'ACP sur 107 sérums. Les variables définissant les axes apparaissent sur le cercle des corrélations.

FIGURE 13b. Sur cette figure apparaissent les deux axes de corrélation définis par l'ACP sur 30 sérums correspondant aux 15 séroconversions étudiées sur NGLB.



1. Non lié à la structure chimique
 car serait lié en RFLN et 50/50 sur bande pas Normal

2. Hypothèse : 1^{re} Pb ionisation.
 lié à la partie ACRYLONE.
 → 1^{er} solvant pour UNIT (pluante baraque)

NH → ionisation possible

→ 2^{de} du couple / blocage
 de immu (N acétylation
 bicarbonate saturé - N-acétylation)

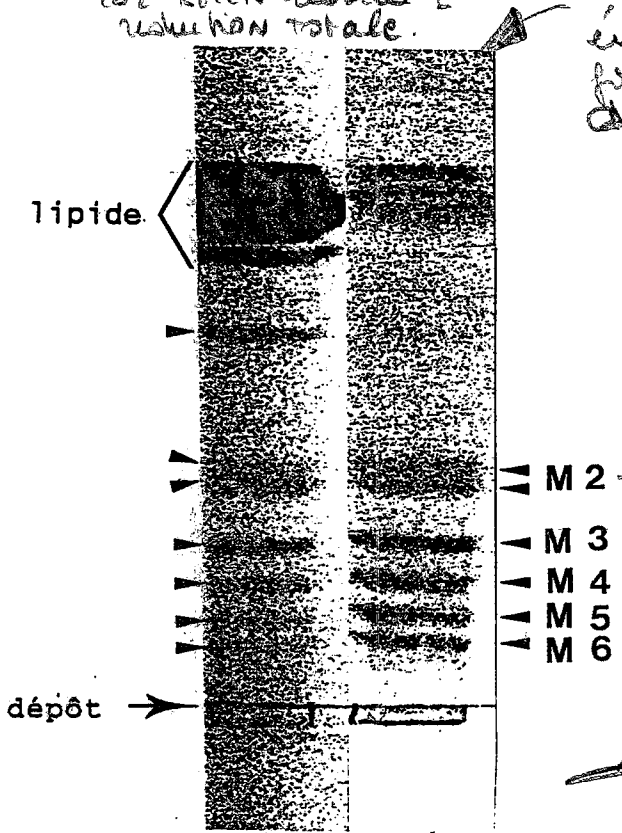
Réduits partielle non échangeable
 car RFLN donne 2 réduction totale.

entraîne de plus une fixation non spécifique des protéines.

Due à forte aglycone -

→ Ionisation du solvant

→ Réduction ~~totale~~



14 a 14 b

~~N Acétylation~~

→ bicarbonate saturé
 acrylate
 partie fixation non spécifique des protéines

FIGURES 14a et 14b. CCM des NGLB.

La figure 14a représente la CCM éclairée sous lumière UV. Il apparaît 7 bandes distinctes sous le front du solvant.

La figure 14b représente la CCM après révélation à l'orcinol. 6 bandes apparaissent nettement. Elles correspondent aux

oligomannosides M2 à M6 couplés. Le mannose (M1) est difficilement révélaté à l'orcinol et la bande correspondante (visible en UV) est à peine perceptible sur la figure.

NB. L'interprétation a été faite grâce à la migration conjointe de témoins connus.

révélation par l'orcinoï sulfurique. L'analyse des CCM suggèrent la présence de deux isomères du mannobiose.

2.3.2. Mise au point de la technique E.L.I.S.A.

La saturation en antigène des puits a été étudiée sur le sérum S4. Le peu de matériel dont nous disposons ne nous a pas permis de réaliser suffisamment d'essais pour travailler dans des conditions optimales c'est à dire à saturation des puits (cf. figure 3d). Néanmoins les puits ont été sensibilisés à 10 µg/ml, en bloquant les sites résiduels avec de la BSA à 3%. Le conjugué et les sérums ont été dilués au 1000ème, qui sont les dilutions donnant les D.O. maximales détectables.

2.3.3. Réactivité des sérums humains sur les NGL B.

* Analyse des corrélations avec l'IFI, la Co-électrosynérèse.

Cette analyse a concerné 15 séroconversions (Figure 15). Les résultats observés en ELISA sur NGLB sont corrélés avec ceux observés en IFI et co-électrosynérèse, le coefficient de corrélation étant nettement plus élevé dans ce dernier cas.

Ces résultats démontrent l'antigénicité des constructions réalisées. Ils sont confirmés par l'expression des résultats fournis par chaque couple de sérum, avant et après séroconversion (Figure 16). Chaque patient étant alors son propre témoin, une séroconversion détectée par les techniques de routine s'est traduite dans tous les cas par une augmentation très sensible du taux des anticorps détectés sur les NGLB.

NGL β
CORRELATION IFI/ELISA

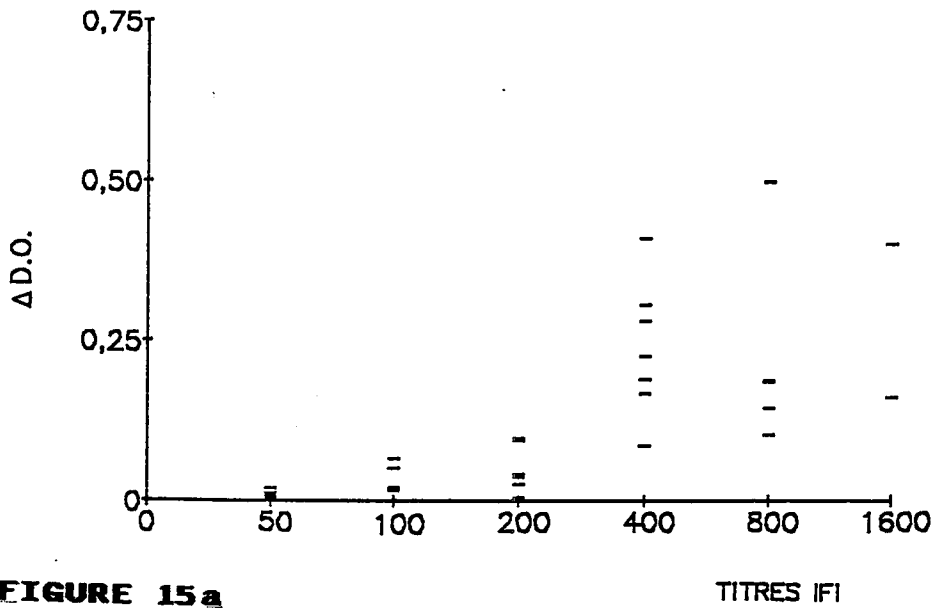


FIGURE 15a

Coefficient de corrélation : 0,60

NGL β
CORRELATION CO-ELECTROSYNERESE/ELISA

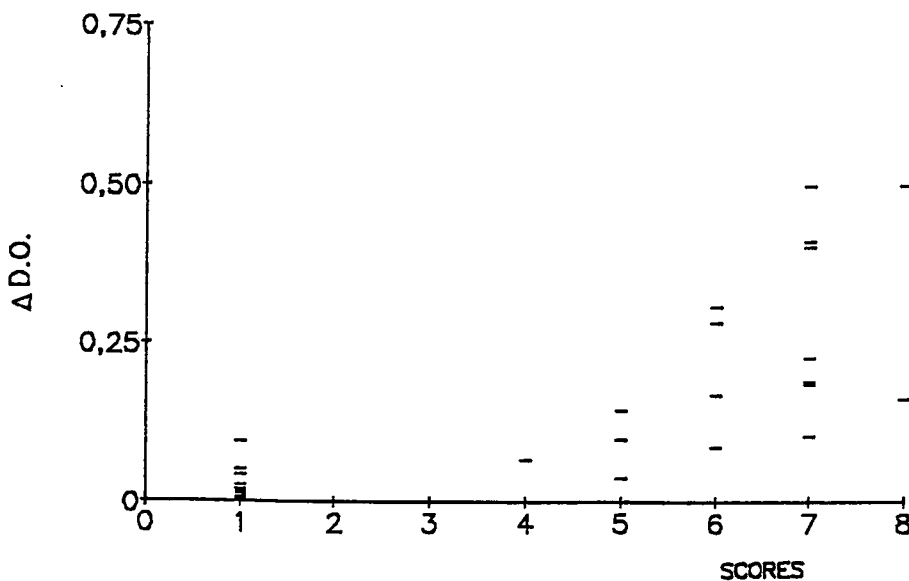


FIGURE 15b

Coefficient de corrélation : 0,75

FIGURES 15a et 15b. Représentation des valeurs (Δ D.O.) des 15 séroconversions testées sur les NGL β exprimés en fonction des titres en IFI (15a) ou des scores de co-électrosynérèse (15b). Les coefficients de corrélation sont exprimés sous chaque figure.

NGLB

ETUDE DE 15 SEROCONVERSIONS

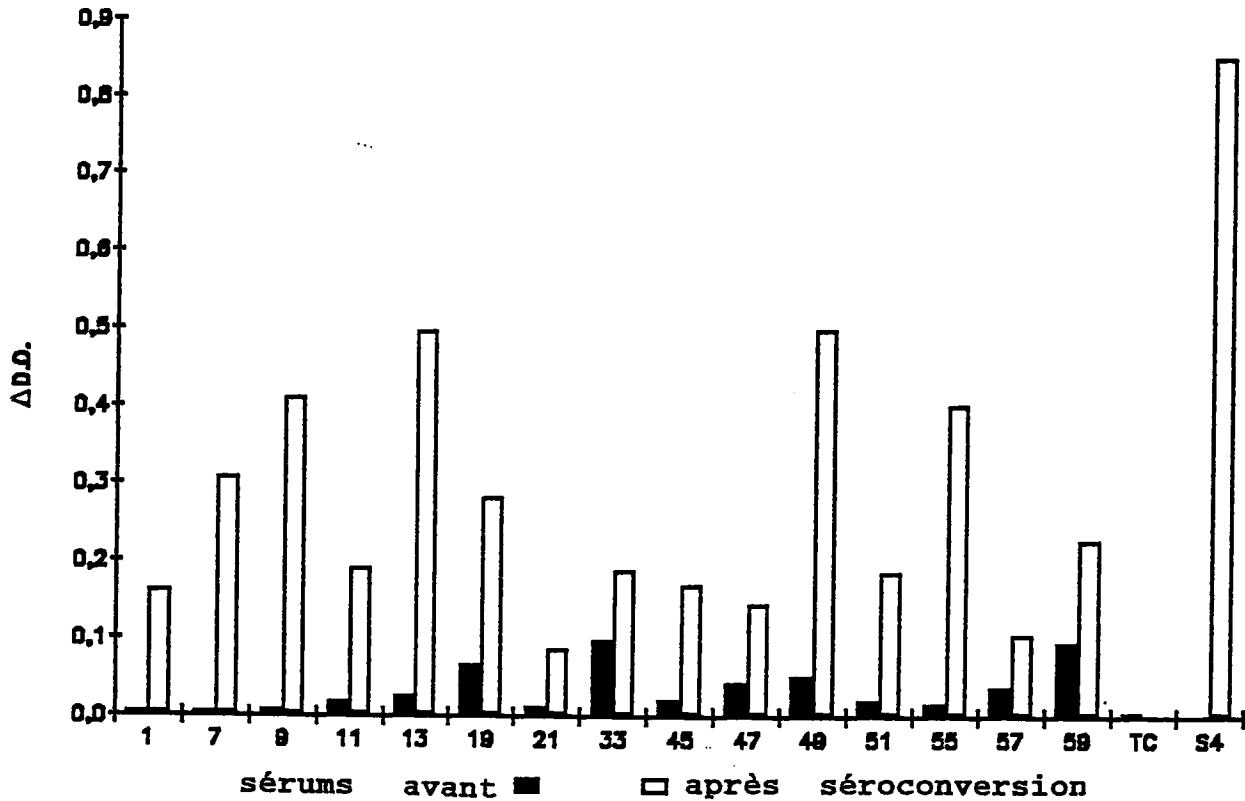


FIGURE 16. Histogramme représentant les $\Delta D.O.$ obtenues dans le test E.L.I.S.A. sur NGLB.

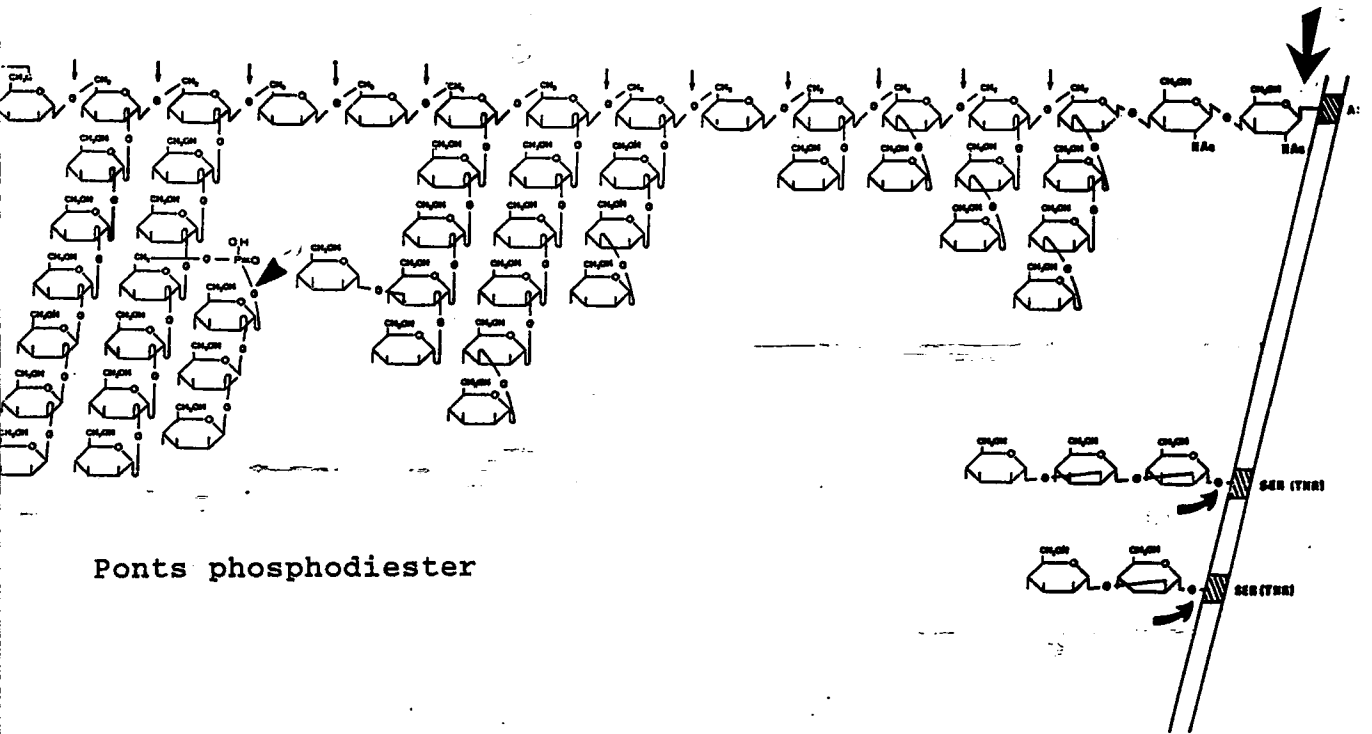
Le sérum S4 est le témoin positif .

TC est le témoin anticorps négatif (Conjugué seul).

* Analyse en ACP.

Cette analyse globale confirme les corrélations de l'E.L.I.S.A. NGLB avec l'IFI et la co-électrosynérèse mais démontre également une liaison étroite entre l'ELISA NGLB et l'ELISA PPM, chacun des points étant très proche de l'axe anticorps (Figure 13b).

Liaison N-glycosidique



Ponts phosphodiester

Liaison O-glycosidique

DISCUSSION

Les phosphopeptidomannanes sont les constituants majeurs de la paroi des levures. Les premières études structurales ont été réalisées sur Saccharomyces cerevisiae grâce à l'utilisation de méthodes chimiques classiques adaptées aux levures (55, 1). Une revue récente (45), réalisant la synthèse des résultats publiés sur C.albicans, propose un schéma d'organisation des PPM de la paroi (voir ci-contre). Deux types de liaisons relient les chaînes polysaccharidiques à la partie protéique. Les liaisons N-glycosidiques concernent de longues chaînes ramifiées, dont la chaîne interne est commune à tous les stades précoces de biosynthèse des glycoprotéines chez les cellules eucaryotes. Chez les Candida seuls des résidus mannose sont greffés sur cette structure de base. Le schéma classique fait référence à une chaîne linéaire formée de mannoses liés en (α 1-6), sur laquelle sont greffées des chaînes latérales dont la taille varie de 1 à 7 mannoses liés en (α 1-2) ou (α 1-3). Des ramifications présentes sur les chaînes latérales sont liées par des ponts phosphodiester et contiennent des liaisons (β 1-2). Les liaisons O-glycosidiques relient de plus courtes chaînes mannosidiques.

Dans ce travail la dépolymérisation séquentielle des phosphopeptidomannanes pariétaux de C.albicans a permis d'obtenir des molécules intermédiaires étudiées sur le plan structural et antigénique. Le choix des conditions chimiques nécessaires à la libération des familles oligosaccharidiques s'est porté sur des méthodes relativement douces afin d'altérer le moins possible les épitopes potentiels. L'hydrolyse acide ménagée (HCl 10 mM) a été

préférée à une méthode utilisant des concentrations d'HCl plus fortes (100 mM), susceptibles d'altérer la spécificité de la réaction (coupure des ponts phosphodiester) en affectant d'autres liaisons glycosidiques (1). Cette hydrolyse a libéré des composés formés de 1 à 8 molécules de mannose sur lesquels l'analyse en RMN a montré la présence de liaisons osidiques α et β . Ces résultats ne correspondent pas à ceux de Kobayashi (30) qui n'ont trouvé à la suite de cette hydrolyse que 4 à 7 oligomannosides différents sur les souches de C.albicans sérotype A et B, au sein desquels seules des liaisons β ont été identifiées. Nos résultats diffèrent également de ceux précédemment obtenus dans le laboratoire par Faille (12), qui à la suite d'une hydrolyse acide (HCl 100 mM.) avaient identifié 9 composés différents liés exclusivement par des liaisons β . La première discordance pourrait s'expliquer par la nature différente de la souche étudiée. La seconde par le fait qu'une hydrolyse par l'HCl plus concentré est susceptible de dégrader des liaisons α par l'extrémité réductrice de la chaîne oligo-mannosidique libérée par coupure des ponts phosphodiesters.

L'hydrolyse alcaline a été menée sans borohydrure de sodium, un agent réducteur couramment employé pour éviter le phénomène de "peeling". L'absence de réducteur a permis de coupler directement au lipide les oligomannosides, sans qu'il soit nécessaire de pratiquer une oxydation périodique. Cette méthode d'hydrolyse a permis d'isoler des composés pour lesquels la CCM a révélé la présence d'oligomannosides portant au moins 7 résidus mannose alors que les études effectuées sur Saccharomyces cerevisiae avaient mis en évidence la présence de courtes chaînes

O-glycosidiques de 1 à 4 mannoses (39). La structure du mannobiose et du mannotriose a été déterminée par RMN. Leurs paramètres sont en tout point identiques à ceux des di et trisaccharides $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}$ et $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}$ décrits par Cohen et Ballou (7) (Tableau B).

Plus récemment, des oligosaccharides β ont été isolés de la paroi de C.albicans pour en étudier le rôle immunomodulateur. Les oligosaccharides s'étendent du mono à l'hexasaccharide ; les mannobiose et mannotriose sont composés par un mélange hétérogène de différents oligomères. L'analyse en RMN (résultats non donnés dans l'article) suggère aux auteurs la présence de liaisons $(\alpha 1-2)$ sur les Man_2 et Man_3 , ce qui confirme nos résultats, et la présence probable de liaisons $(\alpha 1-3)$ et $(\beta 1-3)$ sur les oligosaccharides plus lourds (44).

Les phosphopeptidomannanes ont été décrits depuis plusieurs décades comme les antigènes majeurs des Candida. Plusieurs centaines de travaux concernent leur utilisation à des fins diagnostiques, soit pour la détection d'anticorps, soit en tant que substances fongiques circulantes. Cependant, à l'heure actuelle, aucun travail n'a porté sur la reconnaissance des épitopes du répertoire oligomannosidique de C.albicans ni même exploré une reconnaissance différentielle de chacune des familles oligomannosidiques par des sérums humains. L'objectif de ce travail préliminaire, était donc après une caractérisation chimique partielle de deux familles d'oligomannosides (H et β) d'explorer la réactivité des sérums de patients d'une part sur les molécules de PPM déplétées, d'autre part sur les oligomannosides β après couplage à un lipide selon une méthode

mise au point au laboratoire (62).

Les résultats de l'ELISA impliquant les trois types de PPM démontrent une excellente corrélation entre ce test et les techniques de routine du sérodiagnostic actuellement utilisées au laboratoire, IFI et Co-électrosynérèse. Les discordances avec l'IFI se situent principalement pour les titres de 200, seuil significatif et sont sans doute liées à l'expression des résultats sous forme de titres. Dans ce cas l'ELISA présente l'avantage de fournir des données continues (D.O.) résultant d'un accroissement de la sensibilité (6 séroconversions détectées plus précocément).

Les discordances avec la co-électrosynérèse sont plus importantes. En effet, la présence de systèmes précipitants à coalescence spécifique est parfois reliée à des D.O. inférieures au seuil significatif. Il faut cependant noter la nature différente des antigènes puisque la co-électrosynérèse utilise des antigènes pariétaux et cytoplasmiques (48).

L'analyse de l'ensemble des données fournies par les 110 sérums et des rapports de séroconversion montre que les antigènes apportant la meilleure discrimination entre les sujets sains et les sujets candidosiques sont les PPMH et les PPMB. Néanmoins, les PPMH présentent l'avantage d'être plus facile à obtenir que les PPMB ce qui accroît leur intérêt. Ceci impliquerait que les anticorps dirigés contre les oligosamannosides H, au sein desquels on trouve de manière préférentielle des liaisons β Man n'ont que peu de valeur diagnostique. Ces résultats concordent avec ceux d'un travail réalisé au laboratoire utilisant des néoglycolipides préparés à partir d'oligosaccharides H de C.

albicans (NGLH). (Faille et al. manuscrit en préparation).

L'analyse en composante principale a montré que la présence d'antigènes circulants dans les sérums de patients n'interférait avec aucun des signaux ELISA observés pour les trois antigènes. Ces résultats sont relativement paradoxaux, une fluctuation des taux d'anticorps anti-mannanes liée à la présence d'antigène mannane circulants ayant été observée à plusieurs reprises dans les sérums de sujets candidosiques (48, 53). Il faut cependant remarquer que le Cand-tec^o ne détecte pas les mannanes (19) et qu'il est plus volontiers positif en présence d'anticorps qu'un autre test commercial détectant les mannanes (23).

Les résultats de l'ELISA impliquant les NGLB montrent que ces structures sont antigéniques confirmant les travaux antérieurs du laboratoire sur les NGLH et les néoglycolipides construits à partir d'oligomannosides libérés par acétolyse. Les résultats sont en effet corrélés avec l'IFI et la co-électrosynérèse et le signal augmente nettement au cours d'une séroconversion. L'antigénicité de ces constructions apparait cependant paradoxale puisque la réactivité des sérums ne varie pas de façon significative entre les PPMH et les PPM β . Néanmoins des liaisons (α 1-2), caractérisant les mannobiose et mannotriose des oligomannosides β , sont nombreuses sur la chaîne latérale principale des PPMH et PPM β . Ceci pourrait expliquer pourquoi la déplétion des oligomannosides β n'affecte en rien la réactivité des sérums. De plus ceci est confirmé par l'antigénicité des NGLA observée au sein du laboratoire (Faille, manuscrit en préparation).

Conclusion

La confrontation des différents sérums humains sélectionnés aux antigènes provenant de la dépolymérisation séquentielle des PPM a permis de mettre au point une technique ELISA et d'identifier un antigène discriminant sur le plan diagnostique: les PPMH. Cette technique, apparait comme un complément à la co-électrosynérèse et devrait être utilisée en routine en remplacement de l'IFI au regard de laquelle elle présente de nombreux avantages.

La partie de notre travail portant sur les oligomannosides isolés a permis de progresser dans la connaissance de la structure des PPM pariétaux de C. albicans et de confirmer l'intérêt de la construction de néoglycolipides pour l'étude de leur antigénicité.

La poursuite de ces travaux impliquant des oligomannosides purifiés et la détermination des isotypes d'immunoglobulines devrait permettre, chez des patients sélectionnés, d'apporter des informations sur l'aspect diagnostique et pronostique de la réponse humorale qui les concerne.

1. BALLOU C.E.,
Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope.
Adv. Microb. Physiol., 1976, 14, 93-158.
2. BRAWNER D., CUTLER J.,
Variability in expression of cell surface antigens of Candida albicans during morphogenesis.
Infect. Immun. 1986, 51, 337-343.
3. BRAWNER D., CUTLER J.,
Oral Candida albicans isolates from non-hospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome.
J. Clin. Invest., 1989, 27, 1335-1341.
4. CAPRON A., VERNES A., FRUIT J., DOUVRY F.,
Le diagnostic immunologique des candidoses. Evaluation de deux techniques : immunoélectrophorèse et immunofluorescence . A propos de 187 observations.
Sci. Med., 1973, 4, 463-471.
5. CHARDES T., PIECHACZYK M., CAVAILLES V., SAHLI S.L., PAU B., BASTIDE J.M.,
Production and partial characterisation of anti-Candida monoclonal antibodies.
Annal. Inst. Pasteur/Immunol., 1986, 137, 117-125.
6. COBB S.J., PARRALT D.,
Determination of antibody levels to Candida albicans in healthy and hospitalized adults using a radioimmunoassay.
J. Clin. Pathol., 1978, 31, 1161-1166.
7. COHEN R.E., BALLOU C.E.,
Linkage and sequence analysis of mannose-rich glycoprotein core oligosaccharides by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy.
Biochemistry, 1980, 19, 4345-4358.
8. DOMER J., GARNER R.E., BEFIDI-MENGUE R.N.,
Mannan as an antigen in cell-mediated immunity (CMI) assays and as a modulator of mannan specific CMI.
Infect. Immun., 1989? 57 (3), 693- 700.
9. DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F.,
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Anal. Biochem., 1956, 28, 350-356.
10. DUPONT B.,
Candidoses et mycoses systémiques au cours du syndrome de l'immunodéficience acquise.
Bull. Soc. Fr. Mycol. Med., 1988, XVII, 51-62.

11. DURANDY C., FISCHER A., CHARRON D., GRISCELLI C.,
Specific binding of antigen onto human T lymphocytes.
J. Clin. Invest., 1986, 77, 1557-1564.
12. FAILLE C., et al.,
Immunoreactivity of néoglycolipids constructed from
oligomannosidic residues of the Candida albicans oligomannosides.
Infect. Immun. sous presse.
13. FEUILLADE de CHAUVIN M.,
Mycoses et greffes d'organes.
Bull. Soc. Fr. Mycol. Med., 1988, XVII, 33-50.
14. FISCHER J.F., TRINCHER R.C., AGEL J.F. BUXTON T., WALKER
C.A., JOHNSON D.H., CHEW W.H., RISSING J.P.,
Disseminated candidiasis: A comparison of two immunologic
techniques in the diagnosis.
Am. J. Med. Sc., 1985, 290 (4), 135-142.
15. FOURNET B., STRECKER G., LEROY Y., MONTREUIL J.,
Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methyled and
acetyled methyl glycosides. Applicatiuon to the structural
analysis of glycoprotein glycans.
Anal. Biochem., 1981, 116, 489-502.
16. FRUIT J., CAILLIEZ J.C., ODDS F.C., POULAIN D.,
Expression of an epitope by surface glycoproteins of Candida
albicans. Variability among species, strains and yeast cells of
the genus Candida.
J. Med. Vet. Mycol., 1990, 28, 241-252.
17. FUKAZAWA Y., NISHIKAWA A., SUZUKI M., SHINODA T.,
Immunochemical basis of the serologic specificity of the yeast:
Immunochemical determinants of several antigenic factor of
yeasts.
In " Medical mycology" , Preusser H.J. (ed.), Stuttgart, 1980,
127-136.
18. GARCIA de LOMAS J., MORALES C., GRAU M.A., MIR A.,
Détection of Candida species mannan antigen by indirect ELISA
inhibition.
Mycopathologia, 1988, 102, 175-178.
19. GENTRY L.O., WILKINSON I.D., LEA A.S., PRICE M.F.,
Latex agglutination test for detection of Candida antigen in
patients with disseminated disease.
Eur. J. Clin. Microbiol., 1983, 2, 122-128.
20. GEORGES E., POIROT J.L., GARRIGUES M.L., et al.,
Septicémie à Candida (Torulopsis) glabrata : détection du
mannane sérique par un test au latex.
Bull. Soc. Fr. mycol. Med., 1990, sous presse.
21. GREENFIELD R.A., BIUSSEY M.J., STEPHENS J.L., JONES J.M.,
Serial enzyme-linked immunosorbent assay for antibody to Candida
antigens during induction of chemotherapy for acute leukemia.
J. Inf. Dis., 1983, 148, 275-283.

22. HASENCLEVER H.F., MITCHELL W.O.,
Antigenic studies of Candida. Observation of two antigenic groups in Candida albicans.
J. Bacteriol., 1961, 82, 570-573.
23. HERENT P., et al.
Evaluation rétrospective de l'intérêt diagnostique de deux méthodes de détection antigénique par agglutination de particules de latex au cours des candidoses systémiques.
(Manuscrit en préparation)
24. HOPWOOD V. POULAIN D., FORTIER B., EVANS G., VERNES A.,
A monoclonal antibody to a cell wall component of Candida albicans.
Infect. Immun., 1986, 54, 222-227.
25. JONES J.M.,
Kinetics of antibody responses to cell wall mannan and a major cytoplasmic antigen of Candida albicans in rabbits and humans.
J. Lab. Clin. Med., 1980 (a), 96, 845-860.
26. JONES J.M.,
Quantitation of antibody against cell wall mannan and a major cytoplasmic antigen of Candida in rabbits, mice and humans.
Infect. Immun., 1980, 30, 78-89.
27. JONES J.H.,
Laboratory diagnosis of invasive candidiasis.
Clin. Microbiol. Rev., 1990, 3(1), 32-45.
28. KLEIN R.S., HARRIS C.A., SMALL C.B., MOLL B., LESSER M., FRIEDLAND G.H.,
Oral candidiasis in high risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome.
N. Engl. J. Med., 1984, 311, 354-358.
29. KOBAYASHI H., SHIBATA N., MITOBE H., OKUBO Y., SUZUKI S.,
Structural study of phosphopeptidomannan of yeast-form cells of Candida albicans J-1012 strain, with special reference to application of mild acetolysis.
Arch. Biochem. Biophys., 1989, 272, 364-375.
30. KOBAYASHI H., SHIBATA N., NAKADA M., CHAKI S., MIZUGANI K., OKUBO Y., SUZUKI S.,
Structural analysis of cell wall phosphomannan of Candida albicans NIH B-792 (Serotype B) strain, with special reference to ¹H and ¹³C NMR analysis of acid-labile oligomannosyl residues.
Arch. Biochem. Biophys., 1990, 278, 195-204.
31. KOGAN G., PAVLIAK V. MASCIER L.,
Structural studies of mannans from the cell wall of pathogenic yeast Candida albicans serotypes A and B and Candida parapsilosis.
Carbohydr. Res., 1988, 172, 243-253.

32. KOCOUREK J., BALLOU C.E.,
Method for fingerprinting yeast cell wall mannans.
J. Bacteriol., 100 (3), 1175-1181.
33. LAJEAN-CHAFFIN W., SKUDLAREK J., MORROW J.,
Variable expression of a surface determinant during
proliferation of Candida albicans.
Infect. Immun., 1988, 56, 302-309.
34. MACKENZIE D.W.R.,
Le diagnostic biologique des candidoses.
Ann. Biol. Clin., 1987, 45, 573-578.
35. MATTHEWS R.C., BURNIE J.P.,
Diagnostic of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot
immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-
kilodalton antigen.
J. Clin. Microbiol., 1988, 26, 459-463.
36. MATTHEWS R., BURNIE J., SMITH D., CLARK I., MIDGLEY J.,
CONOLLY M., GAZZARD B.,
Candida in AIDS: evidence for protective antibody.
Lancet, 1990, 8605, 263-266.
37. MEUNIER F.,
Prevention of opportunistic mycoses in immunocompromised
patients.
Rev. Inf. Dis., 1987, 9, 408-416.
38. MIYAKAWA Y., KAGAYA K., FUKAZAWA Y., SOE G.,
Production and characterisation of agglutinating monoclonal
antibodies against antigenic factors for Candida albicans
J. Clin. Microb., 1986, 23, 881-886.
39. NAKAJIMA T., BALLOU C.E.
Characterisation of the carbohydrate fragments obtained from
Saccharomyces cerevisiae mannan by alkaline degradation.
J. Biol. Chem., 1974, 249, 7679-7684.
40. ODDS F.C.,
Isolation, identification and other laboratory aspects of
Candida.
In "Candida and candidiasis", Bailliere Tindal (ed.), London
1988, 60-67.
41. ODDS F.C., HIERHOLZER J.,
Purification and properties of a glycoprotein acid phosphatase
from Candida albicans.
J. Bacteriol., 1973, 114, 257-263.
42. OHKUBO Y., ICHIKAYA T., SUZUKI S.,
Relationship between phosphate content and immunochemical
properties of subfractions of bakers' yeast mannan.
J. Bacteriol., 1978, 136, 63-68.

43. PAZ PARENTE J., CARDON P., MONTREUIL J., FOURNET B.,
A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in
small amounts by using lithium methyl sulfinyl carbanion.
Carbohydr. Res., 1985, 141, 41-47.
44. PODZORSKI R.P., GRAY G.R., NELSON R.D.,
Differents effects of native Candida albicans mannan and
mannan-derived oligosaccharides on antigen-stimulated
lymphoproliferation in vitro.
J.Immunol., 1990, 144, 707-716.
45. POULAIN D., FAILLE C., MICHALSKI J.C., CAMUS D.,
Anticorps monoclonaux anti-Candida albicans : de la biologie
cellulaire aux marqueurs du comportement pathogène.
Med. Sci., 1990, 6, 526-533.
46. POULAIN D., AYADI A., FRUIT J.,
Détection d'un antigène témoin d'infection systémique à Candida
à l'aide d'un anticorps couplé à l'or colloïdal.
Ann. Biol. Clin., 1987, 45, 565-572.
47. POULAIN D., HOPWOOD V., VERNES A.,
Antigenic variability of Candida albicans .
Crit. Rev. Microbiol. , 1985, 12, 223-270.
48. POULAIN D., PINON J.M.,
Diagnosis of systemic candidiasis : development of Co-
counterimmunoelectrophoresis.
Eur. J. Clin. Invest., 1986, 5 (4), 420-426.
49. POULAIN D., AYADI A., DUTOIT E., ARBON G.,
Le diagnostic biologique des candidoses post-opératoires.
Sem. Hop. Paris, 1989, 13, 795-800.
50. REISS E., STONE E.H., HASENCLEVER H.F.,
Serological and cellular immune activity of peptidoglucomannan
fractions of Candida albicans cell walls.
Infect. Immun., 1974, 9, 881-890.
51. REISS E., de REPENTIGNY L., KUIKENDALL R.J., CARTER A.W.,
GALINDO R., AUGER P., BRAGG S.L., KAUFMAN L.,
Monoclonal antibodies against Candida tropicalis mannan:
antigen detection by enzyme immunoassay and immunofluorescence.
J. Clin. Microbiol. 1986, 24, 796-802.
52. de REPENTIGNY L., MARR L., KELLER J.W., CARTER A.W.,
KUYKENDALL R.J., KAUFMAN L., REISS E.,
Comparison of enzyme immunoassay and gaz fluid chromatography
for the rapid diagnosis of invasive candidiasis in cancer
patients.
J. Clin. Microbiol., 1985, 21, 972-979.
53. de REPENTIGNY L., BOUSHIRA M.,
Diagnostic rapide des candidoses opportunistes par la détection
d'antigènes circulants.
Med. Sci., 1987, 3 (2), 100-105.

54. SCHWARZ D.,
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.
Flammarion médecine sciences (ed.), Paris 1989, pp. 306.
55. SENTENDREU R., NORTHCOTE D.H.,
The structure of a glycolipid isolated from the yeast cell wall.
Biochem. J., 1968, 109, 419-432.
56. SHIBATA N., KOBAYASHI H., TOJO M., SUZUKI S.,
Characterisation of phosphopeptidomannan-protein complexes isolated from viable cells of yeast and mycelial forms of Candida albicans NIH B-792 strain by the action of zymolase 100-T.
Arch. Biochem. Biophys., 1986, 251, 697-708.
57. SMITH C.B.,
Candidiasis: Pathogenesis, host resistance and predisposing factors.
In "Candidiasis", Bodey & Fainstein, Raven press (ed.), New York 1985, 53-70.
58. STLUTSKY B., BUFFO J., SOLL D.,
High frequency switching of colony morphology in Candida albicans.
Science, 1985, 230, 666-669.
59. STROCKBINE N.A., LARGEN M.T., ZWEIBEL S.M., BUCKLEY H.,
Identification and molecular weight characterisation of antigens from C.albicans that are recognized by human sera.
Infect. Immun., 1984, 43, 715-721.
60. SUMMERS D.F., GROLLMAN A.P., HASENCLEVER H.F.,
Polysaccharide antigens of the Candida cell wall.
J. Immunol. 1964, 92, 491-499.
61. SUZUKI M., FUKAZAWA Y.,
Immunochemical characterization of Candida albicans cell wall antigens : specific determinant of Candida albicans serotype A mannan.
Microbiol. Immunol., 1982, 26, 387-409.
62. TANG P.W., GOOI H.C., HARDY M., LEE Y.C., FEIZI T.,
Novel approach to the study of the antigenicities and receptor function of carbohydrate chains of glycoprotein.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, 132 (2), 474-480.
63. TOJO M., SHIBATA N., KOBAYASHI M., MIKAMI T., SUZUKI S.,
Preparation of monoclonal antibodies reactive with β 1-2 linked oligomannosyl residues in the phosphopeptidomannan-protein complex of Candida albicans NIH B-792 strain.
Clin. Chem. 1988, 34, 539-543.
64. TSUCHIYA T., FUKASAWA Y., TAGUCHI M., KASE T., SHINODA T.,
Serologic aspects on yeast classification.
Mycopath. Mycol. Applicata, 1974, 53, 77-85.

65. VAN REGENMORTEL M.H.V.,
Polyclonal versus monoclonal antibodies.
In " Advanced courses in biotechnology", Stern & Gamble (ed.),
Totowa (1988), 43-77.